RICHTLINIE 98/64/EG DER KOMMISSION

vom 3. September 1998

zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die Bestimmung von Aminosäuren, Rohfetten und Olaquindox in Futtermitteln und zur Änderung der Richtlinie 71/393/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:

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.

Gemäß der Richtlinie 79/373/EWG des Rates vom 2. April 1979 über den Verkehr mit Mischfuttermitteln [2], zuletzt geändert durch die Richtlinie 97/47/EG der Kommission [3], und der Richtlinie 93/74/EWG des Rates vom 13. September 1993 über Futtermittel für besondere Ernährungszwecke [4], zuletzt geändert durch die Richtlinie 96/25/EG [5], müssen Aminosäuren und Rohfette auf dem Etikett der Futtermittel angegeben werden.

Außerdem schreibt die Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung [6], zuletzt geändert durch die Richtlinie 98/19/EG der Kommission [7], vor, daß der Olaquindoxgehalt bei der Etikettierung angegeben werden muß, wenn dieser Stoff Mischfuttermitteln zugesetzt wird.

Mit der Zweiten Richtlinie 71/393/EWG der Kommission vom 18. November 1971 zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln [8], zuletzt geändert durch die Richtlinie 84/4/EWG [9], werden u. a. Analysemethoden zur Bestimmung von Rohfetten festgelegt. Es ist angezeigt, diese Methode zu ändern.

Es ist eine gemeinschaftliche Analysemethode für die Kontrolle dieser Stoffe festzulegen.

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 Aminosäuren, Rohfetten und Olaquindox nach der im Anhang beschriebenen Methode durchgeführt werden.

Artikel 2

Im Anhang der Richtlinie 71/393/EWG wird Teil 4 „Bestimmung von Rohfett" durch den Teil B des Anhangs der vorliegenden Richtlinie ersetzt.

Artikel 3

(1) Die Mitgliedstaaten erlassen und veröffenltichen spätestens bis zum 31. Dezember 1998 die erfordelrichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie nachzukommen. Sie setzen die Kommission davon unverzüglich in Kenntnis.

Sie wenden diese Vorschriften ab 1. Januar 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.

[1] ABl. L 170 vom 3. 8. 1970, S. 2.
[2] ABl. L 86 vom 6. 4. 1979, S. 30.
[3] ABl. L 211 vom 5. 8. 1997, S. 45.
[4] ABl. L 237 vom 22. 9. 1993, S. 23.
[5] ABl. L 125 vom 23. 5. 1996, S. 35.
[6] ABl. L 270 vom 14. 12. 1970, S. 1.
[7] ABl. L 96 vom 28. 3. 1998, S. 39.
[8] ABl. L 279 vom 20. 12. 1971, S. 7.
[9] ABl. L 15 vom 18. 1. 1984, S. 28.

(2) Die Mitgliedstaaten teilen der Kommission den Wortlaut der wichtigsten innerstaatlichen Rechtsvorschriften mit, die sie auf dem unter diese Richtlinie fallenden Gebiet erlassen.

Artikel 4

Diese Richtlinie tritt am 20. Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Artikel 5

Diese Richtlinie ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 3. September 1998

Für die Kommission
Franz FISCHLER
Mitglied der Kommission

ANHANG

TEIL A

BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN

1 **Zweck und Anwendungsbereich**

Das Verfahren dient zur Bestimmung von freien (synthetischen und natürlichen) und proteingebundenen Aminosäuren in Futtermitteln unter Verwendung eines Aminosäureanalysators. Das Verfahren ist für folgende Aminosäuren anwendbar. Cyst(e)in, Methionin, Lysin, Threonin, Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin und Valin.

Das Verfahren unterscheidet nicht zwischen Salzen von Aminosäuren und kann die D- und L-Formen der Aminosäuren nicht unterscheiden. Es ist nicht für die Bestimmung von Tryptophan oder Hydroxyanalogen der Aminosäuren anwendbar.

2 **Prinzip**

2.1 *Freie Aminosäuren*

Die freien bzw. zugesetzten Aminosäuren werden mit verdünnter Salzsäure extrahiert. Mitextrahierte stickstoffhaltige Makromoleküle werden mit Sulfosalicylsäure ausgefällt und durch Filtrieren entfernt. Die filtrierte Lösung wird auf einen pH-Wert von 2,20 eingestellt. Die Aminosäuren werden durch Ionenaustauschchromatographie getrennt und nach Reaktion mit Ninhydrin durch photometrischen Nachweis bei 570 nm (440 nm für Prolin) bestimmt.

2.2 *Gesamtaminosäuren*

Das gewählte Verfahren hängt von den zu untersuchenden Aminosäuren ab. Cyst(e)in und Methionin müssen vor der Hydrolyse zu Cysteinsäure und Methioninsulfon oxidiert werden. Tyrosin muß im Hydrolysat der nicht oxidierten Probe bestimmt werden. Alle übrigen unter 1 genannten Aminosäuren können aus dem Hydrolysat der oxidierten oder nicht oxidierten Probe bestimmt werden.

Die Oxidation wird bei 0 °C mit einer Perameisensäure-Phenol-Mischung durchgeführt. Überschüssiges Oxidationsreagenz wird mit Natriumdisulfit zerstört. Die oxidierte bzw. nicht oxidierte Probe wird mit Salzsäure (c = 6 mol/l) 23 h hydrolysiert. Das Hydrolysat wird auf einen pH-Wert von 2,20 eingestellt. Die Aminosäuren werden durch Ionenaustauschchromatographie getrennt und nach Reaktion mit Ninhydrin photometrisch bei 570 nm (für Prolin 440 nm) bestimmt.

3 **Reagenzien**

Es soll bi-destilliertes Wasser oder Wasser gleichwertiger Qualität verwendet werden (Leitfähigkeit < 10 µS).

3.1 Wasserstoffperoxid, w = 30 %.

3.2 Ameisensäure, w = 98-100 %.

3.3 Phenol.

3.4 Natriumdisulfit.

3.5 Natriumhydroxid.

3.6 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat.

3.7 Salzsäure, p_{20} = 1,18 g/ml.

3.8 Tri-Natriumcitrat-Dihydrat.

3.9 2,2′-Thiodiethanol (Thiodiglycol).

3.10 Natriumchlorid.

3.11 Ninhydrin.

3.12 Petroleumbenzin, Siedebereich 40-60 °C.

3.13 Norleucin oder sonstige für die Verwendung als interner Standard geeignete Substanzen.

3.14 Stickstoff (< 10 ppm Sauerstoff).

3.15 1-Octanol.

3.16 Aminosäuren.

3.16.1 Standardsubstanzen gemäß Auflistung unter Nummer 1. Es dürfen nur Verbindungen ohne Kristallwasser verwendet werden. Sie sind vor der Verwendung im Vakuum über P_2O_5 oder H_2SO_4 eine Woche zu trocknen.

3.16.2 Cysteinsäure.

3.16.3 Methioninsulfon.

3.17 Natriumhydroxidlösung, c = 7,5 mol/l:

300 g NaOH (3.5) werden im Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

3.18 Natriumhydroxidlösung, c = 1 mol/l:

40 g NaOH (3.5) werden in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

3.19 Phenolhaltige Ameisensäurelösung:

889 g Ameisensäure (3.2) werden mit 111 g Wasser gemischt, und es werden 4,73 g Phenol (3.3) hinzugefügt.

3.20 Hydrolysemischung, c = 6 mol HCl/l unter Zusatz von 1 g Phenol/l:

Zu 492 ml HCl (3.7) wird 1 g Phenol (3.3) hinzugefügt und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

3.21 Extraktionslösung, c = 0,1 mol HCl/l, 2 % Thiodiglycol enthaltend:

8,2 ml HCl (3.7) werden in ca. 900 ml Wasser gegeben, 20 ml Thiodiglycol (3.9) hinzugefügt, und es wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt (3.7 und 3.9 dürfen nicht unmittelbar gemischt werden).

3.22 5-Sulfosalicylsäurelösung, ß = 6 %:

60 g 5-Sulfosalicylsäure (3.6) werden in Wasser gelöst und es wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

3.23 Oxidationsmischung (Perameisensäure-Phenol):

0,5 ml Wasserstoffperoxid (3.1) werden mit 4,5 ml phenolhaltiger Ameisensäurelösung (3.19) in einem kleinen Becherglas gemischt. Es wird bei 20 °C bis 30 °C 1 h stehengelassen, um die Bildung von Perameisensäure zu bewirken. Anschließend wird die Lösung 15 min. in ein Eisbad gestellt und dann sofort verwendet.

Vorsicht: Hautkontakt vermeiden und Schutzkleidung tragen.

3.24 Citratpufferlösung, c = 0,2 mol Na^+/l, pH 2,20:

19,61 g Natriumcitrat (3.8), 5 ml Thiodiglycol (3.9), 1 g Phenol (3.3) und 16,50 ml HCl (3.7) werden in ca. 800 ml Wasser gelöst. Es wird auf PH 2,20 eingestellt und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

3.25 Elutionspuffer entsprechend den Bedingungen des verwendeten Gerätes (4.9).

3.26 Ninhydrinreagenz entsprechend den Bedingungen des verwendeten Gerätes (4.9).

3.27 Aminosäuren-Standardlösungen: Diese Lösungen sind bei < 5 °C aufzubewahren.

3.27.1 Standard-Stammlösung der Aminosäuren (3.16.1), c = 2,5 µmol/ml je Aminosäure in Salzsäure, c = 0,1 mol/l: Diese Lösung ist im Handel erhältlich.

3.27.2 Standard-Stammlösung von Cysteinsäure und Methioninsulfon, c = 1,25 µmol/ml:

0,2115 g Casteinsäure (3.16.2) und 0,2265 g Methioninsulfon (3.16.3) werden in Citratpufferlösung (3.24) in einem 1 000-ml-Meßkolben gelöst, und es wird mit Citratpufferlösung bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung ist bei < 5 °C höchstens 12 Monate aufzubewahren. Sie wird nicht benötigt, falls die Standardlösung (3.27.1) bereits Cysteinsäure und Methioninsulfon enthält.

3.27.3 Stammlösung des internen Standards, z. B. Norleucin, c = 20 µmol/ml:

0,6560 g Norleucin (3.13) werden in Citratpufferlösung (3.24) in einem 250-ml-Meßkolben gelöst, und es wird mit Citratpufferlösung bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist bei < 5 °C höchstens sechs Monate haltbar.

3.27.4 Aminosäurenkalibrierlösung zur Verwendung bei Hydrolysaten gemäß 5.3.3.2, c = 5 nmol/50 µl Cysteinsäure und Methioninsulfon und c = 10 nmol/50 µl der übrigen Aminosäuren:

2,2 g Natriumchlorid (3.10) werden in einem 100-ml-Becherglas in 30 ml Citratpufferlösung (3.24) gelöst. Es werden 4,00 ml Standard-Stammlösung der Aminosäuren (3.27.1), 4,00 ml Standard-Stammlösung von Cysteinsäure und Methinoninsulfon (3.27.2), und, falls verwendet, 0,50 ml Stammlösung des internen Standards (3.27.3) hinzugefügt. Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid (3.18) auf 2,20 eingestellt.

Die Lösung wird mit Citratpufferlösung quantitativ ineinen 50-ml-Meßkolben überführt, mit Citratpufferlösung bis zur Marke aufgefüllt und gemischt.

Die Lösung ist bei < 5 °C höchstens drei Monate lang aufzubewahren.

Siehe auch Bemerkungen unter 9.1.

3.27.5 Aminosäurenkalibrierlösung zur Verwendung bei Hydrolysaten gemäß 5.3.3.1 und bei Extrakten gemäß 5.2: Die Kalibrierlösung wird gemäß 3.27.4 hergestellt, jedoch ohne Zugabe von Natriumchlorid.

Die Lösung ist bei < 5 °C höchstens drei Monate lang aufzubewahren.

4 Geräte

4.1 100- oder 250-ml-Rundkolben mit Rückflußkühler.

4.2 100-ml-Borosilikat-Glasflaschen mit Schraubverschluß mit teflonbeschichteter Dichtung (z. B. Duran, Schott).

4.3 Trockenschrank, auf ± 2 °C regelbar.

4.4 pH-Meter.

4.5 Membranfilter, 0,2 µm Porengröße.

4.6 Zentrifuge.

4.7 Vakuumrotationsverdampfer.

4.8 Schüttelmaschine oder Magnetrührer.

4.9 Aminosäureanalysator oder HPLC-Gerät mit Ionenaustauschersäule, Einrichtung für Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung und Photometer.

Die Säule wird mit sulfoniertem Polystyrolharz gefüllt, das die Trennung der einzelnen Aminosäuren und deren Abtrennung von sonstigen Ninhydrin-positiven Substanzen ermöglicht. Die Pumpen für die Ninhydrin- und für die Pufferlösungen müssen über den Zeitraum des Eichlaufes und des Probenlaufes eine Flußstabilität von ± 0,5 % gewährleisten.

Einige Aminosäureanalysatoren können auch verwendet werden, wenn die Hydrolysate Natriumionenkonzentrationen von c = 0,8 mol/l aufweisen und die restliche Ameisensäure des Oxidationsschrittes enthalten. Andere Analysatoren bieten keine befriedigende Abtrennung bestimmter Aminosäuren, falls das Hydrolysat überschüssige Ameisensäure und/oder hohe Natriumionenkonzentrationen aufweist. In diesem Fall wird das Säurevolumen nach der Hydrolyse und vor der pH-Wert-Einstellung durch Einengen auf ca. 5 ml reduziert. Das Einengen sollte unter Vakuum bei max. 40 °C vorgenommen werden.

5 Durchführung

5.1 *Vorbereitung der Probe*

Die Probe wird so zerkleinert, daß sie vollständig durch ein Sieb mit 0,5 mm Maschenweite hindurchgeht. Feuchte Proben müssen vor dem Vermahlen entweder bei einer Temperatur von max. 50 °C oder durch Gefriertrocknung getrocknet werden. Proben mit hohem Fettgehalt müssen mit Petrolether (3.12) vor dem Vermahlen extrahiert werden.

5.2 *Bestimmung der freien Aminosäuren*

1 g bis 5 g der vorbereitenden Probe (5.1) werden auf 0,2 mg genau in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, und es werden 100 ml Extraktionslösung (3.21) hinzugefügt. Die Mischung wird unter Verwendung einer Schüttelmaschine oder eines Magnetrührers (4.8) 1 h geschüttelt. Nach dem Absetzenlassen werden mit einer Pipette 10,0 ml der überstehenden Lösung in ein 100-ml-Becherglas gegeben.

Es werden 5,0 ml Sulfosalicyclsäurelösung (3.22) unter Rühren hinzugefügt, und mit Hilfe des Magnetrührers wird 5 min. weitergerührt. Die überstehende Lösung wird filtriert oder zentrifugiert, um etwaige Ausfällungen zu entfernen. 10,0 ml der klaren Lösung werden in ein 100-ml-Becherglas gegeben, und unter Verwendung von Natriumhydroxidlösung (3.18) wird der pH-Wert auf 2,20 eingestellt. Die Lösung wird mit Citratpufferlösung (3.24) in einen Meßkolben geeigneter Größe überführt und mit Citratpufferlösung bis zur Marke aufgefüllt.

Bei Verwendung eines internen Standards werden vor dem Auffüllen 1,00 ml der internen Standardlösung (3.27.3) für jeweils 100 ml Endlösung hinzufügt.

Es wird nach 5.4 „Chromatographie“ weiterverfahren.

Wird der Extrakt nicht am selben Tag chromatographiert, ist er bei $< 5\,^{\circ}C$ aufzubewahren.

5.3 *Bestimmung der Gesamtaminosäuren*

5.3.1 Oxidation vor der Hydrolyse (zur Bestimmung von Methionin und Cystein)

Es werden 0,1 g bis 1 g der vorbereiteten Probe (5.1) auf 0,2 mg genau eingewogen:

— in einen 100-ml-Rundkolben (4.1) für die offene Hydrolyse (5.3.2.3) oder

— in einen 250-ml-Rundkolben (4.1) für die offene Hydrolyse (5.3.3.1), falls eine niedrige Natriumionenkonzentration erforderlich ist, oder

— in eine 100-ml-Flasche mit Schraubverschluß (4.2) für die geschlossene Hydrolyse (5.3.2.4).

Die Einwaage sollte einen Stickstoffgehalt von ca. 10 mg und einen Feuchtigkeitsgehalt von höchstens 100 mg aufweisen.

Der Kolben/die Flasche wird in ein Eiswasserbad gestellt und auf 0 °C abgekühlt. Dann werden 5 ml der Oxidationsmischung (3.23) hinzugefügt, und es wird mit Hilfe eines Glasspatels mit gebogener Spitze gemischt. Der Behälter, der den Spatel enthält, wird mit einem luftdichten Film verschlossen, das Eiswasserbad mit dem verschlossenen Behälter in einen Kühlschrank von 0 °C gestellt und 16 h stehengelassen. Anschließend wird das überschüssige Oxidationsreagenz durch Zusatz von 0,84 g Natriumdisulfit (3.4) zersetzt.

Es wird nach 5.3.2.1 weiterverfahren.

5.3.2 Hydrolyse

5.3.2.1 Hydrolyse der oxidierten Probe:

Zu der oxidierten Probe (5.3.1) werden 25 ml Hydrolysemischung (3.20) gegeben. Dabei ist darauf zu achten, daß alle Probenrückstände, die an den Seitenwänden des Gefäßes sowie am Spatel haften, abgewaschen werden. je nach dem verwendeten Hydrolyseverfahren wird gemäß 5.3.2.3 oder 5.3.2.4 weiterverfahren.

5.3.2.2 Hydrolyse der nicht oxidierten Probe:

In einen 100-ml- oder 250-ml-Rundkolben (4.1) bzw. in eine 100-ml-Flasche mit Schraubverschluß (4.2) werden 0,1 g bis 1 g der vorbereiteten Probe (5.1) auf 0,2 mg genau eingewogen. Die Einwaage sollte einen Stickstoffgehalt von ca. 10 mg aufweisen. Es werden 25 ml Hydrolysemischung (3.20) hinzugefügt und mit der Probe gemischt. Dabei ist darauf zu achten, daß die Probe vollständig benetzt ist. Es wird entweder nach 5.3.2.3 oder nach 5.3.2.4 weiterverfahren.

5.3.2.3 Offene Hydrolyse (Rückflußhydrolyse):

Zu der nach 5.3.2.1 oder 5.3.2.2 hergestellten Mischung werden drei Glasperlen hinzugegeben. Es wird zum Sieden erhitzt und unter Rückfluß genau 23 h im Sieden gehalten. Nach Beendigung der Hydrolyse wird der Rückflußkühler mit 5 ml Citratpufferlösung (3.24) gespült und der abgehängte Kolben im Eisbad gekühlt. Es wird gemäß 5.3.3 weiterverfahren.

5.3.2.4 Geschlossene Hydrolyse:

Die Flasche mit der nach 5.3.2.1 oder 5.3.2.2 vorbereiteten Mischung wird bei 110 °C in den Trockenschrank (4.3) gestellt. Um einen durch Gasentwicklung hervorgerufenen Druckaufbau zu vermeiden, wird der Schraubdeckel während der ersten Stunde nur lose auf die Flasche gelegt. *Die Flasche darf nicht verschlossen werden.* Nach 1 h wird die Flasche mit dem Deckel fest verschlossen und 23 h im Trockenschrank bei 110 °C belassen. Nach Beendigung der Hydrolyse wird die Flasche aus dem Trockenschrank genommen, der Verschluß vorsichtig geöffnet, die Flasche in ein Eiswasserbad gestellt und abkühlen gelassen.

Je nach dem Verfahren für die pH-Wert-Einstellung (5.3.3) wird der Inhalt der Flasche quantitativ mit Citratpufferlösung (3.24) in ein 250-ml-Becherglas oder in einen 250-ml-Rundkolben überführt.

Es wird nach 5.3.3 weiterverfahren.

5.3.3 pH-Wert-Einstellung

Je nach der Natriumionentoleranz des Aminosäureanalysators (4.9) wird die pH-Wert-Einstellung nach 5.3.3.1 oder 5.3.3.2 vorgenommen.

5.3.3.1 Für Aminosäureanalysatoren (4.9), die eine niedrige Natriumionenkonzentration erfordern:

Werden Aminosäureanalysatoren verwendet, bei denen eine geringe Natriumionenkonzentration erforderlich ist (wenn also das Säurevolumen reduziert werden muß), wird die Verwendung eines internen Standards (3.27.3) empfohlen.

In diesem Fall sind dem Hydrolysat 2,00 ml der internen Standardlösung (3.27.3) hinzuzufügen.

Zu dem nach 5.3.2.3 oder 5.3.2.4 erhaltenen Hydrolysat werden zwei Tropfen 1-Octanol (3.15) gegeben.

Das Volumen wird am Rotationsverdampfer (4.7) unter vermindertem Druck bei 40 °C auf 5 bis 10 ml reduziert. Wurde das Volumen beim Einengen auf weniger als 5 ml reduziert, wird das Hydrolysat verworfen und die Analyse wiederholt.

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxidlösung (3.18) auf 2,20 eingestellt, und es wird nach 5.3.4 weiterverfahren.

5.3.3.2 Für alle sonstigen Aminosäurenanalysatoren (4.9):

Das nach 5.3.2.3 oder 5.3.2.4 erhaltene Hydrolysat wird durch vorsichtige Zugabe unter Rühren von 17 ml Natriumhydroxidlösung (3.17) teilweise neutralisiert, wobei eine Temperatur von unter 40 °C eingehalten werden muß.

Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxidlösung (3.17 und 3.18) bei Raumtemperatur auf 2,20 eingestellt, und es wird nach 5.3.4 weiterverfahren.

5.3.4 Probenlösung für die Chromatographie

Das auf pH 2,20 eingestellte Hydrolysat (5.3.3.1 oder 5.3.3.2) wird mit Citratpufferlösung (3.24) quantitativ in einen 200-ml-Meßkolben überführt und mit Citratpufferlösung bis zur Marke aufgefüllt.

Falls interner Standard bisher noch nicht hinzugefügt worden ist, werden vor dem Auffüllen 2,00 ml des internen Standards (3.27.3) hinzugegeben. Es wird sorgfältig gemischt.

Nach 5.4 „Chromatographie“ weiterverfahren.

Falls die Problemlösung nicht am selben Tag chromatographiert wird, ist sie bei < 5 °C aufzubewahren.

5.4 *Chromatographie*

Falls erforderlich, wird der Extrakt (5.2) oder das Hydrolysat (5.3.4) vor der Chromatographie auf Raumtemperatur gebracht. Die Mischung wird geschüttelt und eine geeignete Menge durch einen Membranfilter (4.5) filtriert. Die erhaltene klare Lösung wird der Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung eines Aminosäureanalysators bzw. HPLC-Gerätes (4.9) unterzogen.

Die Einspritzung kann von Hand oder automatisch erfolgen. Wesentlich ist, daß jeweils die gleiche Menge $\pm$ 0,5 % der Standardlösung und Probenlösung eingespritzt werden, es sei den, es wird ein interner Standard verwendet. Das Verhältnis der Konzentrationen von Natriumionen und Aminosäuren sollte in der Standard- und der Probenlösung so ähnlich wie möglich sein.

Die Häufigkeit von Kalibrationsläufen hängt vor allem von der Stabilität des Ninhydrinreagenzes und des Analysator-Systems ab. Die Standardlösung oder die Probenlösung wird mit Citratpufferlösung (3.24) so verdünnt, daß die Peakfläche des Standards etwa 30 %—200 % der Peakfläche der einzelnen Aminosäuren in der Probenlösung ausmacht.

Die Chromatographie der Aminosäuren unterschiedet sich leicht je nach Art der verwendeten Geräte und des eingesetzten Harzes. Das System muß in der Lage sein, die Aminosäuren vollständig voneinander und von den sonstigen Ninhydrin-positiven Inhaltsstoffen zu trennen. Im Arbeitsbereich muß das chromatographische System einen linearen Respons aufweisen.

Wird eine equimolare Lösung der zu bestimmenden Aminosäuren analysiert, sollten bei der Chromatographie die unten angegebenen Verhältnisse von Tal zu Peakhöhe zwischen den überlappenden Peaks erreicht werden. Diese equimolare Lösung muß mindestens 30 % der maximalen Menge jeder Aminosäure enthalten, die mit dem jeweiligen Aminosäureanalysator noch präzise bestimmt werden kann.

Bei der Trennung von Threonin und Serin sollte das Verhältnis von Tal zur Peakhöhe des niedrigeren der zwei sich überlappenden Peaks auf dem Chromatogramm nicht mehr als 2 : 10 betragen. Für alle übrigen Aminosäuren sollte die Trennung besser als 1 : 10 sein.

Das System muß gewährleisten, daß Lysin von „Lysinartefakten“ und Omithin abgetrennt wird.

6 **Berechnung der Ergebnisse**

Die Flächen der Proben- und der Kalibrationstandardpeaks werden für jede einzelne Aminosäure bestimmt und der Gehalt in g Aminosäure je kg Probe berechnet:

$$\frac{A \times E \times MG \times F}{B \times W \times 1\,000} = \text{g Aminosäure je kg Probe}$$

Bei Verwendung eines internen Standards ist mit $\frac{D}{C}$ zu mulitiplizieren.

A = Peakfläche der zu bestimmenden Aminosäure im Extrakt (5.2) oder in der Probenlösung (5.3.4),

B = Peakfläche der zu bestimmenden Aminosäure in der Aminosäurenkalibrierlösung (3.27.4 oder 3.27.5),

C = Peakfläche des internen Standards im Extrakt (5.2) oder in der Probenlösung (5.3.4),

D = Peakfläche des internen Standards in der Aminosäurenkalibrierlösung (3.27.4 oder 3.27.5),

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Aminosäure,

E = Konzentration der Aminosäurenkalibrierlösung (3.27.4 oder 3.27.5) in µmol/ml,

W = g Probeneinwaage (auf Originalgewicht berichtigt, falls getrocknet oder entfettet),

F = Gesamtvolumen in ml der Probenlösung (5.3.4) oder nach 6.1 errechnetes Gesamtverdünnungsvolumen in ml des Extrakts (5.2).

Sowohl Cystin als auch Cystein werden im Hydrolysat der oxidierten Probe als Cysteinsäure bestimmt, jedoch als Cystin ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, MG 240,30) unter Verwendung des MG von 120,15 (0,5 × 240,30) berechnet.

Methionin wird als Methioninsulfon im Hydrolysat der oxidierten Probe bestimmt, aber unter Verwendung des MG von Methionin (149,21) als Methionin berechnet.

Zugesetztes freies Methionin wird nach Extraktion als Methionin bestimmt, wobei für die Berechnung das gleiche MG verwendet wird.

6.1 Das Gesamtverdünnungsvolumen (F) des Extraktes für die Bestimmung von freien Aminosäuren (5.2) wird wie folgt berechnet:

$$F = 100\ ml \times \frac{(10\ ml + 5ml)}{10\ ml} \times \frac{Vml}{10\ ml}$$

V = Volumen des Endextrakts (5.2).

7 Beurteilung des Verfahrens

Das Verfahren ist in einem auf internationaler Ebene im Jahr 1990 durchgeführten Vergleichstest an drei verschiedenen Futtermitteln (Mischfuttermittel für Schweine, Mischfuttermittel für Mastküken und Eiweißkonzentrat) und einer Vormischung erprobt worden. Die nach der Eliminierung von Ausreißern erhaltenen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Mittelwerte in g/kg

Referenzmaterial	Aminosäure			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Schweinefutter	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Mastkükenmischfutter	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Eiweißkonzentrat	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Vormischung	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = Anzahl der beteiligten Laboratorien.

7.1 *Wiederholbarkeit*

Für die untersuchten Aminosäuren wurde die Wiederholbarkeit ermittelt. Sie ist, ausgedrückt als Wiederholstandardabweichung, für den obengenannten Vergleichstest in der folgenden Tabelle dargestellt.

Wiederholstandardabweichung (S_r) in g/kg

Referenzmaterial	Aminosäure			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Schweinefutter	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Mastkükenmischfutter	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Eiweißkonzentrat	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Vormischung	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = Anzahl der beteiligten Laboratorien.

Wiederholvariationskoeffizient (%)

Referenzmaterial	Aminosäure			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Schweinefutter	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Mastkükenmischfutter	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Eiweißkonzentrat	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Vormischung	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = Anzahl der beteiligten Laboratorien.

7.2 *Vergleichbarkeit*

Die Ergebnisse der Vergleichstandardabweichung, die sich aus den obengenannten Untersuchungen ergeben, sind in nachstehender Tabelle wiedergegeben.

Vergleichstandardabweichung (S_R) in g/kg

Referenzmaterial	Aminosäure			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Schweinefutter	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Mastkükenmischfutter	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Eiweißkonzentrat	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Vormischung	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = Anzahl der beteiligten Laboratorien.

Vergleichvariationskoeffizient (%)

Referenzmaterial	Aminosäure			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Schweinefutter	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Mastkükenmischfutter	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Eiweißkonzentrat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Vormischung	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = Anzahl der beteiligten Laboratorien.

8 **Verwendung von Referenzmaterialien**

Die korrekte Anwendung der Methode soll durch Mehrfachbestimmungen an zertifizierten Referenzmaterialien, soweit verfügbar, überprüft werden. Für die Kalibration wird die Verwendung einer zertifizierten Aminosäurestandardlösung empfohlen.

9 **Bemerkung**

9.1 Wegen der Unterschiede zwischen den Aminosäureanalysatoren sind die Endkonzentrationen der Aminosäurenkalibrierlösungen (3.27.4 und 3.27.5) und der Probenlösung (5.3.4) als Richtwerte anzusehen.

Der lineare Reaktionsbereich des Geräts muß für alle Aminosäuren geprüft werden.

Die Standardlösung wird mit Citratpufferlösung verdünnt, um Spitzenwerte in der Mitte des Bereichs zu erhalten.

9.2 Falls Geräte für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Analyse der Hydrolysate eingesetzt werden, sind die Versuchsbedingungen gemäß den Empfehlungen des Herstellers zu optimieren.

9.3 Wird diese Methode für Futtermittel angewandt, die mehr als 1 % Chlorid enthalten (Kraftfutter, Mineralfutter, Ergänzungsfutter), so kann der Methioningehalt unterschätzt werden, und es ist eine modifizierte Oxidation erforderlich.

TEIL B

4. BESTIMMUNG VON ROHFETT

1 **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode dient zur Bestimmung des Rohfettgehalts von Futtermitteln. Sie bezieht sich nicht auf die Untersuchung von Ölsaaten und Ölfrüchten im Sinne der Verordnung (EWG) Nr. 136/66 des Rates.

Je nach Art und Zusammensetzung des Futtermittels sowie dem Zweck der Untersuchung ist eines der beiden nachstehend beschriebenen Verfahren anzuwenden.

1.1 *Verfahren A — Direkt extrahierbares Rohfett*

Das Verfahren ist anzuwenden bei Einzelfuttermitteln pflanzlicher Herkunft mit Ausnahme derjenigen, die in den Anwendungsbereich von Verfahren B fallen.

1.2 *Verfahren B — Gesamtrohfett*

Das Verfahren ist anzuwenden bei Einzelfuttermitteln tierischen Ursprungs und bei allen Mischfuttermitteln. Es ist außerdem bei allen Materialien anzuwenden, aus denen Fett ohne vorherige Hydrolyse nicht vollständig extrahiert werden kann, z. B. Kleber, Hefen, Kartoffeleiweiß und Erzeugnissen, die Verfahren unterzogen wurden wie Extrudieren, Flockieren und Erhitzen.

1.3 *Auswertung*

In allen Fällen, in denen mit Verfahren B ein höheres Ergebnis erzielt wird als mit Verfahren A, gilt das mit Verfahren B erhaltene Ergebnis als der richtige Wert.

2 Prinzip

2.1 *Verfahren A*

Die Probe wird mit Petrolether extrahiert. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand getrocknet und gewogen.

2.2 *Verfahren B*

Die Probe wird heiß mit Salzsäure behandelt. Die Mischung wird abgekühlt und filtriert. Der gewaschene und getrocknete Rückstand wird nach dem Verfahren A weiterbehandelt.

3 Reagenzien

3.1 Petrolether mit einem Siedebereich von 40-60 °C. Die Bromzahl muß weniger als 1 und der Abdampfrückstand weniger als 2 mg/100 ml betragen.

3.2 Natriumsulfat, wasserfrei.

3.3 Salzsäure, c = 3 mol HCl/l.

3.4 Filtrationsmittel, z. B. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4 Geräte

4.1 Extraktionsapparat: Sofern das Gerät mit einem Siphon (Soxhletapparat) ausgestattet ist, muß die Rückflußmenge so bemessen sein, daß das Lösungsmittel mindestens zehnmal in der Stunde abläuft; wenn es sich um ein Gerät ohne Siphon handelt, muß die Rückflußmenge etwa 10 ml pro Minute betragen.

4.2 Extraktionshülsen: Diese müssen frei sein von petroletherlöslichen Stoffen und eine Porosität besitzen, die den Forderungen unter 4.1 entspricht.

4.3 Trockenschrank: Vakuumtrockenschrank, einstellbar auf 75 °C ± 3 °C, oder Lufttrockenschrank, einstellbar auf 100 °C ± 3 °C.

4.4 Mikrowellengerät.

5 Ausführung

5.1 *Verfahren A (für Proben mit hohem Fettgehalt siehe Bemerkung 8.1)*

5 g der Probe werden auf 1 mg genau abgewogen, dann in eine Extraktionshülse (4.2) übergeführt und mit einem fettfreien Wattebausch abgedeckt.

Die Hülse wird in einen Extraktionsapparat (4.1) gebracht und sechs Stunden mit Petrolether (3.1). extrahiert, wobei der Petroletherextrakt in einem trockenen, mit einigen Stückchen Bimsstein [1] versehenen, tarierten Kolben aufgefangen wird.

Nach beendeter Extraktion wird das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand mit Kolben anschließend 1,5 Stunden in einem Trockenschrank (4.3) getrocknet und nach dem Abkühlen in einem Exsikkator gewogen. Durch eine zweite Trocknung von 30 Minuten Dauer ist zu prüfen, ob das Gewicht des Fettes konstant geblieben ist (der Gewichtsverlust zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wägungen muß unter 1 mg bleiben).

5.2 *Verfahren B*

2,5 g der Probe (siehe Bemerkung 8.2) werden auf 1 mg genau abgewogen und in ein 400-ml-Becherglas oder einen 300-ml-Erlenmeyerkolben gebracht. Anschließend werden 100 ml Salzsäure, c = 3 mol/l (3.3), und einige Stückchen Bimsstein hinzugefügt. Das Becherglas wird mit einem Uhrglas abgedeckt, bzw. dem Erlenmeyerkolben wird ein Rückflußkühler aufgesetzt. Das Gemisch wird auf kleiner Flamme oder auf einer Heizplatte bis zum Siedepunkt erhitzt und eine Stunde schwach siedengelassen. Es muß vermieden werden, daß das Material an den Wänden des Gefäßes ansetzt.

Dann wird abgekühlt und so viel vom Filtrationsmittel (3.4) zugesetzt, daß beim Filtrieren kein Fettverlust eintritt. Filtriert wird unter Verwendung zweier ineinandergelegter feuchter fettfreier Papierfilter. Der Rückstand wird bis zur neutralen Reaktion mit kaltem Wasser gewaschen. Danach ist zu prüfen, ob das Filtrat noch Fett enthält. Vorhandensein von Fett zeigt, daß vor der Hydrolyse eine Extraktion der Probe mit Petrolether nach Verfahren A vorzunehmen ist.

Der doppelte Papierfilter mit dem Rückstand ist auf ein Uhrglas zu legen und ca. 1,5 Stunden bei 100 °C ± 3 °C im Trockenschrank oder bei 75 °C ± 3 °C im Vakuumtrockenschrank (4.3) zu trocknen.

Der doppelte Filter mit dem trockenen Rückstand wird in eine Extraktionshülse (4.2) gebracht und mit einem fettfreien Wattebausch bedeckt. Die Hülse wird in einen Extraktionsapparat (4.1) eingesetzt. Dann wird wie unter 5.1 Unterabsätze 2 und 3 beschrieben fortgefahren.

[1] Wenn das Fett später qualitativ untersucht werden soll, sind die Bimssteinstückchen durch Glasperlen zu ersetzen.

6 **Berechnung der Ergebnisse**

Das Gewicht des Rückstands wird in Hundertteilen (Prozenten) der Probe ausgedrückt.

7 **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier Parallelbestimmungen (eines Analytikers) sollte bei derselben Probe bei Gehalten an Rohfett von

— bis zu 5 v. H.: 0,2 v. H. absolut,

— 5 bis 10 v. H.: 4,0 v. H. des höheren Resultats,

— mehr als 10 v. H.: 0,4 v. H. absolut

nicht überschreiten

8 **Bemerkungen**

8.1 Bei Erzeugnissen mit hohem Fettgehalt, die schwer zu zerkleinern sind oder sich zur Entnahme einer reduzierten homogenen Probe nicht eignen, ist folgendermaßen zu verfahren:

20 g der Probe werden auf 1 mg genau abgewogen und mit 10 g oder mehr wasserfreiem Natriumsulfat (3.2) gemischt. Dann wird mit Petrolether (3.1) wie unter 5.1 beschrieben extrahiert. Der dabei aufgefangene Extrakt wird mit Petrolether (3.1) auf 500 ml aufgefüllt und gemischt. Von der Lösung werden 50 ml entnommen und in einen kleinen, trockenen, mit Bimssteinkörnchen versehenen ([1]) und tarierten Kolben gebracht. Das Lösungsmittel wird abdestilliert; dann wird wie unter 5.1 letzter Unterabsatz beschrieben getrocknet und weiterverfahren.

Der Extraktionsrückstand in der Hülse wird vom Lösungsmittel befreit und auf 1 mm zerkleinert. Das Material wird in die Extraktionshülse zurückgebracht (kein Natriumsulfat hinzufügen). Dann wird wie unter 5.1 Unterabsätze 2 und 3 beschrieben fortgefahren.

Der Rohfettgehalt, ausgedrückt in Hundertteilen der Probe, wird nach folgender Formel ermittelt:

$(10\ a + b) \times 5$

Darin sind:

a = Rückstandsmasse in Gramm nach der ersten Extraktion (aliquoter Teil des Extraktes),

b = Rückstandsmasse in Gramm nach der zweiten Extraktion.

8.2 Bei fettarmen Erzeugnissen kann mit einer Einwaage von 5 g gearbeitet werden.

8.3 Heimtierfutter mit hohem Wassergehalt müssen vor der Hydrolyse und Extraktion nach Verfahren B möglicherweise mit wasserfreiem Natriumsulfat gemischt werden.

8.4 In 5.2 kann die Verwendung von heißem statt kaltem Wasser zum Waschen des Rückstands nach der Filtration möglicherweise wirksamer sein.

8.5 Die Trocknungszeit von 1,5 Stunden muß bei einigen Futtermitteln möglicherweise verlängert werden. Übermäßiges Trocknen ist zu vermeiden, da dies zu niedrigen Ergebnissen führen kann. Es kann auch ein Mikrowellengerät (4.4) verwendet werden.

8.6 Bei einem Rohfettgehalt von mehr als 15 v. H. wird eine Extraktion nach Verfahren A vor der Hydrolyse und eine erneute Extraktion nach Verfahren B empfohlen.

TEIL C

BESTIMMUNG VON OLAQUINDOX

(N-(2-Hydroxyethyl)-3-Methyl-2-Chinoxalin-Carboxamid-1,4-Dioxid)

1 **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode dient zur Bestimmung von Olaquindox in Futtermitteln. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 5 mg/kg.

2 **Prinzip**

Die Probe wird mit einem Methanol-Wasser-Gemisch extrahiert. Der Gehalt an Olaquindox wird durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) unter Verwendung eines UV-Detektors bestimmt.

([1]) Wenn das Fett später qualitativ untersucht werden soll, sind die Bimssteinstückchen durch Glasperlen zu ersetzen.

3 **Reagenzien**

3.1 Methanol.

3.2 Methanol für die HPLC.

3.3 Wasser für die HPLC.

3.4 Mobile Phase für die HPLC:

Wasser (3.3)-Methanol (3.2)-Gemisch, z. B. 900 + 100 (V + V).

3.5 Standard-Substanz: Olaquindox, rein, N-(2-Hydroxyethyl)-3-Methyl-2-Chinoxalin-Carboxamid-1,4-Dioxid, E 851.

3.5.1 Olaquindox Standard-Stammlösung, 250 µg/ml:

50 mg Olaquindox (3.5) werden auf 0,1 mg genau in einen 200-ml-Meßkolben eingewogen, und es werden 190 ml Wasser zugefügt. Dann wird der Kolben für 20 min. in ein Ultraschallbad (4.1) gestellt. Nach der Ultraschallbehandlung wird die Lösung auf Raumtemperatur gebracht, es wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und gemischt. Der Kolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lösung muß monatlich frisch bereitet werden.

3.5.2 Olaquindox-Standardlösung, 25 µg/ml:

10,0 ml der Standard-Stammlösung (3.5.1) werden in einen 100-ml-Meßkolben überführt. Es wird mit der mobilen Phase (3.4) bis zur Marke aufgefüllt und gemischt. Die Lösung muß vor Gebrauch frisch bereitet werden.

3.5.3 Kalibrierlösungen:

Von der Standardlösung (3.5.2) werden 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 und 20,0 ml jeweils in einen 50-ml-Meßkolben überführt. Es wird mit der mobilen Phase (3.4) bis zur Marke aufgefüllt und gemischt. Die Kolben werden mit Aluminiumfolie umhüllt. Diese Kalibrierlösungen enthalten jeweils 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 und 10,0 µg Olaquindox pro ml. Die Lösungen müssen vor Gebrauch frisch bereitet werden.

4 **Geräte**

4.1 Ultraschallbad.

4.2 Mechanische Schüttelmaschine.

4.3 HPLC-Einrichtung mit UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung oder Diodenarray-Detektor.

4.3.1 Trennsäule, 250 mm × 4 mm, C_{18}-Füllmaterial, Teilchengröße 10 µm oder vergleichbare Säule.

4.4 Membranfilter, 0,45 µm Porengröße.

5 **Durchführung**

Anmerkung: Olaquindox ist lichtempfindlich. Alle Analysenschritte sind deshalb unter Ausschluß von UV-Licht (Verwendung von Braunglasgeräten, Aluminiumfolie oder UV-absorbierenden Materialien) durchzuführen.

5.1 *Allgemeines*

5.1.1 Eine Blindprobe wird untersucht, um zu prüfen, daß weder Olaquindox noch Störsubstanzen vorhanden sind.

5.1.2 Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe (5.1.1) untersucht wird, die mit Olaquindox angereichert wurde. Die zugesetzte Menge an Olaquindox sollte der in der Probe vorhandenen Menge entsprechen. Um auf einen Gehalt von 50 mg/kg anzureichern, werden 10,0 ml der Standard-Stammlösung (3.5.1) in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben überführt und im Stickstoffstrom auf ca. 0,5 ml eingeengt. Dann werden 50 g der Blindprobe zugegeben. Es wird gemischt und 10 min. stehengelassen, bevor mit der Extraktion (5.2) fortgefahren wird.

Anmerkung: Für den Zweck dieser Methode sollte die Blindprobe ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Olaquindox soll nicht nachweisbar sein. Falls eine der Untersuchungsprobe in der Zusammensetzung ähnliche Blindprobe nicht verfügbar ist, ist die Wiederfindungsrate durch definiertes Aufstocken der zu untersuchenden Probe zu ermitteln.

5.2. *Extraktion*

50 g der Probe werden auf 0,01 g genau in einen 1 000-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 100 ml Methanol (3.1) versetzt. Der Kolben wird 5 min. in das Ultraschallbad (4.1) gestellt. Es werden 410 ml Wasser zugegeben, und die Probelösung wird weitere 15 min. mit Ultraschall behandelt. Der Kolben wird aus dem Ultraschallbad genommen, und es wird 30 min. auf der Schüttelmaschine (4.2) geschüttelt. Die Probelösung wird über einen Faltenfilter filtriert. 10,0 ml des Filtrats werden in einen 20-ml-Meßkolben überführt, es wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und gemischt. Ein aliquoter Teil wird über einen Membranfilter (4.4) filtriert. Diese Lösung wird für die HPLC-Bestimmung (5.3) verwendet.

5.3 *HPLC-Bestimmung*

5.3.1 Bedingungen

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

HPLC-Trennsäule: Füllung für Umkehrphasen-Chromatographie (4.3.1),

Mobile Phase (3.4): Wasser (3.3) - Methanol (3.2)-Gemisch, z. B. 900 + 100 (V + V),

Durchflußrate: 1,5-2 ml/min.,

Detektionswellenlänge: 380 nm,

Einspritzvolumen: 20 µl-100 µl.

Die Stabilität des chromatographischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.5.3), die 2,5 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erhalten werden.

5.3.2 Kalibrierkurve

Jede Kalibrierlösung (3.5.3) wird mehrmals eingespritzt, und die Peakhöhen (-flächen) für die einzelnen Konzentrationen werden 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.

5.3.3 Probenlösung

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

6 Berechnung der Ergebnisse

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

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

$$w = \frac{c \times 1\,000}{m} \text{ (mg/kg)}$$

Hierin bedeuten:

c = Olaquindoxkonzentration der Probenlösung (5.2) in µg/ml

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 (3.5.3), die 5,0 µg/ml enthält, verglichen werden.

7.1.1 Co-Chromatographie

Eine Probenlösung wird mit einer geeigneten Menge Kalibrierlösung (3.5.3) versetzt. Die zugesetzte Olaquindoxmenge sollte dem erwarteten Olaquindoxgehalt des Probenextrakts entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extrakts darf nur die Höhe des Olaquindoxpeaks vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe aus dem Zusatzversuch sollte nicht mehr als ± 10 % von der des Peaks der Probenlösung abweichen.

7.1.2 Diodenarray-Detektion

Die Ergebnisse werden gemäß den nachstehenden Kriterien beurteilt:

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

b) Zwischen 220 nm und 400 nm dürfen das Proben- und Standardspektrum an den Peakspitzen des Chromatogramms in den Bereichen, die zwischen 10 % und 100 % relativer Absorption liegen, keine Unterschiede aufweisen. 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 Standards beträgt.

c) Zwischen 220 nm und 400 nm dürfen sich die Spektren des Probenextrakts im Anstieg, am Maximum und im Abstieg des Probenpeaks in den Bereichen des Spektrums zwischen 10 % und 100 % relativer Absorption nicht unterscheiden. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung der Spektren an keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Spektrums am Peakmaximum beträgt.

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

7.2 *Wiederholbarkeit*

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen von zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe bei einem Olaquindoxgehalt zwischen 10 mg/kg und 200 mg/kg 15 % des höheren Resultats nicht überschreiten.

7.3 *Wiederfindungsrate*

Die Wiederfindungsrate soll mindestens 90 % betragen.

8 **Ergebnisse eines Ringversuchs**

Es wurde ein EG-Ringversuch durchgeführt, bei dem vier Ferkelfutter einschließlich eines Blindfutters untersucht wurden. Die Ergebnisse sind nachstehend wiedergegeben.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
Mittelwert (mg/kg)	—	14,6	48,0	95,4
S_r (mg/kg)	—	0,82	2,05	6,36
S_R (mg/kg)	—	1,62	4,28	8,42
VK_r (%)	—	5,6	4,3	6,7
VK_R (%)	—	11,1	8,9	8,8
Sollgehalt (mg/kg)	—	15	50	100
Wiederfindung (%)	—	97,3	96,0	95,4

L : Anzahl der Laboratorien,
n : Anzahl der Einzelwerte,
S_r : Wiederholstandardabweichung,
S_R : Vergleichstandardabweichung,
VK_r : Wiederholvariationskoeffizient,
VK_R : Vergleichvariationskoeffizient.

9 **Bermerkung**

Obwohl die Methode für Futtermittel mit Olaquindoxgehalten von mehr als 100 mg/kg nicht validiert wurde, können zufriedenstellende Ergebnisse durch Verringerung der Einwaage und/oder Verdünnung des Extrakts (5.2) auf den Konzentrationsbereich der Kalibrierkurve (5.3.2) erzielt werden.