RICHTLINIE 1999/27/EG DER KOMMISSION

vom 20. April 1999

zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die Bestimmung von Amprolium, Diclazuril und Carbadox in Futtermitteln sowie zur Änderung der Richtlinien 71/250/EWG und 73/46/EWG und zur Aufhebung der Richtlinie 74/203/EWG

(Text von Bedeutung für den EWR)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 70/373/EWG des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln [1], zuletzt geändert durch die Akte über den Beitritt Österreichs, Finnlands und Schwedens, insbesondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

(1) Gemäß der Richtlinie 70/373/EWG werden die amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Feststellung, ob die aufgrund der Rechts- und Verwaltungsvorschriften festgelegten Anforderungen an Beschaffenheit und Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind, nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und Analysemethoden durchgeführt.

(2) Gemäß der Richtlinie 70/524/EWG des Rates vom 23. November 1970 über Zusatzstoffe in der Tierernährung [2], zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 45/1999 der Kommission [3], muß der Gehalt an Amprolium und Diclazuril bei der Etikettierung angegeben werden, wenn diese Stoffe Vormischungen oder Futtermitteln zugesetzt werden. Die Zulassung für Carbadox zur Verwendung als Zusatzstoff in der Tierernährung wurde mit der Verordnung (EG) Nr. 2788/98 der Kommission vom 22. Dezember 1998 zur Änderung der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung hinsichtlich der Rücknahme der Zulassung bestimmter Wachstumsförderer [4] aufgehoben, und eine amtliche Kontrolle möglicher illegaler Verwendungen verbotener Substanzen ist erforderlich.

(3) Es sind gemeinschaftliche Analysemethoden für die Kontrolle dieser Stoffe festzulegen.

(4) Mit der Ersten Richtlinie 71/250/EWG der Kommission vom 15. Juni 1971 zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln [5], zuletzt geändert durch die Richtlinie 98/54/EG [6], wurden u.a. Analysemethoden für Senföl und Theobromin festgelegt. Angesichts des wissenschaftlichen und technischen Fortschritts sind die beschriebenen Methoden für ihren Bestimmungszweck nicht länger geeignet und daher zu streichen.

(5) Mit der Vierten Richtlinie 73/46/EWG der Kommission vom 5. Dezember 1972 zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln [7], zuletzt geändert durch die Richtlinie 98/54/EG, wurden u.a. Analysemethoden für die Bestimmung von Retinol (Vitamin A) festgelegt. Angesichts des wissenschaftlichen und technischen Fortschritts ist die beschriebene Methode für ihren Bestimmungszweck nicht länger geeignet und daher zu streichen.

(6) Mit der Fünften Richtlinie 74/203/EWG der Kommission vom 25. März 1974 zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln [8], geändert durch die Richtlinie 81/680/EWG [9], wurden Analysemethoden zur Bestimmung von Stärke und ihren Abbauprodukten mit hohem Molekulargewicht in Futtermitteln, die Schnitzel und Diffusionsschnitzel von Rüben, getrocknete Rübenblätter und Rübenköpfe, Kartoffelpülpe, Trockenhefe, inulinhaltige Erzeugnisse oder Grieben, Amprolium, Ethopabat, Dinitolmid, Nicarbazin und Menadion (Vitamin K3) enthalten, festgelegt. Angesichts des wissenschaftlichen und technischen Fortschritts sind alle beschriebenen Methoden für ihren Bestimmungszweck nicht länger geeignet. Diese Richtlinie ist daher aufzuheben.

(7) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermittelausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln auf ihren Gehalt an Amprolium, Diclazuril und Carbadox nach den im Anhang beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

[1] ABl. L 170 vom 3.8.1970, S. 2.
[2] ABl. L 270 vom 14.12.1970, S. 1.
[3] ABl. L 6 vom 12.1.1999, S. 3.
[4] ABl. L 347 vom 23.12.1998, S. 31.
[5] ABl. L 155 vom 12.7.1971, S. 13.
[6] ABl. L 208 vom 24.7.1998, S. 49.
[7] ABl. L 83 vom 30.3.1973, S. 21.
[8] ABl. L 108 vom 22.4.1974, S. 7.
[9] ABl. L 246 vom 29.8.1981, S. 32.

Artikel 2

Die Richtlinie 71/250/EWG wird wie folgt geändert:

1. In Artikel 1 werden die Worte „Senföl“ und „Theobromin“ gestrichen.
2. Die Punkte 8 und 13 des Anhangs werden gestrichen.

Artikel 3

Die Richtlinie 73/46/EWG wird wie folgt geändert:

1. Artikel 2 wird gestrichen.
2. Anhang II wird gestrichen.

Artikel 4

Die Fünfte Richtlinie 74/203/EWG wird aufgehoben.

Artikel 5

Die Mitgliedstaaten erlassen und veröffentlichen spätestens bis zum 31. Oktober 1999 die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um ihr nachzukommen. Sie setzen die Kommission davon unverzüglich in Kenntnis.

Sie wenden die Maßnahmen ab dem 1. November 1999 an.

Wenn die Mitgliedstaaten diese Vorschriften erlassen, nehmen sie in den Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf diese Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten dieser Bezugnahme.

Artikel 6

Diese Richtlinie tritt am zwanzigsten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Artikel 7

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 20. April 1999

Für die Kommission

Franz FISCHLER

Mitglied der Kommission

ANHANG

TEIL A

BESTIMMUNG VON AMPROLIUM

1-[(4-Amino-2-Propyl-5-pyrimidinyl)-Methyl]-2-Picoliniumchlorid Hydrochlorid

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Methode dient zur Bestimmung von Amprolium in Futtermitteln und Vormischungen. Die Nachweisgrenze beträgt 1 mg/kg, die Bestimmungsgrenze 25 mg/kg.

2. **Prinzip**

Die Probe wird mit einem Methanol-Wasser-Gemisch extrahiert. Nach Verdünnung mit der mobilen Phase und Membranfiltration wird der Amproliumgehalt mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) über ein Kationenaustauschermaterial unter Verwendung eines UV-Detektors bestimmt.

3. **Reagenzien**

3.1. Methanol

3.2. Acetonitril, HPLC-Qualität

3.3. Wasser, HPLC-Qualität

3.4. Natriumdihydrogenphosphatlösung, c = 0,1 mol/l

13,80 g Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat werden in einem 1 000-ml-Meßkolben in Wasser (3.3) gelöst, es wird bis zur Marke mit Wasser (3.3) aufgefüllt und gemischt.

3.5. Natriumperchloratlösung, c = 1,6 mol/l

224,74 g Natriumperchloratmonohydrat werden in einem 1 000-ml-Meßkolben in Wasser (3.3) gelöst, es wird bis zur Marke mit Wasser (3.3) aufgefüllt und gemischt.

3.6. Mobile Phase für die HPLC (siehe Bemerkung 9.1)

Mischung aus Acetonitril (3.2), Natriumdihydrogenphosphatlösung (3.4) und Natriumperchloratlösung (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V). Vor der Verwendung wird die Lösung durch einen 0,22 µm Membranfilter (4.3) filtriert und entgast (z. B. mindestens 15 Min. im Ultraschallbad (4.4)).

3.7. Standardsubstanz: Amprolium, rein, 1-[(4-Amino-2-Propylpyrimidin-5-yl)Methyl]-2-Methyl-Pyridinium Chlorid Hydrochlorid, E 750 (siehe 9.2)

3.7.1. Amprolium Standard-Stammlösung, 500 µg/ml

50 mg Amprolium (3.7) werden auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Meßkolben eingewogen, in 80 ml Methanol (3.l) gelöst und für 10 Min. in ein Ultraschallbad (4.4) gestellt. Nach der Ultraschallbehandlung wird die Lösung auf Raumtemperatur gebracht, es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und gemischt. Bei einer Temperatur von ≤ 4 °C bleibt die Lösung während eines Monats stabil.

3.7.2. Amprolium-Standard-Zwischenlösung, 50 µg/ml

5,0 ml der Standard-Stammlösung (3.7.1) werden in einen 50-ml-Meßkolben pipettiert, es wird bis zur Marke mit Extraktionslösung (3.8) aufgefüllt und gemischt. Bei einer Temperatur von ≤ 4 °C bleibt die Lösung während eines Monats stabil.

3.7.3. Kalibrierlösungen

0,5, 1,0 und 2,0 ml der Standard-Zwischenlösung (3.7.2) werden jeweils in einen 50-ml-Meßkolben pipettiert, es wird bis zur Marke mit der mobilen Phase (3.6) aufgefüllt und gemischt. Diese Lösungen enthalten jeweils 0,5, 1,0 und 2,0 µg Amprolium pro ml. Die Lösungen müssen vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

3.8. Extraktionslösung

Methanol (3.1)-Wasser-Mischung 2 + 1 (V + V)

4. **Geräte**

4.1. HPLC-Einrichtung mit Injektionssystem für Einspritzvolumina von 100 µl

4.1.1. Trennsäule für die Kationenaustauschchromatographie, Korngröße 10 µm, 125 mm × 4 mm, z. B. Nucleosil 10 SA, 10 µm, oder ähnlichem

4.1.2. UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung oder Diodenarray-Detektor

4.2. Membranfilter, PTFE-Material, 0,45 µm Porengröße

4.3. Membranfilter, 0,22 µm Porengröße

4.4. Ultraschallbad

4.5. Mechanisches Schüttelgerät oder Magnetrührer

5. **Durchführung**

5.1. *Allgemeines*

5.1.1. Blindprobe

Für die Durchführung des Wiederfindungstests (5.1.2) sollte eine Blindprobe untersucht werden, um zu prüfen, daß weder Amprolium noch Störsubstanzen vorhanden sind. Die Blindprobe sollte ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Amprolium oder Störsubstanzen sollten nicht nachweisbar sein.

5.1.2. Wiederfindungstest

Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe untersucht wird, die mit einer Amprolliummenge angereichert wurde, die der in der Probe vorhandenen Menge entspricht. Um auf einen Gehalt von 100 mg/kg anzureichern, werden 10,0 ml der Standard-Stammlösung (3.7.1) in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben überführt und die Lösung auf ungefähr 0,5 ml eingedampft. Dann werden 50 g der Blindprobe zugegeben. Es wird gründlich gemischt, für 10 Min. stehengelassen und nochmals mehrfach gemischt, bevor mit der Extraktion (5.2) begonnen wird.

Ist eine der zu untersuchenden Probe ähnliche Blindprobe nicht verfügbar (siehe 5.1.1), so kann ein Wiederfindungstest mit Hilfe des Additionsverfahrens durchgeführt werden. In diesem Fall wird die zu untersuchende Probe mit einer Amprolliummenge angereichert, die der bereits in der Probe vorhandenen Menge entspricht. Diese Probe wird zusammen mit der nicht angereicherten Probe untersucht, und die Wiederfindungsrate kann durch Subtraktion ermittelt werden.

5.2. *Extraktion*

5.2.1. Futtermittel und Vormischungen (Amproliumgehalt < 1 %)

Je nach Amproliumgehalt werden 5 bis 40 g der Probe auf 0,01 g genau in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 200 ml Extraktionslösung (3.8) versetzt. Der Kolben wird für 15 Min. in einem Ultraschallbad (4.4) behandelt und anschließend für 1 Std. auf dem Schüttelgerät geschüttelt oder auf dem Magnetrührer gerührt (4.5). Ein Aliquot des Extraktes wird mit der mobilen Phase (3.6) auf einen Amproliumgehalt von 0,5 bis 2 µg/ml verdünnt und gemischt (siehe Bemerkung 9.3). 5 bis 10 ml dieser verdünnten Lösung werden über einen Membranfilter (4.2) filtriert und anschließend für die HPLC-Bestimmung (5.3) verwendet.

5.2.2. Vormischungen (Amproliumgehalt ≥ 1 %)

Je nach Amproliumgehalt werden 1 bis 4 g der Vormischung auf 0,001 g genau in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 200 ml Extraktionslösung (3.8) versetzt. Der Kolben wird für 15 Min. in einem Ultraschallbad (4.4) behandelt und anschließend für 1 Std. auf dem Schüttelgerät geschüttelt oder auf dem Magnetrührer gerührt (4.5). Ein Aliquot des Extraktes wird mit der mobilen Phase (3.6) auf einen Amproliumgehalt von 0,5 bis 2 µg/ml verdünnt und gemischt. 5 bis 10 ml dieser verdünnten Lösung werden über einen Membranfilter (4.2) filtriert und anschließend für die HPLC-Bestimmung (5.3) verwendet.

5.3. *HPLC Bestimmung*

5.3.1. Parameter

Die folgenden Angaben sind Richtwerte, andere Parameter können verwendet werden, sofern sie zu vergleichbaren Ergebnissen führen.

Trennsäule für die Kationen-Austausch-chromatographie (4.1.1):	125 mm × 4 mm, z. B. Nucleosil 10 SA, 10 µm, oder ähnlichem
Mobile Phase (3.6):	Mischung aus Acetonitril (3.2), Natriumdihydrogenphosphatlösung (3.4) und Natriumperchloratlösung (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V)
Flußrate:	0,7 bis 1 ml/Min.
Detektionswellenlänge:	264 nm
Einspritzvolumen:	100 µl

Die Stabilität des chromatographischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.7.3), die 1,0 g/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erhalten werden.

5.3.2. Erstellung der Kalibrierkurve

Jede Kalibrierlösung (3.7.3) wird mehrmals eingespritzt, und die mittleren Peakhöhen (-flächen) werden für die einzelnen Konzentrationen gemessen. Es wird eine Kalibrierkurve erstellt, indem die mittleren Peakhöhen (-flächen) der Kalibrierlösungen auf der Ordinate und die dazugehörigen Konzentrationen in µg/ml auf der Abszisse aufgetragen werden.

5.3.3. Bestimmung der Probenlösung

Der Probenextrakt (5.2) wird mehrmals eingespritzt, wobei dasselbe Volumen wie für die Einspritzung der Kalibrierlösungen verwendet wird. Die mittlere Peakhöhe (-fläche) der Amproliumpeaks wird ermittelt.

6. Berechnung der Ergebnisse

Aus der mittleren Höhe (Fläche) der Amproliumpeaks der Probelösung wird anhand der Kalibrierkurve (5.3.2) die Konzentration der Probenlösung in µg/ml bestimmt.

Der Amproliumgehalt w in mg/kg der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{V \cdot \beta \cdot f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dabei ist:

V = Volumen der Proben-Extraktionslösung in ml gemäß 5.2 (d. h. 200 ml)

β = Amproliumkonzentration der Probenlösung (5.2) in µg/ml

f = Verdünnungsfaktor gemäß 5.2

m = Probeneinwaage in g

7. Überprüfung der Ergebnisse

7.1. *Identität*

Die Identität des Analyten kann durch Co-Chromatographie oder mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors bestätigt werden, wobei die Spektren der Probenlösung (5.2) und der Kalibrierlösung (3.7.3), die 2,0 µg/ml enthält, verglichen werden.

7.1.1. Co-Chromatographie

Eine Probenlösung (5.2) wird mit einer geeigneten Menge Kalibrierlösung (3.7.3) angereichert. Die zugesetzte Amproliummenge sollte dem Amproliumgehalt des Probenextraktes entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extrakts darf nur die Höhe des Amproliumpeaks vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe sollte nicht mehr als ± 10 % von der des ursprünglichen Amproliumpeaks des nicht angereicherten Probenextraktes abweichen.

7.1.2. Diodenarray-Detektion

Die Ergebnisse werden gemäß den nachstehenden Kriterien bewertet:

a) Die Wellenlänge bei maximaler Absorption des Proben- und des Standardspektrums an der Peakspitze des Chromatogramms muß innerhalb eines Bereichs übereinstimmen, der durch das Auflösungsvermögen des Detektionssystems bestimmt wird. Für die Diodenarray-Detektion beträgt dieser Bereich üblicherweise ± 2 nm.

b) Zwischen 210 und 320 nm dürfen sich das Proben- und das Standardspektrum an den Peakspitzen des Chromatogramms in den Bereichen zwischen 10 % und 100 % relativer Absorption nicht unterscheiden. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung zwischen den beiden Spektren an keiner Stelle mehr als 15 % der Absorption des Standardanalyten beträgt.

c) Zwischen 210 und 320 nm dürfen sich die Spektren des Probenextraktes im Anstieg, an der Spitze und im Abstieg des Probenpeaks in den Bereichen des Spektrums zwischen 10 bis 100 % relativer Absorption nicht unterscheiden. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung zwischen den beiden Spektren an keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Spektrums an der Peakspitze beträgt.

Wird eines dieser Kriterien nicht erfüllt, so gilt das Vorhandensein des Analyten als nicht bestätigt.

7.2. Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen bei ein und derselben Probe darf

— bei einem Amproliumgehalt zwischen 25 mg/kg und 500 mg/kg 15 % des höheren Resultats nicht überschreiten;

— bei einem Amproliumgehalt zwischen 500 mg/kg und 1 000 mg/kg 75 mg/kg nicht überschreiten;

— bei einem Amproliumgehalt von über 1 000 mg/kg 7,5 % des höheren Resultats nicht überschreiten.

7.3. Wiederfindungsrate

Bei einer angereicherten (Blind-) Probe sollte die Wiederfindungsrate mindestens 90 % betragen.

8. **Ergebnisse eines Ringversuchs**

Bei einem Ringversuch wurden drei Geflügelfutter (Proben 1 bis 3), ein Mineralfutter (Probe 4) und eine Vormischung (Probe 5) untersucht. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt.

	Probe 1 (Blindprobe)	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Mittelwert [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s_r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV_r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV_R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Sollgehalt [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: Anzahl der Laboratorien.

n: Anzahl der Einzelwerte.

s_r: Standardabweichung der Wiederholbarkeit.

CV_r: Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit.

s_R: Standardabweichung der Vergleichbarkeit.

CV_R: Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit.

9. **Bemerkungen**

9.1. Enthält die Probe Thiamin, so erscheint der Thiaminpeak in der Chromatographie kurz vor dem Amproliumpeak. Bei Anwendung dieser Methode sollten Amprolium und Thiamin getrennt werden. Sind Amprolium und Thiamin nicht durch die bei dieser Methode verwendete Säule getrennt (4.1.1), sollten bis zu 50 % des Acetonitrilanteils der mobilen Phase (3.6) durch Methanol ersetzt werden.

9.2. Gemäß dem britischen Arzneibuch zeigt das Spektrum einer Amproliumlösung (c = 0,02 mol/l) in Salzsäure (c = 0,1 mol/l) Maxima bei 246 nm und 262 nm. Die Absorption sollte bei 246 nm 0,84 und bei 262 nm 0,80 betragen.

9.3. Der Extrakt sollte immer mit der mobilen Phase verdünnt werden, da sich sonst die Retentionszeit des Amproliumpeaks durch Veränderungen der Innenstärke beträchtlich verschieben kann.

TEIL B

BESTIMMUNG VON DICLAZURIL

2,6-Dichlor-alfa-(4-chlorophenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3H)yl)benzenacetonitril

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode dient der Bestimmung von Diclazuril in Futtermitteln und Vormischungen. Die Nachweisgrenze beträgt 0,1 mg/kg, die Bestimmungsgrenze 0,5 mg/kg.

2. **Prinzip**

Nach Hinzufügen eines internen Standards wird die Probe mit salzsäurehaltigem Methanol extrahiert. Bei Futtermitteln wird ein Aliquot des Extraktes mit einer C18-Festphasen-Extraktionskartusche gereinigt. Diclazuril wird aus der Kartusche mit einem Gemisch aus salzsäurehaltigem Methanol und Wasser eluiert. Nach dem Einengen wird der Rückstand in DMF/Wasser gelöst. Bei Vormischungen wird der Extrakt eingeengt und der Rückstand in DMF/Wasser gelöst. Der Diclazurilgehalt wird mittels (ternärer) Gradienten-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) über eine Umkehrphase unter Verwendung eines UV-Detektors bestimmt.

3. **Reagenzien**

3.1. Wasser, HPLC-Qualität

3.2. Ammoniumacetat

3.3. Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBHS)

3.4. Acetonitril, HPLC-Qualität

3.5. Methanol, HPLC-Qualität

3.6. N,N-Dimethylformamid (DMF)

3.7. Salzsäure, ρ_{20} = 1,19 g/ml

3.8. Standardsubstanz: Diclazuril II-24: 2,6-Dichlor-alfa-(4-chlorophenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3H) yl)benzenacetonitril, garantiert rein, E 771,

3.8.1. Diclazuril Standard-Stammlösung, 500 µg/ml

25 mg Diclazuril Standardsubstanz (3.8) werden auf 0,1 mg genau in einen 50-ml-Meßkolben eingewogen, in DMF (3.6) gelöst, bis zur Marke mit DMF (3.6) aufgefüllt und gemischt. Der Meßkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt (oder ein Meßkolben aus braunem Glas verwendet) und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Temperatur von ≤ 4 °C bleibt die Lösung während eines Monats stabil.

3.8.2. Diclazuril-Standardlösung, 50 µg/ml

5,00 ml der Standard-Stammlösung (3.8.l.) werden in einen 50-ml-Meßkolben überführt, es wird bis zur Marke mit DMF (3.6) aufgefüllt und gemischt. Der Meßkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt (oder ein Meßkolben aus braunem Glas verwendet) und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Temperatur von ≤ 4 °C bleibt die Lösung während eines Monats stabil.

3.9. Interne Standardsubstanz: 2,6 Dichloro-α-(4-Chlorophenyl)-4-(4,5 Dihydro-3,5-Dioxo-1,2,4-Triazin-2 (3H) - yl) α-Methylbenzen-Acetonitril

3.9.1. Interne Standard-Stammlösung, 500 µg/ml

25 mg der internen Standardsubstanz (3.9) werden auf 0,1 mg genau in einen 50-ml-Meßkolben eingewogen, in DMF (3.6) gelöst, bis zur Marke mit DMF (3.6) aufgefüllt und gemischt. Der Meßkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt (oder ein Meßkolben aus braunem Glas verwendet) und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Temperatur von ≤ 4 °C bleibt die Lösung während eines Monats stabil.

3.9.2. Interne Standardlösung, 50 µg/ml

5,00 ml der internen Standard-Stammlösung (3.9.1.) werden in einen 50-ml-Meßkolben überführt, es wird bis zur Marke mit DMF (3.6) aufgefüllt und gemischt. Der Meßkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt (oder ein Meßkolben aus braunem Glas verwendet) und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Temperatur von ≤ 4 °C bleibt die Lösung während eines Monats stabil.

3.9.3. Interne Standardlösung für Vormischungen, p/1 000 mg/ml (p = Diclazuril-Sollgehalt in der Vormischung in mg/kg)

p/10 mg der internen Standardsubstanz werden auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Meßkolben eingewogen, mittels Ultraschallbad (4.6) in DMF (3.6) gelöst, bis zur Marke mit DMF (3.6) aufgefüllt und gemischt. Der Meßkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt (oder ein Meßkolben aus braunem Glas verwendet) und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Temperatur von ≤ 4 °C bleibt die Lösung während eines Monats stabil.

3.10. Kalibrierlösung, 2 µg/ml

2,00 ml Diclazuril-Standardlösung (3.8.2) und 2,00 ml interne Standardlösung (3.9.2) werden in einen 50-ml-Meßkolben pipettiert. Es werden 16 ml DMF (3.6) hinzugefügt, mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt und gemischt. Diese Lösung muß vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

3.11. C18-Festphasen-Extraktionskartusche, Sorptionsmenge 100 mg, z. B. Bond Elut

3.12. Extraktionslösung: salzsäurehaltiges Methanol

5,0 ml Salzsäure (3.7) werden in 1 000 ml Methanol (3.5) pipettiert und gemischt.

3.13. Mobile Phase für die HPLC

Elutionsmittel A: Ammoniumacetat-Tetrabutylammoniumhydrogensulfat-Lösung

3.13.1. 5 g Ammoniumacetat (3.2) und 3,4 g TBHS (3.3) werden in 1 000 ml Wasser (3.1) gelöst und gemischt.

3.13.2. Elutionsmittel B: Acetonitril (3.4)

3.13.3. Elutionsmittel C: Methanol (3.5)

4. **Geräte**

4.1. Mechanisches Schüttelgerät

4.2. HPLC Einrichtung für Ternärgradient

4.2.1. Trennsäule für die Umkehrphasenchromatographie, Korngröße 3 µm, 100 mm × 4,6 mm, z. B. Hypersil ODS oder ähnliches Material

4.2.2. UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung oder Diodenarray-Detektor

4.3. Vakuum-Rotationsverdampfer

4.4. Membranfilter, Porengröße 0,45 µm

4.5. Vakuumeinrichtung

4.6. Ultraschallbad

5. **Durchführung**

5.1. *Allgemeines*

5.1.1. Blindprobe

Es sollte eine Blindprobe untersucht werden, um zu prüfen, daß weder Diclazuril noch Störsubstanzen vorhanden sind. Die Blindprobe sollte ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Diclazuril oder Störsubstanzen sollten nicht nachweisbar sein.

5.1.2. Wiederfindungstest

Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe untersucht wird, die mit einer Diclazurilmenge angereichert wurde, die der in der Probe vorhandenen Menge entspricht. Um auf einen Gehalt von 1 mg/kg anzureichern, werden 0,1 ml der Standard-Stammlösung (3.8.1) zu 50 g der Blindprobe zugegeben. Es wird gründlich gemischt, für 10 Min. stehengelassen und nochmals mehrfach gemischt, bevor mit der Extraktion (5.2) begonnen wird.

Ist eine der zu untersuchenden Probe ähnliche Blindprobe nicht verfügbar (siehe 5.l.1), so kann ein Wiederfindungstest mit Hilfe des Additionsverfahrens durchgeführt werden. In diesem Fall wird die zu untersuchende Probe mit einer Diclazurilmenge angereichert, die der bereits in der Probe vorhandenen Menge entspricht. Diese Probe wird zusammen mit der nicht angereicherten Probe untersucht, und die Wiederfindungsrate kann durch Substraktion ermittelt werden.

5.2. *Extraktion*

5.2.1. Futtermittel

50 g der Probe werden auf 0,01 g genau eingewogen und in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben überführt. Es werden 1,00 ml der internen Standardlösung (3.9.2) und 200 ml Extraktionslösung (3.12) hinzugefügt und der Kolben verschlossen. Die Mischung wird über Nacht auf dem Schüttler (4.1) geschüttelt und anschließend 10 Min. stehengelassen. Ein Aliquot von 20 ml der überstehenden Lösung wird in einen geeigneten Glasbehälter überführt und mit 20 ml Wasser verdünnt. Diese Lösung wird auf eine Extraktionskartusche (3.11) gegeben und mittels Vakuum (4.5) hindurch gesaugt. Die Kartusche wird mit 25 ml einer Mischung aus Extraktionslösung (3.12) und Wasser, 65 + 35 (V + V) ausgewaschen. Die gesammelten Fraktionen werden verworfen, der Wirkstoff und der interne Standard werden mit 25 ml einer Mischung aus Extraktionslösung (3.12) und Wasser, 80 + 20 (V + V) eluiert. Diese Fraktion wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (4.3) bei 60 °C und vermindertem Druck zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in 1,0 ml DMF (3.6) gelöst, es werden 1,5 ml Wasser (3.1) hinzugefügt und gemischt. Die Lösung wird über einen Membranfilter (4.4) filtriert und anschließend für die HPLC-Bestimmung (5.3) verwendet.

5.2.2. Vormischungen

1 g der Probe wird auf 0,001 g genau eingewogen und in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben überführt. Es werden 1,00 ml interne Standardlösung (3.9.3) und 200 ml Extraktionslösung (3.12) hinzugefügt, und der Kolben wird verschlossen. Die Mischung wird über Nacht auf dem Schüttler (4.1) geschüttelt und anschließend 10 Min. stehengelassen. Ein 10 000/p-ml-Aliquot (p = Diclazuril-Sollgehalt in der Vormischung in mg/kg) überstehenden Lösung wird in einen Rundkolben von geeigneter Größe überführt. Es wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (4.3) bei vermindertem Druck und 60 °C zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in 10,0 ml DMF (3.6) gelöst, es werden 15,0 ml Wasser hinzugefügt (3.1) und gemischt. Anschließend wird die HPLC-Bestimmung (5.3) durchgeführt.

5.3. *HPLC-Bestimmung*

5.3.1. Parameter

Die folgenden Angaben sind Richtwerte; andere Parameter können verwendet werden, sofern sie zu vergleichbaren Ergebnissen führen:

— Flüssigkeitschromatographiesäule (4.2.1.):	100 mm × 4,6 mm, gepackt mit Hypersil ODS, 3 µm, oder ähnlichem Material	
— Mobile Phase:	Elutionsmittel A (3.13.1):	Wäßrige Lösung aus Ammoniumacetat und Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
	Elutionsmittel B (3.13.2):	Acetonitril
	Elutionsmittel C (3.13.3):	Methanol

— Elutionsart:	— lineare Gradientenelution
	— Ausgangsbedingungen: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)
	— nach 10 Min. Gradientenelution während 30 Min. bis: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)
	10 Min. lang mit B spülen
— Durchflußrate:	1,5 bis 2 ml/Min.
— Einspritzvolumen:	20 µl
— Detektionswellenlänge:	280 nm

Die Stabilität des chromatographischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.10), die 2 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erhalten werden.

5.3.2. Bestimmung der Kalibrierlösung

20 µl der Kalibrierlösung (3.10) werden mehrmals eingespritzt, und die mittlere Peakhöhe (-fläche) für Diclazuril und den internen Standard wird bestimmt.

5.3.3. Bestimmung der Probenlösung

20 µl der Probenlösung (5.2.1, oder 5.2.2) werden mehrmals eingespritzt, und die mittlere Peakhöhe (-fläche) für Diclazuril und den internen Standard wird bestimmt.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

6.1. Futtermittel

Der Diclazurilgehalt w (mg/kg) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\beta_{d,c} \cdot 10V}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dabei ist

$h_{d,s}$ = Peakhöhe (-fläche) von Diclazuril in der Probenlösung (5.2.1)

$h_{i,s}$ = Peakhöhe (-fläche) des internen Standards in der Probenlösung (5.2.1)

$h_{d,c}$ = Peakhöhe (-fläche) von Diclazuril in der Kalibrierlösung (3.10)

$h_{i,c}$ = Peakhöhe (-fläche) des internen Standards in der Kalibrierlösung (3.10)

$\beta_{d,c}$ = Diclazuril-Konzentration in der Kalibrierlösung in µg/ml (3.10)

m = Probeneinwaage in g

V = Volumen des Probenextraktes gemäß 5.2.1 (d. h. 2,5 ml)

6.2. Vormischungen

Der Diclazurilgehalt w (mg/kg) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\beta_{d,c} \cdot 0{,}02V.p}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dabei ist

$h_{d,s}$ = Peakhöhe (-fläche) von Diclazuril in der Probenlösung (5.2.2)

$h_{i,s}$ = Peakhöhe (-fläche) des internen Standards in der Probenlösung (5.2.2)

$h_{d,c}$ = Peakhöhe (-fläche) von Diclazuril in der Kalibrierlösung (3.10)

$h_{i,c}$ = Peakhöhe (-fläche) des internen Standards in der Kalibrierlösung (3.10)

$\beta_{d,c}$ = Diclazuril-Konzentration in der Kalibrierlösung (3.10)

m = Probeneinwaage in g

V = Volumen des Probenextraktes gemäß 5.2.1 (d. h. 2,5 ml)

p = Diclazuril-Sollgehalt in mg/kg in der Vormischung

7. **Überprüfung der Ergebnisse**

7.1. *Identität*

Die Identität des Analyten kann durch Co-Chromatographie oder mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors bestätigt werden, wobei die Spektren des Probenextrakts (5.2.1 oder 5.2.2) und der Kalibrierlösung (3.10) verglichen werden.

7.1.1. Co-Chromatographie

Ein nach 5.2.1 oder 5.2.2 aufbereiteter Probenextrakt wird mit einer geeigneten Menge Kalibrierlösung (3.10) angereichert. Die zugesetzte Diclazurilmenge sollte dem Diclazurilgehalt des Probenextraktes entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extraktes darf nur die Höhe des Diclazurilpeaks und des Peaks des internen Standards vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe sollte nicht mehr als ± 10 % von der des ursprünglichen Diclazurilpeaks oder Standardpeaks des nicht angereicherten Probenextraktes abweichen.

7.1.2. Diodenarray-Detektion

Die Ergebnisse werden gemäß den nachstehenden Kriterien beurteilt:

a) Die Wellenlänge bei maximaler Absorption des Proben- und des Standardspektrums an der Peakspitze des Chromatogramms muß innerhalb eines Bereichs übereinstimmen, der durch das Auflösungsvermögen des Detektionssystems bestimmt wird. Für die Diodenarray-Detektion beträgt dieser Bereich üblicherweise ± 2 nm.

b) Zwischen 230 und 320 nm dürfen sich das Proben- und das Standardspektrum an den Peakspitzen des Chromatogramms in den Bereichen zwischen 10 % und 100 % relativer Absorption nicht unterscheiden. Diese Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung zwischen den beiden Spektren an keiner Stelle mehr als 15 % der Absorption des Standardanalyten beträgt.

c) Zwischen 230 und 320 nm dürfen sich die Spektren des Probenextraktes im Anstieg, an der Spitze und im Abstieg des Probenpeaks in den Bereichen des Spektrums zwischen 10 bis 100 % relativer Absorption nicht unterscheiden. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung zwischen den Spektren an keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Spektrums an der Peakspitze beträgt.

Wird eines dieser Kriterien nicht erfüllt, so gilt das Vorhandensein des Analyten als nicht bestätigt.

7.2. Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen bei ein und derselben Probe darf folgende Werte nicht überschreiten:

— 30 % des höheren Wertes für Diclazurilgehalte zwischen 0,5 mg/kg und 2,5 mg/kg,

— 0,75 mg/kg für Diclazurilgehalte zwischen 2,5 mg/kg und 5 mg/kg,

— 15 % des höheren Wertes für Diclazurilgehalte von mehr als 5 mg/kg.

7.3. Wiederfindungsrate

Bei einer angereicherten (Blind-) Probe sollte die Wiederfindungsrate mindestens 80 % betragen.

8. **Ergebnisse eines Ringversuchs**

Bei einem Ringversuch wurden 5 Proben von 11 Laboratorien untersucht. Diese Proben bestanden aus zwei Tormischungen, von denen eine mit einer organischen (O 100) und die andere mit einer anorganischen Matrix (A 100) gemischt war. Der theoretische Diclazurilgehalt liegt bei 100 mg/kg. Die drei Geflügelfertigfutter stammten von 3 verschiedenen Herstellern (NL) (L1/Z1/K1). Der theoretische Diclazurilgehalt liegt bei 1 mg/kg. Die Laboratorien wurden beauftragt, jede der Proben ein oder zweimal zu untersuchen. (Genauere Angaben über diesen Ringversuch sind dem Journal of AOAC International, Volume 77, 1994, S. 1359-361, zu entnehmen.) Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt:

	Probe 1 A 100	Probe 2 O 100	Probe 3 L 1	Probe 4 Z 1	Probe 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Mittelwert	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S_r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV_r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S_R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV_R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Sollgehalt (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = Anzahl der Laboratorien.
n = Anzahl der Einzelwerte.
S_r = Standardabweichung der Wiederholbarkeit.
CV_r = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit.
S_R = Standardabweichung der Vegleichbarkeit.
CV_R = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit.

9. **Bemerkungen**

Es muß vorab erwiesen sein, daß das Diclazurilsignal im linearen Konzentrationsbereich liegt.

TEIL C

BESTIMMUNG VON CARBADOX

Methyl 3-(2-Chinoxalinylmethylen)Carbazat N^1,N^4-Dioxid

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Diese Methode dient zur Bestimmung von Carbadox in Futtermitteln, Vormischungen und Zubereitungen. Die Nachweisgrenze beträgt 1 mg/kg, die Bestimmungsgrenze 10 mg/kg.

2. **Prinzip**

Die Probe wird mit Wasser vorbehandelt und anschließend mit Methanol-Acetonitril extrahiert. Bei Futtermitteln wird ein Aliquot des filtrierten Extraktes auf einer Aluminiumoxid-Säule gereinigt. Bei Vormischungen und Zubereitungen wird ein Aliquot des filtrierten Extraktes direkt mit einem Gemisch aus Wasser, Methanol und Acetonitril auf eine geeignete Konzentration verdünnt. Der Carbadoxgehalt wird mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) über ein Umkehrphasenmaterial unter Verwendung eines UV-Detektors bestimmt.

3. **Reagenzien**

3.1. Methanol

3.2. Acetonitril, HPLC-Qualität

3.3. Essigsäure, w = 100 %

3.4. Aluminiumoxid: neutral, Aktivität I

3.5. Methanol-Acetonitril 1 + 1 (V + V)

500 ml Methanol (3.1) werden mit 500 ml Acetonitril (3.2) gemischt.

3.6. Essigsäure, σ = 10 %

10 ml Essigsäure (3.3) werden mit 100 ml Wasser gemischt.

3.7. Natriumacetat, CH_3COONa

3.8. Wasser, HPLC-Qualität

3.9. Acetat-Pufferlösung, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0

0,82 g Natriumacetat (3.7) werden in 700 ml Wasser (3.8) gelöst, und der pH-Wert wird mit Essigsäure (3.6) auf 6,0 eingestellt. Die Lösung wird in einen 1 000-ml-Meßkolben überführt, es wird bis zur Marke mit Wasser (3.8) aufgefüllt und gemischt.

3.10. Mobile Phase für die HPLC

825 ml der Acetat-Pufferlösung (3.9) werden mit 175 ml Acetonitril (3.2) vermischt. Die Lösung wird über einen 0,22 µm Filter (4.5) filtriert und entgast (z. B. durch 10 Min. im Ultraschallbad).

3.11. Standardsubstanz:

Carbadox, rein, Methyl 3-(2-Chinoxalinylmethylen) Carbazat N^1,N^4-Dioxid, E 850

3.11.1. Carbadox Standard-Stammlösung, 100 µg/ml (siehe Punkt 5. Durchführung)

25 mg Carbadox Standardsubstanz (3.11) werden auf 0,1 mg genau in einen 250-ml-Meßkolben eingewogen und im Ultraschallbad (4.7) in Methanol-Acetonitril (3.5) gelöst. Nach der Ultraschallbehandlung wird die Lösung auf Raumtemperatur gebracht, es wird bis zur Marke mit Methanol-Acetonitril (3.5) aufgefüllt und gemischt. Der Kolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt (oder ein Meßkolben aus braunem Glas verwendet) und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Temperatur von ≤ 4 °C bleibt diese Lösung während eines Monats stabil.

3.11.2. Kalibrierlösungen

2,0, 5,0, 10,0 und 20,0 ml der Standard-Stammlösung (3.11.1) werden jeweils in einen 100-ml-Meßkolben überführt. Es werden jeweils 30 ml Wasser hinzugefügt, es wird bis zur Marke mit Methanol-Acetonitril (3.5) aufgefüllt und gemischt. Der Kolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt. Diese Lösungen enthalten jeweils 2,0, 5,0, 10,0 und 20,0 µg/ml Carbadox. Kalibrierlösungen müssen vor Gebrauch frisch bereitet werden.

Anmerkung: Für die Bestimmung von Carbadox in Futtermitteln, die weniger als 10 mg/kg enthalten, müssen Kalibrierlösungen mit einer Konzentration von weniger als 2,0 µg/ml bereitet werden.

3.12. Wasser-[Methanol-Acetonitril] (3.5)-Gemisch, 300 + 700 (V + V)

300 ml Wasser werden mit 700 ml des Methanol-Acetonitril Gemisches (3.5) vermischt.

4. **Geräte**

4.1. Mechanisches Schüttelgerät oder Magnetrührer

4.2. Glasfaser-Filterpapier, z. B. Whatman GF/A oder ähnliches

4.3. Glassäule (Länge 300 bis 400 mm, Innendurchmesser etwa 10 mm) mit Sinterglasfritte und Auslaufhahn

Anmerkung: Eine Glassäule mit Hahn oder eine konisch zulaufende Glassäule können ebenfalls verwendet werden; in diesem Fall wird ein kleiner Glaswollestopfen in den unteren Teil der Säule eingebracht.

4.4. HPLC- Einrichtung mit Injektionssystem für ein Einspritzvolumen von 20 µl

4.4.1. Trennsäule für die Umkehrphasenchromatographie, Korngröße 10 µm, 300 mm × 4 mm, gepackt mit C18-Material

4.4.2. UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung oder Diodenarray-Detektor mit einem Meßbereich von 225 bis 400 nm

4.5. Membranfilter, 0,22 µm Porengröße

4.6. Membranfilter, 0,45 µm Porengröße

4.7. Ultraschallbad

5. **Durchführung**

Amnerkung: Carbadox ist lichtempfindlich. Alle Schritte sind daher bei gedämpften Licht durchzuführen, oder er sind braune Glaswaren zu verwenden bzw. die Glaswaren mit Aluminiumfolie zu umwickeln.

5.1. *Allgemeines*

5.1.1. Blindprobe

Für die Durchführung des Wiederfindungstests (5.l.2) sollte eine Blindprobe untersucht werden, um zu prüfen, daß weder Carbadox noch Störsubstanzen vorhanden sind. Die Blindprobe sollte ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Carbadox oder Störsubstanzen sollten nicht nachweisbar sein.

5.1.2. Wiederfindungstest

Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe (5.1.1) untersucht wird, die mit einer Carbadoxmenge angereichert wurde, die der in der Probe vorhandenen Menge entspricht. Um auf einen Gehalt von 50 mg/kg anzureichern, werden 5,0 ml der Standard-Stammlösung (3.11.1) in einen 200-ml-Erlenmeyerkolben gegeben. Die Lösung wird in einem Stickstoffstrom auf ca. 0,5 ml eingeengt. Es werden 10 g der Blindprobe zugegeben, es wird gemischt und für 10 Min. stehengelassen, bevor mit der Extraktion (5.2) begonnen wird.

Ist eine der zu untersuchenden Probe ähnliche Blindprobe nicht verfügbar (siehe 5.1.1), so kann ein Wiederfindungstest mit Hilfe des Additionsverfahrens durchgeführt werden. In diesem Fall wird die zu untersuchende Probe mit einer Carbadoxmenge angereichert, die der bereits in der Probe vorhandenen Menge entspricht. Diese Probe wird zusammen mit der nicht angereicherten Probe untersucht, und die Wiederfindungsrate kann durch Subtraktion ermittelt werden.

5.2. *Extraktion*

5.2.1. Futtermittel

10 g der Probe werden auf 0,01 g genau in einen 200-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Es werden 15,0 ml Wasser hinzugefügt, es wird gemischt und 5 Min. stehengelassen. Dann werden 35,0 ml Methanol-Acetonitril (3.5) hinzugefügt, der Kolben wird verschlossen und anschließend 30 Min. auf dem Schüttelgerät geschüttelt oder auf dem Magnetrührer (4.1) gerührt. (4.1). Die Lösung wird über ein Glasfaser-Filterpapier (4.2) filtriert und ist so für die Reinigung (5.3) bereit.

5.2.2. Vormischungen (0,1 bis 2,0 %)

1 g der ungemahlenen Probe werden auf 0,001 g genau in einen 200-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Es werden 15,0 ml Wasser hinzugefügt, gemischt und 5 Min. stehengelassen. Dann werden 35,0 ml Methanol-Acetonitril (3.5) hinzugefügt, der Kolben wird verschlossen und 30 Min. auf dem Schüttelgerät geschüttelt oder auf dem Magnetrührer (4.1) gerührt. Die Lösung wird über ein Glasfaser-Filterpapier (4.2) filtriert. Ein Aliquot des Filtrats wird in einen 50-ml-Meßkolben gegeben. Es werden 15,0 ml Wasser hinzugefügt, bis zur Marke mit Methanol-Acetonitril (3.5) aufgefüllt und gemischt. Die Carbadox-Konzentration der fertigen Lösung sollte bei etwa 10 µg/ml liegen. Ein Aliquot wird über einen 0,45 µm Membranfilter (4.6) filtriert und anschließend für die HPLC-Bestimmung (5.4) verwendet.

5.2.3. Zubereitungen (> 2 %)

0,2 g der unzerkleinerten Probe werden auf 0,001 g genau in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Es werden 45,0 ml Wasser hinzugefügt, gemischt und 5 Min. stehengelassen. Dann werden 105,0 ml Methanol-Acetonitril (3.5) hinzugefügt. Der Kolben wird verschlossen für 15 Min. in ein Ultraschallbad (4.7) gesetzt und anschließend 15 Min. auf dem Schüttelgerät geschüttelt oder auf dem Magnetrührer gerührt (4.1). Die Lösung wird über Glasfaser-Filterpapier (4.2) filtriert. Ein Aliquot des Filtrats wird mit dem Wasser-Methanol-Acetonitril-Gemisch (3.12) verdünnt, um eine Carbadoxkonzentration von 10 bis 15 µg/ml zu erhalten (für eine 10%ige Zubereitung ist der Verdünnungsfaktor 10). Ein Aliquot wird über einen 0,45 µm, Membranfilter (4.6) filtriert und anschließend für die HPLC-Bestimmung (5.4) verwendet.

5.3. *Reinigung*

5.3.1. Vorbereitung der Aluminiumoxid-Säule

4 g Aluminiumoxid (3.4) werden in die Glassäule (4.3) eingebracht.

5.3.2. Reinigung der Probe

15 ml des filtrierten Extrakts (5.2.1) werden auf die Aluminiumoxid-Säule gegeben und die ersten 2 ml des Eluats werden verworfen. Die folgenden 5 ml werden aufgefangen, ein Aliquot davon über einen 0,45 µm Membranfilter (4.6) filtriert und anschließend für die HPLC-Bestimmung (5.4) verwendet.

5.4. *HPLC-Bestimmung*

5.4.1. Parameter

Die folgenden Angaben sind Richtwerte; andere Parameter können verwendet werden, sofern sie zu vergleichbaren Ergebnisse führen:

Trennsäule für die Umkehrphasenchromatographie (4.1.1):	300 mm × 4 mm, gepackt mit C18, 10 µm
Mobile Phase (3.10):	Mischung aus Acetat-Pufferlösung (3.9) und Acetonitril (3.2), 825 + 175 (V + V)
Flußrate:	1,5 bis 2 ml/Min.
Einspritzvolumen:	20 µl
Detektionswellenlänge:	365 nm

Die Stabilität des chromatographischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.11.2), die 5,0 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erhalten werden.

5.4.2. Kalibrierkurve

Jede Kalibrierlösung (3.11.2) wird mehrmals eingespritzt und die Peakhöhen (-flächen) für die jeweilige Konzentration gemessen. Es wird eine Kalibrierkurve erstellt, indem die mittleren Peakhöhen (-flächen) auf der Ordinate und die dazugehörigen Konzentrationen in µg/ml auf der Abszisse aufgetragen werden.

5.4.3. Probenlösung

Der Probenextrakt [(5.3.2) für Futtermittel, (5.2.2) für Vormischungen und (5.2.3) für Zubereitungen] wird mehrmals eingespritzt und die mittlere Peakhöhe (-fläche) der Carbadoxpeaks ermittelt.

6. Berechnung der Ergebnisse

Aus der mittleren Höhe (Fläche) der Carbadoxpeaks der Probenlösung wird anhand der Kalibrierkurve (5.4.2) die Konzentration der Probenlösung in µg/ml bestimmt.

6.1. Futtermittel

Der Carbadoxgehalt w (mg/kg) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{ß \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dabei ist:

ß = Carbadoxkonzentration des Probenextrakts (5.3.2) in µg/ml

V_1 = Extraktionsvolumen (d. h. 50 ml)

m = Probeneinwaage in g

6.2. Vormischungen und Zubereitungen

Der Carbadoxgehalt w (mg/kg) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{ß \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dabei ist:

ß = Carbadoxkonzentration des Probenextraks (5.2.2 oder 5.2.3) in µg/ml

V_2 = Extraktionsvolumen (d. h. 50 ml für Vormischungen; 150 ml für Zubereitungen)

f = Verdünnungsfaktor gemäß 5.2.2 (Vormischungen) oder 5.2.3 (Zubereitungen)

m = Probeneinwaage in g

7. **Überprüfung der Ergebnisse**

7.1. Identität

Die Identität des Analyten kann durch Co-Chromatographie oder mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors bestätigt werden, wobei die Spektren des Probenextraktes und der Kalibrierlösung (3.11.2), die 10,0 µg/ml enthält, verglichen werden.

7.1.1. Co-Chromatographie

Ein Probenextrakt wird mit einer geeigneten Menge Kalibrierlösung (3.11.2) angereichert. Die zugesetzte Carbadoxmenge sollte dem Carbadoxgehalt des Probenextraktes entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extraktes darf nur die Höhe des Carbadoxpeaks vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe sollte nicht mehr als ± 10 % von der des ursprünglichen Carbadoxpeaks abweichen.

7.1.2. Diodenarray-Detektion

Die Ergebnisse werden gemäß den nachstehenden Kriterien beurteilt:

a) Die Wellenlänge bei maximaler Absorption des Proben- und des Standardspektrums an der Peakspitze des Chromatogramms muß innerhalb eines Bereichs übereinstimmen, der durch das Auflösungsvermögen des Detektionssystems bestimmt wird. Für die Diodenarray-Detektion beträgt dieser Bereich üblicherweise ± 2 nm.

b) Zwischen 225 und 400 nm dürfen sich das Proben- und das Standardspektrum an den Peakspitzen des Chromatogramms in den Bereichen zwischen 10 % und 100 % relativer Absorption nicht unterscheiden. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung zwischen den beiden Spektren an keiner Stelle mehr als 15 % der Absorption des Standardanalyten beträgt.

c) Zwischen 225 und 400 nm dürfen sich die Spektren des Probenextraktes im Anstieg, an der Spitze und im Abstieg des Probenpeaks in den Bereichen des Spektrums zwischen 10 bis 100 % relativer Absorption nicht unterscheiden. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung zwischen den Spektren an keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Spektrums an der Peakspitze beträgt.

Wird eines dieser Kriterien nicht erfüllt, so gilt das Vorhandensein des Analyten als nicht bestätigt.

7.2. Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen bei ein und derselben Probe darf bei einem Carbadoxgehalt von 10 mg/kg und mehr 15 % des höheren Wertes nicht überschreiten.

7.3. Wiederfindungsrate

Bei einer angereicherten (Blind-) Probe sollte die Wiederfindungsrate mindestens 90 % betragen.

8. **Ergebnisse eines Ringversuchs**

Bei einem Ringversuch wurden 6 Futtermittel, 4 Vormischungen und 3 Zubereitungen von 8 Laboratorien untersucht. Jede Probe wurde zweifach untersucht (Genauere Angaben über diesen Ringversuch sind dem Journal of the AOAC, Volume 71, 1988, S. 484-490, zu entnehmen.) Die Ergebnisse (mit Ausnahme von Ausreißern) sind nachstehend zusammengefaßt:

Tabelle 1: Ergebnisse des Ringversuchs für Futtermittel

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
L	8	8	8	8	8	8
N	15	14	15	15	15	15
Mittelwert (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S_r (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S_R (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Sollgehalt (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabelle 2: Ergebnisse des Ringversuchs für Vormischungen und Zubereitungen

	Vormischungen				Zubereitungen		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
N	14	14	14	14	16	16	16
Mittelwert (mg/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r (mg/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R (mg/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV_R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Sollgehalt (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: Anzahl der Laboratorien.
n: Anzahl der Einzelwerte.
S_r: Standardabweichung der Wiederholbarkeit.
CV_r: Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit.
S_R: Standardabweichung der Vergleichbarkeit.
CV_R: Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit.