

DIN EN 17299

ICS 65.120

Einsprüche bis 2018-09-27

Entwurf

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung zugelassener Kokzidiostatika in Konzentrationen von
Zusatzstoffen und deren Verschleppungen im Bereich von 1 % bis 3 % in
Mischfuttermitteln mittels Hochleistungs-LC-MS;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17299:2018**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Screening and determination of authorized coccidiostats at additive and 1 % and 3 %
cross-contamination level, and of non-registered coccidiostats and of one antibiotic at
sub-additive levels, in compound feed with High Performance Liquid Chromatography –
Tandem Mass Spectrometry detection (LC-MS/MS);
German and English version prEN 17299:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-07-27 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 von 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 105 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17299:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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

Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Bestimmung zugelassener Kokzidiostatika in Konzentrationen von Zusatzstoffen und deren Verschleppungen im Bereich von 1 % bis 3 % in Mischfuttermitteln mittels Hochleistungs-LC-MS

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis — Screening and determination of authorized coccidiostats at additive and 1 % and 3 % cross-contamination level, and of non-registered coccidiostats and of one antibiotic at sub-additive levels, in compound feed with High Performance Liquid Chromatography — Tandem Mass Spectrometry detection (LC-MS/MS)

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Kurzbeschreibung	4
5 Reagenzien und Materialien	5
6 Geräte	22
7 Probenahme	23
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	23
8.1 Allgemeines	23
8.2 Laborprobe	23
8.3 Untersuchungsprobe	23
8.4 Prüfmenge	23
9 Verfahren	23
9.1 Positiv- und Negativkontrollproben	23
9.1.1 Allgemeines	23
9.1.2 Positivkontrollprobe (PCS)	24
9.1.3 Negativkontrollprobe (NCS)	24
9.2 Probenvorbereitung	24
9.2.1 Extraktion	24
9.2.2 Filtration	24
9.2.3 Verdünnung	24
9.3 Quantifizierung durch Standardaddition	25
9.4 HPLC-Analyse	25
9.4.1 Analysebedingungen	25
9.4.2 HPLC-Bestimmung	27
9.4.3 Kriterien für die Annahme des Analyseergebnisses	28
10 Berechnung	29
11 Prüfbericht	30
Anhang A (informativ) Ergänzende Geräteinformationen	31
A.1 Allgemeines	31
A.2 Ergebnisse des Ringversuchs	32
A.2.1 Verfahren	32
A.2.2 Materialien	32
A.2.3 Statistische Analyse der Ergebnisse	33
A.2.4 Ergebnisse	34
A.2.5 Interpretation und Schlussfolgerungen	49
A.2.6 Genauigkeit und Richtigkeit	50
A.2.7 Zusätzliche Bemerkungen	50
Literaturhinweise	52

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17299:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

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

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren fest zum gleichzeitigen Screening und/oder zur Bestimmung des Gehalts der elf zugelassenen Kokzidiostatika (Halofuginon, Robenidinhydrochlorid, Nicarbazin, Diclazuril, Decoquinat, Monensin-Natrium, Salinomycin-Natrium, Narasin, Lasalocid-Natrium, Semduramicin-Natrium und Maduramicin-Ammonium-Alpha) durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) in Geflügel-, Rinder- und Schweinefutter in Konzentrationen von Zusatzstoffen und deren Verschleppungen und von fünf nicht registrierten Kokzidiostatika (Ethopabat, Clopidol, Ronidazol, Dimetridazol und Amprolium) in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen und zum Screening auf das verbotene Antibiotikum Furazolidon in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen, in den gleichen Matrices.

Der Anwendungsbereich des Verfahrens ist geeignet für das Screening auf und die Bestimmung von allen elf Kokzidiostatika bei den in der europäischen Gesetzgebung festgelegten Werten, für die nicht registrierten Kokzidiostatika und für das Screening auf das verbotene Antibiotikum.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1 Interner Standard IS

Verbindung mit bekannter Konzentration, die einer Probe zugesetzt wird, um die qualitative Identifizierung und/oder quantitative Bestimmung der Probenbestandteile zu erleichtern

[QUELLE: ISO 20752:2014, 3.2]

4 Kurzbeschreibung

Alle 11 zugelassenen Kokzidiostatika, nicht registrierten Kokzidiostatika und das verbotene Antibiotikum werden mittels Fest-Flüssig-Extraktion extrahiert. Die Extrakte werden zentrifugiert und die Überstände werden filtriert. Nach einer ersten Screening-Analyse werden die Analyten durch Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung einer Elektrospray-Ionisation mit einem weiteren Tandem-Massenspektrometrie-Nachweis bestimmt. Die Quantifizierung der nachgewiesenen Zielanalyten wird unter Verwendung eines mehrstufigen Standard-Additionsverfahrens durchgeführt.

5 Reagenzien und Materialien

WARNUNG —Einatmen und Kontakt mit den toxischen Standardmaterialien und deren Lösungen sind zu vermeiden. Bei der Handhabung der Lösemittel und Lösungen ist unter einem Dunstabzug zu arbeiten.

Sofern nicht anders angegeben, sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit zu verwenden.

5.1 Wasser, HPLC grade oder gleichwertig (z. B. milli-Q-gereinigtes Wasser)

5.2 Acetonitril, HPLC Gradient grade oder Hypergrade LC-MS, Reinheit von mindestens 99,9 %

5.3 Methanol, HPLC grade oder Hypergrade LC-MS

5.4 Ameisensäure, HPLC grade oder Hypergrade LC-MS, Reinheit von mindestens 98 %

5.5 Ethanol, absolut, Reinheit von mindestens 99,9 %

5.6 N, N-Dimethylformamid, Reinheit von mindestens 99 %

5.7 Dimethylsulfoxid, Reinheit von mindestens 99,5 %

5.8 Calciumchlorid, wasserfrei, Reinheit von mindestens 93 %

5.9 Acetonitril-Lösung in Wasser 1 : 1, (Volumenteile)

50 ml Acetonitril (5.2) werden in einen 100-ml-Messkolben gegeben und 50 ml Wasser (5.1) hinzugefügt. Die Lösung ist alle drei Monate frisch herzustellen.

5.10 1%ige Calciumchloridlösung in Methanol

Es werden 1,0 g des wasserfreien Calciumchlorids (5.8) auf 0,1 g genau in einen 100-ml-Messkolben (6.96.9) eingewogen. Das genaue Gewicht des wasserfreien Calciumchlorids (5.8) wird notiert. Die Substanz wird in Methanol (5.3) gelöst und das Volumen mit Methanol (5.3) auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei 4 °C in Glasgeräten aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

5.11 Lösemittelmischung zur Futtermittlextraktion Acetonitril/Methanol/Wasser 80 : 10 : 10, Volumenteile

800 ml Acetonitril (5.2) werden in einen 1 000-ml-Messkolben (6.96.9) gegeben und 100 ml Methanol (5.3) und 100 ml Wasser (5.1) hinzugefügt. Alles wird gründlich gemischt. Die Lösung wird vor der Extraktion frisch zubereitet und bei Raumtemperatur belassen.

5.12 Mobile Phase für HPLC

5.12.1 Wasser, mit 0,5 % Volumenanteil Ameisensäure – Phase A

5 ml Ameisensäure (5.4) werden in einen 1 000-ml-Messkolben (6.9) gegeben und das Volumen mit Wasser (5.1.) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösungen werden jeden Monat frisch hergestellt.

5.12.2 Methanol, mit 0,5 % Volumenanteil Ameisensäure – Phase B

Es werden 5 ml Ameisensäure (5.4) in einen 1 000-ml-Messkolben (6.96.9) gegeben und das Volumen wird mit Methanol (5.3) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösungen werden jeden Monat frisch hergestellt.

5.13 Referenzstandards

Reinheit, die für jedes Los von Referenz- und Internen Standards benötigt wird:

5.13.1 Halofuginon-Hydrobromid, CAS-Nr.: 17395-31-2, Reinheit von mindestens 99 %

5.13.2 Robenidin-Hydrochlorid, CAS-Nr.: 25875-50-7, Reinheit von mindestens 97 %

5.13.3 Nicarbazin, CAS-Nr.: 330-95-0, Reinheit von mindestens 97 %

5.13.4 Diclazuril, CAS-Nr.: 101831-37-2, Reinheit von mindestens 98 %

5.13.5 Decoquinat, CAS-Nr.: 18507-89-6, Reinheit von mindestens 98 %

5.13.6 Semduramicin-Natrium, CAS-Nr.: 113378-31-7, Reinheit von mindestens 93 %, angegeben als Semduramicin

5.13.7 Monensin-Natrium, CAS-Nr.: 22373-78-0, Reinheit von mindestens 86 %, angegeben als Monensin-A-Natrium

5.13.8 Maduramicin-Ammonium, CAS-Nr.: 84878-61-5, Reinheit von mindestens 97 % angegeben als Maduramicin-Ammonium-Alpha

5.13.9 Salinomycin-Natrium, CAS-Nr.: 55721-31-8, Reinheit von mindestens 93 %

5.13.10 Lasalocid-Natrium, CAS-Nr.: 25999-20-6, Reinheit von mindestens 95 %, angegeben als Lasalocid-A-Natrium

5.13.11 Narasin, CAS-Nr.: 55134-13-9, Reinheit von mindestens 97 %, angegeben als Narasin A

5.13.12 Ethopabat, CAS-Nr.: 59-06-3, Reinheit von mindestens 99 %

5.13.13 Clopidol, CAS-Nr.: 2971-90-6, Reinheit von mindestens 99 %

5.13.14 Amproliumhydrochlorid, CAS-Nr.: 137-88-2, Reinheit von mindestens 99 %

5.13.15 Furazolidon, CAS-Nr.: 67-45-8, Reinheit von mindestens 99 %

5.13.16 Ronidazol, CAS-Nr.: 7681-76-7, Reinheit von mindestens 99 %

5.13.17 Dimetridazol, CAS-Nr.: 551-92-8, Reinheit von mindestens 99 %

5.13.18 Robenidin-D₈, Hydrochlorid, CAS-Nr.: 1173097-77-2, Reinheit von mindestens 98 %, zur Verwendung als Interner Standard (IS) für Robenidin (5.13.2)

5.13.19 Dinitrocarbanilid-D₈, CAS-Nr.: 1156508-87-0, Reinheit von mindestens 99 %, zur Verwendung als Interner Standard (IS) für Dinitrocarbanilid (Marker für Nicarbazin (5.13.3))

5.13.20 Bis-Diclazuril, CAS-Nr.: 103337-71-9, Reinheit von mindestens 97 %, zur Verwendung als Interner Standard (IS) für Diclazuril (5.13.4)

5.13.21 Decoquinat-D₅, CAS-Nr.: 1228182-55-5, Reinheit von mindestens 98 %, zur Verwendung als Interner Standard (IS) für Decoquinat (5.13.5)

5.13.22 Nigericin-Natrium, CAS-Nr.: 28643-80-3, Reinheit von mindestens 98 %, zur Verwendung als Interner Standard (IS) für ionophore Kokzidiostatika (5.13.6; 5.13.7; 5.13.8; 5.13.9; 5.13.10; 5.13.11)

5.13.23 Dimetridazol-D₃, CAS-Nr.: 64678-69-9, Reinheit von mindestens 99 %, zur Verwendung als Interner Standard (IS) für Dimetridazol (5.13.17)

5.13.24 Ethopabat-D₅, CAS-Nr.: 59-06-03 -, Reinheit von mindestens 99 %, zur Verwendung als Interner Standard (IS) für Ethopabat (5.13.12)

5.13.25 Furazolidon-D₄, CAS-Nr.: 1217222-76-8, Reinheit von mindestens 99 %, zur Verwendung als Interner Standard (IS) für Furazolidon (5.13.15)

5.13.26 Ronidazol-D₃, CAS-Nr.: 1015855-87-4, Reinheit von mindestens 99 %, zur Verwendung als Interner Standard (IS) für Ronidazol (5.13.16) und Clopidol (5.13.13)

5.14 Standardlösungen

5.14.1 Standard-Stammlösungen, ca. 1 mg/ml

5.14.1.1 Allgemeines

ANMERKUNG Das Molmassenverhältnis wird nur bei der Berechnung der Konzentration des Halofuginons eingeführt, da diese Korrektur in allen anderen Fällen vernachlässigbar ist.

5.14.1.2 Halofuginon

Es werden 10 mg des Halofuginon-Hydrobromid-Standards (5.13.1) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Halofuginon Hydrobromid wird notiert. Die Substanz wird in Acetonitril-Lösung in Wasser (5.9) gelöst und das Volumen mit der Acetonitril-Lösung in Wasser (5.9) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Halofuginon-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (1) ermittelt.

$$C_{\text{HAL}} = \frac{m}{10} \times P \times \frac{M_{\text{HAL}}}{M_{\text{HALHBr}}} \quad (1)$$

Dabei ist

C_{HAL} die Konzentration von Halofuginon in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Halofuginon-Hydrobromid-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,99.

m die gewogene Masse des Halofuginon-Hydrobromid-Standards (5.13.1), in mg;

M_{HAL} die Molmasse von Halofuginon, in g/mol;

M_{HALHBr} die Molmasse von Halofuginon-Hydrobromid, in g/mol.

5.14.1.3 Robenidin

Es werden 10 mg des Robenidin-Hydrochlorid-Standards (5.13.2) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Robenidin-Hydrochlorid wird notiert. Die Substanz wird in Ethanol (5.5) gelöst und das Volumen mit Ethanol (5.5) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Robenidin-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (2) ermittelt.

$$C_{\text{ROB}} = \frac{m}{10} \times P \quad (2)$$

Dabei ist

C_{ROB} die Konzentration von Robenidin in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Robenidin-Hydrochlorid-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,97.

m die gewogene Masse des Robenidin-Hydrochlorid-Standards (5.13.2), in mg.

5.14.1.4 Nicarbazin

Es werden 10 mg des Nicarbazin-Standards (5.13.3) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Nicarbazin wird notiert. Die Substanz wird in Dimethylsulfoxid (5.7) gelöst und das Volumen mit Dimethylsulfoxid (5.7) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Nicarbazin-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (3) ermittelt.

$$C_{\text{NIC}} = \frac{m}{10} \times P \quad (3)$$

Dabei ist

C_{NIC} die Konzentration von Nicarbazin in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Nicarbazin-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,97.

m die gewogene Masse des Nicarbazin-Standards (5.13.3), in mg.

5.14.1.5 Diclazuril

Es werden 10 mg des Diclazuril-Standards (5.13.4) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Diclazuril wird notiert. Die Substanz wird in N,N-Dimethylformamid (5.6) gelöst und das Volumen mit N,N-Dimethylformamid (5.6) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Diclazuril-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (4) ermittelt.

$$C_{\text{DICL}} = \frac{m}{10} \times P \quad (4)$$

Dabei ist

C_{DICL} die Konzentration von Diclazuril in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Diclazuril-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,98.

m die gewogene Masse des Diclazuril-Standards (5.13.4), in mg.

5.14.1.6 Semduramicin

Es werden 10 mg des Semduramicin-Natrium-Standards (5.13.6) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Semduramicin-Natrium wird notiert. Die Substanz wird in 3 ml Methanol (5.3) gelöst und das Volumen mit Acetonitril (5.2) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei -20°C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Semduramicin-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (5) ermittelt.

$$C_{\text{SEM}} = \frac{m}{10} \times P \quad (5)$$

Dabei ist

C_{SEM} die Konzentration von Semduramicin in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Semduramicin-Natrium-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,93.

m die gewogene Masse des Semduramicin-Natrium-Standards (5.13.6), in mg.

5.14.1.7 Monensin

Es werden 10 mg des Monensin-Natrium-Standards (5.13.7) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Monensin-Natrium wird notiert. Die Substanz wird in 3 ml Methanol (5.3) gelöst und das Volumen mit Acetonitril (5.2) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung ist bei -20°C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufzubewahren. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Monensin-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (6) ermittelt.

$$C_{\text{MON}} = \frac{m}{10} \times P \quad (6)$$

Dabei ist

C_{MON} die Konzentration von Monensin in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Monensin-Natrium-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,86.

m die gewogene Masse des Monensin-Natrium-Standards (5.13.7), in mg.

5.14.1.8 Maduramicin

Es werden 10 mg des Maduramicin-Ammonium-Standards (5.13.8) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Maduramicin-Ammonium wird notiert. Die Substanz wird in 3 ml Methanol (5.3) gelöst und das Volumen mit Acetonitril (5.2) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei -20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Maduramicin-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (7) ermittelt.

$$C_{\text{MAD}} = \frac{m}{10} \times P \quad (7)$$

Dabei ist

C_{MAD} die Konzentration von Maduramicin in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Maduramicin-Ammonium-Alpha-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,97.

m die gewogene Masse des Maduramicin-Ammonium-Alpha-Standards (5.13.8), in mg.

5.14.1.9 Salinomycin

Es werden 10 mg des Salinomycin-Natrium-Standards (5.13.9) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Salinomycin-Natrium wird notiert. Die Substanz wird in 3 ml Methanol (5.3) gelöst und das Volumen mit Acetonitril (5.2) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei -20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Salinomycin-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (8) ermittelt.

$$C_{\text{SAL}} = \frac{m}{10} \times P \quad (8)$$

Dabei ist

C_{SAL} die Konzentration von Salinomycin in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Salinomycin-Natrium-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,93.

m die gewogene Masse des Salinomycin-Natrium-Standards (5.13.9), in mg.

5.14.1.10 Lasalocid

Es werden 10 mg des Lasalocid-Natrium-Standards (5.13.10) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Lasalocid-Natrium wird notiert. Die Substanz wird in 3 ml Methanol (5.3) gelöst und das Volumen mit Acetonitril (5.2) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Lasalocid-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (9) ermittelt.

$$C_{\text{LAS}} = \frac{m}{10} \times P \quad (9)$$

Dabei ist

C_{LAS} die Konzentration von Lasalocid in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Lasalocid-Natrium-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,95.

m die gewogene Masse des Lasalocid-Natrium-Standards (5.13.10), in mg.

5.14.1.11 Narasin

Es werden 10 mg des Narasin-Standards (5.13.11) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Narasin wird notiert. Die Substanz wird in 3 ml Methanol (5.3) gelöst und das Volumen mit Acetonitril (5.2) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Narasin-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (10) ermittelt.

$$C_{\text{NAR}} = \frac{m}{10} \times P \quad (10)$$

Dabei ist

C_{NAR} die Konzentration von Narasin in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Narasin-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,97.

m die gewogene Masse des Narasin-Standards (5.13.11), in mg.

5.14.1.12 Amprolium

Es werden 10 mg des Amprolium-Hydrochlorid-Standards (5.13.14) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Amprolium wird notiert. Die Substanz wird in 5 ml Methanol (5.3) gelöst und das Volumen mit Acetonitril (5.2) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Amprolium-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (11) ermittelt.

$$C_{\text{AMP}} = \frac{m}{10} \times P \quad (11)$$

Dabei ist

C_{AMP} die Konzentration von Amprolium in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Amprolium-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,99.

m die gewogene Masse des Amprolium-Standards (5.13.14), in mg.

5.14.1.13 Clopidol

Es werden 10 mg des Clopidol-Standards (5.13.13) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Clopidol wird notiert. Die Substanz wird in 5 ml Dimethylsulfoxid (5.7) gelöst und das Volumen mit Dimethylsulfoxid (5.7) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei -20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Clopidol-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (12) ermittelt.

$$C_{CLOP} = \frac{m}{10} \times P \quad (12)$$

Dabei ist

C_{CLOP} die Konzentration von Clopidol in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Clopidol-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,99.

m die gewogene Masse des Clopidol-Standards (5.13.13), in mg.

5.14.1.14 Dimetridazol

Es werden 10 mg des Dimetridazol-Standards (5.13.17) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Dimetridazol wird notiert. Die Substanz wird in 5 ml Ethanol (5.5) gelöst und das Volumen mit Ethanol (5.5) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei -20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Dimetridazol-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (13) ermittelt.

$$C_{DIM} = \frac{m}{10} \times P \quad (13)$$

Dabei ist

C_{DIM} die Konzentration von Dimetridazol in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Dimetridazol-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,98.

m die gewogene Masse des Dimetridazol-Standards (5.13.17), in mg.

5.14.1.15 Ethopabat

Es werden 10 mg des Ethopabat-Standards (5.13.12) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Ethopabat wird notiert. Die Substanz wird in 5 ml Ethanol (5.5) gelöst und das Volumen mit Ethanol (5.5) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Ethopabat-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (14) ermittelt.

$$C_{\text{ETHO}} = \frac{m}{10} \times P \quad (14)$$

Dabei ist

C_{ETHO} die Konzentration von Ethopabat in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Ethopabat-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,99.

m die gewogene Masse des Ethopabat-Standards (5.13.12), in mg.

5.14.1.16 Furazolidon

Es werden 10 mg des Furazolidon-Standards (5.13.15) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Furazolidon wird notiert. Die Substanz wird in 5 ml Dimethylsulfoxid (5.7) gelöst und das Volumen mit Dimethylsulfoxid (5.7) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Furazolidon-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (15) ermittelt.

$$C_{\text{FURA}} = \frac{m}{10} \times P \quad (15)$$

Dabei ist

C_{FURA} die Konzentration von Furazolidon in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Furazolidon-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,99.

m die gewogene Masse des Furazolidon-Standards (5.13.15), in mg.

5.14.1.17 Ronidazol

Es werden 10 mg des Ronidazol-Standards (5.13.16) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Ronidazol wird notiert. Die Substanz wird in 5 ml Ethanol (5.5) gelöst und das Volumen mit Ethanol (5.5) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Ronidazol-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (16) ermittelt.

$$C_{\text{RON}} = \frac{m}{10} \times P \quad (16)$$

Dabei ist

C_{RON} die Konzentration von Ronidazol in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Ronidazol-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,99.

m die gewogene Masse des Ronidazol-Standards (5.13.16), in mg.

5.14.1.18 Nigericin (IS)

Es werden 10 mg des Nigericin-Natrium-Standards (5.13.22) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Nigericin-Natrium wird notiert. Die Substanz wird in Methanol (5.3) gelöst und das Volumen mit Methanol (5.3) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei -20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Nigericin-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (17) ermittelt.

$$C_{\text{NIG}} = \frac{m}{10} \times P \quad (17)$$

Dabei ist

C_{NIG} die Konzentration von Nigericin in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Nigericin-Natrium-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,98.

m die gewogene Masse des Nigericin-Natrium-Standards (5.13.22), in mg.

5.14.1.19 Robenidin-D₈-Hydrochlorid (IS)

Es werden 10 mg des Robenidin-D₈-Hydrochlorid-Standards (5.13.18) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Robenidin-D₈-Hydrochlorid wird notiert. Die Substanz wird in Ethanol (5.5) gelöst und das Volumen mit Ethanol (5.5) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei -20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Robenidin-D₈-Hydrochlorid-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (18) ermittelt.

$$C_{\text{ROB-D}_8} = \frac{m}{10} \times P \quad (18)$$

Dabei ist

$C_{\text{ROB-D}_8}$ die Konzentration von Robenidin-D₈ in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Robenidin-D₈-Hydrochlorid-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,97.

m die gewogene Masse des Robenidin-D₈-Hydrochlorid-Standards (5.13.18), in mg.

5.14.1.20 Decoquinat-D₅ (IS)

Es werden 10 mg des Decoquinat-D₅-Standards (5.13.21) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Decoquinat-D₅ wird notiert. Die Substanz wird in 1%iger Calciumchloridlösung in Methanol (5.10) gelöst und das Volumen mit 1%iger Calciumchloridlösung in Methanol (5.10) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Decoquinat-D₅-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (19) ermittelt.

$$C_{\text{DEC-D}_5} = \frac{m}{10} \times P \quad (19)$$

Dabei ist

$C_{\text{DEC-D}_5}$ die Konzentration von Decoquinat-D₅ in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Decoquinat-D₅-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,98.

m die gewogene Masse des Decoquinat-D₅-Standards (5.13.21), in mg.

5.14.1.21 Dimetridazol-D₃ (IS)

Es werden 10 mg des Dimetridazol-D₃-Standards (5.13.23) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Dimetridazol-D₃ wird notiert. Die Substanz wird in Ethanol (5.5) gelöst und das Volumen mit Ethanol (5.5) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Dimetridazol-D₃-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (20) ermittelt.

$$C_{\text{DIM-D}_3} = \frac{m}{10} \times P \quad (20)$$

Dabei ist

$C_{\text{DIM-D}_3}$ die Konzentration von Dimetridazol-D₃ in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Dimetridazol-D₃-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,99.

m die gewogene Masse des Dimetridazol-D₃-Standards (5.13.23), in mg.

5.14.1.22 Ethopabat-D₅ (IS)

Es werden 10 mg des Ethopabat-D₅-Standards (5.13.24) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Ethopabat-D₅ wird notiert. Die Substanz wird in Ethanol (5.5) gelöst und das Volumen mit Ethanol (5.5) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Ethopabat-D₅-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (21) ermittelt.

$$C_{\text{ETHO-D}_5} = \frac{m}{10} \times P \quad (21)$$

Dabei ist

$C_{\text{ETHO-D}_5}$ die Konzentration von Ethopabat-D₅ in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Ethopabat-D₅-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,99.

m die gewogene Masse des Ethopabat-D₅-Standards (5.13.24), in mg.

5.14.1.23 Furazolidon-D₄ (IS)

Es werden 10 mg des Furazolidon-D₄-Standards (5.13.25) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Furazolidon-D₄ wird notiert. Die Substanz wird in Dimethylsulfoxid (5.7) gelöst und das Volumen mit Dimethylsulfoxid (5.7) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Furazolidon-D₄-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (22) ermittelt.

$$C_{\text{FURA-D}_4} = \frac{m}{10} \times P \quad (22)$$

Dabei ist

$C_{\text{FURA-D}_4}$ die Konzentration von Furazolidon-D₄ in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Furazolidon-D₄, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,99.

m die gewogene Masse des Furazolidon-D₄-Standards (5.13.25), in mg.

5.14.1.24 Ronidazol-D₃ (IS)

Es werden 10 mg des Ronidazol-D₃-Standards (5.13.26) auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Ronidazol-D₃ wird notiert. Die Substanz wird in Ethanol (5.5) gelöst und das Volumen mit Ethanol (5.5) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Ronidazol-D₃-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (23) ermittelt.

$$C_{\text{RON-D}_3} = \frac{m}{10} \times P \quad (23)$$

Dabei ist

$C_{\text{RON-D}_3}$ die Konzentration von Ronidazol-D₃ in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Ronidazol-D₃-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,99.

m die gewogene Masse des Ronidazol-D₃-Standards (5.13.26), in mg.

5.14.2 Standard-Stammlösungen, ca. 0,3 mg/ml

5.14.2.1 Decoquinat

Es werden 15 mg des Decoquinat-Standards (5.13.5) auf 0,1 mg genau in einen 50-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Decoquinat wird notiert. Die Substanz wird in 1%iger Calciumchloridlösung in Methanol (5.10) gelöst und das Volumen mit 1%iger Calciumchloridlösung in Methanol (5.10) auf 50 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Decoquinat-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (24) ermittelt.

$$C_{\text{DEC}} = \frac{m}{50} \times P \quad (24)$$

Dabei ist

C_{DEC} die Konzentration von Decoquinat in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Decoquinat-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,98.

m die gewogene Masse des Decoquinat-Standards (5.13.5), in mg.

5.14.3 Standard-Stammlösungen, ca. 0,2 mg/ml

5.14.3.1 Bis-Diclazuril (IS)

Es werden 10 mg des Bis-Diclazuril-Standards (5.13.20) auf 0,1 mg genau in einen 50-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Bis-Diclazuril wird notiert. Die Substanz wird in N,N-Dimethylformamid (5.6) gelöst und das Volumen mit N,N-Dimethylformamid (5.6) auf 50 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Bis-Diclazuril-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (25) ermittelt.

$$C_{\text{bis-DICL}} = \frac{m}{50} \times P \quad (25)$$

Dabei ist

$C_{\text{bis-DICL}}$ die Konzentration von Bis-Diclazuril in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Bis-Diclazuril-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,97.

m die gewogene Masse des Bis-Diclazuril-Standards (5.13.20), in mg.

5.14.3.2 Dinitrocarbanilid-D₈ (IS)

Es werden 10 mg des Dinitrocarbanilid-D₈-Standards (5.13.19) auf 0,1 mg genau in einen 50-ml-Messkolben (6.9) eingewogen. Das genaue Gewicht von Dinitrocarbanilid-D₈ wird notiert. Die Substanz wird in N,N-Dimethylformamid (5.6) gelöst und das Volumen mit N,N-Dimethylformamid (5.6) auf 50 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

Die genaue Konzentration der Dinitrocarbanilid-D₈-Standard-Stammlösung wird unter Verwendung des vom Anbieter bereitgestellten Reinheitswertes des Referenzstandards mithilfe von Gleichung (26) ermittelt.

$$C_{\text{DNC-D}_8} = \frac{m}{50} \times P \quad (26)$$

Dabei ist

$C_{\text{DNC-D}_8}$ die Konzentration von Dinitrocarbanilid-D₈ in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Anbieter angegebene Reinheit des Dinitrocarbanilid-D₈-Standards, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,99.

m die gewogene Masse des Dinitrocarbanilid-D₈-Standards (5.13.19), in mg.

5.14.4 Standard-Zwischenlösungen, ca. 0,1 mg/ml

5.14.4.1 Maduramicin

Genau 1,0 ml Maduramicin-Standard-Stammlösung (5.14.1.8) werden in einen 10-ml-Messkolben (6.9) pipettiert (6.8). Das Volumen wird mit Acetonitril (5.2) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird jeden Monat frisch hergestellt.

5.14.4.2 Halofuginon

Genau 1,0 ml Halofuginon-Standard-Stammlösung (5.14.1.2) werden in einen 10-ml-Messkolben (6.9) pipettiert (6.8). Das Volumen wird mit Acetonitril (5.2) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird jeden Monat frisch hergestellt.

5.14.4.3 Diclazuril

Genau 1,0 ml Diclazuril-Standard-Stammlösung (5.14.1.5) werden in einen 10-ml-Messkolben (6.9) pipettiert (6.8). Das Volumen wird mit Acetonitril (5.2) auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird jeden Monat frisch hergestellt.

5.15 Aufstock-Standard-Zusatzlösungen

5.15.1 Zielfuttermittel – Kokzidiostatika-Aufstocklösung

Genau

- 315 µl der Lasalocid-Standard-Stammlösung (5.14.1.10),
- 175 µl der Narasin-Standard-Stammlösung (5.14.1.11),
- 175 µl der Salinomycin-Standard-Stammlösung (5.14.1.9),
- 315 µl der Monensin-Standard-Stammlösung (5.14.1.7),
- 65 µl der Semduramicin-Standard-Stammlösung (5.14.1.6),
- 175 µl der Robenidin-Standard-Stammlösung (5.14.1.3),
- 310 µl der Nicarbazin-Standard-Stammlösung (5.14.1.4),
- 330 µl der Decoquinat-Standard-Stammlösung (5.14.2.1),
- 125 µl der Maduramicin-Standard-Zwischenlösung (5.14.4.1),
- 75 µl der Halofuginon-Standard-Zwischenlösung (5.14.4.2),
- 25 µl der Diclazuril-Standard-Zwischenlösung (5.14.4.3)

werden in einen 20-ml-Messkolben (6.9) pipettiert (6.8).

Wenn das Protokoll gleichzeitig für die Bestimmung der nicht registrierten Kokzidiostatika und des Furazolidon-Antibiotikums in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen anzuwenden ist, werden

- 100 µl der Amprolium-Standard-Stammlösung (5.14.1.12),
- 100 µl der Clopidol-Standard-Stammlösung (5.14.1.13),
- 100 µl der Dimetridazol-Standard-Stammlösung (5.14.1.14),
- 100 µl der Ethopabat-Standard-Stammlösung (5.14.1.15),
- 100 µl der Furazolidon-Standard-Stammlösung (5.14.1.16),
- 100 µl der Ronidazol-Standard-Stammlösung (5.14.1.17)

hinzugefügt. Danach wird das Volumen mit Acetonitril (5.2) auf 20 ml aufgefüllt.

Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

5.15.2 Zielfuttermittel – Kokzidiostatika-IS-Aufstocklösung

Genau

- 180 µl der Robenidin-D₈-Standard-Stammlösung (5.14.1.19),
- 1 250 µl der Dinitrocarbanilid-D₈-Standard-Stammlösung (5.14.3.2),
- 50 µl der Decoquinat-D₅-Standard-Stammlösung (5.14.1.20),
- 15 µl der Bis-Diclazuril-Standard-Stammlösung (5.14.3.1),
- 250 µl der Nigericin-Standard-Stammlösung (5.14.1.18)

werden in einen 20-ml-Messkolben (6.9) pipettiert (6.8).

Wenn das Protokoll gleichzeitig für die Bestimmung der nicht registrierten Kokzidiostatika und des Furazolidon-Antibiotikums in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen anzuwenden ist, werden

- 80 µl der Dimetridazol-D₃-Standard-Stammlösung (5.14.1.21),
- 80 µl der Ethopabat-D₅-Standard-Stammlösung (5.14.1.22),
- 80 µl der Furazolidon-D₄-Standard-Stammlösung (5.14.1.23),
- 80 µl der Ronidazol-D₃-Standard-Stammlösung (5.14.1.24)

hinzugefügt. Danach wird das Volumen mit Acetonitril (5.2) auf 20 ml aufgefüllt.

Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

5.15.3 Zielfuttermittel – Kokzidiostatika-Aufstocklösung

Genau

- 940 µl der Lasalocid-Standard-Stammlösung (5.14.1.10),
- 525 µl der Narasin-Standard-Stammlösung (5.14.1.11),
- 525 µl der Salinomycin-Standard-Stammlösung (5.14.1.9),
- 940 µl der Monensin-Standard-Stammlösung (5.14.1.7),
- 190 µl der Semduramicin-Standard-Stammlösung (5.14.1.6),
- 525 µl der Robenidin-Standard-Stammlösung (5.14.1.3),
- 940 µl der Nicarbazin-Standard-Stammlösung (5.14.1.4),
- 930 µl der Decoquinat-Standard-Stammlösung (5.14.2.1),
- 375 µl der Maduramicin-Standard-Zwischenlösung (5.14.4.1),
- 225 µl der Halofuginon-Standard-Zwischenlösung (5.14.4.2),
- 75 µl der Diclazuril-Standard-Zwischenlösung (5.14.4.3)

werden in einen 20-ml-Messkolben (6.9) pipettiert (6.8).

Wenn das Protokoll gleichzeitig für die Bestimmung der nicht registrierten Kokzidiostatika und des Furazolidon-Antibiotikums in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen anzuwenden ist, werden

- 300 µl der Amprolium-Standard-Stammlösung (5.14.1.12),
- 300 µl der Clopidol-Standard-Stammlösung (5.14.1.13),
- 300 µl der Dimetridazol-Standard-Stammlösung (5.14.1.14),
- 300 µl der Ethopabat-Standard-Stammlösung (5.14.1.14),
- 300 µl der Furazolidon-Standard-Stammlösung (5.14.1.16),
- 300 µl der Ronidazol-Standard-Stammlösung (5.14.1.16)

hinzugefügt. Danach wird das Volumen mit Acetonitril (5.2) auf 20 ml aufgefüllt.

Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

5.15.4 Nichtzielfuttermittel – Kokzidiostatika-IS-Aufstocklösung

Genau

- 540 µl der Robenidin-D₈-Standard-Stammlösung (5.14.1.19),
- 3 750 µl der Dinitrocarbanilid-D₈-Standard-Stammlösung (5.14.3.2),
- 150 µl der Decoquinat-D₅-Standard-Stammlösung (5.14.1.20),
- 50 µl der Bis-Diclazuril-Standard-Stammlösung (5.14.3.1),
- 750 µl der Nigericin-Standard-Stammlösung (5.14.1.18)

werden in einen 20-ml-Messkolben (6.9) pipettiert (6.8).

Wenn das Protokoll gleichzeitig für die Bestimmung der nicht registrierten Kokzidiostatika und des Furazolidon-Antibiotikums in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen anzuwenden ist, werden

- 240 µl der Dimetridazol-D₃-Standard-Stammlösung (5.14.1.21),
- 240 µl der Ethopabat-D₅-Standard-Stammlösung (5.14.1.22),
- 240 µl der Furazolidon-D₄-Standard-Stammlösung (5.14.1.23),
- 240 µl der Ronidazol-D₃-Standard-Stammlösung (5.14.1.24)

hinzugefügt. Danach wird das Volumen mit Acetonitril (5.2) auf 20 ml aufgefüllt.

Die Lösung wird bei –20 °C in Fläschchen aus Braunglas (6.13) aufbewahrt. Die Lösung wird alle drei Monate frisch hergestellt.

6 Geräte

Übliches Laborgerät und insbesondere folgende Geräte:

6.1 HPLC-System, bestehend aus dem Folgenden

6.1.1 Pumpe, pulsationsfrei, mit der eine Volumenfließrate von 0,01 ml/min bis 1,0 ml/min aufrechterhalten werden kann

6.1.2 Injektionssystem, mit einer für 10-µl-Injektionen geeigneten Injektionsschleife

6.1.3 Gekühlter Autosampler, eingestellt auf 4 °C

6.1.4 Säulenheizung, eingestellt auf 35 °C

6.1.5 Umschaltventil

6.1.6 Dreifach-Quadrupol-Massenspektrometer, das in einem Massenbereich von mindestens 200 m/z bis 1 000 m/z betrieben werden kann

Um eine gute Wiederholpräzision bei Injektionen zu erreichen, sollte eine gute Stabilität der ESI-Quelle sichergestellt werden, indem das Massenspektrometer mindestens 48 Stunden lang pumpt, bevor mit den Messungen begonnen wird.

6.1.7 Computerdatensystem

6.2 Schutzsäule, C₁₈, Alltech® oder vergleichbar

6.3 Analytische LC-Säule, 5 µm C₁₈, 150 mm × 3,0 mm Alltima HP Alltech® (mit Endkappe) oder vergleichbar

6.4 Glasfläschchen, 1,5 ml für HPLC, mit Deckeln

6.5 Ultraschallbad

6.6 Schüttelgerät, Überkopfschüttelgerät oder vergleichbares Gerät

6.7 Waagen, darunter eine analytische Waage mit einer Kapazität von 10 g oder größer mit 0,1 mg Ablesbarkeit

6.8 Pipetten mit variablem Luftvolumen oder Kolbenhubpipetten, geeignet für Pipettiervolumina von 10 bis 5 000 µl

6.9 Messkolben, 10 ml, 20 ml, 25 ml, 50 ml und 1 000 ml

6.10 Messkolben mit rundem Boden, 10 ml und 20 ml

6.11 Glasmesszylinder, 50 ml, 100 ml und 1 000 ml

6.12 Glasröhrchen, 100 × 12 mm

6.13 Fläschchen zur Lagerung, Braunglas, 5 ml und 10 ml

6.14 Polypropylenröhrchen, Kapazität von 50 ml, mit Stopfen (Falcon® oder vergleichbar)

6.15 Einwegspritzen, 20 ml

6.16 Nylonfilter, Durchmesser von 47 mm und Porengröße von 0,22 µm oder vergleichbar

6.17 Spritzenfilter, Nylon 0,2 µm oder vergleichbar

6.18 Zerkleinerungs-/Mahlgerät

6.19 Sieb, 1 mm Maschenweite

6.20 Zentrifuge, mit der bei mindestens 1 850 g zentrifugiert werden kann

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Labor eine wirklich repräsentative Probe des Produktes empfängt, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in dieser Europäischen Norm festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 6497 [1] angegeben.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

8.1 Allgemeines

Die Untersuchungsprobe ist nach EN ISO 6498 vorzubereiten.

8.2 Laborprobe

Die Laborprobe (üblicherweise 50 g) wird so gemahlen, dass sie vollständig durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm (6.19) hindurchpasst. Alles wird gründlich gemischt.

8.3 Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe besteht aus einem repräsentativen und homogenisierten Aliquot der gemahlenen Laborprobe (8.2) von mindestens 20 g.

8.4 Prüfmenge

Es werden 5,0 g der gründlich gemischten Untersuchungsprobe (8.3) auf 0,1 g genau in ein 50-ml-Polypropylenröhrchen mit Stopfen (6.14) eingewogen. Die Masse in mg wird notiert. Die Probe wird dem Analyseverfahren (Abschnitt 9) unterzogen.

9 Verfahren

9.1 Positiv- und Negativkontrollproben

9.1.1 Allgemeines

Die Verwendung von Qualitätskontrollproben und Qualitätskontrollkarten wird empfohlen.

In jeden Satz von Proben wird täglich eine Positivkontrollprobe (en: positive control sample, PCS) und eine Negativkontrollprobe (en: negative control sample, NCS) aufgenommen. Die Kontrollproben werden unter Verwendung einer Futtermittel-Blindprobe hergestellt, die der Art des zu analysierenden Futtermittels entspricht. Die Zusammensetzung der Kontrollproben darf an die Art der Analyten angepasst werden, die in den zu analysierenden Proben zu bestimmen sind.

9.1.2 Positivkontrollprobe (PCS)

9.1.2.1 Zielfuttermittel

Es werden 5,0 g einer Blindprobe eines Ziel-Mischfuttermittels auf 0,1 g genau in ein 50-ml-Polypropylenröhrchen mit Stopfen (6.14) eingewogen.

Genau 400 µl der Kokzidiostatika-Aufstocklösung für das Zielfuttermittel (5.15.1) werden hinzupipettiert (6.8). Es wird sorgfältig durchmischt, um den Kontakt mit dem Futtermittel sicherzustellen. Das Röhrchen wird mindestens 1 h vor der Durchführung von (9.2) geöffnet.

9.1.2.2 Nichtzielfuttermittel

Es werden 5,0 g einer Blindprobe eines Nichtziel-Mischfuttermittels in ein 50-ml-Polypropylenröhrchen mit Stopfen (6.14) eingewogen.

Genau 400 µl der Kokzidiostatika-Aufstocklösung (5.15.3) für das Nichtzielfuttermittel werden hinzupipettiert (6.8). Es wird sorgfältig durchmischt, um den Kontakt mit dem Futtermittel sicherzustellen. Das Röhrchen wird mindestens 1 h vor der Durchführung von (9.2) geöffnet.

9.1.3 Negativkontrollprobe (NCS)

Es werden 5,0 g einer Blindprobe eines Mischfuttermittels auf 0,1 g genau in ein 50-ml-Polypropylenröhrchen mit Stopfen (6.14) eingewogen. (9.2) wird durchgeführt.

9.2 Probenvorbereitung

9.2.1 Extraktion

Von jeder unbekannten Probe werden 2 Parallel-Prüfmengen (8.4) vorbereitet. 40 ml Lösemittelmischung zur Futtermittelsextraktion (5.11) werden hinzugegeben. Das Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (6.14) wird fest verschlossen und sichergestellt, dass keine Undichtigkeiten am Deckel vorhanden sind. Das Röhrchen wird kräftig geschüttelt, um sicherzustellen, dass das gesamte Futtermittel im Extraktionslösemittel suspendiert wird. Danach wird es für 0,5 h in ein Ultraschallbad (6.5), das auf 22 °C eingestellt ist, gegeben. Dann wird eine Fest-Flüssig-Extraktion durch Überkopfschütteln der Mischung für 1 h auf dem Schüttler (6.6) durchgeführt und anschließend bei 1 850 g und 20 °C für 10 min zentrifugiert (6.20).

Die PCS und NCS werden dem gleichen Verfahren unterzogen, jedoch als Einzelanalyse (keine Parallelproben).

9.2.2 Filtration

Der in 9.2.1 gewonnene Überstand (für die Mischfuttermittel und für die PCS und die NCS) wird durch einen 0,2-µm-Nylonspritzenfilter (6.17) in ein sauberes Polypropylenröhrchen (6.14) filtriert.

Bei Mischfuttermitteln, die Kokzidiostatika in Konzentrationen von Verschleppungen und möglicherweise nicht registrierte Kokzidiostatika (Ethopabat, Clopidol, Ronidazol, Dimetridazol und/oder Amprolium) sowie das verbotene Antibiotikum Furazolidon in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen und die PCS enthalten, wird direkt mit 9.3 fortgefahren.

Für die NCS wird mit 9.4.2 fortgefahren.

9.2.3 Verdünnung

Bei Mischfuttermitteln, die die Kokzidiostatika in Konzentrationen von Zusatzstoffen enthalten, ist eine Verdünnung erforderlich.

Genau 200 µl des in 9.2.2 gewonnenen Filtrats der Mischfuttermittelprobe werden in einen 20-ml-Messkolben mit rundem Boden (6.9) pipettiert und mit der Lösemittelmischung zur Futtermittelextraktion (5.11) auf 20 ml aufgefüllt. Es wird mit 9.3 fortgefahren.

ANMERKUNG Diese Norm ist zum Screening und zur Bestimmung der Kokzidiostatika und des Furazolidon-Antibiotikums geeignet. Wenn das Screening der einzige Zweck ist, wird mit 9.4 fortgefahren.

9.3 Quantifizierung durch Standardaddition

Mit einer geeigneten automatischen Pipette (6.8) werden sieben 2-ml-Aliquots des fertig filtrierten (9.2.2) oder verdünnten Extrakts (9.2.3) in Glasröhrchen (6.12) genau pipettiert und als S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 bzw. S5 gekennzeichnet.

Mit einer geeigneten automatischen Pipette (6.8) werden genau 50 µl Zielfuttermittel-Aufstocklösung von 9 Internen Standards (5.15.2) oder Nichtzielfuttermittel-Aufstocklösung von 9 Internen Standards (5.15.4) pipettiert, je nachdem, welche Mischfuttermittel analysiert werden sollen, und jeweils in die mit S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 bzw. S5 gekennzeichneten Glasröhrchen gegeben.

Mit einer geeigneten automatischen Pipette (6.8) werden 0, 0, 10, 20, 30, 40 und 50 µl Zielfuttermittel-Aufstocklösung von 11 Kokzidiostatika (5.15.1) oder Nichtzielfuttermittel-Aufstocklösung von 11 Kokzidiostatika (5.15.3) genau pipettiert, je nachdem, welche Mischfuttermittel analysiert werden sollen, und in die mit S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 bzw. S5 gekennzeichneten Glasröhrchen gegeben.

Mit einer geeigneten automatischen Pipette (6.8) werden 50, 50, 40, 30, 20, 10 und 0 µl Acetonitril (5.2) genau pipettiert und in die mit S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 bzw. S5 gekennzeichneten Glasröhrchen gegeben.

Bei nicht Nichtzielfuttermittel-Extrakten werden zusätzlich genau 4 ml Methanol (5.3) mit einer geeigneten automatischen Pipette (6.8) pipettiert und in die Glasröhrchen mit den Extrakten gegeben und es wird gut durchmischt.

ANMERKUNG Wenn bei der Chromatographie für Nichtzielfuttermittel-Extrakte Peak-Form-Probleme auftreten, kann die Verdünnung mit 4 ml der Lösemittelmischung zur Futtermittelextraktion (5.11) anstelle der 4 ml Methanol (5.3) durchgeführt werden.

Bei Zielfuttermittel-Extrakten ist letzterer Schritt nicht erforderlich.

Jeweils 1 ml von jeder in den Glasröhrchen enthaltenen Endprobe werden in 1,5-ml-Fläschchen für HPLC (6.4) mit den Kennzeichnungen S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 bzw. S5 überführt. Die Fläschchen werden verschlossen und der Inhalt wird kräftig geschüttelt. Die Zielfuttermittel-Extrakte werden gründlich gemischt, bevor die 1 ml jeder Endprobe überführt werden.

Alle HPLC-Fläschchen werden anschließend analysiert (9.4.2).

9.4 HPLC-Analyse

9.4.1 Analysebedingungen

Die folgenden Bedingungen dienen als Richtwerte. Andere Bedingungen dürfen verwendet werden, sofern sie zu gleichwertigen Ergebnissen führen.

9.4.1.1 HPLC-Säule: wie in 6.3

9.4.1.2 Schutzsäule: wie in 6.2

9.4.1.3 Mobile Phase: wie in 5.12, Volumenstrom: 0,35 ml/min

Elutionsprogramm: Schritt-Gradient-Modus. Die mobilen Phasen A und B werden verwendet, um die folgende Gradientenelution anzuwenden: die mobile Phase A wird bei 90 % für 2 Minuten gehalten, nach 2 Minuten auf 10 % verringert und für 9 Minuten gehalten. Nach 11 Minuten wird die mobile Phase A auf 90 % erhöht und für 4 Minuten gehalten. Die Gesamtlaufzeit beträgt 15 Minuten.

9.4.1.4 Injektionsvolumen: 10 µl

9.4.1.5 Säulentemperatur: 35 °C

9.4.1.6 Autosampler-Temperatur: 4 °C

9.4.1.7 Umschaltventil-Parameter: 0 bis 2 min, HPLC-Fluss umgeleitet zum Abfallbehälter (Injektionsmodus); (2 bis 13) min, HPLC-Fluss umgeleitet zur Ionenquelle des Massenspektrometers (Lademodus); (13 bis 15) min, HPLC-Fluss umgeleitet zum Abfallbehälter (Injektionsmodus).

Unter diesen Bedingungen sind die Retentionszeiten wie in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1 — Ungefähre Retentionszeiten für bestimmte Kokzidiostatika

Kokzidiostatikum	Retentionszeit [min]
Amprolium	3,25
Ronidazol	5,10
Ronidazol-D ₃	5,10
Dimetridazol	5,15
Dimetridazol-D ₃	5,15
Clopidol	5,26
Furazolidon	5,28
Furazolidon-D ₄	5,29
Halofuginon	5,33
Robenidin	5,50
Robenidin-D ₈	5,50
Ethopabat	5,60
Ethopabat-D ₅	5,60
Dinitrocarbanilid ^a	6,20
Dinitrocarbanilid-D ₈	6,20
Diclazuril	6,30
Bis-Diclazuril	6,30
Semduramicin	8,30
Decoquinat	8,70
Decoquinat-D ₅	8,70
Monensin	9,20

Kokzidiostatikum	Retentionszeit [min]
Lasalocid	9,40
Maduramicin	9,90
Salinomycin	10,30
Narasin A	11,60
Nigericin	11,80
^a Marker für Nicarbazin.	

9.4.1.8 Massenspektrometrie-Parameter:

- Spritzspannung: 3,7 kV.
- Ionisationsmodus: positive ESI oder negative ESI (von 0 min bis 5,9 min und von 7,26 min bis 13,2 min: positive ESI; von 5,9 min bis 7,26 min: negative ESI).
- Kapillar-(Desolvatisierungs-)Temperatur: 370 °C.
- Tubuslinsenversatz: variabel, abhängig vom Analyten, der Zusammensetzung der mobilen Phase und der HPLC-Durchflussrate, Kapillartemperatur. Abgestimmte Werte für den Tubuslinsenversatz unter Verwendung der in diesem Verfahren genannten Bedingungen sind in Anhang A (Tabelle A.1) aufgeführt.
- Erfassungsmodus: Mehrfachreaktionsüberwachung (en: multiple reaction monitoring, MRM); protonierte, deprotonierte und Natriumaddukte (in Abhängigkeit vom Analyten) werden zur Fragmentierung verwendet. Zwei Produkt-Ionen werden aufgezeichnet: Eines der intensivsten (in den meisten Fällen) ist das Quantifizierungsion; ein anderes (mindestens) wird zur Bestätigung der Identität des Analyten oder Internen Standards verwendet. Die für jeden Analyten verwendeten Vorläufer- und Tochterionen sind in Anhang A angegeben.
- Scanbreite (Massenspanne): $\pm 0,2$ m/z.
- Scanzeit (Verweilzeit): 0,03 s.
- Erfassung bei Peakauflösung von 0,7 m/z in beiden Quadrupolen.

Die MS-Parameter werden an das verwendete Messgerät angepasst, z. B.:

- Tubuslinsenversatz = Deprotonierungspotential = Kegelspannung = Declustering-Potential;
- Sprühspannung = Kapillarspannung = Ionensprayspannung;
- Kapillar-Desolvatisierungstemperatur: Zellenausgangspotential [V].

9.4.2 HPLC-Bestimmung

Eine Injektion von Acetonitril (5.2) als Lösemittel-Blindprobe, eine Injektion von NCS (wie in 9.1.3 hergestellt), zwei Injektionen von PCS (wie in 9.3 hergestellt) und eine Injektion der Lösemittel-Blindprobe (5.2) werden durchgeführt.

Alle genannten Bedingungen wurden für das Thermo Quantum Ultra EMR® LC-MS/MS optimiert, das vom EURL-FA Control der Gemeinsamen Forschungsstelle (JRC) der Europäischen Kommission zur Optimierung

und Validierung dieses Protokolls verwendet wird. Sie sind daher nur Richtwerte und müssen für die verwendeten Geräte optimiert werden.

Für die unbekannten Mischfuttermittelproben werden zwei aufeinanderfolgende Injektionen aus jedem Fläschchen mit der Kennzeichnung S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 und S5, wie in (9.3) vorbereitet, in der Reihenfolge S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 und S5 durchgeführt. Eine Lösemittel-Blindprobe (5.2) und eine NCS (wie in 9.1.3 vorbereitet) werden zwischen jede Reihe unbekannter Proben eingefügt.

9.4.3 Kriterien für die Annahme des Analyseergebnisses

9.4.3.1 Annahmeverfahren

Für die Annahme der Versuche müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- die Signale der jeweiligen Quantifizierungen, die womöglich in der Negativkontrollprobe (NCS) vorhanden sind, sollten 1 % der Signale der jeweiligen Quantifizierungen, die in der Positivkontrollprobe (PCS) vorhanden sind, nicht überschreiten;
- die niedrigste angereicherte Probe (S1) wird mit der Hälfte der regulierten Verschleppungskonzentration aufgestockt. Klare Peaks für alle entsprechenden Quantifizierungs- und Bestätigungen sollten aufgezeichnet werden ($S/N > 10$);
- alle Analyt-Signale in den aufgestockten Proben (PCS) sollten die Identifizierungskriterien (9.4.3.2) erfüllen.

Für die Annahme der quantitativen Ergebnisse sollten folgende Kriterien erfüllt sein:

- die analytische Wiederfindung aller 11 (bzw. 17) Zielanalyten in der PCS sollte zwischen 80 % und 120 % liegen;
- die Standardadditions-Regressionsgeraden für alle 11 (bzw. 17) Zielanalyten sollten einen Bestimmungskoeffizienten von 0,95 oder besser haben;
- die Schwankung der relativen Standardabweichung bei der Konzentration für zwei Parallelproben sollte weniger als 10 % betragen.

9.4.3.2 Identifikationskriterien

Für die Identifizierung der Analyten sind die Kriterien die folgenden:

- die Retentionszeiten der Peaks, die jedem der 11 (bzw. 17) Zielanalyten entsprechen, sollten mit den jeweiligen Retentionszeiten identisch sein, die in den PCS innerhalb einer Spanne von ± 5 % aufgezeichnet wurden;
- die jeweiligen Intensitäten der Signale für alle 11 (bzw. 17) Zielanalyten sollten mit den verschiedenen angereicherten Proben zunehmen, d. h. $S_0 < S_1 < S_2 < S_3 < S_4 < S_5$;
- das Vorhandensein der entsprechenden Analyten bei $S/N > 10$ sollte bestätigt werden.

Die relativen Intensitäten der nachgewiesenen Ionen, ausgedrückt als Prozentsatz der Intensität des intensivsten Ions oder Übergangs, müssen denen des zugehörigen Analyten im positiven Qualitätskontrollstandard innerhalb der folgenden Messunsicherheiten entsprechen:

- wenn die relative Intensität größer als 10 % ist, beträgt die maximal zulässige Messunsicherheit ± 20 %;
- wenn die relative Intensität kleiner oder gleich 10 % ist, beträgt die maximal zulässige Messunsicherheit ± 10 %.

10 Berechnung

Es wird eine automatische Integration (Grundlinienmodus) der Peaks durchgeführt, die für die jeweiligen zur Quantifizierung verwendeten Produkt-Ionen erhalten wurden.

Die einzelnen Verhältnisse (außer Halofuginon-Hydrobromid und Amprolium), die unter Verwendung der Gleichung (27) für jede Injektion berechnet wurden (y -Achse), werden in Abhängigkeit von der entsprechenden äquivalenten hinzugefügten Konzentration von jedem der im Futtermittel enthaltenen Analyten für S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 und S5 (x -Achse) grafisch dargestellt.

$$\text{Verhältnis} = \frac{\text{Fläche}(\text{Analyt})}{\text{Fläche}(\text{I.S.})} \quad (27)$$

Dabei ist

Fläche(Analyt) die Fläche des absoluten Signals, die dem Quantifizierungssignal jedes Analyten entspricht;

Fläche(IS) die Fläche des absoluten Signals, die dem Quantifizierungssignal jedes Internen Standards entspricht.

Für die Berechnung der Halofuginon- und Amproliumkonzentrationen werden die einzelnen absoluten Flächen jeder Injektion (y -Achse) in Abhängigkeit von der entsprechenden äquivalenten hinzugefügten Konzentration von Halofuginon bzw. Amprolium in S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 und S5 (x -Achse) grafisch dargestellt.

Die äquivalente hinzugefügte Konzentration aller 11 (bzw. 17) Analyten im Futtermittel wird für S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 und S5 unter Verwendung der Gleichung (28) bestimmt.

$$C_{ax} = \frac{V_{sp} \times V_{st} \times C_{st}}{5\,000} \quad (28)$$

Dabei ist

C_{ax} die äquivalente hinzugefügte Konzentration des Analyten im Futtermittel für S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 und S5, in mg/ml;

V_{sp} das Volumen der Zielfuttermittel-Aufstocklösung von 11 (bzw. 17) Analyten (5.15.1) oder der Nichtzielfuttermittel-Aufstocklösung von 11 (bzw. 17) Analyten (5.15.3), die zu S0a, S0b, S1, S2, S3, S4 bzw. S5 hinzugefügt wurde, in μl ;

V_{st} das Volumen der entsprechenden Standard-Stammlösung (5.14.1; 5.14.2; 5.14.3) oder Standard-Zwischenlösung (5.14.4), die für die Herstellung der Zielfuttermittel-Aufstocklösung von 11 (bzw. 17) Analyten (5.15.1) oder der Nichtzielfuttermittel-Aufstocklösung von 11 (bzw. 17) Analyten (5.15.3) verwendet wurde, in μl ;

C_{st} die Konzentration jedes Analyten in der entsprechenden Standard-Stammlösung (5.14.1; 5.14.2; 5.14.3) oder Standard-Zwischenlösung (5.14.4), die für die Herstellung der Zielfuttermittel-Aufstocklösung von 11 (bzw. 17) Analyten (5.15.1) oder der Nichtzielfuttermittel-Aufstocklösung von 11 (bzw. 17) Analyten (5.15.3) verwendet wurde, in mg/ml.

Die unbekannte Konzentration C_{0x} in Milligramm jedes Analyten pro Kilogramm Futtermittel wird durch Extrapolation der erhaltenen Regressionsgeraden bei $y = 0$ und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 100 bei Proben in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen ermittelt.

Für die Nicarbazin-Konzentration wird die für DNC ermittelte Konzentration um die Reinheit von DNC im Nicarbazin-Standard und das entsprechende Molmassenverhältnis unter Verwendung der Gleichung (29) korrigiert.

$$C_{\text{ONIC}} = (C_{\text{DNCexp}} \times P_{\text{DNC}}) \times \frac{M_{\text{NIC}}}{M_{\text{DNC}}} \quad (29)$$

Dabei ist

C_{ONIC} die anfänglich unbekannte Konzentration von Nicarbazin im Futtermittel, in mg/ml;

C_{DNCexp} die unbekannte Konzentration von DNC in der Probe des Futtermittels, experimentell bestimmt, in mg/ml;

P_{DNC} der Reinheitswert des Referenzstandards für DNC, der aus dem vom Anbieter bereitgestellten Analysezertifikat entnommen wurde, in %;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,712.

M_{NIC} die Molmasse von Nicarbazin, 426,38 g/mol;

M_{DNC} die Molmasse von DNC, 302,25 g/mol.

Bei Proben in Konzentrationen von Zusatzstoffen sollte die aus der Gleichung (29) erhaltene C_{ONIC} mit dem Verdünnungsfaktor 100 multipliziert werden, um die anfänglich geforderte Konzentration zu erhalten.

11 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

- a) sämtliche zur vollständigen Identifizierung der Probe notwendigen Angaben;
- b) das angewendete Probenahmeverfahren, sofern bekannt;
- c) sämtliche zur vollständigen Identifizierung der Kalibriersubstanzen notwendigen Angaben;
- d) das angewendete Prüfverfahren mit Verweisung auf dieses Protokoll;
- e) alle in diesem Protokoll nicht festgelegten oder als optional angesehenen Betriebsbedingungen, einschließlich Einzelheiten zu allen Zwischenfällen, die das (die) Prüfergebnis(se) beeinflusst haben können;
- f) die erhaltenen Prüfergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- g) die mit dem/den Prüfergebnis(en) in Verbindung stehende Unsicherheit;
- h) das Prüfdatum;
- i) wenn die Wiederholpräzision überprüft wurde, das vorliegende Endergebnis;
- j) wenn die Richtigkeit überprüft wurde, das vorliegende Endergebnis.