

*Anhang 9*<sup>69</sup>  
(Art. 21 Abs. 2)

## **Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die Futtermittelkontrolle**

Die Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die Futtermittelkontrolle entsprechen den Anhängen I–VIII der Verordnung (EG) Nr. 152/2009<sup>70</sup>.

<sup>69</sup> Fassung gemäss Ziff. II Abs. 1 der V des WBF vom 18. Okt. 2017 (AS **2017** 6421).  
Bereinigt gemäss Ziff. II Abs. 2 der V des BLW vom 24. April 2023, in Kraft seit  
1. Juni 2023 (AS **2023** 218).

<sup>70</sup> Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der  
Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futter-  
mitteln, ABl. L 54 vom 26.2.2009, S. 1; zuletzt geändert durch Durchführungsverordnung  
(EU) 2022/893, ABl. L 155 vom 8.6.2022, S. 24.

▼ **M3***ANHANG I***PROBENAHMEVERFAHREN****1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH**

Die zur amtlichen Untersuchung bestimmten Futtermittelproben werden gemäß den nachstehenden Verfahren entnommen. Die so gewonnenen Proben gelten als repräsentativ für die Teilpartien.

Zweck der repräsentativen Beprobung ist es, einen kleinen Teil einer Partie zu untersuchen und durch die Bestimmung eines spezifischen Merkmals bei diesem Teil den Durchschnittswert des Merkmals für die gesamte Partie zu ermitteln. Die Partie wird mittels wiederholter Entnahme von Einzelproben an verschiedenen Stellen der Partie untersucht. Diese Einzelproben werden zu einer Sammelprobe gemischt, aus der durch repräsentative Teilung repräsentative Endproben herzustellen sind.

Wenn bei der Sichtprüfung Teile des zu untersuchenden Futtermittels einen Qualitätsunterschied zum übrigen Futtermittel derselben Partie aufweisen, werden diese Teile vom übrigen Futtermittel abgesondert und als getrennte Teilpartie behandelt. Ist eine Aufteilung des Futtermittels in getrennte Teilpartien nicht möglich, so wird das Futtermittel als eine einzige Partie beprobt. In solchen Fällen ist dies im Probenahmebericht zu vermerken.

Ist ein Futtermittel, das gemäß den Bestimmungen der vorliegenden Verordnung beprobt wurde und nachweislich die EU-Anforderungen nicht erfüllt, Teil einer Futtermittelpartie derselben Gruppe oder Bezeichnung, so muss davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis der Beprobung für die gesamte Futtermittelpartie gilt, es sei denn, eine eingehende Bewertung erbringt keinen Nachweis darüber, dass die restliche Partie den EU-Anforderungen nicht genügt.

**2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN**

- **Partie (oder Charge):** identifizierbare Menge an Futtermitteln, die nachweislich gemeinsame Eigenschaften haben, wie Ursprung, Sorte, Art der Verpackung, Verpacker, Übersender oder Kennzeichnung; im Falle eines Herstellungsverfahrens bezeichnet „Partie“ eine Einheit der Herstellung aus einer einzigen Anlage unter Verwendung einheitlicher Herstellungsparameter oder eine Reihe solcher Einheiten, sofern sie in kontinuierlicher Reihenfolge hergestellt und zusammen gelagert werden.
- **Teilpartie:** Partie oder identifizierbare Teilmenge der Partie bzw. Teilpartie.
- **Verplombte Probe:** Probe, die solchermaßen mit einer Plombe verschlossen wurde, dass kein Zugriff auf sie möglich ist, ohne die Plombe zu beschädigen oder zu entfernen.
- **Einzelprobe:** Menge, die an einer Stelle der Teilpartie entnommen wird.
- **Sammelprobe:** Gesamtmenge der aus derselben Teilpartie entnommenen Einzelproben.
- **Reduzierte Probe:** Teilmenge der Sammelprobe, die aus letzterer durch repräsentative Reduktion gewonnen wird.
- **Endprobe:** Teilmenge der reduzierten Probe oder der homogenisierten Sammelprobe.
- **Laborprobe:** für das Labor bestimmte (beim Labor eingegangene) Probe, bei der es sich um die Endprobe, die reduzierte Probe oder die Sammelprobe handeln kann.

▼ **M3**

## 3. ALLGEMEINE BESTIMMUNGEN

- Probenahmepersonal: Die Probenahme erfolgt durch die von der zuständigen Behörde zu diesem Zweck bevollmächtigten Personen.
- Die Probe muss so verplombt werden, dass kein Zugriff auf sie möglich ist, ohne die Plombe zu beschädigen oder zu entfernen. Der Plombenstempel sollte eindeutig identifizierbar und gut sichtbar sein. Alternativ kann die Probe in einen Behälter verfüllt werden, der so verschließbar ist, dass er nicht geöffnet werden kann, ohne das Gefäß bzw. den Behälter dabei irreversibel zu beschädigen. Eine mehrmalige Verwendung des Gefäßes bzw. Behälters ist zu vermeiden.
- Identifizierung der Probe: Die Probe muss mit einer dauerhaften Kennzeichnung versehen und so identifiziert werden, dass eine eindeutige Verbindung zum Probenahmebericht besteht.
- Aus jeder Sammelprobe werden mindestens zwei Endproben entnommen: mindestens eine Probe zur Kontrolle (Vollzug) und eine für den Futtermittelunternehmer (Gegenprobe). Gegebenenfalls kann eine Endprobe zu Referenzzwecken entnommen werden. Im Fall einer Homogenisierung der vollständigen Sammelprobe werden die Endproben aus der homogenisierten Sammelprobe entnommen, es sei denn, dass dieses Verfahren den Vorschriften der Mitgliedstaaten hinsichtlich der Rechte des Futtermittelunternehmers zuwiderläuft.

## 4. GERÄTE

- 4.1. Die Geräte zur Probenahme müssen aus Materialien bestehen, die die zu beprobenden Erzeugnisse nicht kontaminieren können. Geräte, die für eine mehrfache Anwendung vorgesehen sind, müssen leicht zu reinigen sein, damit eine Kreuzkontamination vermieden wird.

4.2. **Empfohlene Geräte für die Probenahme fester Futtermittel**4.2.1. *Manuelle Probenahme*

- 4.2.1.1. Schaufel mit ebenem Boden und rechteckig hochgebogenem Rand.
- 4.2.1.2. Probenahmestab mit langem Schlitz oder Kammern. Die Dimensionierung des Probenahmestabes ist den Merkmalen der Teilpartie (Tiefe des Behälters, Größe des Sacks usw.) und der Partikelgröße des Futtermittels anzupassen.

Falls es sich um einen Probenahmestab mit mehreren Öffnungen handelt, sollten diese durch Kammern oder fortlaufend versetzte Öffnungen voneinander getrennt sein, damit sichergestellt ist, dass die Probe an verschiedenen Stellen entlang des Probenahmestabes entnommen wird.

4.2.2. *Mechanische Probenahme*

Geeignete mechanische Geräte dürfen zur Probenahme aus in Bewegung befindlichen Futtermitteln verwendet werden. „Geeignet“ bedeutet, dass mindestens der gesamte Fließquerschnitt beprobt wird.

Die Probenahme aus in Bewegung befindlichen Futtermitteln (bei hohen Durchflussraten) kann mittels automatischer Probenehmer erfolgen.

4.2.3. *Probenteiler*

Soweit möglich und sinnvoll, sollten zur Herstellung reduzierter Proben Geräte verwendet werden, die zur Zerlegung der Probe in ungefähr gleiche Teile in repräsentativer Form bestimmt sind.

▼ **M3**

## 5. QUANTITATIVE ANFORDERUNGEN HINSICHTLICH DER ANZAHL VON EINZELPROBEN

- Die in den Nummern 5.1 und 5.2 genannten quantitativen Anforderungen hinsichtlich der Anzahl von Einzelproben gelten für Teilpartien bis zu 500 t, die einer repräsentativen Probenahme unterzogen werden können. Das beschriebene Probenahmeverfahren gilt in gleicher Weise für Mengen, die die festgelegte maximale Teilpartie überschreiten, sofern die in den nachstehenden Tabellen vorgegebene Höchstanzahl der Einzelproben außer Acht gelassen wird und statt dessen die Anzahl der Einzelproben anhand der Quadratwurzelformel für den entsprechenden Verfahrensabschnitt (siehe Nummer 5.3) bestimmt und die Mindestgröße der Sammelprobe proportional erhöht wird. Ungeachtet dessen kann eine große Partie in kleinere Teilpartien aufgeteilt und jede Teilpartie nach dem in den Nummern 5.1 und 5.2 beschriebenen Verfahren beprobt werden.
- Die Teilpartie muss so gewählt werden, dass eine Beprobung aller Einzelbestandteile möglich ist.
- Bei sehr großen Partien bzw. Teilpartien (> 500 t) und bei Partien, die so befördert oder gelagert werden, dass eine Probenahme gemäß dem Verfahren der Nummern 5.1 und 5.2 dieses Kapitels nicht erfolgen kann, ist das Probenahmeverfahren nach Nummer 5.3 anzuwenden.
- Ist der Futtermittelunternehmer im Rahmen eines obligatorischen Überwachungssystems gesetzlich zur Einhaltung der vorliegenden Verordnung verpflichtet, so kann er von den in diesem Kapitel festgelegten quantitativen Anforderungen abweichen, um funktionspezifischen Besonderheiten Rechnung zu tragen, sofern er zur Zufriedenheit der zuständigen Behörde die Gleichwertigkeit des Probenahmeverfahrens in Bezug auf den Repräsentationsgrad nachgewiesen hat, und nachdem eine entsprechende Genehmigung seitens der zuständigen Behörde erteilt wurde.
- Ist es nicht möglich, das festgelegte Probenahmeverfahren im Hinblick auf die quantitativen Anforderungen anzuwenden, da sich aus einer Beschädigung der Partie unannehmbare Folgen für den Handel ergeben würden (wegen der Verpackungsart, der Transportweise, der Lagerungsform usw.), so kann ausnahmsweise ein alternatives Probenahmeverfahren angewandt werden, sofern dieses so repräsentativ wie möglich ist und umfassend beschrieben und dokumentiert wird.

5.1. **Quantitative Anforderungen an Einzelproben bezüglich der Untersuchung auf Stoffe oder Erzeugnisse, die gleichmäßig im Futtermittel verteilt sind**5.1.1. *Feste Futtermittel in loser Form*

Teilpartie	Mindestanzahl der Einzelproben
≤ 2,5 t	7
> 2,5 t	√20-mal die Anzahl von Tonnen, aus denen die Teilpartie besteht (*), bis zu 40 Einzelproben

(\*) Wenn sich hierbei eine Bruchzahl ergibt, ist diese auf die nächsthöhere ganze Zahl aufzurunden.

▼ **M3**5.1.2. *Flüssige Futtermittel in loser Form*

Teilpartie	Mindestanzahl der Einzelproben
≤ 2,5 t bzw. ≤ 2 500 l	4 (*)
> 2,5 t bzw. > 2 500 l	7 (*)

(\*) Ist eine Homogenisierung der Flüssigkeit nicht möglich, so muss die Anzahl der Einzelproben erhöht werden.

5.1.3. *Verpackte Futtermittel*

Futtermittel (fest und flüssig) können in Beuteln, Säcken, Dosen, Fässern usw. verpackt sein, die in der Tabelle als Einheiten bezeichnet werden. Große Einheiten (≥ 500 kg bzw. l) sind nach den Vorschriften für lose Futtermittel (siehe Nummern 5.1.1 und 5.1.2) zu beproben.

Teilpartie	Mindestanzahl der Einheiten, aus denen (mindestens) eine Einzelprobe zu entnehmen ist (*)
1 bis 20 Einheiten	1 Einheit (**)
21 bis 150 Einheiten	3 Einheiten (**)
151 bis 400 Einheiten	5 Einheiten (**)
> 400 Einheiten	¼ der √-Anzahl von Einheiten, aus der die Teilpartie besteht (***), bis zu 40 Einheiten

(\*) Kann durch das Öffnen einer Einheit die Analyse beeinträchtigt werden (z. B. leicht verderbliches Nassfutter), so gilt die ungeöffnete Einheit als Einzelprobe.

(\*\*) Bei Einheiten, deren Inhalt höchstens 1 kg bzw. 1 l beträgt, gilt der Inhalt einer Originaleneinheit als Einzelprobe.

(\*\*\*) Wenn sich hierbei eine Bruchzahl ergibt, ist diese auf die nächsthöhere ganze Zahl aufzurunden.

5.1.4. *Futterblöcke und Lecksteine*

Zu beproben ist mindestens ein Futterblock oder Leckstein je Teilpartie zu 25 Einheiten, die Höchstzahl beträgt vier Futterblöcke oder Lecksteine.

Bei Futterblöcken oder Lecksteinen mit einem Gewicht von jeweils maximal 1 kg gilt der Inhalt eines Futterblocks oder Lecksteins als Einzelprobe.

5.1.5. *Raufutter/Grünfutter*

Teilpartie	Mindestanzahl der Einzelproben (*)
≤ 5 t	5
> 5 t	√5-mal die Anzahl von Tonnen, aus der die Teilpartie besteht (**), bis zu 40 Einzelproben

(\*) In bestimmten Fällen (z. B. bei Silage) können die vorgeschriebenen Einzelproben nicht ohne eine unannehmbare Beschädigung der Partie entnommen werden. In diesen Fällen ist ein alternatives Probenahmeverfahren zulässig, und entsprechende Leitlinien für die Beprobung solcher Partien werden vor dem Geltungsbeginn dieser Verordnung erarbeitet.

(\*\*) Wenn sich hierbei eine Bruchzahl ergibt, ist diese auf die nächsthöhere ganze Zahl aufzurunden.

**▼ M3****5.2. Quantitative Anforderungen an Einzelproben bezüglich der Untersuchung auf Bestandteile oder Stoffe, die ungleichmäßig im Futtermittel verteilt sein können**

Diese quantitativen Anforderungen an Einzelproben gelten in folgenden Fällen:

- Untersuchung auf Aflatoxine, Mutterkorn, andere Mykotoxine und schädliche botanische Unreinheiten in Futtermittel-Ausgangserzeugnissen;
- Untersuchung auf Kreuzkontamination durch einen Bestandteil, einschließlich genetisch veränderter Ausgangserzeugnisse, oder einen Stoff, bei dem eine ungleichmäßige Verteilung in Futtermittel-Ausgangserzeugnissen anzunehmen ist.

Hat die Untersuchungsbehörde den starken Verdacht, dass eine solche ungleichmäßige Verteilung auch im Fall einer Kreuzkontamination durch einen Bestandteil oder einen Stoff in einem Futtermittel-Ausgangserzeugnis auftritt, so können die in der nachstehenden Tabelle festgelegten quantitativen Anforderungen gestellt werden.

Teilpartie	Mindestanzahl der Einzelproben
< 80 t	Siehe quantitative Anforderungen in Nummer 5.1. Die Anzahl der zu entnehmenden Einzelproben ist mit dem Faktor 2,5 zu multiplizieren.
≥ 80 t	100

**5.3. Quantitative Anforderungen an Einzelproben bei sehr großen Partien**

Bei großen Teilpartien (> 500 t) ist die Anzahl der zu entnehmenden Einzelproben wie folgt zu festzulegen: 40 Einzelproben +  $\sqrt{t}$ -Tonnen für die Untersuchung auf Stoffe oder Erzeugnisse, die im gesamten Futtermittel gleichmäßig verteilt sind, oder 100 Einzelproben +  $\sqrt{t}$ -Tonnen für die Untersuchung auf Bestandteile oder Stoffe, die ungleichmäßig in Futtermittel-Ausgangserzeugnissen verteilt sein können.

**6. QUANTITATIVE ANFORDERUNGEN AN SAMMELPROBEN**

Je Teilpartie ist eine einzelne Sammelprobe erforderlich.

	Art des Futtermittels	Mindestgröße der Sammelprobe (*) (**)
6.1.	Lose Futtermittel	4 kg
6.2.	Verpackte Futtermittel	4 kg (***)

## ▼ M3

Je Teilpartie ist eine einzelne Sammelprobe erforderlich.

	Art des Futtermittels	Mindestgröße der Sammelprobe (*) (**)
6.3.	Flüssige oder halbflüssige Futtermittel	4 l
6.4.	Futterblöcke oder Lecksteine	
6.4.1.	mit einem Einzelgewicht von mehr als 1 kg	4 kg
6.4.2.	mit einem Einzelgewicht von höchstens 1 kg	Gewicht von 4 Originalblöcken oder -steinen
6.5.	Raufutter/Grünfutter	4 kg (****)

(\*) Ist das beprobte Futtermittel hochwertig, kann eine kleinere Menge als Sammelprobe gewählt werden, sofern dies im Probenahmebericht beschrieben und dokumentiert wird.

(\*\*) Gemäß der Verordnung (EU) Nr. 619/2011 der Kommission vom 24. Juni 2011 zur Festlegung der Probenahme- und Analyseverfahren für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln im Hinblick auf genetisch veränderte Ausgangserzeugnisse, für die ein Zulassungsverfahren anhängig ist oder deren Zulassung abläuft (ABl. L 166 vom 25.6.2011, S. 9) muss die Sammelprobe für die Untersuchung auf genetisch veränderte Ausgangserzeugnisse mindestens 35 000 Samen/Körner enthalten. Dies bedeutet, dass die Größe der Sammelprobe bei Mais mindestens 10,5 kg und bei Sojabohnen 7 kg betragen muss. Bei anderen Samen und Körnern wie Gerste, Hirse, Hafer, Reis, Roggen, Weizen und Raps entspricht die Größe der Sammelprobe von 4 kg mehr als 35 000 Samen/Körnern.

(\*\*\*) Bei verpackten Futtermitteln kann es ebenfalls vorkommen, dass — abhängig von der Größe der einzelnen Einheiten — die für die Sammelprobe vorgeschriebene Größe von 4 kg nicht erreicht werden kann.

(\*\*\*\*) Handelt es sich um Raufutter oder Grünfutter mit geringer relativer Dichte (z. B. Heu, Stroh), sollte die Probengröße mindestens 1 kg betragen.

## 7. QUANTITATIVE ANFORDERUNGEN AN ENDPROBEN

*Endproben*

Mindestens eine Endprobe muss analysiert werden. Die Menge der zur Analyse bestimmten Endproben darf nicht unter den nachstehend festgelegten Mindestmengen liegen:

Feste Futtermittel	500 g (*) (**) (***)
Flüssige oder halbflüssige Futtermittel	500 ml (*)

(\*) Gemäß der Verordnung (EU) Nr. 619/2011 muss die Endprobe für die Untersuchung auf genetisch veränderte Ausgangserzeugnisse mindestens 10 000 Samen/Körner enthalten. Dies bedeutet, dass die Größe der Endprobe bei Mais mindestens 3 000 g und bei Sojabohnen 2 000 g betragen muss. Bei anderen Samen und Körnern wie Gerste, Hirse, Hafer, Reis, Roggen, Weizen und Raps entspricht die Größe der Endprobe von 500 g mehr als 10 000 Samen/Körnern.

(\*\*) Liegt die Größe der Sammelprobe erheblich unter 4 kg bzw. 4 l (siehe Fußnoten in Nummer 6), kann als Endprobe auch eine geringere Menge entnommen werden, sofern dies im Probenahmebericht beschrieben und dokumentiert wird.

(\*\*\*) Bei der Beprobung von Hülsenfrüchten, Getreidekörnern und Schalenfrüchten zur Bestimmung der Pflanzenschutzmittelrückstände muss gemäß der Richtlinie 2002/63/EG der Kommission (ABl. L 187 vom 16.7.2002, S. 30) die Mindestgröße der Endprobe 1 kg betragen.

▼ **M3**

8. PROBEHAHMEVERFAHREN FÜR SEHR GROSSE PARTIEN ODER PARTIEN, DIE SO GELAGERT ODER BEFÖRDERT WERDEN, DASS EINE BEPROBUNG DER GESAMTEN PARTIE NICHT PRAKTIKABEL IST

8.1. **Allgemeine Grundsätze**

Falls es die Art der Beförderung oder Lagerung einer Partie nicht gestattet, Einzelproben aus der gesamten Partie zu entnehmen, sollte die Beprobung solcher Parteien vorzugsweise dann erfolgen, wenn sich die Partie im Fluss befindet.

Falls es sich um Großlager für Futtermittel handelt, sollten die Unternehmer dazu angehalten werden, Einrichtungen im Lager zu installieren, die eine (automatische) Beprobung der gesamten gelagerten Partie ermöglichen.

Im Fall der Anwendung der Probenahmeverfahren nach Kapitel 8 wird der Futtermittelunternehmer oder sein Vertreter über das Probenahmeverfahren informiert. Wird dieses Probenahmeverfahren von dem Futtermittelunternehmer oder seinem Vertreter in Frage gestellt, so muss er es der zuständigen Behörde auf eigene Kosten ermöglichen, die gesamte Partie zu beproben.

8.2. **Große Parteien, die per Schiff befördert werden**8.2.1. *Dynamische Beprobung großer Parteien, die per Schiff befördert werden*

Die Beprobung großer Parteien auf Schiffen ist vorzugsweise durchzuführen, wenn sich das Erzeugnis im Fluss befindet (dynamische Probenahme).

Die Probenahme hat je Laderaum (physisch abtrennbare Einheit) zu erfolgen. Die Laderäume werden allerdings nacheinander geleert, so dass die ursprüngliche physische Trennung nach der Weiterbeförderung in die Lagereinrichtungen nicht mehr besteht. Die Probenahme kann daher unter Bezug auf die ursprüngliche physische Trennung oder auf die Trennung nach der Beförderung in die Lagereinrichtungen erfolgen.

Das Löschen einer Schiffsladung kann mehrere Tage in Anspruch nehmen. In der Regel muss die Beprobung in regelmäßigen Abständen während der gesamten Dauer des Löschvorgangs erfolgen. Es ist jedoch nicht immer praktikabel oder sinnvoll, dass sich ein amtlicher Inspektor während des gesamten Löschvorgangs für die Probenahme vor Ort aufhält. Daher ist die Beprobung eines Teils (einer Teilpartie) der gesamten Partie zulässig. Die Anzahl der Einzelproben wird unter Berücksichtigung des Umfangs der Teilpartie festgelegt.

Wird ein Teil einer Futtermittelpartie derselben Gruppe oder Bezeichnung beprobt und erfüllt diese Teilpartie nachweislich nicht die EU-Anforderungen, so muss davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis der Beprobung für die gesamte Futtermittelpartie gilt, es sei denn, eine eingehende Bewertung erbringt keinen Nachweis darüber, dass die restliche Partie den EU-Anforderungen nicht genügt.

Auch wenn die amtliche Probe automatisch entnommen wird, muss ein Inspektor anwesend sein. Erfolgt die automatische Probenahme jedoch anhand voreingestellter Parameter, die während der Probenahme nicht verändert werden können, und werden die Einzelproben in einem verplombten Behälter gesammelt, was einen möglichen Betrug ausschließt, so ist die Anwesenheit eines Inspektors nur zu Beginn der Probenahme, bei jedem Wechsel des Probenbehälters und am Ende der Probenahme erforderlich.

▼ **M3**8.2.2. *Beprobung von Partien, die per Schiff befördert werden, durch statische Probenahme*

Bei einer statischen Probenahme ist dasselbe Verfahren anzuwenden wie bei Lagereinrichtungen (Silos), die von oben zugänglich sind (siehe Nummer 8.4.1).

Die Probenahme muss am zugänglichen Teil der Partie/des Laderaums erfolgen (von oben). Die Anzahl der Einzelproben wird unter Berücksichtigung des Umfangs der Teilpartie festgelegt. Wird ein Teil einer Futtermittelpartie derselben Gruppe oder Bezeichnung beprobt und erfüllt diese Teilpartie nachweislich nicht die EU-Anforderungen, so muss davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis der Beprobung für die gesamte Futtermittelpartie gilt, es sei denn, eine eingehende Bewertung erbringt keinen Nachweis darüber, dass die restliche Partie den EU-Anforderungen nicht genügt.

8.3. **Beprobung großer Partien in Lagern**

Die Probenahme muss am zugänglichen Teil der Partie erfolgen. Die Anzahl der Einzelproben wird unter Berücksichtigung des Umfangs der Teilpartie festgelegt. Wird ein Teil einer Futtermittelpartie derselben Gruppe oder Bezeichnung beprobt und erfüllt diese Teilpartie nachweislich nicht die EU-Anforderungen, so muss davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis der Beprobung für die gesamte Futtermittelpartie gilt, es sei denn, eine eingehende Bewertung erbringt keinen Nachweis darüber, dass die restliche Partie den EU-Anforderungen nicht genügt.

8.4. **Beprobung von Lagereinrichtungen (Silos)**8.4.1. *Beprobung von Silos mit (leichtem) Zugang von oben*

Die Probenahme muss am zugänglichen Teil der Partie erfolgen. Die Anzahl der Einzelproben wird unter Berücksichtigung des Umfangs der Teilpartie festgelegt. Wird ein Teil einer Futtermittelpartie derselben Gruppe oder Bezeichnung beprobt und erfüllt diese Teilpartie nachweislich nicht die EU-Anforderungen, so muss davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis der Beprobung für die gesamte Futtermittelpartie gilt, es sei denn, eine eingehende Bewertung erbringt keinen Nachweis darüber, dass die restliche Partie den EU-Anforderungen nicht genügt.

8.4.2. *Beprobung von Silos ohne Zugang von oben (geschlossene Silos)*8.4.2.1. **Silos ohne Zugang von oben (geschlossene Silos) mit einer Größe über 100 Tonnen**

In solchen Silos gelagerte Futtermittel können nicht statisch beprobt werden. Wenn das im Silo gelagerte Futtermittel beprobt werden muss und keine Möglichkeit besteht, die Sendung zu bewegen, ist eine Vereinbarung mit dem Unternehmer dahin gehend zu treffen, dass dieser den Inspektor darüber informiert, wann das Silo geleert wird, damit eine Probenahme erfolgen kann, wenn sich das Futtermittel im Fluss befindet.

8.4.2.2. **Silos ohne Zugang von oben (geschlossene Silos) mit einer Größe unter 100 Tonnen**

Im Rahmen des Probenahmeverfahrens ist eine Menge von 50 bis 100 kg in einen Behälter abzufüllen und anschließend zu beproben. Die Größe der Sammelprobe entspricht der gesamten Partie, und die Anzahl der Einzelproben muss im Verhältnis zu der Menge stehen, die zur Probenahme aus dem Silo in einen Behälter abgefüllt wird. Wird ein Teil einer Futtermittelpartie derselben Gruppe oder Bezeichnung beprobt und erfüllt diese Teilpartie nachweislich nicht die EU-Anforderungen, so muss davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis der Beprobung für die gesamte Futtermittelpartie gilt, es sei denn, eine eingehende Bewertung erbringt keinen Nachweis darüber, dass die restliche Partie den EU-Anforderungen nicht genügt.

**▼ M3****8.5. Beprobung loser Futtermittel in großen geschlossenen Containern**

Solche Partien können häufig erst nach dem Entladen beprobt werden. In bestimmten Fällen ist das Entladen am Einfuhrort oder am Kontrollpunkt nicht möglich, weshalb die Probenahme erfolgen sollte, wenn die betreffenden Container entladen sind.

**9. ANWEISUNGEN FÜR DIE ENTNAHME, VORBEREITUNG UND VERPACKUNG DER PROBEN****9.1. Allgemeines**

Die Proben müssen so schnell wie möglich entnommen und vorbereitet werden, wobei die nötigen Vorkehrungen zu treffen sind, um sicherzustellen, dass das Erzeugnis weder verändert noch verunreinigt wird. Die für die Probenahme bestimmten Geräte, Flächen und Behälter müssen sauber und trocken sein.

**9.2. Einzelproben**

Die Einzelproben sind nach dem Zufallsprinzip aus der gesamten Teilpartie zu entnehmen. Ihre Größe muss ungefähr gleich sein.

Die Größe der Einzelprobe muss mindestens 100 g bzw. 25 g bei Raufutter oder Grünfutter mit geringem spezifischem Gewicht betragen.

Sind nach dem Probenahmeverfahren gemäß Nummer 8 weniger als 40 Einzelproben zu entnehmen, muss die Größe der Einzelprobe im Verhältnis zur erforderlichen Größe der Sammelprobe festgelegt werden (siehe Nummer 6).

Bei der Beprobung kleiner Partien verpackter Futtermittel, bei der entsprechend den quantitativen Anforderungen eine begrenzte Anzahl von Einzelproben zu entnehmen ist, umfasst eine Einzelprobe den Inhalt einer Originaleneinheit, der 1 kg bzw. 1 Liter nicht überschreitet.

Bei der Beprobung verpackter Futtermittel, die aus kleinen Einheiten bestehen (z. B. < 250 g) ist die Größe der Einzelprobe von der Größe der Einheit abhängig.

**9.2.1. Lose Futtermittel**

Die Probenahme kann gegebenenfalls auch bei einer Teilpartie erfolgen, die sich in Bewegung (Einladen oder Entladen) befindet.

**9.2.2. Verpackte Futtermittel**

Nach Auswahl der erforderlichen Anzahl der zu beprobenden Einheiten gemäß Kapitel 5 wird aus jeder dieser Einheiten ein Teil des Inhalts mit einem Probenahmestab oder einer Schaufel entnommen. Gegebenenfalls sind die Proben zu entnehmen, nachdem die Einheiten getrennt entleert worden sind.

**9.2.3. Homogene oder homogenisierbare flüssige oder halbflüssige Futtermittel**

Nach Auswahl der erforderlichen Anzahl der zu beprobenden Einheiten gemäß Kapitel 5 wird der Inhalt falls nötig homogenisiert und aus jeder Einheit eine Menge entnommen.

Die Einzelproben können auch beim Ablassen des Inhalts entnommen werden.

▼ **M3**9.2.4. *Nicht homogenisierbare flüssige oder halbflüssige Futtermittel*

Nach Auswahl der erforderlichen Anzahl der zu beprobenden Einheiten gemäß Kapitel 5 werden in unterschiedlicher Höhe Proben entnommen.

Die Probenahme kann auch beim Ablassen des Inhalts erfolgen, wobei jedoch die ersten Fraktionen zu verwerfen sind.

In beiden Fällen muss das Gesamtvolumen mindestens 10 l betragen.

9.2.5. *Futterblöcke und Lecksteine*

Nach Auswahl der erforderlichen Anzahl der zu beprobenden Blöcke oder Steine gemäß Kapitel 5 kann jedem Block oder Stein ein Teil entnommen werden. Besteht die Vermutung, dass es sich um einen nicht homogenen Block bzw. Stein handelt, so kann der ganze Block bzw. Stein als Probe genommen werden.

Bei Futterblöcken oder Lecksteinen mit einem Gewicht von jeweils maximal 1 kg gilt der Inhalt eines Futterblocks oder Lecksteins als Einzelprobe.

9.3. **Vorbereitung der Sammelproben**

Die Einzelproben werden gemischt und zu einer einzigen Sammelprobe zusammengestellt.

9.4. **Vorbereitung der Endproben**

Das Material in der Sammelprobe ist sorgfältig zu mischen<sup>(1)</sup>.

— Jede Probe wird in einen geeigneten Container/Behälter gefüllt. Es sind alle notwendigen Vorkehrungen zu treffen, damit jede Veränderung der Zusammensetzung bzw. jede Verunreinigung oder Verfälschung der Probe während des Transports oder der Lagerung vermieden wird.

— Bei der Untersuchung auf Bestandteile oder Stoffe, die im Futtermittel gleichmäßig verteilt sind, kann die Sammelprobe repräsentativ auf mindestens 2,0 kg bzw. 2,0 l reduziert werden (reduzierte Probe)<sup>(2)</sup>, vorzugsweise mit Hilfe eines mechanischen oder automatischen Probenteilers. Bei der Beprobung von Hülsenfrüchten, Getreidekörnern und Schalenfrüchten auf Pflanzenschutzmittelrückstände beträgt die Mindestgröße der reduzierten Probe 3 kg. Falls aufgrund der Art des Futtermittels die Verwendung eines Probenteilers nicht möglich oder ein Probenteiler nicht verfügbar ist, kann die Probe nach dem Viertelungsverfahren reduziert werden. Dann werden aus den reduzierten Proben ungefähr gleich große Endproben (für Kontroll-, Verteidigungs- und Referenzzwecke) entsprechend den quantitativen Anforderungen in Kapitel 7 hergestellt. Bei der Untersuchung auf Bestandteile, einschließlich genetisch veränderter Ausgangserzeugnisse, oder auf Stoffe, die ungleichmäßig in Futtermittel-Ausgangserzeugnissen verteilt sein können, muss die Sammelprobe folgende Anforderungen erfüllen:

— Sie wird vollständig homogenisiert und anschließend in Endproben aufgeteilt oder

— mit Hilfe eines mechanischen oder automatischen Probenteilers auf mindestens 2 kg bzw. 2 l<sup>(3)</sup> reduziert. Nur dann, wenn aufgrund der Art des Futtermittels die Verwendung eines Probenteilers nicht möglich ist, kann die Probe falls nötig nach dem Viertelungsverfahren reduziert werden. Für die Untersuchung auf genetisch veränderte Ausgangserzeugnisse im Rahmen der Verordnung (EU) Nr. 619/2011 muss die reduzierte Probe mindestens 35 000 Samen/Körner enthalten, damit die Endproben für Durchsetzungs-, Verteidigungs- und Referenzzwecke im Umfang von mindestens 10 000 Samen/Körnern hergestellt werden können (siehe Fußnote (\*\*)) in Kapitel 6 und Fußnote (\*) in Kapitel 7).

<sup>(1)</sup> Klumpen sind zu zerdrücken (sie werden gegebenenfalls vom übrigen Material getrennt und der Probe anschließend wieder untergemischt).

<sup>(2)</sup> Außer bei Raufutter oder Grünfutter mit geringem spezifischem Gewicht.

<sup>(3)</sup> Außer bei Raufutter oder Grünfutter mit geringem spezifischem Gewicht.

▼ **M3**

9.5. **Verpackung der Proben**

Die Behälter oder Packungen sind so zu verplomben und zu kennzeichnen, dass sie nicht ohne Beschädigung der Plombe geöffnet werden können. Hierbei muss die gesamte Kennzeichnung von der Plombe erfasst werden.

9.6. **Versendung der Proben an das Labor**

Die Probe ist — zusammen mit den untersuchungsrelevanten Angaben — so schnell wie möglich an das benannte Analyselabor zu versenden.

10. **PROBENAHMEPROTOKOLL**

Für jede Probe ist ein Probenahmeprotokoll zu erstellen, aus dem die Identität und der Umfang der Teilpartie eindeutig hervorgehen.

Im Protokoll wird außerdem jede Abweichung von den in dieser Verordnung festgelegten Probenahmeverfahren vermerkt.

Das Protokoll wird dem amtlichen Kontrolllabor sowie dem Futtermittelunternehmer und/oder dem vom Futtermittelunternehmer benannten Labor zur Verfügung gestellt.

**▼ M3***ANHANG II***ALLGEMEINE BESTIMMUNGEN HINSICHTLICH DER METHODEN  
ZUR ANALYSE VON FUTTERMITTELN****A. VORBEREITUNG DER PROBEN ZUR ANALYSE****1. Zweck**

Die nachfolgend beschriebenen Verfahren betreffen die Vorbereitung der zur Analyse bestimmten Proben, die nach der Probenahme gemäß den Bestimmungen in Anhang I an die Kontrolllabors versandt wurden.

Die Vorbereitung der Laborproben muss so erfolgen, dass die in den Analysemethoden vorgesehenen Einwaagen homogen und repräsentativ für die Endproben sind.

**2. Vorsichtsmaßnahmen**

Die Wahl des Verfahrens für die Probenvorbereitung hängt von der Art der anzuwendenden Analysemethode und den zu untersuchenden Bestandteilen oder Stoffen ab. Daher ist es äußerst wichtig, sicherzustellen, dass das angewandte Probenvorbereitungsverfahren für die jeweilige Analysemethode und für die zu untersuchenden Bestandteile oder Stoffe geeignet ist.

Alle notwendigen Schritte sind so durchzuführen, dass eine Verunreinigung der Probe und eine Veränderung ihrer Zusammensetzung weitestmöglich vermieden werden.

Das Zerkleinern, Mischen und Sieben muss unverzüglich erfolgen, wobei die Probe möglichst wenig Luft und Licht ausgesetzt werden darf. Die Verwendung von Mühlen oder Zerkleinerungsgeräten, die zu einer merklichen Erwärmung der Probe führen könnten, ist nicht zulässig.

Für besonders hitzeempfindliche Futtermittel wird manuelles Zerkleinern empfohlen. Es ist außerdem darauf zu achten, dass die verwendeten Geräte keine Kontaminationsquelle bilden.

Kann die Probe nicht ohne eine signifikante Veränderung ihres Feuchtigkeitsgehalts vorbereitet werden, so ist dieser vor und nach der Vorbereitung gemäß der in Anhang III Teil A festgelegten Methode zu bestimmen.

**3. Verfahren****3.1. Allgemeines Verfahren**

Das Testaliquot ist der Endprobe zu entnehmen. Das Kegeln und das Viertelungsverfahren werden nicht empfohlen, da dies mit einer hohen Teilungsfehlerquote bei den Testaliquoten einhergehen kann.

**3.1.1. Futtermittel, die direkt gemahlen werden können**

— Die gesiebte Endprobe wird gemischt und in einen geeigneten sauberen, trockenen, luftdicht verschließbaren Behälter abgefüllt. Um eine vollständige Homogenisierung zu gewährleisten, muss die Probe unmittelbar vor der Einwaage (Testaliquot) erneut gemischt werden.

**3.1.2. Futtermittel, die nach Trocknung gemahlen werden können**

— Sofern in der Analysemethode nicht anders festgelegt, wird die Endprobe nach dem in Nummer 4.3 der Methode zur Bestimmung des Feuchtigkeitsgehalts (siehe Anhang III Teil A) vorgesehenen Vortrocknungsverfahren bis auf einen Feuchtigkeitsgehalt von 8-12 % getrocknet. Die weitere Vorbereitung erfolgt gemäß Nummer 3.1.1.

▼ **M3**

## 3.1.3. Flüssige oder halbflüssige Futtermittel

- Die Endprobe wird in einen geeigneten sauberen, trockenen, luftdicht verschließbaren Behälter abgefüllt. Um eine vollständige Homogenisierung zu gewährleisten, muss die Probe unmittelbar vor der Einwaage (Testaliquot) gründlich gemischt werden.

## 3.1.4. Andere Futtermittel

- Endproben, die nach keinem der oben genannten Verfahren vorbereitet werden können, sind nach einem anderen Verfahren zu behandeln, das gewährleistet, dass die Einwaagen (Testaliquote) homogen und repräsentativ für die Endproben sind.

3.2. *Besonderes Verfahren bei Sichtprüfungen oder mikroskopischen Untersuchungen oder im Fall einer Homogenisierung der vollständigen Sammelprobe*

- Bei einer Sichtprüfung (ohne Zuhilfenahme eines Mikroskops) wird die vollständige Laborprobe untersucht.
- Bei einer mikroskopischen Untersuchung kann das Labor die Sammelprobe reduzieren bzw. die reduzierte Probe noch weiter reduzieren. Die Endproben für die Gegenprobe und gegebenenfalls für Referenzzwecke werden nach einem Verfahren entnommen, das dem Verfahren zur Herstellung der Endprobe für den Vollzug gleichwertig ist.
- Im Fall einer Homogenisierung der vollständigen Sammelprobe werden die Endproben aus der homogenisierten Sammelprobe entnommen.

4. **Lagerung der Proben**

Die Proben müssen bei einer Temperatur gelagert werden, die ihre Zusammensetzung nicht beeinflusst. Proben, die zur Analyse von Vitaminen oder besonders lichtempfindlichen Stoffen bestimmt sind, sind so zu lagern, dass die Probe nicht durch Licht beeinträchtigt wird.

## B. BESTIMMUNGEN ÜBER IN ANALYSEVERFAHREN VERWENDETE REAGENZIEN UND GERÄTE

1. Sofern in den Analysemethoden nicht anders festgelegt, müssen alle zur Analyse verwendeten Reagenzien von analysenreiner (p. a.) Qualität sein. Bei der Analyse von Spurenelementen muss die Reinheit der Reagenzien durch Mitführen von Blindproben überprüft werden. Je nach den ermittelten Werten kann eine weitere Reinigung der Reagenzien erforderlich sein.
2. Bei jedem in den Analysemethoden genannten Lösungs-, Verdünnungs-, Spül- oder Auswaschvorgang, bei dem keine Angabe über die Art des zu verwendenden Lösungs- oder Verdünnungsmittels gemacht wird, ist Wasser zu verwenden. Im Allgemeinen wird demineralisiertes oder destilliertes Wasser verwendet. In besonderen Fällen, die in den Analysemethoden angegeben werden, ist das Wasser speziellen Reinigungsverfahren zu unterziehen.
3. Da die übliche Ausstattung von Kontrolllabors vorausgesetzt wird, werden nur besondere Instrumente und Geräte oder solche, die eine spezifische Verwendung erfordern, in den Analysemethoden aufgeführt. Sie müssen gut gereinigt sein, vor allem bei der Bestimmung sehr geringer Stoffmengen.

▼ **M3****C. ANWENDUNG VON ANALYSEMETHODEN UND FORMULIERUNG DER ERGEBNISSE****1. Extraktionsverfahren**

Einige Methoden geben ein spezifisches Extraktionsverfahren vor. Generell können andere Extraktionsverfahren als das in der Methode genannte Verfahren angewandt werden, und zwar unter der Bedingung, dass das angewandte Extraktionsverfahren für die analysierte Matrix eine vergleichbare Extraktionseffizienz aufweist wie das in der Methode genannte Verfahren.

**2. Clean-up-Verfahren**

Einige Methoden geben ein spezifisches Clean-up-Verfahren vor. Generell können andere Clean-up-Verfahren als das in der Methode genannte Verfahren angewandt werden, und zwar unter der Bedingung, dass das angewandte Clean-up-Verfahren für die analysierte Matrix zu vergleichbaren Analyseergebnissen führt wie das in der Methode genannte Verfahren.

**3. Anzahl der Bestimmungen**

Bei der Analyse auf unerwünschte Stoffe sind — sofern das Ergebnis der ersten Bestimmung deutlich (> 50 %) unter dem zu kontrollierenden Sollwert liegt — keine weiteren Bestimmungen erforderlich, vorausgesetzt, dass die geeigneten Qualitätsverfahren angewandt werden. In anderen Fällen ist eine Zweitanalyse (Zweitbestimmung) erforderlich, um eine interne Kreuzkontamination oder eine versehentliche Vermischung der Proben auszuschließen. Anhand des Mittelwerts der beiden Bestimmungen wird — unter Berücksichtigung der Messunsicherheit — die Einhaltung der Höchstgehalte überprüft.

Bei der Kontrolle des angegebenen Gehalts an einem Stoff oder einer Zutat sind — sofern das Ergebnis der Erstbestimmung den angegebenen Gehalt bestätigt, d. h., wenn das Analyseergebnis innerhalb des akzeptablen Toleranzbereichs für den angegebenen Gehalt liegt — keine weiteren Bestimmungen erforderlich, vorausgesetzt, dass die geeigneten Qualitätsverfahren angewandt werden. In anderen Fällen ist eine Zweitanalyse (Zweitbestimmung) erforderlich, um eine interne Kreuzkontamination oder eine versehentliche Vermischung der Proben auszuschließen. Anhand des Mittelwerts der beiden Bestimmungen wird — unter Berücksichtigung der Messunsicherheit — die Einhaltung der Höchstgehalte überprüft.

In einigen Fällen ist der Toleranzbereich in Rechtsvorschriften definiert, beispielsweise in der Verordnung (EG) Nr. 767/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 13. Juli 2009 über das Inverkehrbringen und die Verwendung von Futtermitteln, zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinien 79/373/EWG des Rates, 80/511/EWG der Kommission, 82/471/EWG des Rates, 83/228/EWG des Rates, 93/74/EWG des Rates, 93/113/EG des Rates und 96/25/EG des Rates und der Entscheidung 2004/217/EG der Kommission<sup>(1)</sup>.

**4. Berichterstattung über die angewandte Analysemethode**

Im Analysebericht ist anzugeben, welche Analysemethode angewandt wurde.

**5. Bericht über die Analyseergebnisse**

Das Ergebnis ist gemäß den Anweisungen in der Analysemethode mit einer angemessenen Zahl an signifikanten Ziffern anzugeben und, falls nötig, auf den Feuchtigkeitsgehalt der Endprobe vor deren Vorbereitung umzurechnen.

<sup>(1)</sup> ABl. L 229 vom 1.9.2009, S. 1.

**▼ M3****6. Messunsicherheit und Wiederfindungsrate bei der Analyse auf unerwünschte Stoffe**

Hinsichtlich unerwünschter Stoffe im Sinne der Richtlinie 2002/32/EG erfüllt ein zur Verfütterung bestimmtes Erzeugnis die Bestimmung bezüglich des festgelegten Höchstgehalts nicht, wenn das Analyseergebnis, bezogen auf ein Futtermittel mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 12 %, unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit und der Berichtigung um die Wiederfindungsrate den Höchstgehalt überschreitet. Zur Beurteilung der Einhaltung der Höchstgehalte wird die gemessene Konzentration — nach Berichtigung um die Wiederfindungsrate und nach Abzug der erweiterten Messunsicherheit — herangezogen. Dieses Verfahren wird nur dann angewandt, wenn die Analysemethode die Schätzung der Messunsicherheit und die Berichtigung um die Wiederfindungsrate ermöglicht (z. B. nicht möglich bei mikroskopischer Analyse).

Das Analyseergebnis ist wie folgt festzuhalten (soweit die angewandte Analysemethode die Schätzung der Messunsicherheit und der Wiederfindungsrate ermöglicht):

- a) Berichtigung um die Wiederfindungsrate, wobei diese anzugeben ist. Eine Berichtigung um die Wiederfindungsrate ist nicht erforderlich, wenn letztere 90-110 % beträgt;
- b) als „ $x \pm U$ “, wobei  $x$  das Analyseergebnis und  $U$  die erweiterte Messunsicherheit bezeichnet und ein Faktor von 2 verwendet wird, der zu einem Konfidenzniveau von ca. 95 % führt.

Liegt jedoch das Analyseergebnis deutlich ( $> 50\%$ ) unter dem zu kontrollierenden Sollwert — und unter der Bedingung, dass die geeigneten Qualitätsverfahren angewandt werden und die Analyse lediglich dem Zweck der Überprüfung der Einhaltung der Rechtsvorschriften dient —, können die Analyseergebnisse ohne Berichtigung um die Wiederfindungsrate angegeben werden, und die Angabe der Wiederfindungsrate und der Messunsicherheit kann in diesen Fällen entfallen.



### ANHANG III

## ANALYSEMETHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER ZUSAMMENSETZUNG VON FUTTERMITTEL-AUSGANGSERZEUGNISSEN UND MISCHFUTTERMITTELN

### A. BESTIMMUNG DES FEUCHTIGKEITSGEHALTS

#### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode erlaubt die Bestimmung des Feuchtigkeitsgehalts von Futtermitteln. Bei Futtermitteln, die flüchtige Stoffe wie z. B. organische Säuren enthalten, ist zu beachten, dass zusammen mit dem Feuchtigkeitsgehalt auch bedeutende Mengen an flüchtigen Stoffen bestimmt werden.

Sie betrifft nicht die Untersuchung von Milcherzeugnissen als Futtermittel-Ausgangserzeugnisse, die Untersuchung von Mineralstoffen und Mischungen, die überwiegend aus Mineralstoffen bestehen, die Untersuchung von tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen oder die Untersuchung von Ölsaaten und Ölfrüchten.

#### 2. Prinzip

Die Probe wird unter definierten Bedingungen getrocknet, die von der Art des Futtermittels abhängen. Der Gewichtsverlust wird durch Wiegen bestimmt. Bei festen Futtermitteln mit einem hohen Feuchtigkeitsgehalt ist eine zusätzliche Vortrocknung erforderlich.

#### 3. Geräte

- 3.1. Zerkleinerungsgerät aus einem Material, das keine Feuchtigkeit absorbiert, leicht zu reinigen ist, eine schnelle und gleichmäßige Zerkleinerung ermöglicht, ohne eine merkliche Erwärmung hervorzurufen, das so weit wie möglich den Kontakt mit der Außenluft verhindert und den unter 4.1.1 und 4.1.2 gestellten Anforderungen entspricht (z. B. Mikroschlagkreuzmühlen, Mikrozerkleinerer mit Wasserkühlung, zerlegbare Kegelmühlen, langsam laufende Kegelmühlen oder Zahnscheibenmühlen).
- 3.2. Analysenwaage, Genauigkeit 1 mg.
- 3.3. Trockene Gefäße aus korrosionsbeständigem Metall oder Glas, mit luftdicht schließenden Deckeln; die Nutzfläche muss eine Verteilung der Probe von ca. 0,3 g/cm<sup>2</sup> ermöglichen.
- 3.4. Elektrisch beheizter, temperatureregelter Trockenschrank ( $\pm 2$  °C), der eine schnelle Regelung der Temperatur gewährleistet und eine gute Lüftung besitzt<sup>(1)</sup>.
- 3.5. Elektrisch beheizter regulierbarer Vakuumtrockenschrank mit einer Ölpumpe, der entweder mit einer Vorrichtung für die Zufuhr warmer und getrockneter Luft oder mit einem Trocknungsmittel (z. B. Calciumoxid) ausgestattet ist.
- 3.6. Exsikkator mit dicker, perforierter Platte aus Metall oder Porzellan, der ein wirksames Trocknungsmittel enthält.

#### 4. Verfahren

*Anmerkung:* Die Verfahren, die in diesem Abschnitt beschrieben werden, müssen unverzüglich nach dem Öffnen der Packungen, die die Proben enthalten, durchgeführt werden. Die Analysen sind mindestens doppelt auszuführen.

<sup>(1)</sup> Für die Trocknung von Getreide, Mehl, Grütze und Grieß muss der Trockenschrank eine Wärmekapazität haben, mit der er nach Beladung mit der Höchstzahl gleichzeitig zu trocknender Proben die voreingestellte Temperatur von 131 °C in weniger als 45 min wieder erreicht. Die Lüftung muss so beschaffen sein, dass die Ergebnisse nach 2-stündiger Trocknung einer sein gesamtes Fassungsvermögen auslastenden Anzahl an Weizenproben von den Ergebnissen nach 4-stündiger Trocknung um weniger als 0,15 % abweichen.

**▼B**4.1. *Vorbereitung*

## 4.1.1. Futtermittel, außer den unter 4.1.2 und 4.1.3 genannten

Mindestens 50 g der Probe werden entnommen und erforderlichenfalls unter Vermeidung von Feuchtigkeitsänderungen entsprechend zerkleinert oder geteilt (siehe 6).

## 4.1.2. Getreide und Grütze

Mindestens 50 g der Probe werden entnommen. Diese Menge wird so gemahlen, dass zumindest 50 % der Teilchen durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 0,5 mm passiert werden können und dass beim Passieren durch ein Rundlochsieb mit einem Lochdurchmesser von 1 mm ein Rückstand von höchstens 10 % verbleibt.

## 4.1.3. Flüssige oder breiige Futtermittel; Futtermittel, die überwiegend aus Ölen und Fetten bestehen

Etwa 25 g der Probe, auf 10 mg genau gewogen, werden entnommen, mit einer entsprechenden, auf 10 mg genau gewogenen Menge wasserfreiem Sand vermischt, bis ein homogenes Produkt entsteht.

4.2. *Trocknung*

## 4.2.1. Futtermittel, außer den unter 4.2.2 und 4.2.3 genannten

Ein Gefäß (3.3) wird mit seinem Deckel auf 1 mg genau gewogen. Etwa 5 g der Probe werden auf 1 mg genau in das tarierte Gefäß eingewogen und gleichmäßig verteilt. Das Gefäß wird ohne Deckel in den auf 103 °C vorgeheizten Trockenschrank gestellt. Damit die Temperatur des Trockenschanks nicht zu stark abfällt, ist das Gefäß möglichst rasch hineinzustellen. Es wird 4 h lang getrocknet, wobei die Trocknungszeit von dem Zeitpunkt an gerechnet wird, an dem die Temperatur im Trockenschrank erneut 103 °C erreicht hat. Nach Öffnen des Trockenschanks wird das Gefäß sofort mit dem Deckel verschlossen, aus dem Schrank genommen, 30 bis 45 min lang zum Abkühlen in den Exsikkator (3.6) gestellt und anschließend auf 1 mg genau gewogen.

Bei Futtermitteln, die überwiegend aus Ölen und Fetten bestehen, wird eine zusätzliche Trocknung von 30 min im Trockenschrank bei 130 °C vorgenommen. Der Unterschied zwischen den beiden Wäageergebnissen darf höchstens 0,1 % Feuchtigkeit betragen.

## 4.2.2. Getreide, Mehl, Grütze und Grieß

Ein Gefäß (3.3) wird mit seinem Deckel auf 0,5 mg genau gewogen. Etwa 5 g der zerkleinerten Probe werden auf 1 mg genau in das tarierte Gefäß eingewogen und gleichmäßig verteilt. Das Gefäß wird ohne Deckel in den auf 130 °C vorgeheizten Trockenschrank gestellt. Damit die Temperatur des Trockenschanks nicht zu stark abfällt, ist das Gefäß möglichst rasch hineinzustellen. Es wird 2 h lang getrocknet, wobei die Trocknungszeit von dem Zeitpunkt an gerechnet wird, an dem die Temperatur im Trockenschrank erneut 130 °C erreicht hat. Nach Öffnen des Trockenschanks wird das Gefäß sofort mit dem Deckel verschlossen, aus dem Schrank genommen, 30 bis 45 min lang zum Abkühlen in den Exsikkator (3.6) gestellt und anschließend auf 1 mg genau gewogen.

## 4.2.3. Mischfuttermittel mit einem Saccharose- oder Lactosegehalt von mehr als 4 %: Futtermittel-Ausgangserzeugnisse wie z. B. Johannisbrotschrot, hydrolysierte Getreideerzeugnisse, Malzkeime, Zuckerrübenschnitzel, Fisch- und Zuckerpresssäfte; Mischfuttermittel mit einem Gehalt an kristallwasserhaltigen Mineralstoffen von mehr als 25 %.

Ein Gefäß (3.3) wird mit seinem Deckel auf 0,5 mg genau gewogen. Etwa 5 g der Probe werden auf 1 mg genau in das tarierte Gefäß eingewogen und gleichmäßig verteilt. Das Gefäß wird ohne Deckel in den auf 80 bis 85 °C vorgeheizten Vakuumtrockenschrank (3.5) gestellt. Damit die Temperatur des Vakuumtrockenschanks nicht zu stark abfällt, ist das Gefäß möglichst rasch hineinzustellen.

Der Druck wird auf 100 Torr eingestellt. Die Probe wird 4 h lang bei diesem Druck entweder unter Zufuhr von heißer trockener Luft oder mittels eines Trocknungsmittels (etwa 300 g für 20 Proben) getrocknet.

**▼ B**

Im letzteren Fall wird beim Erreichen des vorgeschriebenen Drucks die Verbindung zur Vakuumpumpe unterbrochen. Die Trocknungszeit wird von dem Zeitpunkt an gerechnet, an dem die Temperatur im Trockenschrank erneut 80 bis 85 °C erreicht hat. Nach Ablauf der Trocknungszeit wird der Vakuumtrockenschrank vorsichtig wieder auf atmosphärischen Druck gebracht. Nach Öffnen des Vakuumtrockenschranks wird das Gefäß sofort mit dem Deckel verschlossen, aus dem Schrank genommen, zum Abkühlen 30 bis 45 min lang in den Exsikkator (3.6) gestellt und anschließend auf 1 mg genau gewogen. Es wird im Vakuumtrockenschrank weitere 30 min bei 80 bis 85 °C getrocknet und erneut gewogen. Der Unterschied zwischen den beiden Wäageergebnissen darf höchstens 0,1 % Feuchtigkeit betragen.

4.3. *Vortrocknung*

## 4.3.1. Futtermittel, außer den unter 4.3.2 genannten

Bei festen Futtermitteln mit einem hohen Feuchtigkeitsgehalt, deren Zerkleinerung schwierig ist, ist eine Vortrocknung wie folgt vorzunehmen:

Von der *nicht zerkleinerten* Probe (sofern erforderlich können gepresste oder klumpenhaltige Futtermittel grob zerkleinert werden) werden 50 g auf 10 mg genau in ein geeignetes Gefäß (z. B. eine Aluminiumschale von 20 × 12 cm mit einem Rand von 0,5 cm) eingewogen und in einem Trockenschrank bei einer Temperatur von 60 bis 70 °C getrocknet, bis der Feuchtigkeitsgehalt einen Wert zwischen 8 und 12 % erreicht hat. Anschließend wird das Gefäß aus dem Trockenschrank genommen, im Labor 1 h lang offen abkühlen gelassen und dann auf 10 mg genau gewogen. Im Folgenden wird die Probe unverzüglich, wie unter 4.1.1 angegeben, zerkleinert und je nach Art des Futtermittels entsprechend den Angaben unter 4.2.1 oder 4.2.3 getrocknet.

## 4.3.2. Getreide

Körner, deren Feuchtigkeitsgehalt höher als 17 % ist, müssen wie folgt vortrocknet werden:

Von den nicht gemahlten Körnern werden 50 g auf 10 mg genau in ein geeignetes Gefäß (z. B. in eine Aluminiumschale von 20 × 12 cm mit einem Rand von 0,5 cm) eingewogen und in einem Trockenschrank bei einer Temperatur von 130 °C 5 bis 7 min getrocknet. Anschließend wird das Gefäß aus dem Trockenschrank genommen, im Labor 2 h lang offen abkühlen gelassen und dann auf 10 mg genau gewogen. Im Folgenden wird die Probe unverzüglich, wie unter 4.1.2 angegeben, gemahlen und entsprechend den Angaben unter 4.2.2 getrocknet.

5. **Berechnung der Ergebnisse**

Der Feuchtigkeitsgehalt (X) der Probe als Prozentsatz wird nach folgenden Formeln berechnet:

5.1. *Trocknung ohne Vortrocknung*

$$X = \frac{(m - m_0)}{m} \times 100$$

wobei:

m = Anfangsgewicht der Probe in g,  
m<sub>0</sub> = Gewicht der trockenen Probe in g.

5.2. *Trocknung mit Vortrocknung*

$$X_p = \left[ \frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left( 1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2} \right)$$

wobei:

m = Anfangsgewicht der Probe in g,  
m<sub>1</sub> = Gewicht der Probe nach der Vortrocknung in g,  
m<sub>2</sub> = Gewicht der Probe nach der Zerkleinerung oder dem Zermahlen in g,  
m<sub>0</sub> = Gewicht der trockenen Probe in g.

**▼B**5.3. *Wiederholbarkeit*

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf 0,2 % Feuchtigkeit (absolut) nicht überschreiten.

6. **Bemerkung**

Wenn eine Zerkleinerung sich als notwendig erweist und dabei mit einer Änderung des Feuchtigkeitsgehalts des Materials gerechnet werden muss, so sind die Analyseergebnisse, die die Bestandteile des Futtermittels betreffen, auf den Feuchtigkeitsgehalt der Originalprobe umzurechnen.

## B. BESTIMMUNG DES FEUCHTIGKEITSGEHALTS IN TIERISCHEN UND PFLANZLICHEN FETTEN UND ÖLEN

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an Wasser und flüchtigen Stoffen in tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen.

2. **Prinzip**

Die Probe wird bei 103 °C getrocknet, bis kein Gewichtsverlust mehr eintritt (der Gewichtsverlust zwischen 2 aufeinanderfolgenden Wägungen darf 1 mg nicht überschreiten). Der Gewichtsverlust wird durch Wiegen bestimmt.

3. **Geräte**

- 3.1. Schale mit flachem Boden, aus korrosionsbeständigem Material, Durchmesser: 8 bis 9 cm, Höhe ca. 3 cm.
- 3.2. Thermometer mit verstärkter Kugel und Ausdehnungsraum am oberen Ende, von ca. 80 bis mindestens 110 °C graduert, Länge ca. 10 cm.
- 3.3. Sandbad oder elektrische Heizplatte.
- 3.4. Exsikkator, der ein wirksames Trocknungsmittel enthält.
- 3.5. Analysenwaage.

4. **Verfahren**

Etwa 20 g der homogenisierten Probe werden auf 1 mg genau in die trockene, gewogene Schale (3.1.) eingewogen, die das Thermometer (3.2) enthält, und auf dem Sandbad oder der elektrischen Heizplatte (3.3) unter ständigem Rühren mit dem Thermometer so erhitzt, dass in ca. 7 min eine Temperatur von 90 °C erreicht wird.

Entsprechend der Häufigkeit, mit der Gasblasen vom Boden der Schale aufsteigen, wird die Heizintensität verringert. Die Temperatur darf 105 °C nicht überschreiten. Unter ständigem Abkratzen des Bodens der Schale wird weiter umgerührt, bis sich keine Blasen mehr bilden.

Um sicherzustellen, dass keine Feuchtigkeit mehr vorhanden ist, wird mehrmals auf 103 °C ± 2 °C erhitzt und zwischen aufeinanderfolgenden Erhitzungen jeweils auf 93 °C gekühlt. Anschließend wird bis zur Raumtemperatur im Exsikkator (3.4) abkühlen gelassen und gewogen. Dieses Verfahren ist so oft zu wiederholen, bis der Gewichtsverlust zwischen 2 aufeinanderfolgenden Wägungen 2 mg nicht mehr überschreitet.

*Anmerkung:* Eine Gewichtserhöhung der Probe nach wiederholter Erwärmung zeigt eine Oxidation des Fettes an. In diesem Fall wird der Berechnung das Ergebnis der Wägung zugrunde gelegt, die unmittelbar vor dem Auftreten der Gewichtszunahme ausgeführt wurde.

5. **Berechnung der Ergebnisse**

Der Feuchtigkeitsgehalt (X) der Probe als Prozentsatz wird nach folgender Formel berechnet:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

**▼ B**

wobei:

$m$  = Probeneinwaage in g,

$m_1$  = Gewicht der Schale mit Inhalt in g vor dem Erhitzen,

$m_2$  = Gewicht der Schale mit Inhalt in g nach dem Erhitzen.

Ergebnisse unter 0,05 % sollten mit der Bezeichnung „weniger als 0,05 %“ angegeben werden.

*Wiederholbarkeit*

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf 0,05 % Feuchtigkeit (absolut) nicht überschreiten.

## C. BESTIMMUNG DES ROHPROTEINGEHALTS

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Berechnung des Rohproteingehalts von Futtermitteln anhand des nach Kjeldahl bestimmten Stickstoffgehalts.

2. **Prinzip**

Die Probe wird durch Schwefelsäure in Anwesenheit eines Katalysators aufgeschlossen. Der saure Aufschluss wird durch eine Natriumhydroxidlösung alkalisiert. Das Ammoniak wird durch Destillation abgetrennt und in einer definierten Menge Schwefelsäure aufgefangen, deren Überschuss durch eine Standard-Natriumhydroxidlösung titriert wird.

Alternativ wird das freigesetzte Ammoniak in überschüssiger Borsäurelösung destilliert, gefolgt von einer Titration mit Salz- oder Schwefelsäurelösung.

3. **Reagenzien**

3.1. Kaliumsulfat.

3.2. Katalysator: Kupfer(II)-oxid,  $\text{CuO}$ , oder Kupfer(II)-sulfatpentahydrat,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

3.3. Zinkgranulat.

3.4. Schwefelsäure,  $\rho_{20} = 1,84$  g/ml.

3.5. Schwefelsäure, volumetrische Standardlösung,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$  mol/l.

3.6. Schwefelsäure, volumetrische Standardlösung,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10$  mol/l.

3.7. Schwefelsäure, volumetrische Standardlösung,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$  mol/l.

3.8. Methylrot-Indikator; 300 mg Methylrot werden in 100 ml Ethanol ( $\sigma = 95$  bis 96 %) gelöst.

3.9. Natriumhydroxidlösung (Verwendung technischer Qualität möglich),  $\beta = 40$  g/100 ml (40 %).

3.10. Natriumhydroxid, volumetrische Standardlösung,  $c(\text{NaOH}) = 0,25$  mol/l.

3.11. Natriumhydroxid, volumetrische Standardlösung,  $c(\text{NaOH}) = 0,10$  mol/l.

3.12. Bimssteinkörner, mit Salzsäure gewaschen und geglüht.

3.13. Acetanilid (Schmelzpunkt = 114 °C, N-Gehalt = 10,36 %).

3.14. Saccharose (stickstofffrei).

3.15. Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ).

3.16. Methylrot-Indikatorlösung: 100 mg Methylrot werden in 100 ml Ethanol oder Methanol gelöst.

**▼ B**

- 3.17. Bromkresolgrünlösung: 100 mg Bromkresolgrün werden in 100 ml Ethanol oder Methanol gelöst.
- 3.18. Borsäurelösung (10 bis 40 g/l in Abhängigkeit vom eingesetzten Gerät)

Bei einer kolorimetrischen Endpunktbestimmung sind der Borsäurelösung Methylrot- und Bromkresolindikatoren zuzufügen. Wird 1 l Borsäurelösung zubereitet, sind vor dem Auffüllen zur Marke 7 ml Methylrot-Indikatorlösung (3.16) und 10 ml Bromkresolgrünlösung (3.17) zuzufügen.

In Abhängigkeit von dem verwendeten Wasser kann sich der pH-Wert von einer Borsäurelösung zur anderen unterscheiden. Häufig ist eine Einstellung des pH-Werts mithilfe einer geringen Menge Alkali erforderlich, um eine positive Blindprobe zu erhalten.

*Anmerkung:* Eine Zugabe von rund 3 ml NaOH (3.11) zu 1 l Borsäure von 10 g/l führt in der Regel zu guten Einstellungen. Die Lösung ist bei Raumtemperatur aufzubewahren und während der Aufbewahrung vor Lichteinfall und Ammoniakdämpfen zu schützen.

- 3.19. Salzsäure, volumetrische Standardlösung,  $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$ .

*Anmerkung:* Andere Konzentrationen volumetrischer Lösungen (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 und 3.19) können verwendet werden, sofern die Berechnungen entsprechend berichtigt werden. Die Konzentrationen sind stets auf 4 Dezimalstellen genau anzugeben.

#### 4. Geräte

Für Aufschluss, Destillation und Titration nach dem Kjeldahl-Verfahren geeignete Geräte.

#### 5. Verfahren

##### 5.1. Aufschluss

Von der Probe wird 1 g auf 0,001 g genau gewogen und in den Kolben des Aufschlussgeräts gegeben. Anschließend werden 15 g Kaliumsulfat (3.1), eine geeignete Katalysatormenge (3.2) (0,3 bis 0,4 g Kupfer(II)-oxid oder 0,9 bis 1,2 g Kupfer(II)-sulfatpentahydrat), 25 ml Schwefelsäure (3.4) und ggf. einige Bimssteinkörnchen (3.12) zugesetzt und vermischt.

Der Kolben wird, wenn notwendig, unter regelmäßigem Schwenken zunächst mäßig erhitzt, bis die Substanz verkohlt ist und das Schäumen aufgehört hat. Dann wird die Flüssigkeit stärker erhitzt und gleichmäßig am Sieden gehalten. Bei korrekter Erhitzung kondensiert die siedende Säure auf der Kolbenwand. Ein Überhitzen der Kolbenwände und Ansetzen organischer Partikel ist zu vermeiden.

Sobald die Lösung klar ist und sich hellgrün färbt, wird sie noch weitere 2 h am Sieden gehalten und danach abkühlen gelassen.

##### 5.2. Destillation

Es wird vorsichtig so viel Wasser zugegeben, dass die Sulfate vollständig gelöst werden. Nach dem Abkühlen werden ggf. einige Körner Zinkgranulat (3.3) zugesetzt. Es wird entweder gemäß 5.2.1 oder 5.2.2 weiterverfahren.

##### 5.2.1. Destillation von Schwefelsäure

In den Auffangkolben des Destillationsapparats werden je nach dem zu erwartenden Stickstoffgehalt genau 25 ml Schwefelsäure (3.5 oder 3.7) gebracht und einige Tropfen Methylrot-Indikator (3.8) hinzugefügt.

**▼B**

Der Aufschlusskolben wird mit dem Kühler des Destillationsapparats verbunden und das Ende des Kühlers mindestens 1 cm tief in die Flüssigkeit des Auffangkolbens gesenkt (siehe Bemerkung 8.3). Dann werden 100 ml Natriumhydroxidlösung (3.9) langsam in den Aufschlusskolben eingefüllt, wobei kein Ammoniak entweichen darf (siehe Bemerkung 8.1). Der Kolben wird so lange erhitzt, bis alles Ammoniak überdestilliert ist.

### 5.2.2. Destillation von Borsäure

Wird der Ammoniakgehalt des Destillats von Hand titriert, findet das im Folgenden beschriebene Verfahren Anwendung. Bei einem voll automatisierten Destilliergerät, das auch die Titration des Ammoniakgehalts des Destillats vornimmt, ist die Betriebsanleitung des Herstellers zu befolgen.

Ein Auffangkolben mit 25 bis 30 ml Borsäurelösung (3.18) wird so unter den Ablauf des Kühlers gestellt, dass sich das Ablaufrohr unter der Oberfläche der überschüssigen Borsäurelösung befindet. Das Destilliergerät wird so eingestellt, dass es 50 ml Natriumhydroxidlösung (3.9) abgibt. Die Bedienung des Destilliergeräts erfolgt entsprechend den Anleitungen des Herstellers. Anschließend wird das durch die Zugabe der Natriumhydroxidlösung freigesetzte Ammoniak abdestilliert. Das Destillat wird in der Borsäure (Auffangssäure) aufgefangen. Die Destillatmenge (Dauer der Dampfdestillation) hängt von der in der Probe enthaltenen Menge Stickstoff ab. Hierbei sind die Anleitungen des Herstellers zu befolgen.

*Anmerkung:* In einem halbautomatischen Destilliergerät erfolgen die Zugabe von überschüssigem Natriumhydroxid und die Dampfdestillation automatisch.

### 5.3. Titration

Es wird entweder gemäß 5.3.1 oder 5.3.2 weiterverfahren.

#### 5.3.1. Schwefelsäure

Die überschüssige Schwefelsäure im Auffangkolben wird mit Natriumhydroxidlösung (3.10 oder 3.11) in Abhängigkeit von der Konzentration der verwendeten Schwefelsäure) titriert, bis der Endpunkt erreicht ist.

#### 5.3.2. Borsäure

Der Inhalt des Auffangkolbens wird mit der volumetrischen Standardlösung der Salzsäure (3.19) oder mit der volumetrischen Standardlösung der Schwefelsäure (3.6) unter Verwendung einer Bürette titriert und die Menge des eingesetzten Titrationsmittels abgelesen.

Bei der kolorimetrischen Endpunktbestimmung ist der Endpunkt erreicht, wenn sich der Inhalt erstmals pink verfärbt. Die Bürette ist auf 0,05 ml genau abzulesen. Eine beleuchtete Magnetrührplatte oder ein fotometrischer Detektor können bei der Visualisierung des Endpunkts hilfreich sein.

Dies kann automatisch erfolgen bei Verwendung eines Wasserdampfdestillators mit automatischer Titration.

Hinsichtlich des Betriebs des jeweiligen Destillators bzw. des Destillier-/Titriergeräts sind die Anleitungen des Herstellers zu befolgen.

*Anmerkung:* Bei Verwendung eines automatischen Titrationssystems beginnt die Titration unmittelbar mit dem Start der Destillation, und es wird die 1%ige Borsäurelösung (3.18) eingesetzt.

**▼ B**

Wird ein vollautomatisches Destilliergerät eingesetzt, kann die automatische Titration des Ammoniaks auch mittels Endpunktbestimmung unter Verwendung eines potenziometrischen pH-Systems durchgeführt werden.

In diesem Fall wird eine automatische Titriervorrichtung mit einem pH-Meter verwendet. Das pH-Meter ist nach dem üblichen Labor-pH-Kalibrierverfahren ordnungsgemäß im Bereich pH 4 bis pH 7 zu kalibrieren.

Der pH-Endpunkt der Titration ist bei einem pH-Wert von 4,6 erreicht, dem steilsten Punkt der Titrationskurve (Wendepunkt).

5.4. *Blindversuch*

Zur Bestätigung, dass die Reagenzien stickstofffrei sind, wird ein Blindversuch (Aufschluss, Destillation und Titration) mit 1 g Saccharose (3.14) anstelle der Probe durchgeführt.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Die Berechnungen werden gemäß 6.1 oder 6.2 durchgeführt.

6.1. *Berechnung für die Titration nach 5.3.1*

Der Rohproteingehalt, ausgedrückt als Massenanteil, wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

wobei:

$V_0$  = Volumen NaOH (3.10 oder 3.11), das im Blindversuch eingesetzt wurde, in ml,

$V_1$  = Volumen NaOH (3.10 oder 3.11), das in der Titration der Probe eingesetzt wurde, in ml,

$c$  = Konzentration des Natriumhydroxids (3.10 oder 3.11), in mol/l,

$m$  = Probeneinwaage in g.

6.2. *Berechnung für die Titration nach 5.3.2*6.2.1. **Titration mit Salzsäure**

Der Rohproteingehalt, ausgedrückt als Massenanteil, wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

wobei:

$m$  = Probeneinwaage in g,

$c$  = Konzentration der volumetrischen Standardlösung von Salzsäure (3.19), in mol/l,

$V_0$  = Volumen der Salzsäure, die im Blindversuch eingesetzt wurde, in ml,

$V_1$  = Volumen der Salzsäure, die für die Probenmenge eingesetzt wurde, in ml.

6.2.2. **Titration mit Schwefelsäure**

Der Rohproteingehalt, ausgedrückt als Massenanteil, wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

**▼ B**

wobei:

$m$  = Probeneinwaage in g,

$c$  = Konzentration der volumetrischen Standardlösung von Schwefelsäure (3.6), in mol/l,

$V_0$  = Volumen der Schwefelsäure (3.6), die im Blindversuch eingesetzt wurde, in ml,

$V_1$  = Volumen der Schwefelsäure (3.6), die für die Probenmenge eingesetzt wurde, in ml.

## 7. **Beurteilung des Verfahrens**

### 7.1. *Wiederholbarkeit*

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf die folgenden Werte nicht überschreiten:

— 0,2 % absolut bei Gehalten von weniger als 20 % Rohprotein,

— 1,0 % relativ zum höheren Wert bei Gehalten von 20 bis 40 % Rohprotein,

— 0,4 % absolut bei Gehalten von mehr als 40 % Rohprotein.

### 7.2. *Genauigkeit*

Die Analyse (Aufschluss, Destillation und Titration) wird mit 1,5 bis 2,0 g Acetanilid (3.13) in Gegenwart von 1 g Saccharose (3.14) durchgeführt; 1 g Acetanilid verbraucht 14,80 ml Schwefelsäure (3.5). Die Wiederfindung muss mindestens 99 % betragen.

## 8. **Bemerkungen**

8.1. Es können manuelle, halbautomatische oder automatische Geräte verwendet werden. Bei Geräten, die ein Umfüllen zwischen Aufschluss und Destillation erfordern, ist darauf zu achten, dass dies verlustlos geschieht. Verfügt der Destillationsapparat nicht über einen Tropftrichter, so erfolgt die Zugabe der Natriumhydroxidlösung unmittelbar vor dem Anschließen des Kolbens an den Kühler; die Flüssigkeit ist in diesem Fall langsam an den Kolbenwänden entlang laufen zu lassen.

8.2. Kommt es während des Aufschlusses zur Verfestigung der Mischung, ist mit der Bestimmung von vorn zu beginnen und eine größere als die oben genannte Menge an Schwefelsäure (3.4) zu verwenden.

8.3. Bei stickstoffarmen Proben kann die in den Auffangkolben einzufüllende Menge Schwefelsäure (3.7) gegebenenfalls auf 10 oder 15 ml verringert und mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt werden.

8.4. Für Routineanalysen können auch andere Methoden zur Bestimmung des Rohproteins herangezogen werden; die in diesem Teil C beschriebene Kjeldahl-Methode ist jedoch die Referenzmethode. Die Gleichwertigkeit der Ergebnisse der alternativen Methode (z. B. DUMAS) im Vergleich zur Referenzmethode muss für jede Matrix einzeln nachgewiesen werden. Da die Ergebnisse einer alternativen Methode auch nach Feststellung ihrer Gleichwertigkeit leicht von den Ergebnissen der Referenzmethode abweichen können, muss im Analysebericht angegeben werden, welche Analyse zur Bestimmung des Rohproteins verwendet wurde.

## D. BESTIMMUNG DES HARNSTOFFGEHALTS

### 1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Harnstoffgehalts von Futtermitteln.

**▼ B****2. Prinzip**

Die Probe wird unter Zusatz eines Klärungsmittels in Wasser suspendiert. Die Suspension wird filtriert. Nach Zugabe von 4-Dimethylaminobenzaldehyd (4-DMAB) wird der Gehalt an Harnstoff im Filtrat durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt.

**3. Reagenzien**

- 3.1. 4-Dimethylaminobenzaldehydlösung: 1,6 g 4-DMAB werden in 100 ml 96 %igen Ethanol gelöst und 10 ml Salzsäure ( $\rho_{20} = 1,19$  g/ml) hinzugefügt. Das Reagenz ist höchstens 2 Wochen haltbar.
- 3.2. Carrez-Lösung I: 21,9 g Zinkacetat,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und 3 g Eisessig werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.
- 3.3. Carrez-Lösung II: 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat (II),  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , werden in Wasser gelöst und auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.
- 3.4. Aktivkohle, keinen Harnstoff adsorbierend (zu prüfen).
- 3.5. Harnstofflösung (Massenkonzentration = 0,1 %).

**4. Geräte**

- 4.1. Mechanisches Schüttelgerät, ca. 35 bis 40  $\text{min}^{-1}$ .
- 4.2. Reagenzgläser: 160 × 16 mm, mit Schliffstopfen.
- 4.3. Spektralfotometer.

**5. Verfahren****5.1. Analysengang der Probe**

Von der Probe werden 2 g auf 1 mg genau eingewogen und mit 1 g Aktivkohle (3.4) in einen 500-ml-Messkolben gebracht. Hierzu werden 400 ml Wasser und 5 ml Carrez-Lösung I (3.2) gegeben, ca. 30 s gemischt und dann 5 ml Carrez-Lösung II (3.3) zugesetzt. Das Ganze wird 30 min lang im Schüttelgerät rotiert. Dann wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und filtriert.

Von den klaren und farblosen Filtraten werden je 5 ml in je ein Reagenzglas mit Schliffstopfen pipettiert, 5 ml 4-DMAB-Lösung (3.1) zugesetzt und gemischt. Die Gläser werden in einem Wasserbad bei 20 °C (+/- 4 °C) temperiert. Nach 15 min wird die Extinktion der Probenlösung im Vergleich mit der Blindprobenlösung der Reagenzien im Spektralfotometer bei 420 nm gemessen.

**5.2. Kalibrationskurve**

Volumen von 1, 2, 4, 5 bzw. 10 ml Harnstofflösung (3.5) werden entnommen, in je 100-ml-Messkolben gebracht und mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Von jeder Lösung werden 5 ml mit je 5 ml 4-DMAB-Lösung (3.1) gemischt. Die Extinktion wird, wie oben angegeben, im Vergleich mit einer Lösung, die 5 ml 4-DMAB und 5 ml harnstofffreies Wasser enthält, gemessen. Es wird eine Kalibrationskurve aufgestellt.

**6. Berechnung der Ergebnisse**

Mithilfe der Kalibrationskurve ist die Menge an Harnstoff in der Versuchsprobe zu bestimmen.

Das Ergebnis ist als Prozentsatz der Probe auszudrücken.

**7. Bemerkungen**

- 7.1. Bei einem Harnstoffgehalt von mehr als 3 % ist die Einwaage auf 1 g zu reduzieren bzw. die Anfangslösung so weit zu verdünnen, dass in 500 ml höchstens 50 mg Harnstoff enthalten sind.

**▼ B**

- 7.2. Bei niedrigen Harnstoffgehalten wird die Einwaage erhöht, soweit das Filtrat klar und farblos bleibt.
- 7.3. Enthält die Probe einfache Stickstoffverbindungen, insbesondere Aminosäuren, so ist die Extinktion bei 435 nm zu messen.

**E. BESTIMMUNG DES GEHALTS AN FLÜCHTIGEN STICKSTOFFHALTIGEN BASEN****I. DURCH MIKRODIFFUSION****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an flüchtigen stickstoffhaltigen Basen, ausgedrückt als Ammoniak, in Futtermitteln.

**2. Prinzip**

Die Probe wird mit Wasser extrahiert, die Lösung geklärt und filtriert. Die flüchtigen stickstoffhaltigen Basen werden nach Zusatz von Kaliumcarbonatlösung durch Mikrodifffusion abgetrennt, in einer Borsäurelösung aufgefangen und mit Schwefelsäure titriert.

**3. Reagenzien**

- 3.1. Trichloressigsäurelösung (Massenkonzentration = 20 %).
- 3.2. Indikator: 33 mg Bromkresolgrün und 65 mg Methylrot werden in 100 ml Ethanol (Volumenkonzentration = 95 bis 96 %) gelöst.
- 3.3. Borsäurelösung: 10 g Borsäure werden in einem 1-l-Messkolben in 200 ml Ethanol (Volumenkonzentration = 95 bis 96 %) und 700 ml Wasser gelöst. Vom Indikator (3.2) werden 10 ml hinzugefügt. Die Lösung wird gemischt und nötigenfalls unter Zusatz von Natriumhydroxidlösung auf eine hellrote Farbe gebracht. Von dieser Lösung kann 1 ml bis zu 300 µg NH<sub>3</sub> binden.
- 3.4. Gesättigte Kaliumcarbonatlösung: 100 g Kaliumcarbonat werden in 100 ml siedendem Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen wird die Lösung filtriert.
- 3.5. 0,01 mol/l Schwefelsäure.

**4. Geräte**

- 4.1. Mechanisches Schüttelgerät, ca. 35 bis 40 min<sup>-1</sup>.
- 4.2. Conwayschalen (vgl. Skizze) aus Glas oder Plastik.
- 4.3. Mikrobüretten mit 0,01-ml-Einteilung.

**5. Verfahren**

Von der Probe werden 10 g auf 1 mg genau gewogen, mit 100 ml Wasser in einen 200-ml-Messkolben gegeben und 30 min lang im Schüttelgerät gemischt oder verrührt. Dann werden 50 ml Trichloressigsäurelösung (3.1) hinzugefügt, mit Wasser zur Marke aufgefüllt, kräftig geschüttelt und durch einen Faltenfilter filtriert.

In die Mitte der Conwayschale wird 1 ml Borsäurelösung (3.3) und in den Ring der Schale 1 ml des Probenfiltrats pipettiert. Die Schale wird mit dem angefetteten Deckel teilweise bedeckt; dann wird schnell 1 ml der gesättigten Kaliumcarbonatlösung (3.4) in den Ring gegeben und die Schale luftdicht verschlossen. Um mit Sicherheit eine Mischung der beiden Reagenzien zu erreichen, wird die Schale vorsichtig in waagerechter Stellung gedreht. Darauf lässt man das Ganze mindestens 4 h lang bei Raumtemperatur oder 1 h lang bei 40 °C stehen.

Die in der Borsäurelösung enthaltenen flüchtigen Basen werden anschließend mit Schwefelsäure (3.5) unter Verwendung einer Mikrobürette (4.3) titriert.

Nach demselben Verfahren ist ein Blindversuch ohne die zu analysierende Probe durchzuführen.

**▼ B****6. Berechnung der Ergebnisse**

1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,01 mol/l) entspricht 0,34 mg Ammoniak.

Das Ergebnis ist als Prozentsatz der Probe auszudrücken.

Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf die folgenden Werte nicht überschreiten:

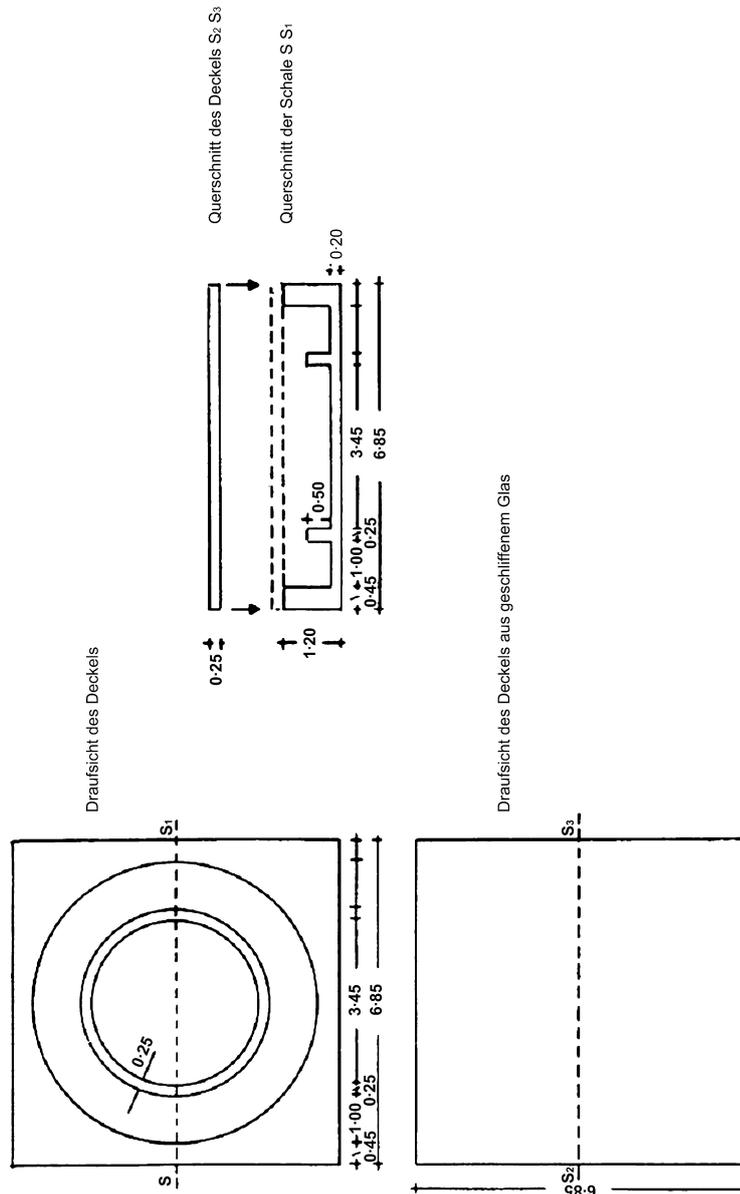
- 10 % relativ bei Ammoniakgehalten von weniger als 1,0 %,
- 0,1 % absolut bei Ammoniakgehalten von 1,0 % oder mehr.

**7. Bemerkung**

Enthält die Probe mehr als 0,6 % Ammoniak, ist das ursprüngliche Filtrat zu verdünnen.

**CONWAY CELL**

Scale 1/1



**▼B****II. DURCH DESTILLATION****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an flüchtigen stickstoffhaltigen Basen, ausgedrückt als Ammoniak, in Fischmehl, das praktisch keinen Harnstoff enthält. Sie ist nur anzuwenden bei Gehalten < 0,25 % Ammoniak.

**2. Prinzip**

Die Probe wird mit Wasser extrahiert, die Lösung geklärt und filtriert. Die flüchtigen stickstoffhaltigen Basen werden nach Zusatz von Magnesiumoxid in der Siedehitze abgetrennt und in einer definierten Menge Schwefelsäure aufgefangen, deren Überschuss durch Natriumhydroxidlösung zurücktitriert wird.

**3. Reagenzien**

- 3.1. Trichloressigsäurelösung (Massenkonzentration = 20 %).
- 3.2. Magnesiumoxid.
- 3.3. Antischaumemulsion (z. B. Silikon).
- 3.4. 0,05 mol/l Schwefelsäure.
- 3.5. 0,1 mol/l Natriumhydroxidlösung.
- 3.6. Methylrotlösung 0,3 %, in Ethanol (Volumenkonzentration = 95 bis 96 %).

**4. Geräte**

- 4.1. Mechanisches Schüttelgerät, ca. 35 bis 40 min<sup>-1</sup>.
- 4.2. Destillationsapparatur nach Kjeldahl.

**5. Verfahren**

Von der Probe werden 10 g auf 1 mg genau gewogen, mit 100 ml Wasser in einen 200-ml-Messkolben gegeben und 30 min lang im Schüttelgerät gemischt oder gerührt. Dann werden 50 ml Trichloressigsäurelösung (3.1) hinzugefügt, es wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt, kräftig geschüttelt und durch einen Faltenfilter filtriert.

Je nach dem vermuteten Gehalt an flüchtigen stickstoffhaltigen Basen wird eine entsprechende Menge (im Allgemeinen 100 ml) des klaren Filtrats auf 200 ml verdünnt und 2 g Magnesiumoxid (3.2) sowie einige Tropfen Antischaumemulsion (3.3) hinzugefügt. Die Lösung muss gegen Lackmuspapier alkalisch reagieren; anderenfalls ist noch Magnesiumoxid (3.2) zuzusetzen. Es ist gemäß 5.2 und 5.3 der Analysenmethode zur Bestimmung des Rohproteingehalts (Teil C dieses Anhangs) weiterzuverfahren.

Nach demselben Verfahren ist ein *Blindversuch* ohne die zu analysierende Probe durchzuführen.

**6. Berechnung der Ergebnisse**

1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,05 mol/l) entspricht 1,7 mg Ammoniak.

Das Ergebnis ist als Prozentsatz der Probe auszudrücken.

*Wiederholbarkeit*

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf 10 % (relativ) Ammoniak nicht überschreiten.

**F. BESTIMMUNG DES GEHALTS AN AMINOSÄUREN (AUSSER TRYPTOPHAN)****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an freien (synthetischen und natürlichen) sowie der gesamten (peptidgebundenen und freien) Aminosäuren in Futtermitteln unter Verwendung eines Aminosäureanalysators. Die Methode ist für folgende Aminosäuren anwendbar:

**▼ B**

Cyst(e)in, Methionin, Lysin, Threonin, Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin und Valin.

Die Methode unterscheidet nicht zwischen Salzen von Aminosäuren und dient auch nicht zur Unterscheidung der D- und L-Formen der Aminosäuren. Sie ist nicht zur Bestimmung des Gehalts an Tryptophan oder Hydroxyanaloga der Aminosäuren anwendbar.

**2. Prinzip****2.1. Freie Aminosäuren**

Die freien 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 Ionenaustauschchromatografie getrennt und nach Reaktion mit Ninhydrin durch fotometrischen Nachweis bei 570 nm bestimmt.

**2.2. Gesamtaminosäuren**

Die gewählte Methode hängt von den zu untersuchenden Aminosäuren ab. Cyst(e)in und Methionin müssen vor der Hydrolyse zu Cysteinsäure bzw. 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 der 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. die nicht oxidierte Probe wird mit Salzsäure (3,20) 23 h lang hydrolysiert. Das Hydrolysat wird auf einen pH-Wert von 2,20 eingestellt. Die Aminosäuren werden durch Ionenaustauschchromatografie getrennt und nach Reaktion mit Ninhydrin fotometrisch bei 570 nm (bei Prolin 440 nm) bestimmt.

**3. Reagenzien**

Es ist bidestilliertes Wasser oder Wasser gleichwertiger Qualität zu verwenden (Leitfähigkeit < 10 µS/cm).

- 3.1. Wasserstoffperoxid, w (Massenanteil) = 30 %.
- 3.2. Ameisensäure, w (Massenanteil) = 98 bis 100 %.
- 3.3. Phenol.
- 3.4. Natriumdisulfit.
- 3.5. Natriumhydroxid.
- 3.6. 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat.
- 3.7. Salzsäure, Dichte ca. 1,18 g/ml.
- 3.8. Tri-Natriumcitrat-Dihydrat.
- 3.9. 2,2'-Thiodiethanol (Thiodiglycol).
- 3.10. Natriumchlorid.
- 3.11. Ninhydrin.
- 3.12. Petrolether, Siedepunktintervall 40 bis 60 °C.
- 3.13. Norleucin oder sonstige für die Verwendung als interner Standard geeignete Verbindung.

**▼ B**

- 3.14. Stickstoffgas (< 10 ppm Sauerstoff).
- 3.15. 1-Octanol.
- 3.16. Aminosäuren.
- 3.16.1. Standardstoffe gemäß Auflistung unter 1. Es dürfen nur reine Verbindungen ohne Kristallwasser verwendet werden. Sie sind vor der Verwendung im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 Woche lang zu trocknen.
- 3.16.2. Cysteinsäure.
- 3.16.3. Methioninsulfon.
- 3.17. Natriumhydroxidlösung, c = 7,5 mol/l:  
300 g NaOH (3.5) in Wasser lösen und auf 1 l auffüllen.
- 3.18. Natriumhydroxidlösung, c = 1 mol/l:  
40 g NaOH (3.5) in Wasser lösen und auf 1 l auffüllen.
- 3.19. Phenolhaltige Ameisensäurelösung:  
889 g Ameisensäure (3.2) werden mit 111 g Wasser gemischt; anschließend 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, β = 6 %:  
60 g 5-Sulfosalicylsäure (3.6) in Wasser lösen und mit Wasser auf 1 l auffüllen.
- 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 bis 30 °C 1 h stehen gelassen, um die Bildung von Perameisensäure zu bewirken. Anschließend wird die Lösung 15 min in ein Eisbad gestellt, bevor sie der Probe zugegeben wird.  
  
Vorsicht: Hautkontakt vermeiden und Schutzkleidung tragen.
- 3.24. Citratpufferlösung, c = 0,2 mol Na<sup>+</sup>/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. Der pH-Wert wird auf 2,20 eingestellt. Mit Wasser auf 1 l auffüllen.
- 3.25. Elutionspuffer entsprechend den Anforderungen 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.

**▼ B**

## 3.27.1. Aminosäuren-Standard-Stammlösung (3.16.1):

$c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$  je Aminosäure in Salzsäure

Diese Lösung ist im Handel erhältlich.

3.27.2. Standard-Stammlösung von Cysteinsäure und Methioninsulfon,  $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$ :

0,2115 g Cysteinsäure (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 zur Marke aufgefüllt. Die Lösung ist bei  $< 5 \text{ }^\circ\text{C}$  höchstens 12 Monate haltbar. Sie wird nicht benötigt, falls die Standard-Stammlösung (3.27.1) bereits Cysteinsäure und Methioninsulfon enthält.

3.27.3. Stammlösung des internen Standards, z. B. Norleucin,  $c = 20 \mu\text{mol/ml}$ :

0,6560 g Norleucin (3.13) werden in Citratpufferlösung (3.24) in einem Messkolben gelöst, und es wird mit Citratpufferlösung auf 250 ml aufgefüllt. Diese Lösung ist bei  $< 5 \text{ }^\circ\text{C}$  höchstens 6 Monate haltbar.

3.27.4. Aminosäurenkalibrierlösung zur Verwendung bei Hydrolysaten,  $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$  Cysteinsäure und Methioninsulfon und  $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$  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 Methioninsulfon (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 quantitativ in einen 50-ml-Messkolben überführt, und es wird mit Citratpufferlösung (3.24) zur Marke aufgefüllt und gemischt.

Die Lösung ist bei  $< 5 \text{ }^\circ\text{C}$  höchstens 3 Monate haltbar.

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  $< 5 \text{ }^\circ\text{C}$  höchstens 3 Monate haltbar.

**4. Geräte**

- 4.1. 100- oder 250-ml-Rundkolben mit Rückflusskühler.
- 4.2. 100-ml-Borosilikat-Glasflaschen mit Schraubverschluss mit Gummidichtung/teflonbeschichteter Dichtung (z. B. Duran, Schott).
- 4.3. Trockenschrank mit forcierter Umluft, auf  $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  regelbar.
- 4.4. pH-Meter (auf drei Dezimalstellen genau).
- 4.5. Membranfilter,  $0,22 \mu\text{m}$  Porengröße.
- 4.6. Zentrifuge.
- 4.7. Vakuum-Rotationsverdampfer.
- 4.8. Mechanischer Schüttler oder Magnetrührer.

**▼ B**

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

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 Kalibrationslaufes und des Probenlaufes eine Flussstabilität von  $\pm 0,5\%$  gewährleisten.

Bei einigen Aminosäureanalysatoren können auch Hydrolyseverfahren angewandt 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 ist unter Vakuum bei höchstens 40 °C vorzunehmen.

## 5. Verfahren

### 5.1. Vorbereitung der Probe

Die Probe wird so fein vermahlen, dass sie ein Sieb mit 0,5 mm Maschenweite passieren kann. Proben mit hohem Feuchtigkeitsgehalt müssen vor dem Vermahlen entweder bei einer Temperatur von höchstens 50 °C luftgetrocknet oder aber gefriergetrocknet werden. Proben mit hohem Fettgehalt sind vor dem Vermahlen mit Petrolether (3.12) zu extrahieren.

### 5.2. Bestimmung des Gehalts an freien Aminosäuren in Futtermitteln und Vormischungen

Eine geeignete Menge (1 bis 5 g) der vorbereiteten Probe (5.1) auf 0,2 mg genau in einen Erlenmeyerkolben einwiegen und 100,0 ml Extraktionslösung (3.21) hinzufügen. Mit einem mechanischen Schüttler 60 min schütteln bzw. mit einem Magnetrührer (4.8) rühren. Nach dem Absetzen lassen werden mit einer Pipette 10,0 ml der überstehenden Lösung in ein 100-ml-Becherglas gegeben.

Es werden 5,0 ml Sulfosalicylsäurelösung (3.22) unter Rühren hinzugefügt, und mithilfe des Magnetrührers wird 5 min weitergerührt. Die überstehende Lösung wird filtriert oder zentrifugiert, um alle Ausfällungen zu entfernen. Von der klaren Lösung werden 10,0 ml 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 (3.24) zur Marke aufgefüllt.

Bei Verwendung eines internen Standards werden vor dem Auffüllen 1,00 ml der Stammlösung des internen Standards (3.27.3) für jeweils 100 ml Endlösung hinzugefügt und mit Citratpufferlösung (3.24) zur Marke aufgefüllt.

Anschließend wird die Chromatografie gemäß 5.4 durchgeführt.

Werden die Extrakte nicht am selben Tag chromatografiert, sind sie bei  $< 5$  °C aufzubewahren.

### 5.3. Bestimmung des Gehalts an Gesamtaminosäuren

#### 5.3.1. Oxidation

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

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

**▼ B**

- in einen 250-ml-Rundkolben (4.1), falls eine niedrige Natriumionen-konzentration (5.3.3.1) erforderlich ist, oder
- in eine 100-ml-Flasche mit Schraubverschluss (4.2) für die geschlossene Hydrolyse (5.3.2.4).

Die Einwaage muss einen Stickstoffgehalt von etwa 10 mg und einen Feuchtigkeitsgehalt von höchstens 100 mg haben.

Der Kolben/die Flasche wird in ein Eisbad gestellt und auf 0 °C abgekühlt. Dann werden 5 ml der Oxidationsmischung (3.23) hinzugefügt, und es wird mithilfe eines Glasspatels mit gebogener Spitze gemischt. Der Behälter, der den Spatel enthält, wird mit einer luftdichten Folie verschlossen, das Eiswasserbad mit dem verschlossenen Behälter in einen Kühlschrank mit einer Temperatur von 0 °C gestellt und 16 h stehen gelassen. Nach 16 h wird der Behälter aus dem Kühlschrank genommen und das überschüssige Oxidationsreagenz durch Zusatz von 0,84 g Natriumdisulfit (3.4) zersetzt.

Es wird gemäß 5.3.2.1 weiterverfahren.

### 5.3.2. Hydrolyse

#### 5.3.2.1. *Hydrolyse der oxidierten Proben*

Zu der oxidierten Probe (die gemäß 5.3.1 vorbereitet wurde) 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 Proben*

In einen 100-ml- oder 250-ml-Rundkolben (4.1) bzw. in eine 100-ml-Flasche mit Schraubverschluss (4.2) werden 0,1 bis 1 g der vorbereiteten Probe (5.1) auf 0,2 mg genau eingewogen. Die Einwaage muss einen Stickstoffgehalt von ca. 10 mg aufweisen. Vorsichtig 25 ml Hydrolysemischung (3.20) hinzufügen und mit der Probe vermischen. Es wird entweder gemäß 5.3.2.3 oder gemäß 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 3 Glasperlen hinzugegeben. Sie wird zum Sieden erhitzt und unter Rückfluss genau 23 h am 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 und eine Explosion zu verhindern, wird der Schraubverschluss 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 (4.3) belassen. Nach Beendigung der Hydrolyse wird die Flasche aus dem Trockenschrank genommen, der Verschluss vorsichtig geöffnet, die Flasche in ein Eisbad 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 gemäß 5.3.3 weiterverfahren.

**▼B**

## 5.3.3. pH-Wert-Einstellung

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

5.3.3.1. *Für Aminosäureanalysatoren oder HPLC-Einrichtungen (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 einer Stammlösung eines internen Standards (3.27.3) empfohlen.

In diesem Fall sind dem Hydrolysat vor dem Verdampfen 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 2 Tropfen 1-Octanol (3.15) gegeben.

Das Volumen wird am Rotationsverdampfer (4.7) unter Vakuum bei 40 °C auf 5 bis 10 ml reduziert. Wurde das Volumen beim Einengen versehentlich 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 gemäß 5.3.4 weiterverfahren.

5.3.3.2. *Für alle sonstigen Aminosäureanalysatoren (4.9)*

Die nach 5.3.2.3 oder 5.3.2.4 erhaltenen Hydrolysate werden 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 anschließend 3.18) bei Raumtemperatur auf 2,20 eingestellt, und es wird gemäß 5.3.4 weiterverfahren.

## 5.3.4. Probenlösung für die Chromatografie

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 (3.24) zur Marke aufgefüllt.

Falls bisher noch kein interner Standard hinzugefügt worden ist, werden vor dem Auffüllen 2,00 ml des internen Standards (3.27.3) hinzugegeben und dann mit Citratpufferlösung (3.24) zur Marke aufgefüllt. Es wird sorgfältig gemischt.

Anschließend wird die Chromatografie gemäß 5.4 durchgeführt.

Falls die Probenlösungen nicht am selben Tag chromatografiert werden, sind sie bei < 5 °C aufzubewahren.

5.4. *Chromatografie*

Falls erforderlich, wird der Extrakt (5.2) oder das Hydrolysat (5.3.4) vor der Chromatografie auf Raumtemperatur gebracht. Die Mischung wird geschüttelt und eine geeignete Menge durch einen 0,22-µm-Membranfilter (4.5) filtriert. Die so erhaltene klare Lösung wird der Ionenaustauschchromatografie unter Verwendung eines Aminosäureanalysators bzw. einer HPLC-Einrichtung (4.9) unterzogen.

Die Einspritzung kann von Hand oder automatisch erfolgen. Wesentlich ist, dass jeweils die gleiche Menge  $\pm 0,5$  % der Standardlösung und der Probenlösung eingespritzt wird, es sei denn, 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.

**▼B**

Die Häufigkeit von Kalibrationsläufen hängt von der Stabilität des Ninhydrinreagenzes und des Analysatorsystems ab. Die Standardlösung oder die Probenlösung wird mit Citratpufferlösung (3.24) so verdünnt, dass die Peakfläche des Standards etwa 30 bis 200 % der Peakfläche der einzelnen Aminosäuren in der Probenlösung ausmacht.

Die Chromatografie der Aminosäuren unterscheidet sich leicht je nach Art des verwendeten Analysators und des eingesetzten Harzes. Das System muss in der Lage sein, die Aminosäuren vollständig voneinander und von den sonstigen Ninhydrin-positiven Substanzen zu trennen. Im Betriebsbereich muss das chromatografische System bei Änderungen der Aminosäuremengen, die der Säule hinzugefügt wird, eine lineare Reaktion aufweisen.

Wird eine equimolare Lösung der zu bestimmenden Aminosäuren analysiert, sollten bei der Chromatografie 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 (4.9) noch präzise bestimmt werden kann.

Für die Trennung von Threonin-Serin darf das Verhältnis von Tal zur Peakhöhe des niedrigeren der 2 sich überlappenden Peaks auf dem Chromatogramm nicht mehr als 2:10 betragen (wenn nur Cyst(e)in, Methionin, Threonin und Lysin bestimmt werden, beeinträchtigt eine unzureichende Trennung von angrenzenden Peaks die Bestimmung). 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 Kalibrationsstandardpeaks werden für jede einzelne Aminosäure bestimmt und der Gehalt (X) in g Aminosäure je kg Probe berechnet:

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1\,000}$$

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

- A = Peakfläche, Hydrolysat oder Extrakt
- B = Peakfläche, Kalibrierstandardlösung
- C = Peakfläche, interner Standard im Hydrolysat oder Extrakt
- D = Peakfläche, interner Standard, Kalibrierstandardlösung
- M = Molmasse der zu bestimmenden Aminosäure
- c = Konzentration des Standards in  $\mu\text{mol/ml}$
- m = Probeneinwaage (auf Originalgewicht berichtigt, falls getrocknet oder entfettet), in g
- V = Gesamtvolumen des Hydrolysats (5.3.4) in ml oder errechnetes Gesamtverdünnungsvolumen des Extrakts (6.1) in ml

Sowohl Cystin als auch Cystein werden im Hydrolysat der oxidierten Probe als Cysteinsäure bestimmt, jedoch als Cystin ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ ,  $M = 240,30 \text{ g/mol}$ ) unter Verwendung der Molmasse von  $120,15 \text{ g/mol}$  ( $0,5 \times 240,30 \text{ g/mol}$ ) berechnet.

Methionin wird als Methioninsulfon in Hydrolysaten der oxidierten Probe bestimmt, aber unter Verwendung des M von Methionin ( $149,21 \text{ g/mol}$ ) als Methionin berechnet.

**▼B**

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

- 6.1. Das Gesamtverdünnungsvolumen der Extrakte (F) für die Bestimmung des Gehalts an freien Aminosäuren (5.2) wird wie folgt berechnet:

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

V = Volumen des Endextrakts.

7. **Beurteilung des Verfahrens**

Das Verfahren ist in einem auf internationaler Ebene im Jahr 1990 durchgeführten Vergleichstest an 4 verschiedenen Futtermitteln (Mischfuttermittel für Schweine, Mischfuttermittel für Mastküken, Eiweißkonzentrat und einer Vormischung) erprobt worden. Die nach der Eliminierung von Ausreißern erhaltenen Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) sind in den Tabellen unter diesem Punkt dargestellt.

**Mittelwerte in g/kg**

Referenzmaterial	Aminosäure			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Schweinemischfütter	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Mastkükenmischfütter	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 Standardabweichung der Wiederholbarkeit, für den oben genannten Vergleichstest in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Standardabweichung der Wiederholbarkeit ( $s_r$ ) in g/kg**

Referenzmaterial	Aminosäure			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Schweinemischfütter	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Mastkükenmischfütter	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.

## ▼B

**Variationskoeffizient (%) für die Standardabweichung der Wiederholbarkeit ( $s_r$ )**

Referenzmaterial	Aminosäure			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Schweinemischfutter	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Mastküenmischfutter	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 hinsichtlich der Standardabweichung der Vergleichbarkeit, die sich aus den oben genannten Untersuchungen ergeben, sind in nachstehender Tabelle dargestellt.

**Standardabweichung der Vergleichbarkeit ( $s_R$ ) in g/kg**

Referenzmaterial	Aminosäure			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Schweinemischfutter	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Mastküenmischfutter	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.

**Variationskoeffizient (%) für die Standardabweichung der Vergleichbarkeit ( $s_R$ )**

Referenzmaterial	Aminosäure			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Schweinemischfutter	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Mastküenmischfutter	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.

**▼ B****8. Verwendung von Referenzmaterialien**

Die korrekte Anwendung der Methode ist durch Mehrfachbestimmungen an zertifizierten Referenzmaterialien (soweit verfügbar) zu überprüfen. Für die Kalibration wird die Verwendung einer zertifizierten Aminosäurestandardlösung empfohlen.

**9. Bemerkungen**

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

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

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

- 9.2. Falls Geräte für die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie 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 (Krafftuttermittel, Mineralfuttermittel, Ergänzungsfuttermittel), so könnte der Methioningehalt unterschätzt werden, und es ist eine modifizierte Oxidation erforderlich.

**G. BESTIMMUNG DES TRYPTOPHANGEHALTS****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gesamtgehalts an Tryptophan und des Gehalts an freiem Tryptophan in Futtermitteln. Sie dient nicht zur Unterscheidung zwischen D- und L-Formen.

**2. Prinzip**

Zur Bestimmung des Gesamtgehalts an Tryptophan wird die Probe unter alkalischen Bedingungen mit gesättigter Bariumhydroxid-Lösung hydrolysiert, auf 110 °C erhitzt und 20 h auf dieser Temperatur gehalten. Nach der Hydrolyse wird ein interner Standard zugegeben.

Zur Bestimmung des Gehalts an freiem Tryptophan wird die Probe unter leicht sauren Bedingungen in Gegenwart eines internen Standards extrahiert.

Tryptophan und der interne Standard im Hydrolysat bzw. im Extrakt werden durch HPLC mit Fluoreszenzdetektor bestimmt.

**3. Reagenzien**

- 3.1. Es ist bidestilliertes Wasser oder Wasser gleichwertiger Qualität zu verwenden (Leitfähigkeit < 10 µS/cm).
- 3.2. Standardsubstanz: Tryptophan (Reinheit/Gehalt ≥ 99 %), im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.
- 3.3. Interner Standard: α-Methyl-Tryptophan (Reinheit/Gehalt ≥ 99 %), im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.
- 3.4. Bariumhydroxid-Octahydrat (das Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O darf nicht übermäßig der Luft ausgesetzt werden, um die Bildung von BaCO<sub>3</sub> zu vermeiden, das die Bestimmung beeinträchtigen könnte) (siehe Bemerkung 9.3).
- 3.5. Natriumhydroxid.
- 3.6. Orthophosphorsäure, w (Massenanteil) = 85 %.
- 3.7. Salzsäure, ρ<sub>20</sub> = 1,19 g/ml.
- 3.8. Methanol, HPLC-Qualität.
- 3.9. Petrolether, Siedebereich 40 bis 60 °C.

**▼ B**

- 3.10. Natriumhydroxidlösung,  $c = 1 \text{ mol/l}$ :
- 40,0 g NaOH (3.5) in Wasser lösen und mit Wasser (3.1) auf 1 l auffüllen.
- 3.11. Salzsäure,  $c = 6 \text{ mol/l}$ :
- 492 ml HCl (3.7) mit Wasser auf 1 l auffüllen.
- 3.12. Salzsäure,  $c = 1 \text{ mol/l}$ :
- 82 ml HCl (3.7) mit Wasser auf 1 l auffüllen.
- 3.13. Salzsäure,  $c = 0,1 \text{ mol/l}$ :
- 8,2 ml HCl (3.7) mit Wasser auf 1 l auffüllen.
- 3.14. Orthophosphorsäure,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$ :
- 34 ml Orthophosphorsäure (3.6) mit Wasser (3.1) auf 1 l auffüllen.
- 3.15. Konzentrierte Tryptophanlösung (3.2),  $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ :
- 0,2553 g Tryptophan (3.2) in einem 500-ml-Messkolben in Salzsäure (3.13) lösen und mit Salzsäure (3.13) zur Marke auffüllen. Bei  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  höchstens 4 Wochen aufbewahren.
- 3.16. Konzentrierte interne Standardlösung,  $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ :
- 0,2728 g  $\alpha$ -Methyl-Tryptophan (3.3) in einem 500-ml-Messkolben in Salzsäure (3.13) lösen und mit Salzsäure (3.13) zur Marke auffüllen. Bei  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  höchstens 4 Wochen aufbewahren.
- 3.17. Kalibrierstandardlösung von Tryptophan und internem Standard:
- 2,00 ml konzentrierte Tryptophanlösung (3.15) und 2,00 ml konzentrierte interne Standardlösung ( $\alpha$ -Methyl-Tryptophan) (3.16) mit Wasser (3.1) und Methanol (3.8) auf etwa dasselbe Volumen und etwa dieselbe Methanolkonzentration (10 bis 30 %) wie das fertige Hydrolysat verdünnen.
- Diese Lösung muss vor Gebrauch frisch hergestellt werden.
- Während der Zubereitung vor direktem Sonnenlicht schützen.
- 3.18. Essigsäure.
- 3.19. 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol.
- 3.20. Ethanolamin,  $w$  (Massenanteil)  $> 98 \%$ .
- 3.21. Lösung von 1 g 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol (3.19) in 100 ml Methanol (3.8).
- 3.22. Mobile Phase für die HPLC: 3,00 g Essigsäure (3.18) + 900 ml Wasser (3.1) + 50,0 ml Lösung (3.21) von 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol (3.19) in Methanol (3.8) (1g/100ml). Der pH-Wert wird mit Ethanolamin (3.20) auf 5,00 eingestellt. Mit Wasser (3.1) auf 1 l auffüllen.
4. **Geräte**
- 4.1. HPLC-Einrichtung mit Fluoreszenzdetektor.
- 4.2. HPLC-Trennsäule,  $125 \times 4 \text{ mm}$ ,  $\text{C}_{18}$ ,  $3 \text{ } \mu\text{m}$  Korngröße, oder vergleichbare Säule.
- 4.3. pH-Meter.
- 4.4. Polypropylen-Kolben, 125 ml, Weithals mit Schraubverschluss.

**▼ B**

- 4.5. Membranfilter, 0,45 µm Porengröße.
- 4.6. Autoklav, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.
- 4.7. Mechanischer Schüttler oder Magnetrührer.
- 4.8. Vortex-Schüttelgerät.

**5. Verfahren****5.1. Vorbereitung der Proben**

Die Probe wird so fein vermahlen, dass sie ein Sieb mit 0,5 mm Maschenweite passieren kann. Proben mit hohem Feuchtigkeitsgehalt müssen vor dem Vermahlen entweder bei einer Temperatur von höchstens 50 °C luftgetrocknet oder aber gefriergetrocknet werden. Proben mit hohem Fettgehalt sind vor dem Vermahlen mit Petrolether (3.9) zu extrahieren.

**5.2. Bestimmung des Gehalts an freiem Tryptophan (Extrakt)**

Eine geeignete Menge (1 bis 5 g) der vorbereiteten Probe (5.1) auf 1 mg genau in einen Erlenmeyerkolben einwiegen. 100,0 ml Salzsäure (3.13) und 5,00 ml konzentrierte interne Standardlösung (3.16) zugeben. Mit einem mechanischen Schüttler oder einem Magnetrührer (4.7) 60 min schütteln bzw. mischen. Absetzen lassen und 10,0 ml der überstehenden Lösung in ein Becherglas pipettieren. 5 ml Orthophosphorsäure (3.14) zugeben. Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxidlösung (3.10) auf 3 eingestellt. Ausreichend Methanol (3.8) für eine Methanolkonzentration von 10 bis 30 % im Endvolumen zugeben. In einen Messkolben mit ausreichendem Volumen überführen und mit Wasser auf das für die Chromatografie notwendige Volumen verdünnen (entspricht etwa dem Volumen der Kalibrierstandardlösung (3.17)).

Einige ml der Lösung werden vor der Einspritzung in die HPLC-Säule durch einen 0,45-µm-Membranfilter (4.5) filtriert. Die Chromatografie gemäß 5.4 durchführen.

Standardlösung und Extrakte sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen. Falls es nicht möglich ist, die Extrakte am selben Tag zu analysieren, können sie bei 5 °C maximal 3 Tage aufbewahrt werden.

**5.3. Bestimmung des Gehalts an Gesamttryptophan (Hydrolysat)**

0,1 bis 1 g der vorbereiteten Probe (5.1) werden auf 0,2 mg genau in den Polypropylenkolben (4.4) eingewogen. Die Einwaage muss einen Stickstoffgehalt von ca. 10 mg aufweisen. 8,4 g Bariumhydroxid-Octahydrat (3.4) und 10 ml Wasser zugeben. Mithilfe eines Vortex-Schüttelgeräts (4.8) oder Magnetrührgeräts (4.7) mischen. Den teflonbeschichteten Magneten in der Mischung lassen. Die Gefäßwände mit 4 ml Wasser abspülen. Schraubkappe aufsetzen und Kolben locker verschließen. In einem Autoklaven (4.6) 30 bis 60 min mit kochendem Wasser erhitzen. Den Autoklaven schließen und 20 h bei 110 (+/- 2) °C autoklavieren.

Vor dem Öffnen des Autoklaven ist die Temperatur auf knapp unter 100 °C zu senken. Um Kristallisation des Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O zu vermeiden, sind der warmen Mischung 30 ml Wasser mit Zimmertemperatur zuzugeben. Leicht schütteln oder rühren. 2,00 ml konzentrierte interne Standardlösung (α-Methyl-Tryptophan) (3.16) zugeben. Die Gefäße im Wasser-/Eisbad 15 min kühlen.

Anschließend 5 ml Orthophosphorsäure (3.14) zugeben. Das Gefäß im Kühlbad belassen und unter Rühren mit HCl (3.11) neutralisieren; der pH-Wert wird mit HCl (3.12) auf 3,0 eingestellt. Ausreichend Methanol für eine Methanolkonzentration von 10 bis 30 % im Endvolumen zugeben. In einen Messkolben mit ausreichendem Volumen überführen und mit Wasser auf das für die Chromatografie notwendige Volumen verdünnen (z. B. 100 ml). Die Zugabe von Methanol darf keine Präzipitation verursachen.

**▼ B**

Einige ml der Lösung werden vor der Einspritzung in die HPLC-Säule durch einen 0,45-µm-Membranfilter (4.5) filtriert. Die Chromatografie gemäß 5.4 durchführen.

Standardlösung und Extrakte sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen. Falls es nicht möglich ist, die Hydrolysate am selben Tag zu analysieren, können sie bei 5 °C höchstens 3 Tage aufbewahrt werden.

5.4. *HPLC-Bestimmung*

Die folgenden Angaben für eine isokratische Trennung sind Richtwerte; andere Parameter können verwendet werden, sofern sie zu vergleichbaren Ergebnissen führen (siehe auch Bemerkungen 9.1 und 9.2):

HPLC-Trennsäule (4.2):	125 × 4 mm, C <sub>18</sub> , 3 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule
Säulentemperatur:	Raumtemperatur
Mobile Phase (3.22):	3,00 g Essigsäure (3.18) + 900 ml Wasser (3.1) + 50,0 ml Lösung (3.21) von 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol (3.19) in Methanol (3.8) (1 g/100 ml). Den pH-Wert mit Ethanolamin (3.20) auf 5,0 einstellen. Mit Wasser (3.1) auf 1 l auffüllen.
Durchflussrate:	1 ml/min
Gesamtlaufzeit:	ca. 34 min
Detektionswellenlänge:	Anregung: 280 nm, Emission: 356 nm
Einspritzvolumen:	20 µl

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Die Menge von Tryptophan (X) in g je 100 g Probe wird wie folgt berechnet:

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = Peakfläche des internen Standards; Kalibrierstandardlösung (3.17)

B = Peakfläche von Tryptophan, Extrakt (5.2) oder Hydrolysat (5.3)

V<sub>1</sub> = Volumen der konzentrierten Tryptophanlösung (3.15), das der Kalibrierlösung (3.17) zugegeben wurde, in ml (2 ml)

c = Konzentration der konzentrierten Tryptophanlösung (3.15), die der Kalibrierlösung (3.17) zugegeben wurde, in µmol/ml (= 2,50)

V<sub>2</sub> = Volumen der konzentrierten internen Standardlösung (3.16), das bei der Extraktion (5.2) (= 5,00 ml) oder dem Hydrolysat (5.3) (= 2,00 ml) zugegeben wurde, in ml

C = Peakfläche des internen Standards, Extrakt (5.2) oder Hydrolysat (5.3)

D = Peakfläche von Tryptophan, Kalibrierstandardlösung (3.17)

V<sub>3</sub> = Volumen der konzentrierten internen Standardlösung (3.16), das der Kalibrierstandardlösung (3.17) zugegeben wurde, in ml (2,00 ml)

m = Probeneinwaage (korrigiert auf Originalgewicht, falls getrocknet und/oder entfettet), in g

M = Molmasse von Tryptophan (= 204,23 g/mol)

7. **Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf 10 % des höheren Werts nicht überschreiten.

**▼ B****8. Ergebnisse eines Ringversuchs**

Es wurde ein EG-Ringversuch (4. Vergleichstest) durchgeführt, bei dem 3 Proben von bis zu 12 Laboratorien analysiert wurden, um die Hydrolysemethode zu zertifizieren. Jede Probe wurde mehrfach (5-mal) analysiert. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst:

	Probe 1 Schweinefutter	Probe 2 Schweinefutter mit Zusatz von L-Tryptophan	Probe 3 Kraffutter für Schweine
L	12	12	12
n	50	55	50
Mittelwert [g/kg]	2,42	3,40	4,22
$s_r$ [g/kg]	0,05	0,05	0,08
$r$ [g/kg]	0,14	0,14	0,22
$VK_r$ [ %]	1,9	1,6	1,9
$s_R$ [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
$VK_R$ [ %]	6,3	6,0	2,2

L = Zahl der Laboratorien, die Ergebnisse übermittelt haben  
n = Zahl der Einzelergebnisse ohne Ausreißer (Ausreißertest von Cochran, Dixon)  
 $s_r$  = Standardabweichung der Wiederholbarkeit  
 $s_R$  = Standardabweichung der Vergleichbarkeit  
 $r$  = Wiederholbarkeit  
R = Vergleichbarkeit  
 $VK_r$  = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit, in %  
 $VK_R$  = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit, in %

Es wurde ein weiterer EG-Ringversuch (3. Vergleichstest) durchgeführt, bei dem 2 Proben von bis zu 13 Laboratorien analysiert wurden, um die Methode zur Extraktion von freiem Tryptophan zu zertifizieren. Jede Probe wurde mehrfach (5-mal) analysiert. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst:

	Probe 4 Mischung aus Weizen und Soja	Probe 5 Mischung aus Weizen und Soja (= Probe 4) mit Tryptophan-Zusatz (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Mittelwert [g/kg]	0,391	0,931
$s_r$ [g/kg]	0,005	0,012
$r$ [g/kg]	0,014	0,034
$VK_r$ [ %]	1,34	1,34
$s_R$ [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
$VK_R$ [ %]	4,71	5,11

L = Zahl der Laboratorien, die Ergebnisse übermittelt haben  
n = Zahl der Einzelergebnisse ohne Ausreißer (Ausreißertest von Cochran, Dixon)  
 $s_r$  = Standardabweichung der Wiederholbarkeit  
 $s_R$  = Standardabweichung der Vergleichbarkeit  
 $r$  = Wiederholbarkeit  
R = Vergleichbarkeit  
 $VK_r$  = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit  
 $VK_R$  = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit

▼**B**

Es wurde ein weiterer EG-Vergleichstest durchgeführt, bei dem 4 Proben von bis zu 7 Laboratorien analysiert wurden, um die Tryptophan-Hydrolyse zu zertifizieren. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst. Jede Probe wurde mehrfach (5-mal) analysiert.

	Probe 1 Schweine mischfütter- mittel (CRM 117)	Probe 2 Fischmehl mit geringem Fettgehalt (CRM 118)	Probe 3 Sojamehl (CRM 119)	Probe 4 Magermilch pulver (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Mittelwert [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
$s_r$ [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
$r$ [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
$VK_r$ [ %]	1,04	1,15	1,30	0,76
$s_R$ [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
$R$ [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
$VK_R$ [ %]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = Zahl der Laboratorien, die Ergebnisse übermittelt haben  
n = Zahl der Einzelergebnisse ohne Ausreißer (Ausreißertest von Cochran, Dixon)  
 $s_r$  = Standardabweichung der Wiederholbarkeit  
 $s_R$  = Standardabweichung der Vergleichbarkeit  
 $r$  = Wiederholbarkeit  
 $R$  = Vergleichbarkeit  
 $VK_r$  = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit  
 $VK_R$  = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit

9. **Bemerkungen**

- 9.1. Mit den folgenden besonderen Chromatografiebedingungen kann eine bessere Trennung von Tryptophan und  $\alpha$ -Methyl-Tryptophan erreicht werden.

Isokratische Trennung, gefolgt von der Reinigung der Gradientensäule:

HPLC-Trennsäule: 125 × 4 mm, C<sub>18</sub>, 5 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule  
Säulentemperatur: 32 °C  
Mobile Phase: A: 0,01 mol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Methanol, 95 + 5 (V+V).  
B: Methanol  
Gradientenprogramm: 0 min 100 % A 0 % B  
15 min 100 % A 0 % B  
17 min 60 % A 40 % B  
19 min 60 % A 40 % B  
21 min 100 % A 0 % B  
33 min 100 % A 0 % B  
Durchflussrate: 1,2 ml/min  
Gesamtlaufzeit: ca. 33 min

- 9.2. Die Durchführung der Chromatografie variiert je nach Art der HPLC und der verwendeten Säulenpackung. Das System muss so gewählt werden, dass eine Grundlinientrennung zwischen Tryptophan und dem internen Standard möglich ist. Die Abbauprodukte müssen deutlich von

**▼ B**

Tryptophan und dem internen Standard getrennt werden. Zur Untersuchung der Grundlinie unter dem internen Standard auf Verunreinigungen sind Hydrolysate ohne internen Standard zu analysieren. Die Laufzeit muss lang genug sein, dass alle Abbauprodukte eluiert werden, andernfalls können späte Elutionspeaks anschließende Chromatografiedurchgänge beeinträchtigen.

Im Betriebsbereich muss das Chromatographiesystem eine lineare Reaktion ergeben. Die lineare Reaktion ist bei einer konstanten (der normalen) Konzentration des internen Standards und unterschiedlichen Tryptophankonzentrationen zu messen. Die Größe des Tryptophan- und des internen Standardpeaks müssen sich innerhalb des linearen Bereichs des HPLC-/Fluoreszenzsystems befinden. Sollten der Tryptophan- und/oder der interne Standardpeak/die internen Standardpeaks zu klein oder zu hoch sein, ist die Analyse mit einer anderen Probengröße und/oder einem anderen Endvolumen zu wiederholen.

9.3. *Bariumhydroxid*

Älteres Bariumhydroxid ist schwerer löslich. Dies kann zur Folge haben, dass die Lösung für die HPLC-Bestimmung nicht klar ist und zu niedrigen Tryptophan-Werten führen kann.

## H. BESTIMMUNG DES GEHALTS AN ROHÖLEN UND -FETTEN

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Rohöl- und Rohfettgehalts von Futtermitteln. Sie erstreckt sich nicht auf die Analyse von Ölsaaten und Ölfrüchten.

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

1.1. *Verfahren A — Direkt extrahierbare Rohöle und Rohfette*

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

1.2. *Verfahren B — Gesamtgehalt an Rohölen und Rohfetten*

Das Verfahren ist anzuwenden bei Futtermittel-Ausgangserzeugnissen tierischen Ursprungs und bei allen Mischfuttermitteln. Es ist außerdem bei allen Erzeugnissen anzuwenden, aus denen Öle und Fette ohne vorherige Hydrolyse nicht vollständig extrahiert werden können (z. B. Kleber, Hefen, Kartoffeleiweiß und Erzeugnisse, die Verfahren unterzogen wurden wie Extrudieren, Flockieren und Erhitzen).

1.3. *Auswertung der Ergebnisse*

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 unter Erhitzen mit Salzsäure behandelt. Die Mischung wird abgekühlt und filtriert. Der gewaschene und getrocknete Rückstand wird nach Verfahren A weiterbehandelt.

**▼ B****3. Reagenzien**

- 3.1. Petrolether, Siedepunktintervall 40 bis 60 °C. Die Bromzahl muss weniger als 1 und der Abdampfdruckstand weniger als 2 mg/100 ml betragen.
- 3.2. Natriumsulfat, wasserfrei.
- 3.3. Salzsäure,  $c = 3 \text{ mol/l}$ .
- 3.4. Filterhilfsmittel, 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 10-mal in der Stunde abläuft. Wenn es sich um ein Gerät ohne Siphon handelt, muss die Rückflussmenge etwa 10 ml/min betragen.
- 4.2. Extraktionshülsen: Diese müssen frei sein von petroletherlöslichen Stoffen und eine Porosität besitzen, die den Anforderungen nach 4.1 Genüge leistet.
- 4.3. Trockenschrank: Vakuumtrockenschrank, eingestellt auf 75 °C ( $\pm 3 \text{ °C}$ ) oder Lufttrockenschrank, eingestellt auf 100 °C ( $\pm 3 \text{ °C}$ ).

**5. Verfahren****5.1. Verfahren A (siehe Bemerkung 8.1)**

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

Die Hülse wird in einen Extraktionsapparat (4.1) eingesetzt und 6 h lang mit Petrolether (3.1) extrahiert. Der Petroletherextrakt wird in einem trockenen, mit einigen Körnern Bimsstein<sup>(1)</sup> versehenen, tarierten Kolben aufgefangen.

Nach beendeter Extraktion wird das Lösungsmittel abdestilliert. Anschließend wird der Rückstand mit Kolben 1,5 h im Trockenschrank (4.3) getrocknet und nach dem Abkühlen in einem Exsikkator gewogen. Durch eine zweite Trocknung von 30 min Dauer ist zu prüfen, ob das Gewicht der Öle und Fette konstant geblieben ist (der Gewichtsverlust zwischen 2 aufeinanderfolgenden Wägungen darf 1 mg nicht überschreiten).

**5.2. Verfahren B**

Von der Probe (siehe Bemerkung 8.2) werden 2,5 g auf 1 mg genau abgewogen und in ein 400-ml-Becherglas oder einen 300-ml-Erlenmeyerkolben gebracht. Anschließend werden 100 ml Salzsäure (3.3) und einige Körner 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 1 h schwach sieden gelassen. Es ist zu verhindern, dass das Material sich an den Wänden des Gefäßes festsetzt.

Dann wird abgekühlt und so viel vom Filterhilfsmittel (3.4) zugesetzt, dass beim Filtrieren kein Öl- bzw. Fettverlust eintritt. Filtriert wird unter Verwendung eines feuchten, fettfreien doppelten Filterpapiers. Der Rückstand wird bis zur neutralen Reaktion mit kaltem Wasser gewaschen. Danach ist zu überprüfen, dass das Filtrat keine Öle und Fette mehr enthält. Bei Vorhandensein von Ölen oder Fetten muss vor der Hydrolyse eine Extraktion der Probe mit Petrolether nach Verfahren A vorgenommen werden.

Das doppelte Filterpapier mit dem Rückstand ist auf ein Uhrglas zu legen und ca. 1,5 h bei 100 °C ( $\pm 3 \text{ °C}$ ) im Lufttrockenschrank (4.3) zu trocknen.

<sup>(1)</sup> Soll das Öl oder Fett später einer Qualitätsprüfung unterzogen werden, sind die Bimssteinkörner durch Glasperlen zu ersetzen.

**▼ B**

Das doppelte Filterpapier mit dem trockenen Rückstand wird in eine Extraktionshülse (4.2) überführt und mit einem fettfreien Wattebausch abgedeckt. Die Hülse wird in einen Extraktionsapparat (4.1) eingesetzt. Dann wird, wie unter 5.1 Absätze 2 und 3 beschrieben, weiterverfahren.

**6. Berechnung der Ergebnisse**

Das Gewicht des Rückstands wird als Prozentsatz der Probe ausgedrückt.

**7. Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen eines Analytikers darf bei ein und derselben Probe die folgenden Werte nicht überschreiten:

- 0,2 % absolut bei Gehalten an Rohölen und -fetten von unter 5 %,
- 4,0 % relativ zum höchsten Wert bei Gehalten von 5 bis 10 %,
- 0,4 % absolut bei Gehalten über 10 %.

**8. Bemerkungen**

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

Von der Probe werden 20 g 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 und tarierten Kolben gebracht. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und dann wird, wie unter 5.1 letzter Absatz beschrieben, getrocknet und weiterverfahren.

Der Extraktionsrückstand in der Hülse wird vom Lösungsmittel befreit, auf 1 mm zerkleinert und wieder zurück in die Extraktionshülse gebracht (ohne Zugabe von Natriumsulfat). Dann wird, wie unter 5.1 Absätze 2 und 3 beschrieben, fortgefahren.

Der Gehalt an Ölen und Fetten, ausgedrückt als Prozentsatz der Probe, wird nach folgender Formel berechnet:

$$(10 m_1 + m_2) \times 5$$

wobei:

- $m_1$  = Gewicht des Rückstands in g nach der ersten Extraktion (aliquoter Teil des Extrakts),
- $m_2$  = Gewicht des Rückstands in g nach der zweiten Extraktion.

- 8.2. Bei öl- und fettarmen Erzeugnissen kann mit einer Einwaage von 5 g gearbeitet werden.
- 8.3. Heimtierfutter mit hohem Wassergehalt muss vor der Hydrolyse und Extraktion nach Verfahren B möglicherweise mit wasserfreiem Natriumsulfat gemischt werden.
- 8.4. Bei dem Verfahren nach 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 h muss bei einigen Futtermitteln möglicherweise verlängert werden. Übermäßiges Trocknen ist zu vermeiden, da dies zu niedrigen Ergebnissen führen kann. Es kann auch ein Mikrowellengerät verwendet werden.

**▼ B**

- 8.6. Bei einem Rohöl/-fettgehalt von mehr als 15 % wird vor der Hydrolyse eine Extraktion nach Verfahren A und danach eine erneute Extraktion nach Verfahren B empfohlen. Dies hängt zum Teil von der Art des Futtermittels und der Art des Rohfetts im Futtermittel ab.

**I. BESTIMMUNG DES ROHFASERGEHALTS****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an säure- und alkaliunlöslichen, fettfreien organischen Bestandteilen in Futtermitteln, herkömmlicherweise als Rohfaser bezeichnet.

**2. Prinzip**

Die gegebenenfalls entfettete Probe wird nacheinander mit kochender Schwefelsäurelösung und kochender Kaliumhydroxidlösung definierter Konzentrationen behandelt. Der Rückstand wird durch Filtration auf einem gesinterten Glasfilter getrennt, gewaschen, getrocknet, gewogen und bei 475 bis 500 °C verascht. Der Gewichtsverlust bei dieser Veraschung entspricht der Rohfaser der Einwaage.

**3. Reagenzien**

- 3.1. Schwefelsäure,  $c = 0,13 \text{ mol/l}$ .
- 3.2. Antischaummittel (z. B. n-Oktanol).
- 3.3. Filterhilfsmittel (Celite 545 oder gleichwertiges Mittel), 4 h auf 500 °C erhitzt (8.6).
- 3.4. Aceton.
- 3.5. Petrolether, Siedebereich 40 bis 60 °C.
- 3.6. Salzsäure,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$ .
- 3.7. Kaliumhydroxidlösung,  $c = 0,23 \text{ mol/l}$ .

**4. Geräte**

- 4.1. Heizvorrichtung für den Aufschluss mit Schwefelsäure und Kaliumhydroxidlösung, ausgestattet mit einer Halterung für den Glasfiltertiegel (4.2) und einem Abflussrohr mit Hahn zum Flüssigkeitsablauf, für den Vakuumanschluss und, sofern möglich, auch mit einem Anschluss für die Zufuhr von Druckluft. Vor der täglichen Inbetriebnahme muss die gesamte Apparatur mit Wasser 5 min erhitzt werden.
- 4.2. Glasfiltertiegel mit eingeschmolzenem gesintertem Glasfilter (Porengröße 40 bis 90 µm). Vor dem erstmaligen Gebrauch wird der Tiegel einige Minuten bei 500 °C gegläht und dann abkühlen gelassen (8.6).
- 4.3. Siedezylinder (mindestens 270 ml) mit einem Rückflusskühler.
- 4.4. Trockenschrank mit Thermostat.
- 4.5. Muffelofen mit Thermostat.
- 4.6. Extraktionsvorrichtung mit einer Halterung für den Glasfiltertiegel (4.2) und einem Abflussrohr mit Hahn für den Flüssigkeitsablauf und den Vakuumanschluss.
- 4.7. Verbindungsringe zur Verbindung von Heizvorrichtung (4.1), Filtertiegel (4.2) und Siedezylinder (4.3), Verbindungsringe zur Verbindung von Kaltextraktionsvorrichtung (4.6) und Filtertiegel.

**5. Verfahren**

Von der vorbereiteten Probe werden 1 g auf 1 mg genau in den Glasfiltertiegel (4.2) eingewogen (siehe Bemerkungen 8.1, 8.2 und 8.3), und es wird 1 g Filterhilfsmittel (3.3) hinzugefügt.

**▼ B**

Der Glasfiltertiegel (4.2) wird in die Heizvorrichtung (4.1) eingesetzt und mit dem Siedezylinder (4.3) verbunden. 150 ml auf Siedetemperatur erhitzte Schwefelsäure (3.1) werden in den mit dem Tiegel verbundenen Siedezylinder überführt, und es werden erforderlichenfalls einige Tropfen Antischaummittel (3.2) hinzugefügt.

Die Flüssigkeit wird innerhalb von  $5 \pm 2$  min zum Sieden erhitzt und genau 30 min im kräftigen Sieden gehalten.

Der Hahn im Abflussrohr (4.1) wird geöffnet und die Schwefelsäure mithilfe von Vakuum durch den Glasfiltertiegel abgesaugt. Der Filterrückstand wird 3-mal mit je 30 ml kochendem Wasser gewaschen. Nach jedem Waschvorgang ist der Rückstand trocken zu saugen.

Der Auslaufhahn wird geschlossen, und es werden 150 ml siedende Kaliumhydroxidlösung (3.7) und einige Tropfen Antischaummittel (3.2) in den mit dem Siedezylinder verbundenen Glasfiltertiegel gegeben. Die Flüssigkeit wird innerhalb von  $5 \pm 2$  min zum Sieden erhitzt und genau 30 min im kräftigen Sieden gehalten. Die Filtration und das Waschen des Rückstands werden in der gleichen Weise durchgeführt wie nach der Behandlung mit Schwefelsäure.

Nach dem letzten Waschen wird der Rückstand trocken gesaugt und der Tiegel mit Inhalt vom Siedezylinder gelöst und an die Kaltextraktionsvorrichtung (4.6) angeschlossen. Unter Anlegen von Vakuum wird der Rückstand 3-mal mit je 25 ml Aceton (3.4) gewaschen, wobei der Rückstand nach jedem Waschvorgang trocken zu saugen ist.

Der Filtertiegel mit Inhalt wird im Trockenschrank bei 130 °C bis zur Massekonstanz getrocknet, in einem Exsikkator abgekühlt und anschließend rasch gewogen. Danach wird der Filtertiegel mit Inhalt in einen Muffelofen gebracht und mindestens 30 min bei einer Temperatur von 475 bis 500 °C bis zur Massekonstanz verascht (der Gewichtsverlust in 2 aufeinanderfolgenden Wägungen darf 2 mg nicht überschreiten).

Nach dem Erhitzen wird der Tiegel zunächst im Muffelofen und dann im Exsikkator abgekühlt und anschließend gewogen.

Es wird ein Blindversuch ohne Probe durchgeführt. Der beim Veraschen auftretende Gewichtsverlust darf 4 mg nicht überschreiten.

## 6. Berechnung der Ergebnisse

Der Gehalt an Rohfaser als Prozentsatz der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

wobei:

m = Einwaage in g,

m<sub>0</sub> = Gewichtsverlust nach dem Veraschen während der Bestimmung, in g,

m<sub>1</sub> = Gewichtsverlust nach dem Veraschen während des Blindversuchs, in g.

## 7. Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf die folgenden Werte nicht überschreiten:

— 0,6 % absolut bei einem Rohfasergehalt von weniger als 10 %,

— 6 % relativ zum höheren Wert bei einem Rohfasergehalt von 10 % und mehr.

## 8. Bemerkungen

- 8.1. Futtermittel, welche mehr als 10 % Rohfett enthalten, müssen vor der Bestimmung mit Petrolether (3.5) entfettet werden. Dazu wird der Glasfiltertiegel (4.2) mit Inhalt an die Kaltextraktionsvorrichtung (4.6)

**▼ B**

angeschlossen und unter Anlegen von Vakuum 3-mal mit je 30 ml Petrolether gewaschen, wobei sichergestellt wird, dass der Rückstand trocken ist. Der Tiegel mit Inhalt wird an die Heizvorrichtung (4.1) angeschlossen. Danach ist gemäß 5 fortzufahren.

- 8.2. Futtermittel, die Fette enthalten, welche nicht direkt mit Petrolether (3.5) extrahiert werden können, müssen, wie unter 8.1 angegeben, entfettet werden und nach dem Sieden mit Säure ein weiteres Mal entfettet werden. Nach dem Sieden mit Säure und dem anschließenden Waschvorgang wird der Tiegel mit Inhalt an die Kaltextraktionsvorrichtung (4.6) angeschlossen und 3-mal mit je 30 ml Aceton und danach weitere 3-mal mit je 30 ml Petrolether entfettet. Der Filtertiegel (4.2) wird trocken gesaugt und die Analyse, wie unter 5 beschrieben, fortgesetzt, beginnend mit der Behandlung mit Kaliumhydroxidlösung.
- 8.3. Bei Futtermitteln, die mehr als 5 % Carbonate, ausgedrückt als Calciumcarbonat, enthalten, wird der Tiegel (4.2) mit der eingewogenen Probemenge an die Heizvorrichtung (4.1) angeschlossen. Die Probe wird 3-mal mit je 30 ml Salzsäure (3.6) gewaschen. Nach jeder Zugabe wird die Probe vor dem Absaugen etwa 1 min stehen gelassen. Anschließend wird 1-mal mit 30 ml Wasser gewaschen. Danach ist, wie unter 5 angegeben, fortzufahren.
- 8.4. Wenn ein Gerät benutzt wird, bei dem mehrere Glasfiltertiegel an derselben Heizvorrichtung gleichzeitig befestigt sind, dürfen 2 Einzelbestimmungen derselben Probe nicht in derselben Untersuchungsreihe vorgenommen werden.
- 8.5. Wenn nach dem Sieden mit Säure bzw. Lauge Schwierigkeiten bei der Filtration eintreten, wird Druckluft durch das Auslassrohr der Heizvorrichtung zugeführt und anschließend die Filtration fortgesetzt.
- 8.6. Die Veraschungstemperatur darf 500 °C nicht überschreiten, um die Haltbarkeit der Glasfiltertiegel zu verlängern. Beim Erhitzen und Abkühlen sind vor allem übermäßige Temperatursprünge zu vermeiden.

## J. BESTIMMUNG DES ZUCKERGEHALTS

### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an reduzierenden Zuckern und des Gesamtzuckers nach Inversion, ausgedrückt als Glucose oder gegebenenfalls nach Multiplikation mit dem Faktor 0,95 als Saccharose. Sie wird bei Mischfuttermitteln angewendet. Für andere Futtermittel sind besondere Verfahren vorgesehen. Gegebenenfalls muss der Gehalt an Lactose getrennt bestimmt und dieses Ergebnis bei der Berechnung berücksichtigt werden.

### 2. Prinzip

Die Zucker werden in verdünntem Ethanol gelöst; die Lösung wird mit den Lösungen Carrez I und II geklärt. Nach dem Verdunsten des Ethanols werden vor und nach der Inversion die Bestimmungen nach der Luff-Schoorl-Methode durchgeführt.

### 3. Reagenzien

- 3.1. Ethanollösung (Volumenkonzentration = 40 %), Dichte: 0,948 g/ml bei 20 °C, auf den Umschlagpunkt von Phenolphthalein eingestellt.
- 3.2. Carrez-Lösung I: 21,9 g Zinkacetat,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , und 3 g Eisessig werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
- 3.3. Carrez-Lösung II: 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat (II),  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
- 3.4. Methylorangelösung (Massenkonzentration = 0,1 %).
- 3.5. Salzsäure 4 mol/l.
- 3.6. Salzsäure 0,1 mol/l.

**▼ B**

- 3.7. Natriumhydroxidlösung 0,1 mol/l.
- 3.8. Reagenz nach Luff-Schoorl:  
 Die Zitronensäurelösung (3.8.2) ist unter vorsichtigem Rühren in die Natriumcarbonatlösung (3.8.3) zu gießen. Nach Zugabe der Kupfersulfatlösung (3.8.1) ist mit Wasser auf 1 l aufzufüllen. Über Nacht absetzen lassen und dann filtrieren.  
 Die Konzentration des so erhaltenen Reagenz (Cu 0,05 mol/l; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mol/l) muss geprüft werden, siehe 5.4 letzter Absatz. Der pH-Wert der Lösung muss bei etwa 9,4 liegen.
- 3.8.1. Kupfersulfatlösung: 25 g Kupfersulfat, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, eisenfrei, werden in 100 ml Wasser gelöst.
- 3.8.2. Zitronensäurelösung: 50 g Zitronensäure, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> H<sub>2</sub>O, werden in 50 ml Wasser gelöst.
- 3.8.3. Natriumcarbonatlösung: 143,8 g Natriumcarbonat, wasserfrei, werden in ca. 300 ml warmem Wasser gelöst. Die Lösung wird abkühlen gelassen.
- 3.9. Natriumthiosulfatlösung 0,1 mol/l.
- 3.10. Stärkelösung: eine Aufschlämmung von 5 g löslicher Stärke in 30 ml Wasser wird zu 1 l siedendem Wasser hinzugefügt und 3 min lang im Sieden gehalten; dann wird abkühlen gelassen und gegebenenfalls 10 mg Quecksilberiodid als Konservierungsmittel hinzugefügt.
- 3.11. Schwefelsäure 3 mol/l.
- 3.12. Kaliumiodidlösung (Massenkonzentration = 30 %).
- 3.13. Bimssteinkörner, mit Salzsäure ausgekocht, mit Wasser gewaschen und getrocknet.
- 3.14. 3-Methylbutan-1-ol.
4. **Geräte**  
 Mechanisches Schüttelgerät, ca. 35 bis 40 min<sup>-1</sup>.
5. **Verfahren**
- 5.1. *Extraktion der Probe*  
 Von der Probe werden 2,5 g auf 1 mg genau in einen 250-ml-Messkolben eingewogen. Nach Zugabe von 200 ml Ethanol (3.1) wird der Kolben 1 h lang im Schüttelgerät gemischt. Anschließend werden 5 ml Carrez-Lösung I (3.2) hinzugefügt, und es wird ca. 30 s lang gerührt. Dann werden 5 ml Carrez-Lösung II (3.3) hinzugefügt und 1 min lang gerührt; nun wird mit Ethanol (3.1) zur Marke aufgefüllt, homogenisiert und filtriert. Vom Filtrat werden 200 ml abpipettiert und auf ungefähr die Hälfte des Volumens eingeengt, um den größten Teil des Ethanols zur Verdunstung zu bringen. Der Abdampfrückstand wird mit warmem Wasser in einen 200-ml-Messkolben übergespült, abgekühlt, mit Wasser zur Marke aufgefüllt, homogenisiert und, falls erforderlich, filtriert. Diese Lösung wird für die Bestimmung des Gehalts an reduzierenden Zuckern und nach Inversion zur Bestimmung des Gesamtzuckers verwendet.
- 5.2. *Bestimmung des Gehalts an reduzierenden Zuckern*  
 Eine Menge von höchstens 25 ml der Lösung, die weniger als 60 mg reduzierende Zucker, ausgedrückt als Glucose, enthält, wird abpipettiert, falls erforderlich mit destilliertem Wasser auf 25 ml aufgefüllt und der Gehalt an reduzierendem Zucker nach der Luff-Schoorl-Methode bestimmt. Das Ergebnis wird als Prozentsatz Glucose in der Probe ausgedrückt.
- 5.3. *Bestimmung des Gehalts an Gesamtzucker nach Inversion*  
 Von der Lösung werden 50 ml in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, einige Tropfen Methylorangelösung (3.4) hinzugefügt und dann vorsichtig unter ständigem Rühren Salzsäure (3.5) bis zum eindeutigen Umschlag nach Rot hinzugegeben. Dann werden 15 ml Salzsäure (3.6)

**▼ B**

hinzugefügt, und der Kolben wird 30 min lang in ein Bad mit kräftig siedendem Wasser gestellt, dann schnell auf die Temperatur von etwa 20 °C abgekühlt und 15 ml Natriumhydroxidlösung (3.7) hinzugegeben. Der Kolben wird mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt, geschüttelt und eine Menge von höchstens 25 ml entnommen, die weniger als 60 mg reduzierende Zucker, ausgedrückt als Glucose, enthält. Falls erforderlich, wird mit destilliertem Wasser auf 25 ml aufgefüllt und der Gehalt an reduzierenden Zuckern nach der Luff-Schoorl-Methode bestimmt. Das Ergebnis wird als Prozentsatz Glucose oder gegebenenfalls nach Multiplikation mit dem Faktor 0,95 als Saccharose ausgedrückt.

#### 5.4. *Titration nach Luff-Schoorl*

In einen 300-ml-Erlenmeyerkolben werden 25 ml Reagenz nach Luff-Schoorl (3.8) pipettiert und anschließend genau 25 ml der geklärten Zuckerlösung hinzugefügt. Nach Zugabe von 2 Körnchen Bimsstein (3.13) wird unter Schütteln mit der Hand über freier Flamme von mittlerer Höhe erhitzt, so dass die Flüssigkeit in etwa 2 min zum Sieden kommt. Anschließend wird der Erlenmeyerkolben sofort auf ein Drahtnetz mit einer Asbestscheibe, in die ein Loch von etwa 6 cm Durchmesser gestanzt wurde, gestellt; vorher wird unter dem Drahtnetz eine Flamme entzündet und so eingestellt, dass der Kolben nur am Boden erhitzt wird. Dann wird der Kolben mit einem Rückflusskühler verbunden. Von diesem Augenblick an wird der Kolben genau 10 min sieden gelassen und anschließend sofort in kaltem Wasser abgekühlt. Nach etwa 5 min wird wie folgt titriert:

Der Flüssigkeit werden 10 ml Kaliumiodidlösung (3.12) und unmittelbar danach, aber vorsichtig (wegen der Gefahr des übermäßigen Schäumens), 25 ml Schwefelsäure (3.11) zugegeben. Dann wird mit Natriumthiosulfatlösung (3.9) zunächst bis zum Auftreten einer mattgelben Farbe titriert und nach Zugabe von Stärkelösung (3.10) als Indikator die Titration zu Ende geführt.

Die gleiche Titration wird in einer Mischung aus genau 25 ml Reagenz nach Luff-Schoorl (3.8) und 25 ml Wasser nach Zugabe von 10 ml Kaliumiodidlösung (3.12) und 25 ml Schwefelsäure (3.11) durchgeführt, jedoch ohne vorheriges Erhitzen.

#### 6. **Berechnung der Ergebnisse**

Aus der unten angeführten Tabelle wird die Menge Glucose in mg abgelesen, die der Differenz der Ergebnisse beider Titrationen, ausgedrückt in ml Natriumthiosulfatlösung (0,1 mol/l), entspricht. Das Ergebnis wird als Prozentsatz der Probe angegeben.

#### 7. **Sonderverfahren**

- 7.1. Bei sehr stark melassehaltigen Futtermitteln und anderen wenig homogenen Futtermitteln werden 20 g in einen 1-l-Messkolben eingewogen, 500 ml Wasser hinzugefügt und 1 h lang im Schüttelgerät gemischt. Danach wird — jedoch mit jeweils der 4-fachen Menge der Carrez-Lösungen I (3.2) und II (3.3) — wie unter 5.1 beschrieben geklärt. Anschließend wird mit Ethanol (Volumenkonzentration = 80 %) zur Marke aufgefüllt.

Die Lösung wird homogenisiert und filtriert. Das Ethanol wird, wie unter 5.1 beschrieben, entfernt. Bei Abwesenheit verkleisterter Stärke wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt.

- 7.2. Bei Melasse und Futtermittel-Ausgangserzeugnissen, die reich an Zucker, aber praktisch stärkefrei sind (Johannisbrot, Zuckerrübetrockenschnitzel usw.), werden 5 g in einen 250-ml-Messkolben eingewogen und 200 ml destilliertes Wasser hinzugefügt. Dann wird 1 h lang oder, falls erforderlich, länger im Schüttelgerät gemischt. Danach wird mit den Carrez-Lösungen I (3.2) und II (3.3), wie unter 5.1 beschrieben, geklärt und anschließend mit Wasser zur Marke aufgefüllt, homogenisiert und filtriert. Zur Bestimmung des Gesamtzuckergehalts wird, wie unter 5.3 beschrieben, verfahren.

#### 8. **Bemerkungen**

- 8.1. Es wird empfohlen, vor dem Erhitzen mit dem Luff-Schoorl-Reagenz (unabhängig vom Volumen) etwa 1 ml 3-Methylbutan-1-ol (3.14) hinzuzufügen, um die Schaumbildung zu vermeiden.

**▼B**

- 8.2. Die Differenz zwischen dem Gehalt an Gesamtzucker nach Inversion, ausgedrückt als Glucose, und dem Gehalt an reduzierenden Zuckern, ausgedrückt als Glucose, ergibt nach Multiplikation mit dem Faktor 0,95 das Ergebnis als Prozentsatz Saccharose.
- 8.3. Zur Bestimmung des Gehalts an reduzierenden Zuckern, mit Ausnahme von Milchzucker (Lactose), gibt es 2 Möglichkeiten:
- 8.3.1. Für eine annähernde Berechnung wird der aus einer getrennten Bestimmung ermittelte Lactosegehalt mit 0,675 multipliziert und das Ergebnis von dem Gehalt an reduzierenden Zuckern abgezogen.
- 8.3.2. Für eine genaue Berechnung der reduzierenden Zucker (mit Ausnahme von Lactose) ist es notwendig, dass beiden endgültigen Bestimmungen die gleiche Menge der Einwaage zugrunde liegt. Die eine Bestimmung wird in einem Teil der nach 5.1. hergestellten Lösung durchgeführt, die zweite Bestimmung in einem Teil der Lösung, die bei der Bestimmung des Lactosegehalts mittels der für diesen Zweck vorgesehenen Methode (nach Vergärung der anderen Zuckerarten und Klärung) hergestellt wird.

In beiden Fällen wird der anwesende Zucker nach der Luff-Schoorl-Methode bestimmt und in mg Glucose berechnet. Diese beiden Werte werden voneinander subtrahiert und die Differenz wird als Prozentsatz der Probe ausgedrückt.

*Beispiel:*

Die beiden abpipettierten Mengen entsprechen bei jeder Bestimmung einer Probeneinwaage von 250 mg.

Im ersten Fall werden 17 ml Natriumthiosulfatlösung 0,1 mol/l, entsprechend 44,2 mg Glucose, verbraucht; im zweiten Fall werden 11 ml, entsprechend 27,6 mg Glucose, verbraucht.

Die Differenz beträgt also 16,6 mg Glucose.

Der Gehalt an reduzierenden Zuckern (mit Ausnahme von Lactose), berechnet als Glucose, ist demnach

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64 \%$$

**Tabelle für 25 ml Reagenz nach Luff-Schoorl**

ml Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub> O<sub>3</sub> 0,1 mol/l, 2 min erhitzen, 10 min sieden

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/l	Glucose, Fructose, In- vertzucker C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Lactose C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Maltose C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/l
	ml	mg	Differenz	mg	Differenz	Mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

**▼ B****K. BESTIMMUNG DES LACTOSEGEHALTS****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Lactosegehalts von Futtermitteln, die mehr als 0,5 % Lactose enthalten.

**2. Prinzip**

Die Zucker werden in Wasser gelöst. Die Lösung wird mit Hefe — *Saccharomyces cerevisiae* — vergoren, wobei die Lactose nicht angegriffen wird. Nach Klärung und Filtration wird der Gehalt an Lactose im Filtrat nach der Luff-Schoorl-Methode bestimmt.

**3. Reagenzien**

3.1. *Saccharomyces-cerevisiae*-Suspension: 25 g frische Hefe werden in 100 ml Wasser suspendiert. Im Kühlschrank ist die Suspension höchstens 1 Woche haltbar.

3.2. Carrez-Lösung I: 21,9 g Zinkacetat,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , und 3 g Eisessig werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3.3. Carrez-Lösung II: 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat (II),  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3.4. Reagenz nach Luff-Schoorl:

Die Zitronensäurelösung (3.4.2) wird unter vorsichtigem Rühren in die Natriumcarbonatlösung (3.4.3) gegossen. Nach Zugabe der Kupfersulfatlösung (3.4.1) wird auf 1 l mit Wasser aufgefüllt. Über Nacht absetzen lassen und dann filtrieren. Die Konzentration des so erhaltenen Reagenz ( $\text{Cu}$  0,05 mol/l;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 mol/l) muss geprüft werden. Der pH-Wert muss bei etwa 9,4 liegen.

3.4.1. Kupfersulfatlösung: 25 g Kupfersulfat,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , eisenfrei, werden in 100 ml Wasser gelöst,

3.4.2. Zitronensäurelösung: 50 g Zitronensäure,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , werden in 50 ml Wasser gelöst,

3.4.3. Natriumcarbonatlösung: 143,8 g Natriumcarbonat, wasserfrei, werden in ca. 300 ml warmem Wasser gelöst. Die Lösung wird abkühlen gelassen.

3.5. Bimssteinkörner mit Salzsäure ausgekocht, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

3.6. Kaliumiodidlösung (Massenkonzentration = 30 %).

3.7. Schwefelsäure 3 mol/l.

3.8. Natriumthiosulfatlösung 0,1 mol/l.

3.9. Stärkelösung: Eine Aufschlämmung von 5 g löslicher Stärke in 30 ml Wasser wird zu 1 l siedendem Wasser hinzugefügt und 3 min lang im Sieden gehalten; dann wird abgekühlt und gegebenenfalls 10 mg Quecksilberiodid als Konservierungsmittel hinzugefügt.

**4. Geräte**

Wasserbad mit Thermostat, auf 38 bis 40 °C eingestellt.

**5. Verfahren**

Von der Probe wird 1 g auf 1 mg genau eingewogen und mit 25 bis 30 ml Wasser in einen 100-ml-Messkolben gebracht. Der Messkolben wird 30 min lang in ein Bad mit siedendem Wasser gestellt und auf eine Temperatur von etwa 35 °C abgekühlt. Anschließend werden 5 ml Hefesuspension (3.1) zugefügt. Dann wird der Kolben geschüttelt, 2 h lang in einem Wasserbad bei 38 bis 40 °C stehen gelassen und auf etwa 20 °C abgekühlt.

Danach werden 2,5 ml Carrez-Lösung I (3.2) hinzugefügt, und es wird 30 s lang gerührt. Dann werden 2,5 ml Carrez-Lösung II (3.3) hinzugefügt, und es wird nochmals 30 s lang gerührt. Nun wird mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt, gemischt und filtriert. Vom Filtrat wird eine Menge

**▼B**

von höchstens 25 ml, die möglichst 40 bis 80 mg Lactose enthält, in einen 300-ml-Erlenmeyerkolben abpipettiert. Gegebenenfalls wird mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt.

Auf dieselbe Weise wird ein Blindversuch mit 5 ml Hefesuspension (3.1) ausgeführt. Dann wird der Gehalt an Lactose nach der Luff-Schoorl-Methode wie folgt bestimmt: Nach Zugabe von genau 25 ml des Reagenz nach Luff-Schoorl (3.4) und von 2 Körnchen Bimsstein (3.5) wird unter Schütteln mit der Hand über freier Flamme von mittlerer Höhe erhitzt, so dass die Flüssigkeit in etwa 2 min zum Sieden kommt. Anschließend wird der Erlenmeyerkolben sofort auf ein Drahtnetz mit einer Asbestscheibe, in die ein Loch von etwa 6 cm Durchmesser gestanzt wurde, gestellt; vorher wird unter dem Drahtnetz eine Flamme entzündet und so eingestellt, dass der Kolben nur am Boden erhitzt wird. Dann wird der Kolben mit einem Rückflusskühler verbunden. Von diesem Augenblick an wird der Kolben genau 10 min sieden gelassen und anschließend sofort in kaltem Wasser abgekühlt. Nach etwa 5 min wird wie folgt titriert:

Zu der Flüssigkeit werden 10 ml Kaliumiodidlösung (3.6) und unmittelbar danach, aber vorsichtig (wegen der Gefahr des übermäßigen Schäumens), 25 ml Schwefelsäure (3.7) hinzugegeben. Dann wird mit Natriumthiosulfatlösung (3.8) zunächst bis zum Auftreten einer mattgelben Farbe titriert und nach Zugabe von Stärkelösung (3.9) als Indikator die Titration zu Ende geführt.

Die gleiche Titration wird in einer Mischung aus genau 25 ml Reagenz nach Luff-Schoorl (3.4) und 25 ml Wasser nach Zugabe von 10 ml Kaliumiodidlösung (3.6) und 25 ml Schwefelsäure (3.7) durchgeführt, jedoch ohne vorheriges Erhitzen.

**6. Berechnung der Ergebnisse**

Aus der unten angeführten Tabelle wird die Menge Lactose in mg abgelesen, die der Differenz der Ergebnisse beider Titrationen, ausgedrückt in ml Natriumthiosulfatlösung (0,1 mol/l), entspricht.

Das Ergebnis entspricht dem Gehalt an wasserfreier Lactose und wird als Prozentsatz der Probe ausgedrückt.

**7. Bemerkung**

Wenn mehr als 40 % vergärbare Zucker vorhanden sind, werden mehr als 5 ml Hefesuspension (3.1) verwendet.

**Tabelle für 25 ml Reagenz nach Luff-Schoorl**ml Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub> O<sub>3</sub> 0,1 mol/l, 2 min erhitzen, 10 min sieden

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/l	Glucose, Fructose, Invertzucker C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Lactose C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Maltose C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/l
	ml	mg	Differenz	mg	Differenz	Mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

**▼B**

## L. BESTIMMUNG DES STÄRKEGEGHALTS

**POLARIMETRISCHES VERFAHREN**1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an Stärke und ihrer Abbauprodukte mit hoher Molmasse in Futtermitteln zum Zweck der Prüfung ihrer Übereinstimmung mit dem angegebenen Energiegehalt (Anhang VII) und mit der Richtlinie 96/25/EG des Rates <sup>(1)</sup>.

2. **Prinzip**

Die Methode basiert auf einer doppelten Bestimmung. Bei der ersten Bestimmung wird die Probe mit verdünnter Salzsäure behandelt. Nach Klärung und Filtration wird die optische Drehung der Lösung polarimetrisch gemessen.

Bei der zweiten Bestimmung wird die Probe mit 40 %igem Ethanol extrahiert. Nach Behandlung des Filtrats mit Salzsäure wird geklärt, filtriert und die optische Drehung unter den gleichen Bedingungen wie bei der ersten Bestimmung gemessen.

Der Unterschied zwischen den beiden Messungen, multipliziert mit einem bekannten Faktor, ergibt den Stärkegehalt der Probe.

3. **Reagenzien**

3.1. Salzsäure, Lösung (Massenanteil = 25 %) Dichte: 1,126 g/ml.

3.2. Salzsäure, Lösung (Massenkonzentration = 1,13 %).

Die Konzentration muss durch Titration mit Natriumhydroxidlösung (0,1 mol/l) in Gegenwart von Methylrot (Massenkonzentration = 0,1 %) in Ethanol (Volumenkonzentration = 94 %) geprüft werden. Für die Neutralisierung von 10 ml werden 30,94 ml NaOH (0,1 mol/l) benötigt.

3.3. Carrez-Lösung I: 21,9 g Zinkacetat,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , und 3 g Eisessig werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3.4. Carrez-Lösung II: 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat (II),  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3.5. Ethanol, Lösung (Volumenkonzentration = 40 %), Dichte: 0,948 g/ml bei 20 °C.

4. **Geräte**

4.1. 250-ml-Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen und Rückflusskühler.

4.2. Polarimeter oder Saccharimeter.

5. **Verfahren**5.1. *Vorbereitung der Probe*

Die Probe muss so fein gemahlen werden, dass sie vollständig durch ein Rundlochsieb mit einem Lochdurchmesser von 0,5 mm passiert werden kann.

5.2. *Bestimmung der gesamten optischen Drehung (P oder S) (siehe Bemerkung 7.1)*

Von der Probe werden 2,5 g auf 1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und 25 ml Salzsäure (3.2) hinzugefügt. Der Kolben wird geschüttelt, bis sich der Stoff gleichmäßig verteilt hat; dann werden weitere 25 ml Salzsäure (3.2) hinzugegeben. Der Kolben wird in ein Bad mit kochendem Wasser gestellt und während der ersten 3 min kräftig und regelmäßig geschüttelt, um die Bildung von Klumpen zu verhindern. Die in dem Wasserbad enthaltene Wassermenge muss ausreichen,

<sup>(1)</sup> ABL L 125 vom 23.5.1996, S. 35.

**▼ B**

um das Wasser auch dann noch über dem Siedepunkt zu halten, wenn der Kolben eingetaucht wird. Während des Schüttelns darf der Kolben nicht aus dem Wasser herausgenommen werden. Nach genau 15 min wird der Kolben aus dem Wasserbad entfernt, 30 ml kaltes Wasser hinzugefügt und unverzüglich auf 20 °C abgekühlt.

Danach werden 5 ml Carrez-Lösung I (3.3) hinzugefügt, und es wird ca. 30 s lang geschüttelt. Anschließend werden 5 ml Carrez-Lösung II (3.4) hinzugefügt, und es wird nochmals 30 s geschüttelt. Dann wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt, gemischt und filtriert. Ist das Filtrat nicht vollständig klar (was selten vorkommt), muss die Bestimmung mit größeren Mengen Carrez-Lösungen I und II, z. B. 10 ml, wiederholt werden.

Anschließend wird die optische Drehung der Lösung in einem 200-mm-Rohr mit einem Polarimeter oder einem Saccharimeter gemessen.

5.3. *Bestimmung der optischen Drehung (P' oder S') der in 40 %igem Ethanol löslichen Substanzen*

Von der Probe werden 5 g auf 1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und etwa 80 ml Ethanol (3.5) hinzugefügt (siehe Bemerkung 7.2). Anschließend wird der Kolben 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und währenddessen 6-mal kräftig geschüttelt, damit sich die Testprobe gründlich mit dem Ethanol vermischt. Dann wird mit Ethanol (3.5) zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und filtriert.

Von dem Filtrat werden 50 ml (= 2,5 g der Probe) in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben abpipettiert und 2,1 ml Salzsäure (3.1) hinzugefügt; der Kolben wird kräftig geschüttelt, an einen Rückflusskühler angeschlossen und in ein Bad mit siedendem Wasser gestellt. Nach genau 15 min wird der Erlenmeyerkolben aus dem Wasserbad herausgenommen und der Inhalt in einen 100-ml-Messkolben mit einer kleinen Menge von kaltem Wasser überspült; anschließend wird auf eine Temperatur von 20 °C abgekühlt.

Danach wird mit den Carrez-Lösungen I (3.3) und II (3.4) geklärt, mit Wasser zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und filtriert und die optische Drehung gemessen, wie unter 5.2 zweiter und dritter Absatz beschrieben.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Der Stärkegehalt (%) wird wie folgt berechnet:

6.1. *Polarimetrische Messung*

$$\text{Stärkegehalt (\%)} = \frac{2\,000(P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = Optische Drehung insgesamt in Winkelgrad

P' = Optische Drehung in Winkelgrad der in 40 %igem Ethanol löslichen Substanzen

$[\alpha]_D^{20^\circ}$  = Spezifische optische Drehung von reiner Stärke. Für diesen Faktor <sup>D</sup> werden die nachstehenden, allgemein anerkannten Werte angewendet:

+185,9°:	Reisstärke,
+185,7°:	Kartoffelstärke,
+184,6°:	Maisstärke,
+182,7°:	Weizenstärke,
+181,5°:	Gerstenstärke,
+181,3°:	Haferstärke,
+184,0°:	sonstige Stärkearten sowie Stärkegemische in Mischfuttermitteln.

6.2. *Saccharimetrische Messung*

$$\text{Stärkegehalt (\%)} = \frac{2\,000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \times \frac{(2\,N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6\,N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

**▼ B**

- S = Optische Drehung insgesamt in Saccharimeter-Grad  
 S' = Optische Drehung in Saccharimeter-Grad der in 40 %igem Ethanol löslichen Substanzen  
 N = Gewicht (g) von Saccharose in 100 ml Wasser, das bei Messung mit einem 200-mm-Rohr eine optische Drehung von 100 Saccharimeter-Grad bewirkt:  
 16,29 g für die französischen Saccharimeter,  
 26,00 g für die deutschen Saccharimeter,  
 20,00 g für gemischte Saccharimeter,  
 $[\alpha]_D^{20}$  = Spezifische optische Drehung von reiner Stärke (siehe 6.1).

6.3. *Wiederholbarkeit*

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf 0,4 % (absolut) bei Stärkegehalten von weniger als 40 % und 1 % (relativ) bei Stärkegehalten von 40 % und mehr nicht überschreiten.

7. **Bemerkungen**

- 7.1. Enthält die Probe mehr als 6 % Carbonate, berechnet als Calciumcarbonat, so müssen diese vor der Bestimmung der gesamten optischen Drehung durch Behandlung mit der genau notwendigen Menge verdünnter Schwefelsäure zerstört werden.
- 7.2. Bei Erzeugnissen mit hohem Lactosegehalt, z. B. bei Molkenpulver oder Magermilchpulver, wird nach Zusatz von 80 ml Ethanol (3.5) wie folgt verfahren: Der Messkolben wird an einen Rückflusskühler angeschlossen und 30 min lang in ein Wasserbad von 50 °C gestellt. Nach dem Abkühlen wird das Verfahren, wie unter 5.3 beschrieben, fortgeführt.
- 7.3. Folgende Futtermittel-Ausgangserzeugnisse führen, sofern sie in größeren Mengen in Futtermitteln vorhanden sind, erwiesenermaßen zu Interferenzen bei der Bestimmung des Stärkegehalts durch das polarimetrische Verfahren und könnten so falsche Ergebnisse zur Folge haben:
- (Zucker-)Rübenerzeugnisse wie (Zucker-)Rübenschnitzel, (Zucker-)Rübenmelasse, (Zucker-)Rübenmelasseschnitzel, (Zucker-)Rübenvinasse, (Rüben-)Zucker,
  - Zitrustrester,
  - Leinsamen; Leinkuchen; Leinextraktionsschrot,
  - Rapssamen; Rapskuchen; Rapsextraktionsschrot; Rapsschalen,
  - Sonnenblumenkerne; Sonnenblumenextraktionsschrot; Sonnenblumenextraktionsschrot aus teilgeschälter Saat,
  - Kokoskuchen; Kokosextraktionsschrot,
  - Kartoffelpülpe,
  - Trockenhefe,
  - Erzeugnisse mit hohem Inulingehalt (z. B. Topinambur-Chips und -Mehl),
  - Grießen/Grammeln.

## M. BESTIMMUNG DES ROHASCHEGEHALTS

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Rohaschegehalts von Futtermitteln.

**▼ B****2. Prinzip**

Die Probe wird bei 550 °C verascht; der Rückstand wird gewogen.

**3. Reagenzien**

Ammoniumnitrat, Lösung (Massenkonzentration = 20 %).

**4. Geräte**

4.1. Heizplatte.

4.2. Elektrischer Muffelofen mit Thermostat.

4.3. Veraschungsschale aus Quarzglas, Porzellan oder Platin, entweder rechteckig (ca. 60 × 40 × 25 mm) oder rund (Durchmesser: 60 bis 75 mm, Höhe: 20 bis 40 mm).

**5. Verfahren**

Etwa 5 g (2,5 g bei Stoffen, die zur Blasenbildung neigen) der Probe werden auf 1 mg genau in eine vorher bei 550 °C geglühte, abgekühlte und tarierte Veraschungsschale eingewogen. Die Schale wird auf der Heizplatte allmählich bis zum Verkohlen des Stoffes erhitzt. Die Veraschung erfolgt gemäß 5.1 oder 5.2.

5.1. Die Schale wird in den auf 550 °C eingestellten Muffelofen gebracht und darin bei dieser Temperatur so lange gehalten, bis sich eine weiße, hellgraue oder rötliche Asche bildet, die offensichtlich frei von Kohlepartikeln ist. Dann wird die Schale in einen Exsikkator gestellt und unmittelbar nach dem Abkühlen gewogen.

5.2. Die Schale wird 3 h lang in den auf 550 °C eingestellten Muffelofen gebracht. Dann wird die Schale in einen Exsikkator gestellt und unmittelbar nach dem Abkühlen gewogen. Anhand einer zweiten Veraschung von 30 min ist zu prüfen, ob das Gewicht der Asche konstant geblieben ist (der Gewichtsverlust zwischen 2 aufeinanderfolgenden Wägungen darf 1 mg nicht überschreiten).

**6. Berechnung der Ergebnisse**

Das Gewicht des Rückstands wird berechnet, indem das Leergewicht abgezogen wird.

Das Ergebnis ist als Prozentsatz der Probe auszudrücken.

**7. Bemerkungen**

7.1. Bei *schwer zerstörbaren Stoffen* werden der abgekühlten Rohasche nach einer ersten Veraschung von mindestens 3 h einige Tropfen 20 %iger Ammoniumnitratlösung oder Wasser zugefügt (jedoch vorsichtig, um ein Zerstäuben oder Verkleben der Asche zu vermeiden). Nach Trocknung im Trockenschrank wird die Veraschung weitergeführt. Der Vorgang wird gegebenenfalls bis zur vollständigen Veraschung wiederholt.

7.2. Bei *Stoffen, die der unter 7.1 beschriebenen Behandlung widerstehen*, ist wie folgt vorzugehen: Nach einer Veraschung von 3 h wird die Asche mit warmem Wasser aufgenommen und durch einen kleinen aschefreien Filter abfiltriert. In der ursprünglichen Schale werden Filter und dessen Inhalt verascht. Das Filtrat wird in die abgekühlte Schale gebracht, bis zur Trockne eingedampft, verascht und gewogen.

7.3. Bei *Ölen und Fetten* wird eine Probe von 25 g in eine Schale entsprechender Abmessung genau eingewogen. Es wird dann durch Anzünden des Stoffes mit einem Streifen aus aschefreiem Filterpapier verkohlt. Nach der Verkohlung wird mit möglichst geringer Menge Wasser angefeuchtet. Anschließend wird getrocknet und die Veraschung, wie unter 5 beschrieben, zu Ende geführt.

**▼B****N. BESTIMMUNG DES GEHALTS AN IN SALZSÄURE UNLÖSLICHER ASCHE****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an in Salzsäure unlöslichen, mineralischen Bestandteilen von Futtermitteln. Abhängig von der Art der Probe sind 2 Verfahren vorgesehen.

1.1. *Verfahren A:* anzuwenden bei organischen Futtermittel-Ausgangserzeugnissen und bei den meisten Mischfuttermitteln.

1.2. *Verfahren B:* anzuwenden bei Mineralstoffen und Mineralstoffmischungen sowie bei allen Mischfuttermitteln, deren Gehalt an in Salzsäure unlöslicher Asche bei der Bestimmung nach Verfahren A mehr als 1 % beträgt.

**2. Prinzip**

2.1. *Verfahren A:* Die Probe wird verascht. Die Asche wird in Salzsäure zum Sieden gebracht und der unlösliche Rückstand abfiltriert und gewogen.

2.2. *Verfahren B:* Die Probe wird mit Salzsäure behandelt. Die Lösung wird abfiltriert, der Rückstand wird verascht, und die so erhaltene Asche nach Verfahren A weiterbehandelt.

**3. Reagenzien**

3.1. Salzsäure 3 mol/l.

3.2. Trichloressigsäure, Lösung (Massenkonzentration = 20 %).

3.3. Trichloressigsäure, Lösung (Massenkonzentration = 1 %).

**4. Geräte**

4.1. Heizplatte.

4.2. Elektrischer Muffelofen mit Thermostat.

4.3. Veraschungsschalen aus Quarzglas, Porzellan oder Platin, entweder rechteckig (ca. 60 × 40 × 25 mm) oder rund (Durchmesser: 60 bis 75 mm, Höhe: 20 bis 40 mm).

**5. Verfahren****5.1. Verfahren A**

Die Einwaage wird unter den Bedingungen, die für die Bestimmung des Rohaschegehalts beschrieben sind, verascht. Es kann auch die bei dieser Analyse erhaltene Asche verwendet werden.

Die Asche wird zusammen mit 75 ml Salzsäure (3.1) in ein Becherglas von 250 bis 400 ml Inhalt überführt. Es wird vorsichtig zum Sieden erhitzt und 15 min weiter in schwachem Sieden gehalten. Die warme Lösung wird durch einen aschefreien Papierfilter filtriert und der Rückstand mit warmem Wasser bis zum Ausbleiben der sauren Reaktion ausgewaschen. Der Filter mit dem Rückstand wird nach dem Trocknen bei einer Temperatur von mindestens 550 °C und höchstens 700 °C in einer tarierten Veraschungsschale verascht und anschließend im Exsikkator gekühlt und gewogen.

**5.2. Verfahren B**

Von der Analysenprobe werden 5 g auf 1 mg genau in ein Becherglas von 250 bis 400 ml Fassungsvermögen eingewogen. Dann werden nacheinander 25 ml Wasser und 25 ml Salzsäure (3.1) zugegeben, gemischt, und es wird bis zum Nachlassen des Aufbrausens gewartet. Zuletzt werden weitere 50 ml Salzsäure (3.1) zugegeben. Nach dem Nachlassen der eventuell erneut auftretenden Gasentwicklung wird das Becherglas 30 min lang oder, wenn notwendig, länger in ein siedendes Wasserbad gestellt, bis die vollständige Hydrolyse eventuell vorhandener Stärke eingetreten ist. Es wird warm durch einen aschefreien Filter filtriert. Der Filter wird mit etwa 50 ml warmem Wasser ausgewaschen (siehe Bemerkung 7). Anschließend wird der Filter mit Rückstand in eine Veraschungsschale gestellt, getrocknet und bei einer Temperatur von mindestens 550 °C und höchstens 700 °C verascht. Die Asche wird mit

**▼ B**

75 ml Salzsäure (3.1) in ein Becherglas von 250 bis 400 ml Fassungsvermögen überführt und anschließend, wie unter 5.1 zweiter Absatz beschrieben, weiterbehandelt.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Das Gewicht des Rückstands wird berechnet, indem das Leergewicht abgezogen wird. Das Ergebnis ist als Prozentsatz der Probe auszudrücken.

7. **Bemerkung**

Treten bei der Filtration Schwierigkeiten auf, so wird die Bestimmung wiederholt. Hierbei werden anstelle von 50 ml Salzsäure (3.1) 50 ml 20 %iger Trichloressigsäurelösung (3.2) zugegeben; der Filter wird mit einer warmen 1 %igen Trichloressigsäurelösung (3.3) ausgewaschen.

O. BESTIMMUNG DES GEHALTS AN CARBONATEN

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt es, in den meisten Futtermitteln den Gehalt an Carbonaten, herkömmlicherweise als Calciumcarbonat bezeichnet, zu bestimmen.

In bestimmten Fällen (z. B. bei Eisencarbonat) ist jedoch eine besondere Methode anzuwenden.

2. **Prinzip**

Die Carbonate werden mit Salzsäure zersetzt; die frei gewordene Kohlensäure wird in einem graduierten Rohr aufgefangen. Das erhaltene Gasvolumen wird mit demjenigen verglichen, welches unter den gleichen Bedingungen von einer bekannten Menge Calciumcarbonat freigesetzt wird.

3. **Reagenzien**

- 3.1. Salzsäure, Dichte 1,10 g/ml.
- 3.2. Calciumcarbonat.
- 3.3. Schwefelsäure, etwa 0,05 mol/l, mit Methylrot angefärbt.

4. **Geräte**

Apparatur nach Scheibler-Dietrich (siehe Skizze) oder gleichwertiges Gerät.

5. **Verfahren**

Je nach dem Carbonatgehalt der Probe wird eine Einwaage wie folgt eingewogen:

- 0,5 g bei Erzeugnissen mit einem Anteil von 50 bis 100 % Carbonaten, ausgedrückt als Calciumcarbonat,
- 1 g bei Erzeugnissen mit einem Anteil von 40 bis 50 % Carbonaten, ausgedrückt als Calciumcarbonat,
- 2 bis 3 g bei anderen Erzeugnissen.

Die Einwaage wird in die Spezialflasche (4) der Apparatur gebracht, die mit einem Röhrchen aus unzerbrechlichem Material versehen ist, das 10 ml Salzsäure (3.1) enthält. Anschließend wird die Flasche an die Apparatur angeschlossen. Dann wird der Drei-Weg-Hahn (5) so gedreht, dass das Rohr (1) mit der Außenluft in Verbindung steht. Mit dem beweglichen Rohr (2), das mit angefärbter Schwefelsäure (3.3) gefüllt und mit dem graduierten Rohr (1) verbunden ist, wird das Niveau der Flüssigkeit auf den Nullpunkt der Skala eingestellt. Der Hahn (5) wird so gedreht, dass das Rohr (1) mit dem Rohr (3) verbunden ist. Anschließend wird der Nullpunkt kontrolliert.

Die Salzsäure (3.1) wird durch Kippen der Flasche (4) langsam über die Einwaage laufen gelassen. Durch Absenken des beweglichen Rohrs (2) wird der Druck ausgeglichen. Die Flasche (4) wird so lange hin und her bewegt, bis die Kohlensäureentwicklung ganz aufgehört hat.

Der Druckausgleich erfolgt, indem die Flüssigkeit in den Rohren (1) und (2) wieder auf gleiches Niveau gebracht wird. Nach *einigen Minuten* — sobald das Volumen konstant ist — kann abgelesen werden.

Es ist ein Vergleichsversuch mit 0,5 g Calciumcarbonat (3.2) unter denselben Bedingungen durchzuführen.

**▼ B****6. Berechnung der Ergebnisse**

Der Gehalt an Carbonaten, ausgedrückt als Calciumcarbonat, wird nach folgender Formel berechnet:

$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

wobei!

X = Massenanteil (%) an Carbonaten in der Probe, ausgedrückt als Calciumcarbonat,

V = ml CO<sub>2</sub>, von der Einwaage freigesetzt,

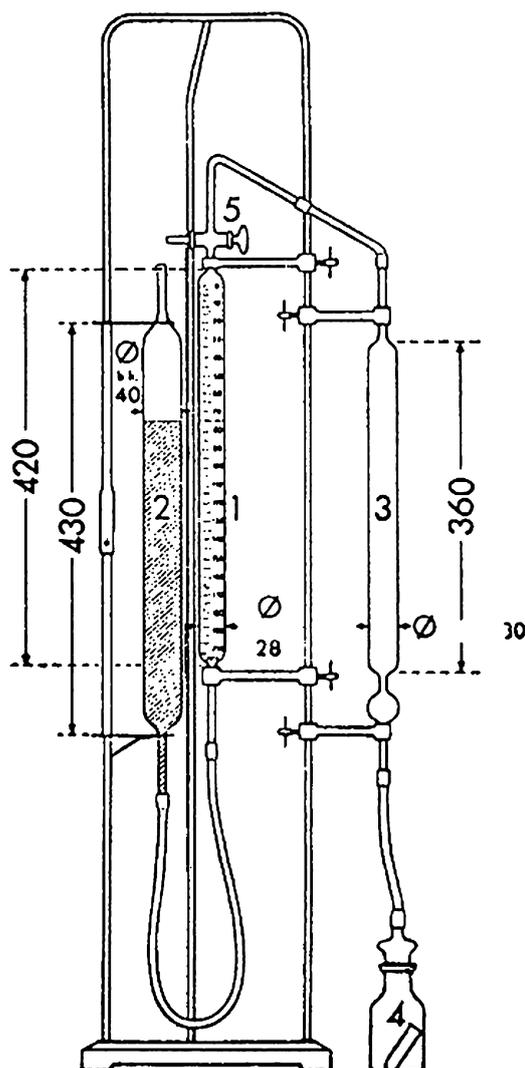
V<sub>1</sub> = ml CO<sub>2</sub>, aus 0,5 g CaCO<sub>3</sub> freigesetzt,

m = Probeneinwaage in g.

**7. Bemerkungen**

- 7.1. Beträgt die Einwaage mehr als 2 g, werden vor Beginn des Versuchs 15 ml destilliertes Wasser in die Flasche (4) zugegeben und gemischt. Beim Vergleichsversuch ist dieselbe Wassermenge zu verwenden.
- 7.2. Bei Verwendung eines Apparats, dessen Volumen von dem der Scheibler-Dietrich-Apparatur abweicht, sind die Einwaage, die Vergleichsmenge und die Berechnung der Ergebnisse entsprechend anzupassen.

APPARATUR NACH SCHEIBLER-DIETRICH ZUR BESTIMMUNG VON CO<sub>2</sub>



(Abmessungen in mm)

**▼ B**

## P. BESTIMMUNG DES GESAMTPHOSPHORGEHALTS

**FOTOMETRISCHE METHODE**1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an Gesamtphosphor in Futtermitteln. Sie ist besonders für die Untersuchung von Futtermitteln mit einem geringen Gehalt an Phosphor geeignet. In bestimmten Fällen (phosphorreiche Erzeugnisse) kann eine gravimetrische Methode angewandt werden.

2. **Prinzip**

Die Probe wird entweder auf trockenem Wege (bei organischen Futtermitteln) oder auf nassem Wege (bei Mineralstoffen und flüssigen Futtermitteln) aufgeschlossen und in Säure gelöst. Die Lösung wird mit dem Vanadat-Molybdat-Reagenz behandelt. Die Extinktion der gelb gefärbten Lösung wird bei 430 nm im Spektralfotometer gemessen.

3. **Reagenzien**

3.1. Calciumcarbonat.

3.2. Salzsäure,  $\rho_{20} = 1,10$  g/ml (ca. 6 mol/l).3.3. Salpetersäure,  $\rho_{20} = 1,045$  g/ml.3.4. Salpetersäure,  $\rho_{20} = 1,38$  bis 1,42 g/ml.3.5. Schwefelsäure,  $\rho_{20} = 1,84$  g/ml.

3.6. Vanadat-Molybdat-Reagenz: 200 ml Ammoniumheptamolybdatlösung (3.6.1) werden mit 200 ml Ammoniummonovanadatlösung (3.6.2) und 134 ml Salpetersäure (3.4) in einem 1-l-Messkolben gemischt und mit Wasser zur Marke aufgefüllt.

3.6.1. Ammoniumheptamolybdatlösung: 100 g Ammoniumheptamolybdat,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , werden in heißem Wasser gelöst. 10 ml Ammoniakwasser (D: 0,91 g/ml) werden hinzugefügt, und das Volumen wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.3.6.2. Ammoniummonovanadatlösung: 2,35 g Ammoniummonovanadat,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , werden in 400 ml heißem Wasser gelöst. 20 ml verdünnte Salpetersäure (7 ml  $\text{HNO}_3$  (3.4) + 13 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) werden unter ständigem Rühren langsam hinzugefügt, und das Volumen wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.3.7. Phosphor-Standardlösung 1 mg je ml: 4,387 g Kaliumdihydrogenphosphat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , werden in Wasser gelöst. Das Volumen wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.4. **Geräte**

4.1. Veraschungsschalen aus Quarzglas, Platin oder Porzellan.

4.2. Elektrischer Muffelofen mit Thermostat auf 550 °C eingestellt.

4.3. Kjeldahl-Kolben, 250 ml.

4.4. Messkolben und Präzisions-Pipetten.

4.5. Spektralfotometer.

4.6. Reagenzgläser, ca. 16 mm Durchmesser, mit Stopfen graduiert bis zu 14,5 mm Durchmesser; Fassungsvermögen: 25 bis 30 ml.

5. **Verfahren**5.1. *Vorbereitung der Lösung*

Je nach der Art der Probe wird die Lösung, wie unter 5.1.1 oder 5.1.2 angegeben, vorbereitet.

5.1.1. *Allgemeines Verfahren*

Von der Probe werden 1 g oder mehr auf 1 mg genau in einen Kjeldahl-Kolben eingewogen und mit 20 ml Schwefelsäure (3.5) versetzt; dann wird geschüttelt, um das Material vollständig mit der Säure zu benetzen und um zu verhindern, dass es an den Wandungen des Kolbens anhaftet; anschließend wird der Kolben erhitzt und 10 min

**▼B**

im Sieden gehalten. Nach geringem Abkühlen werden 2 ml Salpetersäure (3.4) hinzugefügt; es wird schwach erhitzt und wieder etwas abgekühlt. Dann wird noch ein wenig Salpetersäure (3.4) hinzugegeben und erneut zum Sieden erhitzt. Das Verfahren wird so oft wiederholt, bis die Lösung farblos geworden ist. Hierauf wird abgekühlt, etwas Wasser zugesetzt und die Flüssigkeit in einen 500-ml-Messkolben überführt, wobei der Kjeldahl-Kolben mit heißem Wasser ausgespült wird. Nach Abkühlen wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt, homogenisiert und filtriert.

5.1.2. *Verfahren für Proben, die organische Stoffe enthalten, aber frei sind von Calcium- bzw. Magnesiumdihydrogenphosphaten*

Von der Probe werden 2,5 g auf 1 mg genau in eine Veraschungsschale eingewogen und mit 1 g Calciumcarbonat (3.1) vollständig vermischt. Im Muffelofen wird bei 550 °C verascht, bis die Asche weiß oder grau ist (kleine Mengen Kohle stören nicht). Die Asche wird in ein 250-ml-Becherglas gebracht, 20 ml Wasser und so viel Salzsäure (3.2) zugefügt, bis das Aufbrausen ausbleibt. Zuletzt werden weitere 10 ml Salzsäure (3.2) zugegeben. Dann wird das Becherglas auf ein Sandbad gestellt und bis zur Trockne eingedampft, um die Kieselsäure unlöslich zu machen. Der Rückstand wird in 10 ml Salpetersäure (3.3) aufgenommen und 5 min lang auf dem Sandbad oder der Heizplatte zum Sieden erhitzt, wobei der Rückstand nicht ganz trocken werden darf. Die Flüssigkeit wird in einen 500-ml-Messkolben übergespült, wobei das Becherglas mehrmals mit heißem Wasser ausgewaschen wird. Nach Abkühlen wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt, homogenisiert und filtriert.

5.2. *Entwicklung der Färbung und Messung der Extinktion*

Ein aliquoter Teil des nach 5.1.1 oder 5.1.2 erhaltenen Filtrats wird verdünnt, um eine Konzentration an Phosphor von höchstens 40 µg/ml zu erhalten. Von dieser Lösung werden 10 ml in ein Reagenzglas (4.6) pipettiert und 10 ml Vanadat-Molybdat-Reagenz (3.6) hinzugefügt. Das Reagenzglas wird geschüttelt und dann mindestens 10 min bei einer Temperatur von 20 °C stehen gelassen. Anschließend wird die Extinktion im Spektrofotometer bei 430 nm gegen eine Lösung von 10 ml Wasser und 10 ml Vanadat-Molybdat-Reagenz (3.6) gemessen.

5.3. *Kalibrationskurve*

Aus der Standardlösung (3.7) werden Lösungen hergestellt, die 5, 10, 20, 30 bzw. 40 µg Phosphor je ml enthalten. Zu jeweils 10 ml dieser Lösungen werden 10 ml Vanadat-Molybdat-Reagenz (3.6) hinzugefügt. Das Reagenzglas wird geschüttelt und dann mindestens 10 min bei einer Temperatur von 20 °C stehen gelassen. Dann wird die Extinktion entsprechend den unter 5.2 genannten Bedingungen gemessen. Die Kalibrationskurve wird aufgestellt, indem die Extinktionswerte auf der Ordinate und die entsprechende Phosphormenge auf der Abszisse aufgetragen werden. Bei Phosphorkonzentrationen von 0 bis 40 µg/ml ist die Kurve linear.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Der Phosphorgehalt der Analysenprobe wird mithilfe der Kalibrationskurve bestimmt.

Das Ergebnis ist als Prozentsatz der Probe auszudrücken.

**Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf die folgenden Werte nicht überschreiten:

— 3 % relativ zum höheren Wert bei einem Phosphorgehalt von unter 5 %,

— 0,15 % absolut bei einem Phosphorgehalt von mehr als 5 %.

**▼B****Q. BESTIMMUNG DES CHLORGEHALTS AUS CHLORIDEN****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Chlorgehalts aus wasserlöslichen Chloriden, herkömmlicherweise als Natriumchlorid bezeichnet. Sie ist bei allen Futtermitteln anwendbar.

**2. Prinzip**

Die Chloride werden in Wasser gelöst. Handelt es sich um Erzeugnisse, die organische Stoffe enthalten, wird eine Klärung vorgenommen. Die Lösung wird mittels Salpetersäure schwach angesäuert, und die Chloride werden mit einer Silbernitratlösung als Silberchlorid gefällt. Der Silbernitratüberschuss wird mit einer Ammoniumthiocyanatlösung nach der Volhard-Methode zurücktitriert.

**3. Reagenzien**

- 3.1. Ammoniumthiocyanatlösung 0,1 mol/l.
- 3.2. Silbernitratlösung 0,1 mol/l.
- 3.3. Gesättigte Ammonium-Eisen(III)-Sulfatlösung  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ .
- 3.4. Salpetersäure, Dichte: 1,38 g/ml.
- 3.5. Diethylether.
- 3.6. Aceton.
- 3.7. Carrez-Lösung I: 21,9 g Zinkacetat,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , und 3 g Eisessig werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
- 3.8. Carrez-Lösung II: 10,6 g Kaliumhexacyanoferrat(II),  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
- 3.9. Aktivkohle, chloridfrei und keine Chloride adsorbierend.

**4. Geräte**

Mechanisches Schüttelgerät, ca. 35 bis 40  $\text{min}^{-1}$ .

**5. Verfahren****5.1. Vorbereitung der Lösung**

Je nach der Art der Probe wird, wie unter 5.1.1, 5.1.2 oder 5.1.3 beschrieben, eine Lösung hergestellt.

Gleichzeitig ist ein *Blindversuch* ohne die zu analysierende Probe durchzuführen.

**5.1.1. Proben, die frei von organischen Stoffen sind**

Eine Menge von höchstens 10 g der Analysenprobe mit einem Gehalt von höchstens 3 g Chlor in Form von Chloriden wird auf 1 mg genau abgewogen und in einen 500-ml-Messkolben mit 400 ml Wasser von etwa 20 °C gebracht. Dann wird 30 min lang in dem Schüttelgerät rotiert, zur Marke aufgefüllt, homogenisiert und filtriert.

**5.1.2. Proben, die organische Stoffe enthalten (mit Ausnahme der unter 5.1.3 angeführten Erzeugnisse)**

Etwa 5 g der Analysenprobe werden auf 1 mg genau eingewogen und mit 1 g Aktivkohle in einen 500-ml-Messkolben gebracht. Hierzu werden 400 ml Wasser von etwa 20 °C und 5 ml Carrez-Lösung I (3.7) gegeben, 30 s gerührt und anschließend 5 ml Carrez-Lösung II (3.8) zugesetzt. Dann wird 30 min lang in dem Schüttelgerät rotiert, zur Marke aufgefüllt, homogenisiert und filtriert.

**▼B**

- 5.1.3. Backfutter, Leinkuchen und Leinmehl, Erzeugnisse mit einem hohen Leinmehlgehalt oder sonstige Erzeugnisse mit einem hohen Gehalt an Pflanzenschleim oder kolloidalen Stoffen (z. B. verkleisterte Stärke)

Die Lösung wird, wie unter 5.1.2 beschrieben, zubereitet, jedoch nicht filtriert. Es wird dekantiert (falls erforderlich, zentrifugiert); dann werden 100 ml der überstehenden Lösung in einen 200-ml-Messkolben pipettiert. Es wird mit Aceton (3.6) gemischt und mit demselben Lösungsmittel zur Marke aufgefüllt, homogenisiert und filtriert.

- 5.2. *Titration*

Von dem Filtrat, das nach 5.1.1, 5.1.2 oder 5.1.3 erhalten wurde, werden (je nach dem zu erwartenden Chlorgehalt) 25 bis 100 ml in einen Erlenmeyerkolben pipettiert. Die aliquote Menge darf höchstens 150 mg Chlor (Cl) enthalten. Falls erforderlich, wird mit Wasser auf mindestens 50 ml verdünnt. Dann werden 5 ml Salpetersäure (3.4), 20 ml der gesättigten Ammonium-Eisen(III)-Sulfatlösung (3.3) und 2 Tropfen Ammoniumthiocyanatlösung (3.1) aus einer bis zum Nullpunkt gefüllten Bürette hinzugesetzt. Anschließend wird aus einer Bürette Silbernitratlösung (3.2) zugegeben, bis ein Überschuss von 5 ml vorhanden ist. Dann werden 5 ml Diethylether (3.5) zugegeben, und es wird kräftig geschüttelt, um den Niederschlag zum Ausflocken zu bringen. Der Überschuss an Silbernitrat wird mit Ammoniumthiocyanatlösung (3.1) titriert, bis eine rotbraune Farbe auftritt, die 1 min beständig ist.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Die Menge Chlor (X), ausgedrückt als % Natriumchlorid, wird nach folgender Formel berechnet:

$$X = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

wobei:

$V_1$  = zugegebene Silbernitratlösung 0,1 mol/l, in ml,

$V_2$  = Ammoniumthiocyanatlösung 0,1 mol/l, die für die Titration verbraucht werden, in ml,

$m$  = Probeneinwaage in g.

Falls der Blindversuch einen Verbrauch an Silbernitratlösung 0,1 mol/l anzeigt, wird dieser Wert von dem Volumen ( $V_1 - V_2$ ) abgezogen.

7. **Bemerkungen**

- 7.1. Die Titration kann auch mit der potenziometrischen Methode erfolgen.
- 7.2. Bei sehr fettreichen Erzeugnissen ist eine vorherige Entfettung mit Diethylether oder Petrolether durchzuführen.
- 7.3. Bei Fischmehl kann die Titration nach der Mohr-Methode durchgeführt werden.



ANHANG IV

**ANALYSEMETHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON FUTTERMITTELN AUF IHREN GEHALT AN ZUGELASSENEN ZUSATZSTOFFEN**

A. BESTIMMUNG DES VITAMIN-A-GEHALTS

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Vitamin-A-(Retinol-)Gehalts in Futtermitteln und Vormischungen. Unter Vitamin A wird der nach dieser Methode ermittelte Gehalt an all-*trans*-Vitamin-A-Alkohol und seinen *cis*-Isomeren verstanden. Der Vitamin-A-Gehalt wird in Internationalen Einheiten (IE) je kg angegeben. Eine IE entspricht der Aktivität von 0,300 µg all-*trans*-Vitamin-A-Alkohol oder 0,344 µg all-*trans*-Vitamin-A-Acetat oder 0,550 µg all-*trans*-Vitamin-A-Palmitat.

Die Bestimmungsgrenze beträgt 2 000 IE Vitamin A/kg.

2. **Prinzip**

Die Probe wird mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung hydrolysiert, und das Vitamin A wird mit Petrolether extrahiert. Das Lösungsmittel wird eingedampft; der Rückstand wird in Methanol gelöst und, falls notwendig, auf die erforderliche Konzentration verdünnt. Der Vitamin-A-Gehalt wird mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitsschromatografie (RP-HPLC) unter Verwendung eines UV- oder Fluoreszenzdetektors bestimmt. Die chromatografischen Bedingungen werden so gewählt, dass keine Auftrennung zwischen all-*trans*-Vitamin-A-Alkohol und seinen *cis*-Isomeren erfolgt.

3. **Reagenzien**

- 3.1. Ethanol,  $\sigma = 96 \%$ .
- 3.2. Petrolether, Siedepunktintervall 40 bis 60 °C.
- 3.3. Methanol.
- 3.4. Kaliumhydroxid-Lösung,  $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$ .
- 3.5. Natriumascorbat-Lösung,  $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$  (siehe Bemerkung 7.7).
- 3.6. Natriumsulfid,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$  ( $x = 7$  bis  $9$ )
  - 3.6.1. Natriumsulfid-Lösung,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$  in Glycerin,  $\beta = 120 \text{ g/l}$  (für  $x = 9$ ) (siehe Bemerkung 7.8).
- 3.7. Phenolphthalein-Lösung,  $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$  in Ethanol (3.1).
- 3.8. 2-Propanol.
- 3.9. Mobile Phase für die HPLC: Mischung von Methanol (3.3) und Wasser, z. B. 980 + 20 (V+V). Das Mischungsverhältnis ist der jeweils verwendeten Säule anzupassen.
- 3.10. Stickstoff, sauerstofffrei.
- 3.11. All-*trans*-Vitamin-A-Acetat, reinst, mit zertifizierter Aktivität, z. B.  $2,80 \times 10^6 \text{ IE/g}$ 
  - 3.11.1. Stammlösung von all-*trans*-Vitamin-A-Acetat: 50 mg Vitamin-A-Acetat (3.11) auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben einwiegen. In 2-Propanol (3.8) lösen und zur Marke mit demselben Lösungsmittel auffüllen. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 1 400 IE Vitamin A je ml. Der genaue Gehalt ist gemäß 5.6.3.1 zu bestimmen.
- 3.12. All-*trans*-Vitamin-A-Palmitat, reinst, mit zertifizierter Aktivität, z. B.  $1,80 \times 10^6 \text{ IE/g}$

**▼ B**

3.12.1. Stammlösung von all-*trans*-Vitamin-A-Palmitat: 80 mg Vitamin-A-Palmitat (3.12) auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben einwiegen. In 2-Propanol (3.8) lösen und mit demselben Lösungsmittel zur Marke auffüllen. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 1 400 IE Vitamin A je ml. Der genaue Gehalt ist gemäß 5.6.3.2 zu bestimmen.

3.13. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (siehe Bemerkung 7.5).

**4. Geräte**

4.1. Vakuum-Rotationsverdampfer.

4.2. Braunglasgeräte

4.2.1. Stehkolben oder Erlenmeyerkolben, 500 ml, mit Schliffhülse.

4.2.2. Messkolben mit Schliffstopfen, enghalsig, 10, 25, 100 und 500 ml.

4.2.3. Scheidetrichter, konische Form, 1 000 ml, mit Schliffstopfen.

4.2.4. Spitzkolben, 250 ml, mit Schliffhülsen.

4.3. Allihn-Rückflusskühler, Mantellänge 300 mm, Kernschliff mit Adapter für Gaseinleitung.

4.4. Phasentrennungsfaltenfilter, Durchmesser 185 mm (z. B. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5. HPLC-Einrichtung mit Injektionssystem

4.5.1. HPLC-Trennsäule, 250 × 4 mm, C<sub>18</sub>, 5 oder 10 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule (Leistungskriterium: nur ein Peak für alle Retinol-Isomeren unter diesen HPLC-Bedingungen).

4.5.2. UV- oder Fluoreszenzdetektor mit variabler Wellenlängeneinstellung.

4.6. Spektralfotometer mit Quarz-Küvetten von 10 mm Schichtdicke.

4.7. Wasserbad mit Magnetrührer.

4.8. Extraktionsapparat (Abbildung 1) bestehend aus:

4.8.1. 1-l-Standzylinder mit Schliff und Schliffstopfen,

4.8.2. Schliffeinsatz mit Seitenarm und einem in der Höhe verschiebbaren Rohr in der Mitte. Das verschiebbare Rohr sollte ein U-förmiges unteres Ende und eine Düse am entgegengesetzten Ende haben, so dass die obere Flüssigkeitsphase aus dem Zylinder in den Scheidetrichter überführt werden kann.

**5. Verfahren**

*Anmerkung:* Vitamin A ist empfindlich gegenüber Licht (UV-Strahlung) und Oxidation. Es muss deshalb unter Ausschluss von Licht (Verwendung von Braunglasgeräten oder von mit Aluminiumfolie umhüllten Glasgeräten) und Sauerstoff (Stickstoffspülung) gearbeitet werden. Während der Extraktion muss das Luftpolster über der Flüssigkeit durch Stickstoff ersetzt werden (zur Vermeidung von Überdruck Stopfen rechtzeitig lüften).

5.1. *Vorbereitung der Probe*

Die Probe wird unter Vermeidung von Erwärmung so fein vermahlen, dass sie ein Sieb mit 1 mm Maschenweite passieren kann. Die Zerkleinerung darf erst **unmittelbar** vor dem Einwiegen und Verseifen erfolgen, da sonst Vitamin-A-Verluste auftreten können.

**▼ B**5.2. *Verseifung*

Je nach Vitamin-A-Gehalt 2 bis 25 g der Probe auf 1 mg genau in einen 500-ml-Steh- oder Erlenmeyerkolben (4.2.1) einwiegen. Nacheinander unter Schwenken 130 ml Ethanol (3.1), etwa 100 mg BHT (3.13), 2 ml Natriumascorbat-Lösung (3.5) und 2 ml Natriumsulfid-Lösung (3.6) zusetzen. Den Kolben mit einem Rückflusskühler (4.3) verbinden und in ein Wasserbad mit Magnetrührer (4.7) geben. Bis zum Sieden erhitzen und 5 min am Rückflusskühler kochen. Anschließend 25 ml Kaliumhydroxidlösung (3.4) durch den Rückflusskühler (4.3) zugeben und unter ständigem Rühren und schwachem Stickstoffstrom 25 min weiterkochen. Den Kühler mit etwa 20 ml Wasser ausspülen und den Kolbeninhalt auf Zimmertemperatur abkühlen.

5.3. *Extraktion*

Die Verseifungslösung wird mit insgesamt 250 ml Wasser quantitativ in einen 1 000-ml-Scheidetrichter (4.2.3) oder in den Extraktionsapparat (4.8) überspült. Der Verseifungskolben wird mit 25 ml Ethanol (3.1) und anschließend mit 100 ml Petrolether (3.2) nachgewaschen, und die Spülflüssigkeiten werden ebenfalls in den Scheidetrichter oder den Extraktionsapparat überführt. Das Wasser/Ethanol-Verhältnis in den vereinigten Lösungen muss etwa 2:1 betragen. 2 min lang kräftig schütteln und dann 2 min lang absetzen lassen.

5.3.1. *Extraktion mithilfe eines Scheidetrichters (4.2.3)*

Nach Phasentrennung (siehe Bemerkung 7.3) wird die Petroletherphase in einen anderen Scheidetrichter (4.2.3) überführt. Diese Extraktion 2-mal mit je 100 ml Petrolether (3.2) und 2-mal mit je 50 ml Petrolether (3.2) wiederholen.

Die vereinigten Extrakte werden im Scheidetrichter zunächst unter leichtem Schwenken (Vermeidung von Emulsionsbildung) 2-mal mit jeweils 100 ml Wasser gespült und dann durch mehrmaliges Schütteln mit weiteren Portionen von 100 ml Wasser so oft gewaschen, bis das Waschwasser bei Zugabe von Phenolphthalein-Lösung (3.7) farblos bleibt (4-maliges Waschen ist normalerweise ausreichend). Zur Entfernung eventuell suspendierten Wassers wird der gewaschene Extrakt durch einen trockenen Phasentrennungsfaltenfilter (4.4) in einen 500-ml-Messkolben (4.2.2) filtriert. Scheidetrichter und Filter mit 50 ml Petrolether (3.2) nachwaschen, mit Petrolether (3.2) zur Marke auffüllen und gut schütteln.

5.3.2. *Extraktion mithilfe eines Extraktionsapparats (4.8)*

Nach Phasentrennung (siehe Bemerkung 7.3) wird der Schliffstopfen des Standzylinders (4.8.1) durch den Schliffeinsatz (4.8.2) ersetzt und das verschiebbare Rohr so eingestellt, dass sich das U-förmige untere Ende gerade über dem Niveau der Grenzfläche befindet. Durch Druckausübung von einer am Seitenarm angebrachten Stickstoffleitung wird die obere Petroletherphase in einen 1 000-ml-Scheidetrichter (4.2.3) überführt. 100 ml Petrolether (3.2) werden in den Standzylinder gegeben, der mit einem Stopfen verschlossen und gründlich geschüttelt wird. Nach der Phasentrennung wird die obere Phase wie zuvor in den Scheidetrichter überführt. Diese Extraktion wird noch 1-mal mit 100 ml Petrolether (3.2) und 2-mal mit je 50 ml Petrolether (3.2) wiederholt, und die Petroletherphasen werden in den Scheidetrichter überführt.

Die vereinigten Petroletherextrakte, wie unter 5.3.1 erläutert, waschen und wie dort beschrieben weiterverfahren.

5.4. *Vorbereitung der Probenlösung für die HPLC*

Ein aliquoter Teil der Petrolether-Lösung (gemäß 5.3.1 oder 5.3.2) wird in einen 250-ml-Spitzkolben (4.2.4) pipettiert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck und bei einer Badtemperatur von höchstens 40 °C am Rotationsverdampfer (4.1) fast bis zur Trockne eingedampft. Danach wird unter Stickstoff (3.10) Druckausgleich geschaffen und der Kolben vom Rotationsverdampfer abgenommen. Das restliche Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom (3.10) abgeblasen, und der Rückstand

**▼ B**

wird sofort in einer definierten Menge (10 bis 100 ml) Methanol (3.3) aufgenommen (die Konzentration von Vitamin A muss etwa 5 bis 30 IE/ml betragen).

5.5. *Bestimmung durch HPLC*

Die Abtrennung von Vitamin A erfolgt mithilfe einer Umkehrphasen- $C_{18}$ -Säule (4.5.1), und die Konzentration wird mithilfe eines UV-Detektors (325 nm) oder eines Fluoreszenzdetektors (Anregung: 325 nm, Emission: 475 nm) (4.5.2) gemessen.

Hierzu wird ein aliquoter Teil (z. B. 20  $\mu$ l) der nach 5.4 erhaltenen methanolischen Lösung auf die Trennsäule gegeben und mit der mobilen Phase (3.9) eluiert. Die mittlere Peakhöhe (-fläche) von mehreren Einspritzungen derselben Probenlösung wird ermittelt. In gleicher Weise werden auch die mittleren Peakhöhen (-flächen) von mehreren Einspritzungen der Kalibrierlösungen (5.6.2) bestimmt.

## HPLC-Bedingungen

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

HPLC-Trennsäule (4.5.1):	250 $\times$ 4 mm, $C_{18}$ , 5 oder 10 $\mu$ m Korngröße, oder vergleichbare Säule
Mobile Phase (3.9):	Mischung von Methanol (3.3) und Wasser, z. B. 980 + 20 (V+V).
Durchflussrate:	1 bis 2 ml/min
Detektor (4.5.2):	UV-Detektor (325 nm) oder Fluoreszenzdetektor (Anregung: 325 nm, Emission: 475 nm)

5.6. *Kalibrierung*5.6.1. *Herstellen der Gebrauchsstandardlösungen*

Von der Vitamin-A-Acetat-Stammlösung (3.11.1) oder der Vitamin-A-Palmitat-Stammlösung (3.12.1) 20 ml in einen 500-ml-Steh- oder Erlenmeyerkolben (4.2.1) pipettieren und, wie unter 5.2 beschrieben, aber ohne Zugabe von BHT, hydrolysieren. Anschließend mit Petrolether (3.2) gemäß 5.3 extrahieren und mit Petrolether (3.2) auf 500 ml auffüllen. 100 ml dieses Extrakts werden am Rotationsverdampfer (siehe 5.4) fast bis zur Trockne eingedampft. Das verbleibende Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom (3.10) abgeblasen, und der Rückstand wird in 10,0 ml Methanol (3.3) aufgenommen. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 560 IE Vitamin A je ml. Der genaue Gehalt ist nach 5.6.3.3 zu bestimmen. Die Gebrauchsstandardlösung muss vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

Von dieser Gebrauchsstandardlösung werden 2,0 ml in einen 20-ml-Messkolben pipettiert. Es wird mit Methanol (3.3) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Der Sollgehalt dieser verdünnten Gebrauchsstandardlösung beträgt 56 IE Vitamin A je ml.

5.6.2. *Herstellen der Kalibrierlösungen und Erstellung der Kalibrationskurve*

Von der **verdünnten** Gebrauchsstandardlösung werden 1,0 ml, 2,0 ml, 5,0 ml bzw. 10,0 ml in jeweils einen 20-ml-Messkolben pipettiert. Es wird mit Methanol (3.3) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Der Sollgehalt dieser Lösungen beträgt 2,8 IE, 5,6 IE, 14,0 IE bzw. 28,0 IE Vitamin A je ml.

Von jeder Kalibrierlösung werden mehrmals 20  $\mu$ l eingespritzt, und die mittleren Peakhöhen (-flächen) werden gemessen. Anhand der so ermittelten mittleren Peakhöhen (-flächen) und unter Berücksichtigung der Ergebnisse der UV-Kontrolle (5.6.3.3) wird eine Kalibrationskurve erstellt.

**▼B**

## 5.6.3. UV-Kontrolle der Standardlösungen

5.6.3.1. *Vitamin-A-Acetat-Stammlösung*

Von der Vitamin-A-Acetat-Stammlösung (3.11.1) werden 2,0 ml in einen 50-ml-Messkolben (4.2.2) pipettiert, und es wird mit 2-Propanol (3.8) zur Marke aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 56 IE Vitamin A je ml. Von dieser verdünnten Vitamin-A-Acetat-Lösung werden 3,0 ml in einen 25-ml-Messkolben pipettiert; es wird mit 2-Propanol (3.8) zur Marke aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 6,72 IE Vitamin A je ml. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen 2-Propanol (3.8) im Spektralfotometer (4.6) zwischen 300 und 400 nm gemessen. Das Extinktionsmaximum muss zwischen 325 und 327 nm liegen.

Berechnung des Vitamin-A-Gehalts:

$$\text{IE Vitamin A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ E für Vitamin-A-Acetat} = 1\,530 \text{ bei } 326 \text{ nm in 2-Propanol})$$

5.6.3.2. *Vitamin-A-Palmitat-Stammlösung*

Von der Vitamin-A-Palmitat-Stammlösung (3.12.1) werden 2,0 ml in einen 50-ml-Messkolben (4.2.2) pipettiert, und es wird mit 2-Propanol (3.8) zur Marke aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 56 IE Vitamin A je ml. Von dieser verdünnten Vitamin-A-Palmitat-Lösung werden 3,0 ml in einen 25-ml-Messkolben pipettiert; es wird zur Marke mit 2-Propanol (3.8) aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 6,72 IE Vitamin A je ml. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen 2-Propanol (3.8) im Spektralfotometer (4.6) zwischen 300 und 400 nm gemessen. Das Extinktionsmaximum muss zwischen 325 und 327 nm liegen.

Berechnung des Vitamin-A-Gehalts:

$$\text{IE Vitamin A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ für Vitamin-A-Palmitat} = 957 \text{ bei } 326 \text{ nm in 2-Propanol})$$

5.6.3.3. *Vitamin-A-Gebrauchsstandardlösung*

Von der gemäß 5.6.1 hergestellten, **unverdünnten** Vitamin-A-Gebrauchsstandardlösung werden 3,0 ml in einen 50-ml-Messkolben (4.2.2) pipettiert, und es wird mit 2-Propanol (3.8) zur Marke aufgefüllt. 5,0 ml dieser Lösung werden in einen 25-ml-Messkolben pipettiert; es wird mit 2-Propanol (3.8) zur Marke aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 6,72 IE Vitamin A je ml. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen 2-Propanol (3.8) im Spektralfotometer (4.6) zwischen 300 und 400 nm gemessen. Das Extinktionsmaximum muss zwischen 325 und 327 nm liegen.

Berechnung des Vitamin-A-Gehalts:

$$\text{IE Vitamin A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ E für Vitamin-A-Alkohol} = 1\,821 \text{ bei } 325 \text{ nm in 2-Propanol})$$

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Aus der mittleren Höhe (Fläche) der Vitamin-A-Peaks der Probenlösung wird anhand der Kalibrationskurve (5.6.2) die Konzentration der Probenlösung in IE/ml bestimmt.

**▼ B**

Der Vitamin-A-Gehalt  $w$  (in IE/kg) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} \text{ [IE/kg]}$$

wobei:

$c$  = Vitamin-A-Konzentration der Probenlösung (5.4) in IE/ml,  
 $V_1$  = Volumen der Probenlösung (5.4) in ml,  
 $V_2$  = Volumen des unter 5.4 entnommenen aliquoten Teils in ml,  
 $m$  = Probeneinwaage in g.

## 7. Bemerkungen

- 7.1. Bei Proben mit niedriger Vitamin-A-Konzentration kann es zweckmäßig sein, die Petroletherextrakte von 2 Verseifungsansätzen (Einwaage 25 g) zu einer Probenlösung für die HPLC-Bestimmung zu vereinigen.
- 7.2. Die Einwaage für die Analyse darf höchstens 2 g Fett enthalten.
- 7.3. Bei schlechter Phasentrennung können etwa 10 ml Ethanol (3.1) zur Zerstörung der Emulsion zugegeben werden.
- 7.4. Bei Lebertran oder anderen reinen Fetten ist die Verseifungsdauer auf 45 bis 60 min zu erhöhen.
- 7.5. Statt BHT kann Hydrochinon verwendet werden.
- 7.6. Bei Verwendung einer Normalphasensäule ist die Trennung der Retinolisomeren möglich. Allerdings müssen in diesem Fall für die Berechnungen die Peakhöhen (-flächen) aller *cis*- und *trans*-Isomeren addiert werden.
- 7.7. Statt Natriumascorbat-Lösung können etwa 150 mg Ascorbinsäure verwendet werden.
- 7.8. Statt Natriumsulfid-Lösung können etwa 50 mg EDTA verwendet werden.
- 7.9. Bei der Bestimmung des Gehalts an Vitamin A in Milchaustausch-Futtermitteln sind folgende Aspekte zu berücksichtigen:
  - bei der Verseifung (5.2): Aufgrund des Fettgehalts in der Probe ist gegebenenfalls die Menge der eingesetzten Kaliumhydroxidlösung (3.4) zu erhöhen;
  - bei der Extraktion (5.3): Aufgrund des Vorhandenseins von Emulsionen ist gegebenenfalls eine Anpassung des Wasser/Ethanol-Verhältnisses von 2:1 erforderlich.

Um festzustellen, ob die angewandte Analysemethode zuverlässige Ergebnisse für diese spezifische Matrix (Milchaustausch-Futtermittel) liefert, ist ein Wiederfindungstest an einer weiteren Probeneinwaage durchzuführen. Ist die Wiederfindungsrate kleiner als 80 %, muss das Analyseergebnis um die Wiederfindung korrigiert werden.

## 8. Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf 15 % des höheren Werts nicht überschreiten.

**▼B**9. **Ergebnisse eines Ringversuchs <sup>(1)</sup>**

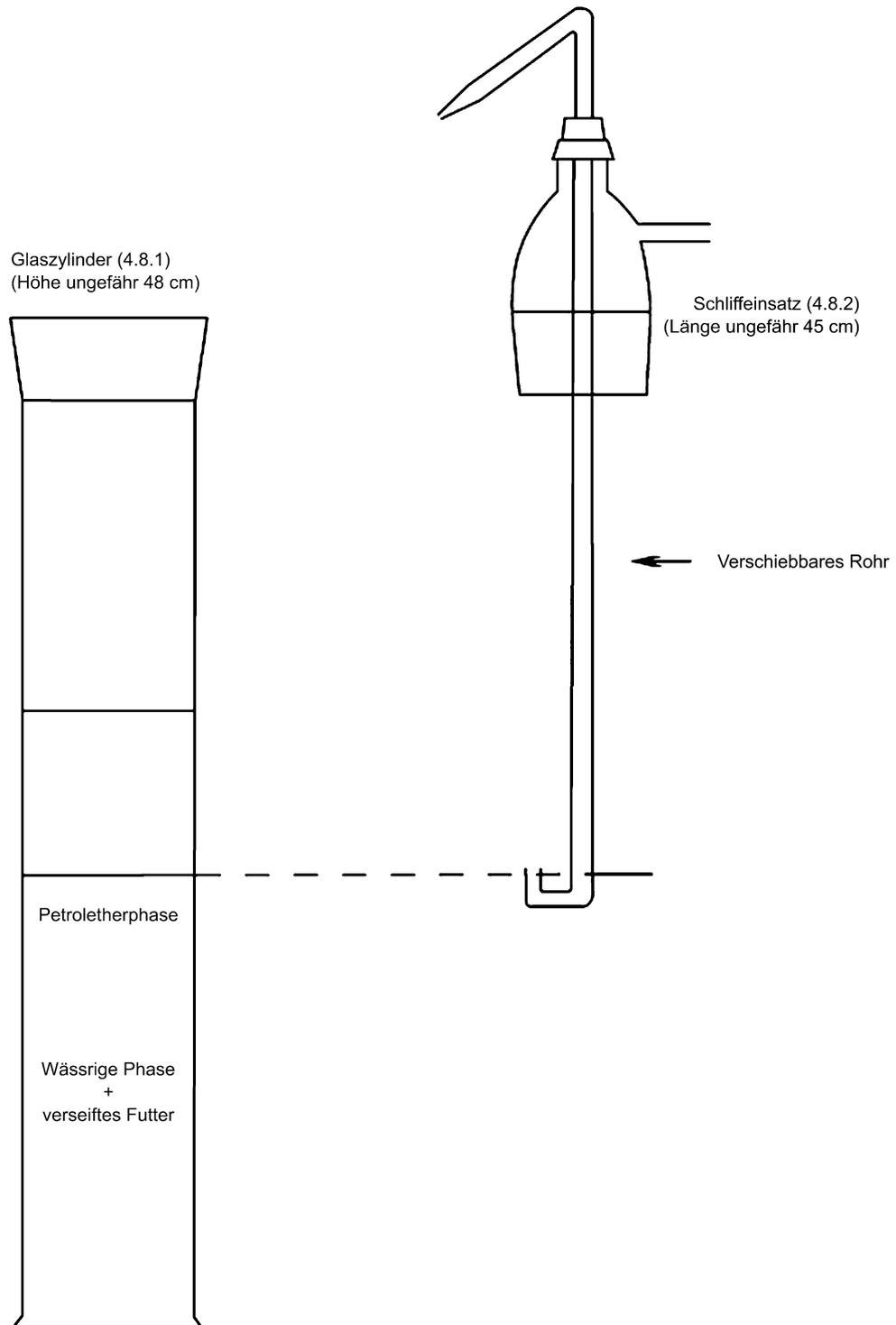
	Vormischun- gen	Fertigfutter- vormischun- gen	Mineralfutter	Einweißkon- zentrat	Ferkelauf- zuchtfutter
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Mittelwert [IE/ kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s <sub>r</sub> [IE/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IE/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
VK <sub>r</sub> [ %]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S <sub>R</sub> [IE/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IE/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
VK <sub>R</sub> [ %]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = Anzahl der Laboratorien  
 n = Anzahl der Einzelwerte  
 s<sub>r</sub> = Standardabweichung der Wiederholbarkeit  
 s<sub>R</sub> = Standardabweichung der Vergleichbarkeit  
 r = Wiederholbarkeit  
 R = Vergleichbarkeit  
 VK<sub>r</sub> = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit  
 VK<sub>R</sub> = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit

<sup>(1)</sup> Durchgeführt von der Fachgruppe Futtermittel des Verbands deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ B

Abbildung 1: Extraktionsapparat (4.8)



**▼ B****B. BESTIMMUNG DES VITAMIN-E-GEHALTS****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Vitamin-E-Gehalts von Futtermitteln und Vormischungen. Der Vitamin-E-Gehalt wird in mg DL- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat je kg angegeben. 1 mg DL- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat entspricht 0,91 mg DL- $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E).

Die Bestimmungsgrenze beträgt 2 mg Vitamin E/kg. Diese Grenze wird nur mit dem Fluoreszenzdetektor erreicht. Bei einem UV-Detektor beträgt die Bestimmungsgrenze 10 mg/kg.

**2. Prinzip**

Die Probe wird mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung hydrolysiert, und das Vitamin E wird mit Petrolether extrahiert. Das Lösungsmittel wird eingedampft; der Rückstand wird in Methanol gelöst und, falls notwendig, auf die erforderliche Konzentration verdünnt. Der Vitamin-E-Gehalt wird mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitsschromatografie (RP-HPLC) unter Verwendung eines UV- oder Fluoreszenzdetektors bestimmt.

**3. Reagenzien**

- 3.1. Ethanol,  $\sigma = 96 \%$ .
- 3.2. Petrolether, Siedeintervall 40 bis 60 °C.
- 3.3. Methanol.
- 3.4. Kaliumhydroxid-Lösung,  $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$ .
- 3.5. Natriumascorbat-Lösung,  $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$  (siehe Bemerkung 7.7).
- 3.6. Natriumsulfid,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$  ( $x = 7$  bis  $9$ )
- 3.6.1. Natriumsulfid-Lösung,  $c = 0,5 \text{ mol}/1$  in Glycerin,  $\beta = 120 \text{ g}/1$  (für  $x = 9$ ) (siehe Bemerkung 7.8).
- 3.7. Phenolphthalein-Lösung,  $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$  in Ethanol (3.1).
- 3.8. Mobile Phase für die HPLC: Mischung von Methanol (3.3) und Wasser, z. B. 980 + 20 (V+V). Das Mischungsverhältnis ist der jeweils verwendeten Säule anzupassen.
- 3.9. Stickstoff, sauerstofffrei.
- 3.10. DL- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat, reinst, mit zertifizierter Aktivität
- 3.10.1. DL- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat-Stammlösung: 100 mg DL- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat (3.10) auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben einwiegen. In Ethanol (3.1) lösen und mit demselben Lösungsmittel zur Marke auffüllen. 1 ml dieser Lösung enthält 1 mg DL- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat. (UV-Kontrolle siehe 5.6.1.3; Stabilisierung siehe Bemerkung 7.4).
- 3.11. DL- $\alpha$ -Tocopherol, reinst, mit zertifizierter Aktivität
- 3.11.1. DL- $\alpha$ -Tocopherol-Stammlösung: Von DL- $\alpha$ -Tocopherol (3.11) werden 100 mg auf 0,1 mg genau in einen 100-ml Messkolben eingewogen. In Ethanol (3.1) lösen und mit demselben Lösungsmittel zur Marke auffüllen. 1 ml dieser Lösung enthält 1 mg DL- $\alpha$ -Tocopherol. (UV-Kontrolle siehe 5.6.2.3; Stabilisierung siehe Bemerkung 7.4).
- 3.12. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (siehe Bemerkung 7.5).

**4. Geräte**

- 4.1. Rotationsfilmverdampfer.

**▼ B**

- 4.2. Braunglasgeräte
  - 4.2.1. Stehkolben oder Erlenmeyerkolben, 500 ml, mit Schliffhülse.
  - 4.2.2. Messkolben mit Schliffstopfen, enghalsig, 10, 25, 100 und 500 ml.
  - 4.2.3. Scheidetrichter, konische Form, 1 000 ml, mit Schliffstopfen.
  - 4.2.4. Spitzkolben, 250 ml, mit Schliffhülsen.
- 4.3. Allihn-Rückflusskühler, Mantellänge 300 mm, Kernschliff mit Adapter für Gaseinleitung.
- 4.4. Phasentrennungsfaltenfilter, Durchmesser 185 mm (z. B. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5. HPLC-Einrichtung mit Injektionssystem.
  - 4.5.1. HPLC-Trennsäule, 250 × 4 mm, C<sub>18</sub>, 5 oder 10 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule,
  - 4.5.2. UV- oder Fluoreszenzdetektor mit variabler Wellenlängeneinstellung.
- 4.6. Spektralfotometer mit Quarz-Küvetten von 10 mm Schichtdicke.
- 4.7. Wasserbad mit Magnetrührer.
- 4.8. Extraktionsapparat (Abbildung 1) bestehend aus:
  - 4.8.1. 1-l-Standzylinder mit Schliff und Schliffstopfen,
  - 4.8.2. Schliffeinsatz mit Seitenarm und einem in der Höhe verschiebbaren Rohr in der Mitte. Das verschiebbare Rohr muss ein U-förmiges unteres Ende und eine Düse am entgegengesetzten Ende haben, so dass die obere Flüssigkeitsphase aus dem Zylinder in den Scheidetrichter überführt werden kann.

**5. Verfahren**

*Anmerkung:* Vitamin E ist empfindlich gegenüber Licht (UV-Strahlung) und Oxidation. Daher muss unter Ausschluss von Licht (Verwendung von Braunglasgeräten oder von mit Aluminiumfolie umhüllten Glasgeräten) und Sauerstoff (Stickstoffspülung) gearbeitet werden. Während der Extraktion muss das Luftpolster über der Flüssigkeit durch Stickstoff ersetzt werden (zur Vermeidung von Überdruck Stopfen immer wieder lüften).

**5.1. Vorbereitung der Probe**

Die Probe wird unter Vermeidung von Erwärmung so fein vermahlen, dass sie ein Sieb mit 1 mm Maschenweite passieren kann. Die Zerkleinerung darf erst **unmittelbar** vor dem Einwiegen und Verseifen erfolgen, da sonst Vitamin-E-Verluste auftreten können.

**5.2. Verseifung**

Je nach Vitamin-E-Gehalt 2 bis 25 g der Probe auf 0,01 g genau in einen 500-ml-Steh- oder Erlenmeyerkolben (4.2.1) einwiegen. Nacheinander unter Schwenken 130 ml Ethanol (3.1), etwa 100 mg BHT (3.12), 2 ml Natriumascorbat-Lösung (3.5) und 2 ml Natriumsulfid-Lösung (3.6) zusetzen. Den Kolben mit dem Rückflusskühler (4.3) verbinden und in ein Wasserbad mit Magnetrührer (4.7) geben. Bis zum Sieden erhitzen und 5 min am Rückflusskühler kochen. Anschließend 25 ml Kaliumhydroxidlösung (3.4) durch den Rückflusskühler (4.3) zugeben, und unter ständigem Rühren und schwachem Stickstoffstrom 25 min weiterkochen. Den Kühler mit etwa 20 ml Wasser ausspülen und den Kolbeninhalt auf Zimmertemperatur abkühlen.

**▼ B**5.3. *Extraktion*

Die Verseifungslösung wird mit insgesamt 250 ml Wasser quantitativ in einen 1 000-ml-Scheidetrichter (4.2.3) oder in den Extraktionsapparat (4.8) überspült. Der Verseifungskolben wird mit 25 ml Ethanol (3.1) und anschließend mit 100 ml Petrolether (3.2) nachgewaschen, und die Spülflüssigkeiten werden ebenfalls in den Scheidetrichter oder den Extraktionsapparat überführt. Das Wasser/Ethanol-Verhältnis in den vereinigten Lösungen muss etwa 2:1 betragen. 2 min kräftig schütteln und dann 2 min absetzen lassen.

5.3.1. *Extraktion mithilfe eines Scheidetrichters (4.2.3)*

Nach Phasentrennung (siehe Bemerkung 7.3) wird die Petroletherphase in einen anderen Scheidetrichter (4.2.3) überführt. Diese Extraktion 2-mal mit je 100 ml Petrolether (3.2) und 2-mal mit je 50 ml Petrolether (3.2) wiederholen.

Die vereinigten Extrakte werden im Scheidetrichter unter leichtem Schwenken (Vermeidung von Emulsionsbildung) 2-mal mit jeweils 100 ml Wasser gespült und dann durch mehrmaliges Schütteln mit weiteren Portionen von 100 ml Wasser so oft gewaschen, bis das Waschwasser bei Zugabe von Phenolphthalein-Lösung (3.7) farblos bleibt (4-maliges Waschen ist normalerweise ausreichend). Zur Entfernung eventuell suspendierten Wassers wird der gewaschene Extrakt durch einen trockenen Phasentrennungsfaltenfilter (4.4) in einen 500-ml-Messkolben (4.2.2) filtriert. Scheidetrichter und Filter mit 50 ml Petrolether (3.2) nachwaschen, mit Petrolether (3.2) zur Marke auffüllen und gut schütteln.

5.3.2. *Extraktion mithilfe eines Extraktionsapparats (4.8)*

Nach Phasentrennung (siehe Bemerkung 7.3) wird der Stopfen des Standzylinders (4.8.1) durch den Schliffeinsatz (4.8.2) ersetzt und das verschiebbare Rohr so eingestellt, dass sich das U-förmige untere Ende gerade über dem Niveau der Grenzfläche befindet. Durch Druckausübung von einer am Seitenarm angebrachten Stickstoffleitung wird die obere Petroletherphase in einen 1 000-ml-Scheidetrichter (4.2.3) überführt. 100 ml Petrolether (3.2) werden in den Standzylinder gegeben, der mit einem Stopfen verschlossen und gründlich geschüttelt wird. Nach der Phasentrennung wird die obere Phase wie zuvor in den Scheidetrichter überführt. Diese Extraktion wird noch 1-mal mit 100 ml Petrolether (3.2) und 2-mal mit je 50 ml Petrolether (3.2) wiederholt, und die Petroletherphasen werden in den Scheidetrichter überführt.

Die vereinigten Petroletherextrakte, wie unter 5.3.1 erläutert, waschen und wie dort beschrieben weiterverfahren.

5.4. *Vorbereitung der Probenlösung für die HPLC*

Ein aliquoter Teil der Petrolether-Lösung (gemäß 5.3.1 oder 5.3.2) wird in einen 250-ml-Spitzkolben (4.2.4) pipettiert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck und bei einer Badtemperatur von höchstens 40 °C am Rotationsverdampfer (4.1) fast bis zur Trockne eingedampft. Danach wird unter Stickstoff (3.9) Druckausgleich geschaffen und der Kolben vom Rotationsverdampfer abgenommen. Das restliche Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom (3.9) abgeblasen, und der Rückstand wird sofort in einer definierten Menge (10 bis 100 ml) Methanol (3.3) aufgenommen (die Konzentration von DL- $\alpha$ -Tocopherol muss etwa 5 bis 30  $\mu\text{g/ml}$  betragen).

5.5. *Bestimmung durch HPLC*

Die Abtrennung von Vitamin E erfolgt mithilfe einer Umkehrphasen- $\text{C}_{18}$ -Säule (4.5.1), und die Konzentration wird mithilfe eines Fluoreszenzdetektors (Anregung: 295 nm, Emission: 330 nm) oder eines UV-Detektors (292 nm) (4.5.2) gemessen.

**▼B**

Hierzu wird ein aliquoter Teil (z. B. 20 µl) der nach 5.4 erhaltenen methanolischen Lösung auf die Trennsäule gegeben und mit der mobilen Phase (3.8) eluiert. Die mittlere Peakhöhe (-fläche) von mehreren Einspritzungen derselben Probenlösung wird ermittelt. In gleicher Weise werden auch die mittleren Peakhöhen (-flächen) von mehreren Einspritzungen der Kalibrierlösungen (5.6.2) bestimmt.

**HPLC-Parameter**

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

HPLC-Trennsäule (4.5.1):	250 × 4 mm, C <sub>18</sub> , 5 oder 10 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule
Mobile Phase (3.8):	Mischung von Methanol (3.3) und Wasser z. B. 980 + 20 (V+V)
Durchflussrate:	1 bis 2 ml/min
Detektor (4.5.2)	Fluoreszenzdetektor (Anregung: 295 nm; Emission 330 nm) oder UV-Detektor (292 nm)

5.6. *Kalibrierung (DL-α-Tocopherol-Acetat oder DL-α-Tocopherol)*5.6.1. *DL-α-Tocopherol-Acetat-Standard*5.6.1.1. *Herstellen der Gebrauchsstandardlösung*

Von der DL-α-Tocopherol-Acetat-Stammlösung (3.10.1) werden 25 ml in einen 500-ml-Steh- oder Erlenmeyerkolben (4.2.1) pipettiert und, wie unter 5.2 beschrieben, hydrolysiert. Anschließend mit Petrolether (3.2) gemäß 5.3 extrahieren und mit Petrolether auf 500 ml auffüllen. Von diesem Extrakt werden 25 ml am Rotationsverdampfer (siehe 5.4) fast bis zur Trockne eingedampft. Das verbleibende Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom (3.9) abgeblasen, und der Rückstand wird in 25,0 ml Methanol (3.3) aufgenommen. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 45,5 µg DL-α-Tocopherol je ml; das entspricht 50 µg DL-α-Tocopherol-Acetat je ml. Die Gebrauchsstandardlösung muss vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

5.6.1.2. *Herstellen der Kalibrierlösungen und Erstellung der Kalibrationskurve*

Von der Gebrauchsstandardlösung werden 1,0 ml, 2,0 ml, 4,0 ml bzw. 10,0 ml in jeweils einen 20-ml-Messkolben pipettiert; es wird mit Methanol (3.3) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Der Sollgehalt dieser Lösungen beträgt 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml, 10,0 µg/ml bzw. 25,0 µg/ml DL-α-Tocopherol-Acetat, d. h. 2,28 µg/ml, 4,55 µg/ml, 9,10 µg/ml bzw. 22,8 µg/ml DL-α-Tocopherol.

Von jeder Kalibrierlösung werden mehrmals 20 µl eingespritzt, und die mittleren Peakhöhen (-flächen) werden gemessen. Anhand der so ermittelten mittleren Peakhöhen (-flächen) wird eine Kalibrationskurve erstellt.

5.6.1.3. *UV-Kontrolle der DL-α-Tocopherol-Acetat-Stammlösung (3.10.1)*

Von der DL-α-Tocopherol-Acetat-Stammlösung (3.10.1) werden 5,0 ml mit Ethanol auf 25,0 ml aufgefüllt. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen Ethanol (3.1) im Spektrofotometer (4.6) zwischen 250 und 320 nm gemessen.

Das Extinktionsmaximum muss bei 284 nm liegen:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ bei } 284 \text{ nm in Ethanol}$$

Bei der vorliegenden Verdünnung muss eine Extinktion von 0,84 bis 0,88 erzielt werden.

**▼ B**5.6.2. DL- $\alpha$ -Tocopherol-Standard5.6.2.1. *Herstellen der Gebrauchsstandardlösung*

Von der DL- $\alpha$ -Tocopherol-Stammlösung (3.11.1) werden 2 ml in einen 50-ml-Messkolben pipettiert und in Methanol (3.3) gelöst; es wird mit Methanol zur Marke aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 40  $\mu\text{g}$  DL- $\alpha$ -Tocopherol je ml; das entspricht 44,0  $\mu\text{g}$  DL- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat je ml. Die Gebrauchsstandardlösung muss vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

5.6.2.2. *Herstellen der Kalibrierlösungen und Erstellung der Kalibrationskurve*

Von der Gebrauchsstandardlösung werden 1,0 ml, 2,0 ml, 4,0 ml bzw. 10,0 ml in jeweils einen 20-ml-Messkolben pipettiert; es wird mit Methanol (3.3) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Der Sollgehalt dieser Lösungen beträgt 2,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 8,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw. 20,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DL- $\alpha$ -Tocopherol, d. h. 2,20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4,40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 8,79  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw. 22,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DL- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat.

Von jeder Kalibrierlösung werden mehrmals 20  $\mu\text{l}$  eingespritzt, und die mittleren Peakhöhen (-flächen) werden gemessen. Anhand der so ermittelten mittleren Peakhöhen (-flächen) wird eine Kalibrationskurve erstellt.

5.6.2.3. *UV-Kontrolle der DL- $\alpha$ -Tocopherol-Stammlösung (3.11.1)*

Von der DL- $\alpha$ -Tocopherol-Stammlösung (3.11.1) werden 2,0 ml mit Ethanol auf 25,0 ml aufgefüllt; das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen Ethanol (3.1) im Spektrofotometer (4.6) zwischen 250 und 320 nm gemessen. Das Extinktionsmaximum muss bei 292 nm liegen:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ bei } 292 \text{ nm in Ethanol}$$

Bei der vorliegenden Verdünnung muss eine Extinktion von 0,6 erzielt werden.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Aus der mittleren Höhe (Fläche) der Vitamin-E-Peaks der Probenlösung wird anhand der Kalibrationskurve (5.6.1.2 oder 5.6.2.2) die Konzentration der Probenlösung in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (berechnet als  $\alpha$ -Tocopherol-Acetat) bestimmt.

Der Vitamin-E-Gehalt  $w$  (in  $\text{mg}/\text{kg}$ ) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} \text{ [mg/kg]}$$

wobei:

$c$  = Vitamin-E-Konzentration (als  $\alpha$ -Tocopherol-Acetat) der Probenlösung (5.4) in  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,

$V_1$  = Volumen der Probenlösung (5.4) in ml,

$V_2$  = Volumen des unter 5.4 entnommenen aliquoten Teils in ml,

$m$  = Probeneinwaage in g.

7. **Bemerkungen**

7.1. Bei Proben mit niedriger Vitamin-E-Konzentration kann es zweckmäßig sein, die Petroletherextrakte von 2 Verseifungsansätzen (Einwaage 25 g) zu einer Probenlösung für die HPLC-Bestimmung zu vereinigen.

7.2. Die Einwaage für die Analyse darf höchstens 2 g Fett enthalten.

7.3. Bei schlechter Phasentrennung können etwa 10 ml Ethanol (3.1) zur Zerstörung der Emulsion zugegeben werden.

**▼ B**

- 7.4. Nach der spektralfotometrischen Vermessung der DL- $\alpha$ -Tocopherol-Acetat- oder der DL- $\alpha$ -Tocopherol-Lösung nach 5.6.1.3 bzw. 5.6.2.3 empfiehlt es sich, der Lösung (3.10.1 bzw. 3.10.2) etwa 10 mg BHT (3.12) zuzusetzen und die Lösung im Kühlschrank aufzubewahren (Haltbarkeit höchstens 4 Wochen).
- 7.5. Statt BHT kann Hydrochinon verwendet werden.
- 7.6. Bei Verwendung einer Normalphasensäule ist die Trennung von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol möglich.
- 7.7. Statt Natriumascorbat-Lösung können etwa 150 mg Ascorbinsäure verwendet werden.
- 7.8. Statt Natriumsulfid-Lösung können etwa 50 mg EDTA verwendet werden.
- 7.9. Vitamin-E-Acetat hydrolysiert unter alkalischen Bedingungen sehr schnell und ist deshalb sehr oxidationsanfällig, insbesondere in Gegenwart von Spurenelementen wie Eisen oder Kupfer. Bei der Bestimmung des Vitamin-E-Gehalts in Vormischungen, bei denen ein Gehalt von 5 000 mg/kg überschritten wird, könnte es zu einem Abbau von Vitamin E kommen. Deshalb wird zur Bestätigung eine HPLC-Methode mit einem enzymatischen Aufschluss der Vitamin-E-Formel ohne einen alkalischen Verseifungsschritt empfohlen.
8. **Wiederholbarkeit**  
Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf 15 % des höheren Werts nicht überschreiten.
9. **Ergebnisse eines Ringversuchs<sup>(1)</sup>**

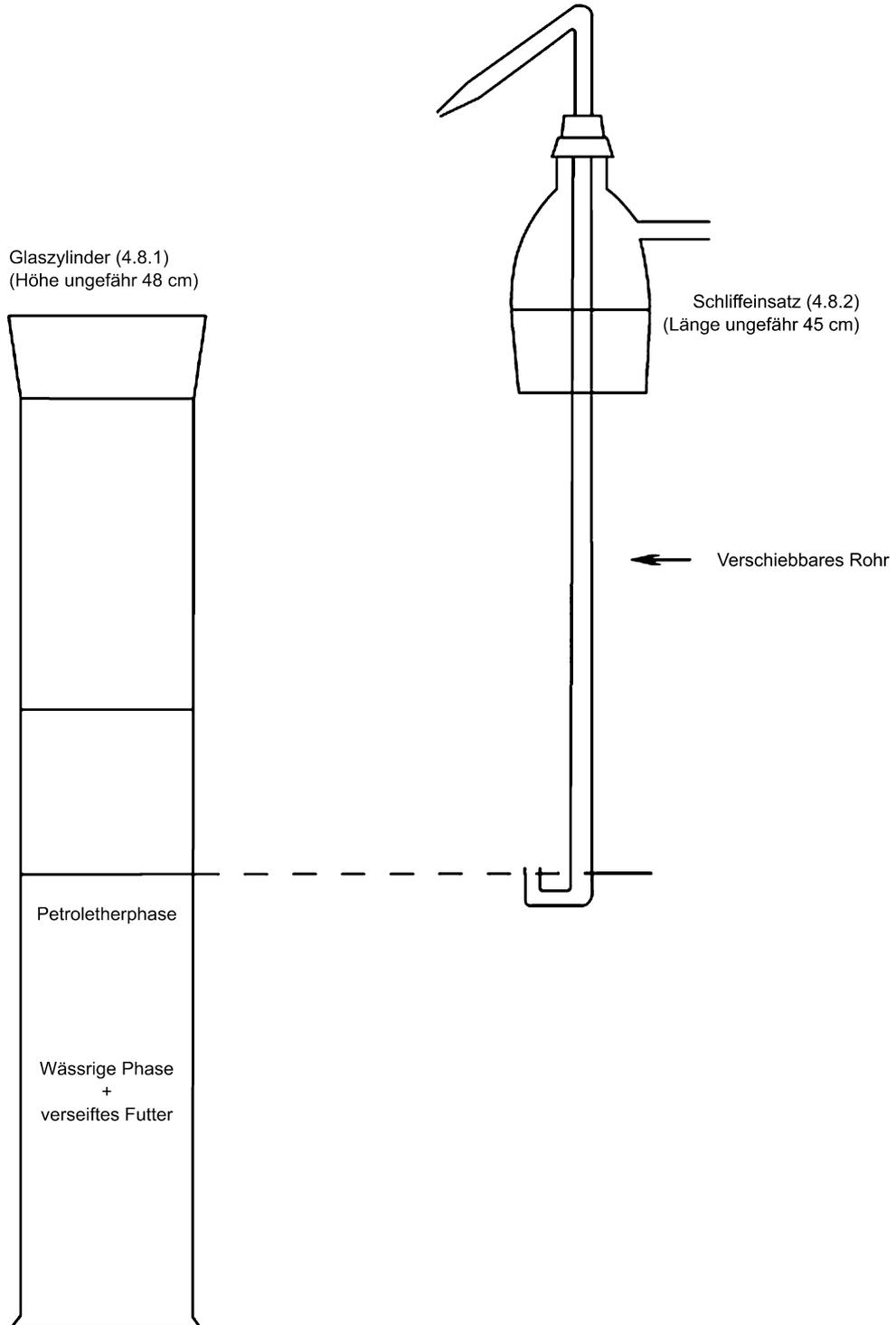
	Vormischungen	Fertigfutter-vormischungen	Mineralfutter	Eiweißkonzentrat	Ferkelaufzuchtfutter
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Mittelwert [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
$s_r$ [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
VK <sub>r</sub> [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
S <sub>R</sub> mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
VK <sub>R</sub> [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

- L = Anzahl der Laboratorien  
n = Anzahl der Einzelwerte  
 $s_r$  = Standardabweichung der Wiederholbarkeit  
 $s_R$  = Standardabweichung der Vergleichbarkeit  
r = Wiederholbarkeit  
R = Vergleichbarkeit  
VK<sub>r</sub> = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit  
VK<sub>R</sub> = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit

<sup>(1)</sup> Durchgeführt von der Fachgruppe Futtermittel des Verbands deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ B

Abbildung 1: Extraktionsapparat (4.8)



**▼B****C. BESTIMMUNG DES GEHALTS AN DEN SPURENELEMENTEN EISEN, KUPFER, MANGAN UND ZINK****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an den Spurenelementen Eisen, Kupfer, Mangan und Zink in Futtermitteln. Die Bestimmungsgrenzen liegen bei:

- Eisen (Fe): 20 mg/kg,
- Kupfer (Cu): 10 mg/kg,
- Mangan (Mn): 20 mg/kg,
- Zink (Zn): 20 mg/kg.

**2. Prinzip**

Die Probe wird nach Zerstörung eventuell vorhandener organischer Substanz in Salzsäure gelöst. Die Elemente Eisen, Kupfer, Mangan und Zink werden nach entsprechender Verdünnung der Analysenlösung mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt.

**3. Reagenzien***Vorbemerkungen*

Das zur Herstellung der Reagenzien und Analysenlösungen verwendete Wasser muss „frei“ von den zu bestimmenden Kationen sein, d. h., das Wasser muss entweder in einer Borsilikatglas- oder Quarzapparatur 2-fach destilliert oder durch doppelten Ionenaustausch gereinigt worden sein.

Die zur Analyse verwendeten Reagenzien müssen mindestens von analysenreiner Qualität sein. Die Abwesenheit des zu bestimmenden Elements wird mittels eines Blindversuchs kontrolliert. Falls erforderlich, sind die Reagenzien einer zusätzlichen Reinigung zu unterziehen.

Anstelle der nachfolgend beschriebenen Standardlösungen können auch handelsübliche Standardlösungen verwendet werden, deren Reinheit garantiert und vor der Verwendung kontrolliert wurde.

- 3.1. Salzsäure (D: 1,19 g/ml).
- 3.2. Salzsäure (6 mol/l).
- 3.3. Salzsäure (0,5 mol/l).
- 3.4. Fluorwasserstoffsäure (Volumenkonzentration = 38 bis 40 %); Eisengehalt: weniger als 1 mg/l; Glührückstand (als Sulfat): weniger als 10 mg/l.
- 3.5. Schwefelsäure (D: 1,84 g/ml).
- 3.6. Wasserstoffperoxid, ca. 100 Volumina Sauerstoff (Massenanteil = 30 %).
- 3.7. Eisen-Standardlösung (1 000 µg Fe/ml), wie folgt zubereitet, oder eine gleichwertige handelsübliche Lösung: 1 g Eisendraht wird in 200 ml 6 mol/l Salzsäure (3.2) gelöst. Es werden 16 ml Wasserstoffperoxid (3.6) zugegeben; dann wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt:
  - 3.7.1. Eisen-Gebrauchsstandardlösung (100 µg Fe/ml): Die Standardlösung (3.7) wird im Verhältnis 1:9 mit Wasser verdünnt.
- 3.8. Kupfer-Standardlösung (1 000 µg Cu/ml), wie folgt zubereitet, oder eine gleichwertige handelsübliche Lösung:
  - In 25 ml 6 mol/l Salzsäure (3.2) wird 1 g Kupfer in Pulverform gelöst. Es werden 5 ml Wasserstoffperoxid (3.6) zugegeben, und dann wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.
- 3.8.1. Kupfer-Gebrauchsstandardlösung (10 µg Cu/ml): Die Standardlösung (3.8) wird im Verhältnis 1:9 mit Wasser verdünnt; anschließend wird die so entstandene Lösung wiederum im Verhältnis 1:9 mit Wasser verdünnt.

**▼ B**

- 3.9. Mangan-Standardlösung (1 000 µg Mn/ml), wie folgt zubereitet, oder eine gleichwertige handelsübliche Lösung:
- In 25 ml 6 mol/l Salzsäure (3.2) wird 1 g Mangan in Pulverform gelöst; dann wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.
- 3.9.1. Mangan-Gebrauchsstandardlösung (10 µg Mn/ml): Die Standardlösung (3.9) wird im Verhältnis 1:9 mit Wasser verdünnt; anschließend wird die so entstandene Lösung wiederum im Verhältnis 1:9 mit Wasser verdünnt.
- 3.10. Zink-Standardlösung (1 000 µg Zn/ml), wie folgt zubereitet, oder eine gleichwertige handelsübliche Lösung:
- In 25 ml 6 mol/l Salzsäure (3.2) wird 1 g Zink in Streifen- oder Plattenform gelöst; dann wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.
- 3.10.1. Zink-Gebrauchsstandardlösung (10 µg Zn/ml): Die Standardlösung (3.10) wird im Verhältnis 1:9 mit Wasser verdünnt; anschließend wird die so entstandene Lösung wiederum im Verhältnis 1:9 mit Wasser verdünnt.
- 3.11. Lanthanchloridlösung: In 150 ml Wasser wird 12 g Lanthanoxid gelöst und 100 ml 6 mol/l Salzsäure (3.2) zugegeben. Dann wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

**4. Geräte**

- 4.1. Muffelofen mit Regelvorrichtung und gegebenenfalls mit Temperaturanzeige.
- 4.2. Glasgeräte müssen aus resistentem Borsilikatglas sein. Es wird empfohlen, Glasgeräte zu benutzen, die ausschließlich der Bestimmung des Gehalts an Spurenelementen vorbehalten bleiben.
- 4.3. Atomabsorptions-Spektrofotometer; das Gerät muss innerhalb des vorgesehenen Messbereichs hinsichtlich seiner Empfindlichkeit und Genauigkeit den Anforderungen der jeweiligen Methode genügen.

**5. Verfahren <sup>(1)</sup>**

- 5.1. *Proben mit organischen Bestandteilen*
- 5.1.1. *Veraschung und Herstellung der Analysenlösung <sup>(2)</sup>*
- 5.1.1.1. Von der Probe werden 5 bis 10 g (auf 0,2 mg genau abgewogen) in eine Quarz- oder Platinschale gegeben (siehe Anmerkung b) und im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet; dann wird die Schale in den kalten Muffelofen (4.1) verbracht. Der Ofen wird geschlossen (siehe Anmerkung c) und die Temperatur innerhalb von ca. 90 min langsam auf 450 bis 475 °C erhöht. Diese Temperatur wird 4 bis 16 h (z. B. über Nacht) aufrechterhalten, um Kohleteilchen zu entfernen; dann wird der Ofen geöffnet und abkühlen gelassen (siehe Anmerkung d).

<sup>(1)</sup> Andere Aufschlussmethoden können verwendet werden, sofern erwiesen ist, dass sie zu vergleichbaren Ergebnissen führen (z. B. Mikrowellen-Druckaufschluss).

<sup>(2)</sup> Grünfütter (frisch oder getrocknet) kann größere Mengen pflanzlicher Kieselsäure enthalten, welche Spurenelemente binden kann und daher entfernt werden muss. Bei Proben dieser Futtermittel muss also nach folgendem geänderten Verfahren vorgegangen werden: Das Verfahren 5.1.1.1 wird bis zur Filtration durchgeführt. Das den unlöslichen Rückstand enthaltende Filterpapier wird 2-mal mit kochendem Wasser ausgewaschen, in eine Quarz- oder Platinschale gegeben und im Muffelofen (4.1) bei weniger als 550 °C bis zur vollständigen Elimination aller Kohlepartikel verascht. Nach dem Abkühlen werden einige Tropfen Wasser und danach 10-15 ml Fluorwasserstoffsäure (3.4) zugegeben und bei ca. 150 °C zur Trockne eingedampft. Verbleibt im Rückstand noch Kieselsäure, so wird diese erneut in einigen ml Fluorwasserstoffsäure (3.4) gelöst und anschließend zur Trockne eingedampft. Dann werden 5 Tropfen Schwefelsäure (3.5) zugesetzt und so lange erhitzt, bis keine weißen Dämpfe mehr auftreten. Nach Zugabe von 5 ml 6 mol/l Salzsäure (3.2) und etwa 30 ml Wasser wird erhitzt und die Lösung in den 250-ml-Messkolben filtriert. Letzterer wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt (HCl-Konzentration etwa 0,5 mol/l). Anschließend wird wie ab 5.1.2 beschrieben weiterverfahren.

**▼ B**

Die Asche wird mit Wasser angefeuchtet und in ein 250-ml-Becherglas gegeben. Die Schale wird mit insgesamt etwa 5 ml Salzsäure (3.1) ausgespült, die anschließend langsam und vorsichtig (da es aufgrund von CO<sub>2</sub>-Bildung eventuell zu einer heftigen Reaktion kommen kann) in das Becherglas gegeben wird. Unter Schütteln wird Salzsäure (3.1) tropfenweise zugegeben, bis die Schaumbildung aufhört. Die Salzsäure wird unter gelegentlichem Umrühren mit einem Glasstab bis zur Trockne abgedampft.

Dem Rückstand werden 15 ml 6 mol/l Salzsäure (3.2) und anschließend etwa 120 ml Wasser zugefügt. Umgerührt wird mit dem Glasstab, der in dem Becherglas zu belassen ist. Letzteres wird mit einem Uhrglas abgedeckt. Die Flüssigkeit wird langsam zum Sieden gebracht und so lange im Sieden gehalten, bis die Asche vollständig gelöst ist. Dann wird durch ein aschefreies Filterpapier filtriert und das Filtrat in einem 250-ml-Messkolben aufgefangen. Das Becherglas und der Filter werden mit 5 ml heißer 6 mol/l Salzsäure (3.2) und 2-mal mit kochendem Wasser ausgewaschen. Anschließend wird der Messkolben mit Wasser zur Marke aufgefüllt (HCl-Konzentration etwa 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2. Sollte der Filterrückstand schwarz aussehen (Kohlenstoff), so wird er im Trockenschrank abermals bei 450 bis 475 °C verascht. Diese Veraschung, die nur wenige Stunden erfordert (etwa 3 bis 5 h) ist abgeschlossen, wenn die Asche weiß oder nahezu weiß aussieht. Der Rückstand wird mit etwa 2 ml Salzsäure (3.1) aufgenommen, zur Trockne eingedampft und mit 5 ml 6 mol/l Salzsäure (3.2) versetzt. Nach dem Erwärmen wird die Lösung in den Messkolben filtriert, und Letzterer mit Wasser zur Marke aufgefüllt (HCl-Konzentration etwa 0,5 mol/l).

*Anmerkungen:*

- a) Bei der Bestimmung des Gehalts an Spurenelementen ist unbedingt auf die Gefahr von Verunreinigungen, insbesondere durch Zink, Kupfer und Eisen zu achten. Deshalb müssen die bei der Probenvorbereitung benutzten Geräte frei von diesen Metallen sein.

Um die Gefahr von Verunreinigungen einzuschränken, ist in staubfreier Luft, mit absolut reinen Geräten und sorgfältig gewaschenen Glasgeräten zu arbeiten. Die Zinkbestimmung ist für Verunreinigungen durch Glasgeräte, Reagenzien, Staub usw. besonders anfällig.

- b) Die Einwaage wird nach dem etwa zu erwartenden Spurenelementgehalt des Futtermittels unter Berücksichtigung der Empfindlichkeit des verwendeten Spektrofotometers berechnet. Bei Futtermitteln, die einen niedrigen Gehalt an Spurenelementen aufweisen, kann es erforderlich sein, eine Probe von 10 bis 20 g einzuwägen und das Volumen der Analysenlösung auf 100 ml zu begrenzen.
- c) Die Veraschung muss in einem geschlossenen Muffelofen ohne Einblasen von Luft oder Sauerstoff erfolgen.
- d) Die vom Pyrometer angezeigte Temperatur darf 475 °C nicht überschreiten.

## 5.1.2. Spektrofotometrische Bestimmung

## 5.1.2.1. Herstellen der Kalibrierlösungen

Aus den Gebrauchsstandardlösungen 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 und 3.10.1 werden für jedes der zu bestimmenden Spurenelemente eine Reihe von Kalibrierlösungen hergestellt. Jede dieser Kalibrierlösungen hat eine HCl-Konzentration von etwa 0,5 mol/l und (im Falle von Eisen, Mangan und Zink) einen Lanthanchlorid-Gehalt, der einer Massenkonzentration von 0,1 % La entspricht.

Die gewählten Spurenelementkonzentrationen müssen im Empfindlichkeitsbereich des verwendeten Spektrofotometers liegen. Die nachfolgenden Tabellen zeigen Beispiele für die Zusammensetzung typischer Reihen von Kalibrierlösungen. Je nach Typ und Empfindlichkeit des verwendeten Spektrofotometers kann es jedoch erforderlich sein, für die Kalibrierlösungen eine andere Konzentration zu wählen.

**▼B****Eisen**

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml Gebrauchsstandardlösung (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

10 ml Lanthanchloridlösung (3.11) zugeben und mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

**Kupfer**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml Gebrauchsstandardlösung (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

**Mangan**

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml Gebrauchsstandardlösung (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

10 ml Lanthanchloridlösung (3.11) zugeben und mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

**Zink**

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml Gebrauchsstandardlösung (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

10 ml Lanthanchloridlösung (3.11) zugeben und mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

**5.1.2.2. Herstellen der Analysenlösung**

Für die Bestimmung des Kupfergehalts kann die nach 5.1.1 hergestellte Analysenlösung in der Regel direkt verwendet werden. Gegebenenfalls wird ein aliquoter Teil dieser Analysenlösung in einen 100-ml-Messkolben pipettiert und mit 0,5 mol/l Salzsäure (3.3) zur Marke aufgefüllt, um ihre Konzentration in den Bereich der Kalibrierlösungen zu bringen.

Für die Bestimmung des Gehalts an Eisen, Mangan und Zink wird ein aliquoter Teil der nach 5.1.1 hergestellten Lösung in einen 100-ml-Messkolben pipettiert. Es werden 10 ml Lanthanchloridlösung (3.11) zugegeben und mit 0,5 mol/l Salzsäure (3.3) zur Marke aufgefüllt (siehe Bemerkung 8).

**5.1.2.3. Blindversuch**

Es wird ein Blindversuch ausgeführt, der alle Verfahrensschritte umfassen muss, nur dass das Probematerial selbst weggelassen wird. Die Kalibrierlösung „0“ ersetzt nicht den Blindversuch.

**5.1.2.4. Messung der Atomabsorption**

Die Atomabsorption der Kalibrierlösungen und der Analysenlösungen ist mit oxydierender Luft-Azetylen-Flamme bei folgenden Wellenlängen zu messen:

Fe: 248,3 nm,

Cu: 324,8 nm,

**▼ B**

Mn: 279,5 nm,

Zn: 213,8 nm.

Jede Messung ist 4-mal auszuführen.

5.2. *Mineralfutter*

Enthält die Probe keine organischen Substanzen, so erübrigt sich eine vorherige Veraschung. In diesem Fall wird dann ab 5.1.1.1 zweiter Absatz weiterverfahren. Ein Abrauchen mit Fluorwasserstoffsäure kann entfallen.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Die Spurenelementkonzentration in der Analysenlösung wird mithilfe einer Kalibrationskurve berechnet und das Ergebnis in mg Spurenelement/kg der Probe (ppm) ausgedrückt.

7. **Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen eines Analytikers bei ein und derselben Probe darf die folgenden Werte nicht überschreiten:

- 5 mg/kg absolut für Spurenelementgehalte bis 50 mg/kg,
- 10 % des höheren Werts für Spurenelementgehalte von 50 bis 100 mg/kg,
- 10 mg/kg absolut für Spurenelementgehalte von 100 bis 200 mg/kg,
- 5 % des höheren Werts für Spurenelementgehalte von mehr als 200 mg/kg.

8. **Bemerkung**

Das Vorhandensein von größeren Phosphatmengen kann die Bestimmung des Gehalts an Eisen, Mangan und Zink beeinträchtigen. Diese Interferenzen sind durch die Zugabe von Lanthanchloridlösung (3.11) zu korrigieren. Weist die Probe jedoch das Gewichtsverhältnis Ca + Mg/P > 2 auf, kann auf die Zugabe von Lanthanchloridlösung (3.11) zu der Analysenlösung und den Kalibrierlösungen verzichtet werden.

D. BESTIMMUNG DES HALOFUGINONGEHALTS

*DL-trans-7-Brom-6-chlor-3-(3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl)-4(3H)-chinazolinon-hydrobromid*

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Halofuginongehalts von Futtermitteln. Die Bestimmungsgrenze beträgt 1 mg/kg.

2. **Prinzip**

Nach der Behandlung mit heißem Wasser wird Halofuginon als freie Base mit Ethylacetat extrahiert und anschließend durch Ausschütteln mit Salzsäure in das Hydrochlorid überführt. Der Extrakt wird durch Ionenaustauschchromatografie gereinigt. Der Halofuginongehalt wird mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) unter Verwendung eines UV-Detektors bestimmt.

3. **Reagenzien**

- 3.1. Acetonitril, HPLC-Qualität.
- 3.2. Amberlite XAD-2-Harz.
- 3.3. Ammoniumacetat.
- 3.4. Ethylacetat.
- 3.5. Essigsäure (Eisessig).

**▼ B**

- 3.6. Halofuginon-Standardsubstanz: DL-*trans*-7-Brom-6-chlor-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]-4(3H)-chinazolinon-hydrobromid, E 764
- 3.6.1. Halofuginon-Standard-Stammlösung, 100 µg/ml
- Von Halofuginon (3.6) werden 50 mg auf 0,1 mg genau in einen 500-ml-Messkolben eingewogen und in Ammoniumacetat-Pufferlösung (3.18) gelöst. Es wird mit der Pufferlösung zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese Lösung ist 3 Wochen haltbar, wenn sie im Dunkeln bei 5 °C aufbewahrt wird.
- 3.6.2. Kalibrierlösungen
- Von der Standard-Stammlösung (3.6.1) werden 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 bzw. 6,0 ml jeweils in einen 100-ml-Messkolben überführt. Es wird mit der mobilen Phase (3.21) zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Diese Lösungen enthalten Halofuginon in Konzentrationen von 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 bzw. 6,0 µg/ml. Die Lösungen müssen vor Gebrauch frisch hergestellt werden;
- 3.7. Salzsäure ( $\rho_{20} = \text{ca. } 1,16 \text{ g/ml}$ ).
- 3.8. Methanol.
- 3.9. Silbernitrat.
- 3.10. Natriumascorbat.
- 3.11. Natriumcarbonat (Soda).
- 3.12. Natriumchlorid.
- 3.13. EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz).
- 3.14. Wasser, HPLC-Qualität.
- 3.15. Natriumcarbonatlösung,  $c = 10 \text{ g/100 ml}$ .
- 3.16. Mit Natriumchlorid gesättigte Natriumcarbonatlösung,  $c = 5 \text{ g/100 ml}$
- 50 g Natriumcarbonat (3.11) werden in Wasser gelöst und auf 1 l verdünnt; dann wird Natriumchlorid (3.12) zugegeben, bis die Lösung gesättigt ist.
- 3.17. Salzsäure, ca. 0,1 mol/l
- 10 ml Salzsäure (3.7) werden mit Wasser auf 1 l verdünnt.
- 3.18. Ammoniumacetat-Pufferlösung, ca. 0,25 mol/l
- 19,3 g Ammoniumacetat (3.3) und 30 ml Essigsäure (3.5) werden in Wasser (3.14) gelöst und auf 1 l verdünnt.
- 3.19. Vorbereitung des Amberlite XAD-2-Harzes
- Eine ausreichende Menge Amberlite (3.2) wird mit Wasser chloridfrei gewaschen. Die Prüfung der Waschflüssigkeit erfolgt mit Silbernitratlösung (3.20). Danach wird das Harz mit 50 ml Methanol (3.8) gewaschen. Das Methanol wird verworfen und das Harz in frischem Methanol aufbewahrt.
- 3.20. Silbernitratlösung, ca. 0,1 mol/l
- 0,17 g Silbernitrat (3.9) werden in 10 ml Wasser gelöst.
- 3.21. Mobile Phase für die HPLC:
- 500 ml Acetonitril (3.1) werden mit 300 ml Ammoniumacetat-Pufferlösung (3.18) und 1 200 ml Wasser (3.14) gemischt. Der pH-Wert wird mit Essigsäure (3.5) auf 4,3 eingestellt. Die Lösung wird durch einen 0,22-µm-Filter (4.8) filtriert und entgast (z. B. durch 10-minütige Ultraschallbehandlung). Diese Lösung ist 1 Monat lang haltbar, wenn sie in einem verschlossenen Gefäß im Dunkeln aufbewahrt wird.

**▼ B****4. Geräte**

- 4.1. Ultraschallbad.
- 4.2. Rotationsverdampfer.
- 4.3. Zentrifuge.
- 4.4. HPLC-Einrichtung mit UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung oder Diodenarray-Detektor
  - 4.4.1. HPLC-Trennsäule, 300 × 4 mm, C<sub>18</sub>, 10 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule.
- 4.5. Glassäule (300 × 10 mm) mit gesintertem Glasfilter und Absperrhahn.
- 4.6. Glasfaserfilter, 150 mm Durchmesser.
- 4.7. Membranfilter, 0,45 µm Porengröße.
- 4.8. Membranfilter, 0,22 µm Porengröße.

**5. Verfahren**

*Anmerkung:* Halofuginon ist als freie Base in Alkali- und Ethylacetat-Lösungen instabil. Es darf höchstens 30 min in Ethylacetat bleiben.

5.1. *Allgemeines*

- 5.1.1. Zur Prüfung, dass weder Halofuginon noch Störsubstanzen vorhanden sind, ist eine Blindprobe zu untersuchen.
- 5.1.2. Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe untersucht wird, die mit Halofuginon angereichert wurde. Die zugesetzte Menge an Halofuginon sollte der in der Probe vorhandenen Menge entsprechen. Zur Anreicherung auf einen Gehalt von 3 mg/kg werden 300 µl der Standard-Stammllösung (3.6.1) zu 10 g der Blindprobe gegeben. Es wird gemischt und 10 min gewartet, bevor mit der Extraktion (5.2) fortgefahren wird.

*Anmerkung:* Für den Zweck dieser Methode muss die Blindprobe ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Halofuginon darf nicht nachweisbar sein.

5.2. *Extraktion*

Von der vorbereiteten Probe werden 10 g auf 0,1 g genau in ein 200-ml-Zentrifugenglas eingewogen. Es werden 0,5 g Natriumascorbat (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) und 20 ml Wasser hinzugefügt, und es wird gemischt. Das Zentrifugenglas wird 5 min in ein 80 °C heißes Wasserbad gestellt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 20 ml Natriumcarbonatlösung (3.15) hinzugefügt, und es wird gemischt. Unmittelbar danach werden 100 ml Ethylacetat (3.4) hinzugefügt, und es wird 15 s kräftig von Hand geschüttelt. Danach wird das Zentrifugenglas mit gelockertem Stopfen 3 min in ein Ultraschallbad (4.1) gestellt. Es wird 2 min zentrifugiert und die Ethylacetatphase durch einen Glasfaserfilter (4.6) in einen 500-ml-Scheidetrichter dekantiert. Die Extraktion der Probe wird mit weiteren 100 ml Ethylacetat wiederholt. Die vereinigten Extrakte werden 1 min lang mit 50 ml der mit Natriumchlorid gesättigten Natriumcarbonatlösung (3.16) gewaschen. Die wässrige Phase wird verworfen.

Die organische Phase wird 1 min mit 50 ml Salzsäure (3.17) extrahiert. Die untere Säurephase wird in einen 250-ml-Scheidetrichter abgelassen. Die organische Phase wird erneut 1,5 min mit weiteren 50 ml Salzsäure extrahiert. Die beiden Säureextrakte werden vereinigt und durch ca. 10 s langes Schütteln mit 10 ml Ethylacetat (3.4) gewaschen.

**▼ B**

Die wässrige Phase wird quantitativ in einen 250-ml-Rundkolben überführt und die organische Phase verworfen. Das restliche in der sauren Lösung enthaltene Ethylacetat wird mithilfe des Rotationsverdampfers (4.2) entfernt. Die Temperatur des Wasserbads darf 40 °C nicht überschreiten. Bei einem Unterdruck von ca. 25 mbar wird das restliche Ethylacetat bei 38 °C innerhalb von 5 min entfernt.

5.3. *Clean-up*5.3.1. *Vorbereitung der Amberlitesäule*

Für jeden Probenextrakt wird eine XAD-2-Säule vorbereitet. Von dem vorbereiteten Amberlite (3.19) werden 10 g mit Methanol (3.8) in eine Glassäule (4.5) eingefüllt. Auf das obere Ende des Harzbettes wird ein kleiner Glaswattebausch gebracht. Das Methanol wird aus der Säule ablaufen gelassen und das Harz mit 100 ml Wasser gewaschen. Sobald die Flüssigkeit das obere Ende des Harzbettes erreicht hat, wird der Absperrhahn geschlossen. Vor Gebrauch ist die Säule 10 min zu äquilibrieren. Die Säule darf nie trockenlaufen.

5.3.2. *Clean-up der Probe*

Der Extrakt (5.2) wird quantitativ auf die vorbereitete Amberlitesäule (5.3.1) aufgebracht und eluiert. Das Eluat wird verworfen. Die Elutionsgeschwindigkeit darf 20 ml/min nicht überschreiten. Der Rundkolben wird mit 20 ml Salzsäure (3.17) gespült und die Austauschersäule mit der Spülflüssigkeit gewaschen. Die eventuell auf der Säule verbliebene saure Lösung wird mit einem Luftstrom restlos ausgeblasen. Die Waschlösungen werden verworfen. Es werden 100 ml Methanol (3.8) auf die Säule gegeben und ein Eluat von 5 bis 10 ml in einem 250-ml-Rundkolben aufgefangen. Das restliche Methanol wird 10 min lang zur Äquilibrierung auf dem Harz belassen; anschließend wird die Elution mit einer Elutionsgeschwindigkeit von höchstens 20 ml/min fortgesetzt und das Eluat in demselben Rundkolben aufgefangen. Das Methanol wird am Rotationsverdampfer (4.2) abgedampft, wobei die Temperatur des Wasserbads 40 °C nicht übersteigen darf. Der Rückstand wird unter Verwendung der mobilen Phase (3.21) quantitativ in einen 10-ml-Messkolben überführt. Es wird mit der mobilen Phase zur Marke aufgefüllt und gemischt. Ein aliquoter Teil wird durch einen Membranfilter (4.7) filtriert. Diese Lösung wird für die HPLC-Bestimmung (5.4) aufbewahrt.

5.4. *HPLC-Bestimmung*5.4.1. *Parameter*

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

HPLC-Trennsäule (4.4.1),

Mobile Phase für die HPLC (3.21),

Durchflussrate: 1,5 bis 2 ml/min,

Detektionswellenlänge: 243 nm,

Einspritzvolumen: 40 bis 100 µl.

Die Stabilität des chromatografischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.6.2), die 3,0 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erreicht sind.

5.4.2. *Erstellung der Kalibrationskurve*

Jede Kalibrierlösung (3.6.2) wird mehrmals eingespritzt, und die Peakhöhen (-flächen) für die einzelnen Konzentrationen werden gemessen. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt, indem die mittleren Peakhöhen oder -flächen der Kalibrierlösungen auf der Ordinate und die dazugehörigen Konzentrationen in µg/ml auf der Abszisse aufgetragen werden.

**▼ B****5.4.3. Bestimmung der Probenlösung**

Der Probenextrakt (5.3.2) wird mehrmals eingespritzt, wobei dasselbe Volumen wie für die Einspritzung der Kalibrierlösungen verwendet wird, und die mittlere Peakhöhe (-fläche) der Halofuginonpeaks wird ermittelt.

**6. Berechnung der Ergebnisse**

Aus der mittleren Peakhöhe (-fläche) der Halofuginonpeaks der Probenlösung wird anhand der Kalibrationskurve (5.4.2) die Konzentration der Probenlösung in µg/ml bestimmt.

Der Halofuginongehalt  $w$  (in mg/kg) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

wobei:

$c$  = Halofuginonkonzentration der Probenlösung in µg/ml,

$m$  = Probeneinwaage in g.

**7. Überprüfung der Ergebnisse****7.1. Identität**

Die Identität des Analyten kann durch Co-Chromatografie oder mithilfe eines Diodenarray-Detektors bestätigt werden, wobei die Spektren der Probenlösung und der Kalibrierlösung (3.6.2), die 6,0 µg/ml enthält, verglichen werden.

**7.1.1. Co-Chromatografie**

Eine Probenlösung wird mit einer geeigneten Menge einer Kalibrierlösung (3.6.2) versetzt. Die Menge des zugesetzten Halofuginons muss dem erwarteten Halofuginongehalt der Probenlösung entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extrakts darf nur die Höhe des Halofuginonpeaks vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe darf höchstens  $\pm 10$  % von der des Peaks der nicht angereicherten 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 in der Regel  $\pm 2$  nm.
- b) Zwischen 225 und 300 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 keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Standardanalyten beträgt.
- c) Zwischen 225 und 300 nm dürfen sich die Spektren des Probenextrakts im Anstieg, an der Spitze und im Abstieg des Probenpeaks in den Bereichen 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.

**▼ B**

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

7.2. *Wiederholbarkeit*

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf bei einem Halofuginongehalt von bis zu 3 mg/kg 0,5 mg/kg nicht überschreiten.

7.3. *Wiederfindungsrate*

Für eine angereicherte Blindprobe muss die Wiederfindung mindestens 80 % betragen.

8. **Ergebnisse eines Ringversuchs**

Es wurde ein Ringversuch <sup>(1)</sup> durchgeführt, bei dem 3 Proben von 8 Laboratorien untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

**Ergebnisse**

	Probe A (Blindprobe) nach Erhalt	Probe B (Mehl)		Probe C (Pellets)	
		Nach Erhalt	Nach 2 Monaten	Nach Erhalt	Nach 2 Monaten
Mittelwert [mg/kg]	NN	2,80	2,42	2,89	2,45
s <sub>R</sub> [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
VK <sub>R</sub> [ %]	—	16	18	14	17
Wiederfindung [ %]		86	74	88	75

NN = nicht nachweisbar

s<sub>R</sub> = Standardabweichung der Vergleichbarkeit

VK<sub>R</sub> = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit

## E. BESTIMMUNG DES ROBENIDINGEHALTS

*1,3-bis[(4-Chlorobenzyliden)amino]-guanidin-hydrochlorid*1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Robenidingehalts von Futtermitteln. Die Bestimmungsgrenze beträgt 5 mg/kg.

2. **Prinzip**

Die Probe wird mit angesäuertem Methanol extrahiert. Der Extrakt wird getrocknet und ein aliquoter Teil zum *Clean-up* auf eine Aluminiumoxidsäule gegeben. Robenidin wird mit Methanol von der Säule eluiert, eingengt und mit der mobilen Phase auf ein geeignetes Volumen gebracht. Der Robenidingehalt wird mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) unter Verwendung eines UV-Detektors bestimmt.

3. **Reagenzien**

## 3.1. Methanol

## 3.2. Angesäuertes Methanol

In einen 500-ml-Messkolben werden 4,0 ml Salzsäure ( $\rho_{20} = 1,18$  g/ml) überführt. Es wird mit Methanol (3.1) zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Diese Lösung muss vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

<sup>(1)</sup> *The Analyst* 108, 1983, S. 1252-1256.

**▼ B**

- 3.3. Acetonitril, HPLC-Qualität
- 3.4. Molekularsieb  
Typ 3A, 8 bis 12 Mesh (Korngröße 1,6 bis 2,5 mm, kristallines Aluminiumsilicat, Porendurchmesser 0,3 nm).
- 3.5. Aluminiumoxid, sauer, Aktivitätsstufe I, für die Säulenchromatografie  
100 g Aluminiumoxid werden in ein geeignetes Gefäß gegeben und mit 2,0 ml Wasser versetzt. Das Gefäß wird verschlossen und etwa 20 min geschüttelt. Das Aluminiumoxid ist in einem gut verschlossenen Behälter aufzubewahren.
- 3.6. Kaliumdihydrogenphosphatlösung,  $c = 0,025$  mol/l  
In einem 1 000-ml-Messkolben werden 3,40 g Kaliumdihydrogenphosphat in Wasser (HPLC-Qualität) gelöst. Es wird zur Marke aufgefüllt und durchmischt.
- 3.7. Dinatriumhydrogenphosphatlösung,  $c = 0,025$  mol/l  
In einem 1 l-Messkolben werden 3,55 g wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat (oder 4,45 g Dihydrat oder 8,95 g Dodecahydrat) in Wasser (HPLC-Qualität) gelöst. Es wird zur Marke aufgefüllt und durchmischt.
- 3.8. Mobile Phase für die HPLC  
Folgende Reagenzien werden gemischt:  
650 ml Acetonitril (3.3),  
250 ml Wasser (HPLC-Qualität),  
50 ml Kaliumdihydrogenphosphatlösung (3.6),  
50 ml Dinatriumhydrogenphosphatlösung (3.7).  
Die Lösung wird durch einen 0,22- $\mu$ m-Filter (4.6) filtriert und entgast (z. B. durch 10-minütige Ultraschallbehandlung).
- 3.9. Standardsubstanz  
Robenidin 1,3-bis[(4-Chlorbenzyliden)amino]-guanidin-hydrochlorid, rein
- 3.9.1. Robenidin-Standard-Stammlösung, 300  $\mu$ g/ml  
Von der Robenidin-Standardsubstanz (3.9) werden 30 mg auf 0,1 mg genau eingewogen, in einem 100-ml-Messkolben in angesäuertem Methanol (3.2) gelöst und mit demselben Lösungsmittel zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Der Messkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt und im Dunkeln aufbewahrt.
- 3.9.2. Robenidin-Standardlösung, 12  $\mu$ g/ml  
Von der Standard-Stammlösung (3.9.1) werden 10,0 ml in einen 250-ml-Messkolben überführt. Es wird mit der mobilen Phase (3.8) zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Der Messkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt und im Dunkeln aufbewahrt.
- 3.9.3. Kalibrierlösungen  
Von der Robenidin-Standardlösung (3.9.2) werden 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 bzw. 25,0 ml jeweils in einen 50-ml-Messkolben überführt. Es wird mit der mobilen Phase (3.8) zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Diese Lösungen enthalten Robenidin in Konzentrationen von 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 bzw. 6,0  $\mu$ g/ml. Die Lösungen müssen vor Gebrauch frisch hergestellt werden.
- 3.10. Wasser, HPLC-Qualität

**▼ B****4. Geräte**

## 4.1. Glassäule

Braunglas mit Absperrhahn und Reservoir mit einem Fassungsvermögen von ca. 150 ml, Innendurchmesser 10 bis 15 mm, Länge 250 mm.

## 4.2. Mechanischer Schüttler oder Magnetrührer.

## 4.3. Rotationsfilmverdampfer.

## 4.4. HPLC-Einrichtung mit UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung oder Diodenarray-Detektor mit einem Messbereich von 250 bis 400 nm

4.4.1. HPLC-Trennsäule: 300 × 4 mm, C<sub>18</sub>, 10 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule.

## 4.5. Glasfaser-Filterpapier, z. B. Whatman GF/A oder gleichwertig.

## 4.6. Membranfilter, 0,22 µm Porengröße.

## 4.7. Membranfilter, 0,45 µm Porengröße.

**5. Verfahren**

*Anmerkung:* Robenidin ist lichtempfindlich. Bei allen Verfahrensschritten sind Braunglasgeräte zu verwenden.

5.1. *Allgemeines*

## 5.1.1. Zur Prüfung, dass weder Robenidin noch Störsubstanzen vorhanden sind, ist eine Blindprobe zu untersuchen.

## 5.1.2. Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe (5.1.1) untersucht wird, die mit Robenidin angereichert wurde. Die zugesetzte Menge an Robenidin sollte der in der Probe vorhandenen Menge entsprechen. Zur Anreicherung auf einen Gehalt von 60 mg/kg werden 3,0 ml der Standard-Stammlösung (3.9.1) in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben gegeben. Die Lösung wird in einem Stickstoffstrom auf ca. 0,5 ml eingeeengt. Dann werden 15 g der Blindprobe zugegeben. Es wird gemischt und 10 min stehen gelassen, bevor mit der Extraktion (5.2) fortgeföhren wird.

*Anmerkung:* Für den Zweck dieser Methode muss die Blindprobe ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Robenidin darf nicht nachweisbar sein.

5.2. *Extraktion*

Von der vorbereiteten Probe werden 15 g auf 0,01 g genau in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 100,0 ml angesäuertem Methanol (3.2) versetzt und nach Verschließen des Kolbens 1 h auf dem Schüttler (4.2) geschüttelt. Die Lösung wird über Glasfaserfilterpapier (4.5) filtriert und das gesamte Filtrat in einem 150-ml-Erlenmeyerkolben aufgefangen. Es werden 7,5 g Molekularsieb (3.4) zugegeben, und nach Verschließen des Kolbens wird 5 min geschüttelt. Anschließend wird sofort durch ein Glasfaserfilterpapier filtriert. Diese Lösung wird für die Reinigung (5.3) aufbewahrt.

5.3. *Reinigung*5.3.1. *Vorbereitung der Aluminiumoxid-Säule*

In das untere Ende der Glassäule (4.1) wird ein Glaswattebausch eingebracht, der mit einem Glasstab zusammengedrückt wird. Von dem vorbereiteten Aluminiumoxid (3.5) werden 11,0 g auf die Säule aufgebracht. Dabei ist darauf zu achten, dass der Kontakt mit der Luft so gering wie möglich gehalten wird. Durch leichtes Klopfen an das untere Ende der befüllten Säule wird das Aluminiumoxid verdichtet.

**▼ B**5.3.2. **Reinigung der Probe**

Von dem Probenextrakt (5.2) werden 5,0 ml mit einer Pipette auf die Säule gegeben, wobei die Pipettenspitze die Säulenwand berühren soll. Nach Absorption der Lösung durch das Aluminiumoxid wird das Robenidin mit 100 ml Methanol (3.1) bei einer Flussrate von 2-3 ml/min von der Säule eluiert und das Eluat in einem 250-ml-Rundkolben aufgefangen. Die Methanollösung wird am Rotationsverdampfer (4.3) bei 40 °C und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird mit 3 bis 4 ml der mobilen Phase (3.8) erneut gelöst und quantitativ in einen 10-ml-Messkolben überführt. Der Kolben wird mehrmals mit je 1 bis 2 ml der mobilen Phase gespült, und die Spüllösungen werden in den Messkolben gegeben. Es wird mit der mobilen Phase zur Marke aufgefüllt und gemischt. Ein aliquoter Teil wird durch einen 0,45-µm-Membranfilter (4.7) filtriert. Diese Lösung wird für die HPLC-Bestimmung (5.4) aufbewahrt.

5.4. **HPLC-Bestimmung**5.4.1. **Parameter**

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

HPLC-Trennsäule (4.4.1),

mobile Phase für die HPLC (3.8),

Durchflussrate: 1,5 bis 2 ml/min,

Detektionswellenlänge: 317 nm,

Einspritzvolumen: 20 bis 50 µl).

Die Stabilität des chromatografischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.9.3), die 3,6 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erreicht sind.

5.4.2. **Erstellung der Kalibrationskurve**

Jede Kalibrierlösung (3.9.3) wird mehrmals eingespritzt, und die Peakhöhen (-flächen) für die einzelnen Konzentrationen werden gemessen. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt, indem die mittleren Peakhöhen (-flächen) der Kalibrierlösungen auf der Ordinate und die dazugehörigen Konzentrationen in µg/ml auf der Abszisse aufgetragen werden.

5.4.3. **Bestimmung der Probenlösung**

Der Probenextrakt (5.3.2) wird mehrmals eingespritzt, wobei dasselbe Volumen wie für die Einspritzung der Kalibrierlösungen verwendet wird, und die mittlere Peakhöhe (-fläche) der Robenidinpeaks wird ermittelt.

**6. Berechnung der Ergebnisse**

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

Der Robenidingehalt  $w$  (in mg/kg) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

wobei:

$c$  = Robenidinkonzentration der Probenlösung in µg/ml,

$m$  = Probeneinwaage in g.

**▼B****7. Überprüfung der Ergebnisse**7.1. *Identität*

Die Identität des Analyten kann durch Co-Chromatografie oder mithilfe eines Diodenarray-Detektors bestätigt werden, wobei die Spektren der Probenlösung und der Kalibrierlösung (3.9.3), die 6 µg/ml enthält, verglichen werden.

7.1.1. *Co-Chromatografie*

Eine Probenlösung wird mit einer geeigneten Menge Kalibrierlösung (3.9.3) versetzt. Die Menge des zugesetzten Robenidins muss dem erwarteten Robenidingehalt der Probenlösung entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extrakts darf nur die Höhe des Robenidinpeaks vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe darf höchstens  $\pm 10\%$  von der des Peaks der nicht angereicherten 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 in der Regel  $\pm 2$  nm.
- b) Zwischen 250 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 keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Standardanalyten beträgt.
- c) Zwischen 250 und 400 nm dürfen sich die Spektren des Probenextrakts im Anstieg, an der Spitze und im Abstieg des Probenpeaks in den Bereichen 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*

Bei einem Robenidingehalt von mehr als 15 mg/kg darf die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe 10 % des höheren Werts nicht überschreiten.

7.3. *Wiederfindungsrate*

Für eine angereicherte Blindprobe muss die Wiederfindungsrate mindestens 85 % betragen.

**8. Ergebnisse eines Ringversuchs**

Bei einem EG-Ringversuch wurden 4 Proben von Geflügel- und Kaninchenfutter in Form von Mehl oder Pellets von 12 Laboratorien analysiert. Jede Probe wurde doppelt analysiert. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

**▼ B**

	Geflügelfutter		Kaninchenfutter	
	Mehl	Pellets	Mehl	Pellets
Mittelwert [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
$s_r$ [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
$VK_r$ [ %]	5,4	4,5	3,3	4,1
$s_R$ [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
$VK_R$ [ %]	16,1	12,0	10,6	9,7
Wiederfindung [ %]	90,0	93,3	87,2	80,2

$s_r$  = Standardabweichung der Wiederholbarkeit

$VK_r$  = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit

$s_R$  = Standardabweichung der Vergleichbarkeit

$VK_R$  = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit

#### F. BESTIMMUNG DES DICLAZURILGEHALTS

*2,6-Dichlor-alpha-(4-chlorophenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3H)-yl)benzacetoneitril*

##### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Diclazurilgehalts von 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 angesäuertem Methanol extrahiert. Bei Futtermitteln wird ein aliquoter Teil des Extrakts mit einer  $C_{18}$ -Festphasen-Extraktionskartusche gereinigt. Diclazuril wird aus der Kartusche mit einem Gemisch aus angesäuertem Methanol und Wasser eluiert. Nach dem Einengen wird der Rückstand in DMF/Wasser gelöst. Bei Vormischungen wird der Extrakt eingeeengt und der Rückstand in DMF/Wasser gelöst. Der Diclazurilgehalt wird mittels ternärer Gradienten-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (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,  $\rho_{20} = 1,19$  g/ml.

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

3.8.1. Diclazuril-Standard-Stammlösung, 500  $\mu$ g/ml

Von der Diclazuril-Standardsubstanz (3.8) werden 25 mg auf 0,1 mg genau in einen 50-ml-Messkolben eingewogen und in DMF (3.6) gelöst; es wird mit DMF (3.6) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Der Messkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt (oder ein Messkolben aus braunem Glas verwendet) und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Temperatur von  $\leq 4$  °C ist diese Lösung 1 Monat haltbar.

**▼B**

## 3.8.2. Diclazuril-Standardlösung, 50 µg/ml

Von der Standard-Stammlösung (3.8.1) werden 5,00 ml in einen 50-ml-Messkolben überführt; es wird mit DMF (3.6) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Der Messkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt (oder ein Messkolben aus braunem Glas verwendet) und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Temperatur von  $\leq 4$  °C ist diese Lösung 1 Monat haltbar.

3.9. Interne Standardsubstanz: 2,6 Dichloro- $\alpha$ -(4-chlorophenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3H)-yl)- $\alpha$ -methylbenzetonitril

## 3.9.1. Interne Standard-Stammlösung, 500 µg/ml

Von der internen Standardsubstanz (3.9) werden 25 mg auf 0,1 mg genau in einen 50-ml-Messkolben eingewogen und in DMF (3.6) gelöst; es wird mit DMF (3.6) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Der Messkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt (oder ein Messkolben aus braunem Glas verwendet) und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Temperatur von  $\leq 4$  °C ist diese Lösung 1 Monat haltbar.

## 3.9.2. Interne Standardlösung, 50 µg/ml

Von der internen Standard-Stammlösung (3.9.1.) werden 5,00 ml in einen 50-ml-Messkolben überführt; es wird mit DMF (3.6) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Der Messkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt (oder ein Messkolben aus braunem Glas verwendet) und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Temperatur von  $\leq 4$  °C ist diese Lösung 1 Monat haltbar.

## 3.9.3. Interne Standardlösung für Vormischungen, p/1000 mg/ml

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

Von der internen Standardsubstanz werden p/10 mg auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und mittels Ultraschallbad (4.6) in DMF (3.6) gelöst; es wird mit DMF (3.6) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Der Messkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt (oder ein Messkolben aus braunem Glas verwendet) und im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Temperatur von  $\leq 4$  °C ist diese Lösung 1 Monat haltbar.

## 3.10. Kalibrierlösung, 2 µg/ml

In einen 50-ml-Messkolben werden 2,00 ml Diclazuril-Standardlösung (3.8.2) und 2,00 ml interne Standardlösung (3.9.2) pipettiert. Es werden 16 ml DMF (3.6) hinzugefügt; anschließend wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese Lösung muss vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

3.11. C<sub>18</sub>-Festphasen-Extraktionskartusche, z. B. Bond Elut, Größe: 1 cc, Sorptionsmenge: 100 mg.

## 3.12. Extraktionslösung: angesäuertes 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:

## 3.13.1. Elutionsmittel A: Ammoniumacetat-Tetrabutylammoniumhydrogensulfat-Lösung,

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).

**▼ B****4. Geräte**

- 4.1. Mechanischer Schüttler.
- 4.2. HPLC-Einrichtung für ternären Gradienten
  - 4.2.1. HPLC-Trennsäule, 3 µm Korngröße, 100 × 4,6 mm, z. B. Hypersil ODS, oder vergleichbare Säule.
  - 4.2.2. UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung oder Diodenarray-Detektor.
- 4.3. Rotationsfilmverdampfer.
- 4.4. Membranfilter, 0,45 µm Porengröße.
- 4.5. Vakuumeinrichtung.
- 4.6. Ultraschallbad.

**5. Verfahren**5.1. *Allgemeines*5.1.1. *Blindprobe*

Zur Prüfung, dass weder Diclazuril noch Störsubstanzen vorhanden sind, ist eine Blindprobe zu untersuchen. Die Blindprobe muss ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Diclazuril oder Störsubstanzen dürfen nicht nachweisbar sein.

5.1.2. *Wiederfindungstest*

Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe untersucht wird, die mit Diclazuril angereichert wurde. Die zugesetzte Menge sollte der in der Probe vorhandenen Menge entsprechen. Zur Anreicherung auf einen Gehalt von 1 mg/kg werden 0,1 ml der Standard-Stammlösung (3.8.1) zu 50 g der Blindprobe gegeben. Es wird gründlich gemischt, 10 min stehen gelassen und nochmals mehrfach gemischt, bevor mit der Extraktion (5.2) fortgefahren wird.

Ist eine der zu untersuchenden Probe ähnliche Blindprobe nicht verfügbar (siehe 5.1.1), so kann ein Wiederfindungstest mithilfe 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 Subtraktion ermittelt werden.

5.2. *Extraktion*5.2.1. *Futtermittel*

Von der Probe werden 50 g 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. Anschließend wird der Kolben verschlossen. Die Mischung wird über Nacht auf dem Schüttler (4.1) geschüttelt und anschließend 10 min stehen gelassen. Ein aliquoter Teil 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, und 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 mithilfe eines Rotationsverdampfers (4.3) bei 60 °C zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in 1,0 ml DMF (3.6) gelöst; es werden 1,5 ml Wasser (3.1) hinzugefügt, gemischt und durch einen Membranfilter (4.4) filtriert. Anschließend wird die HPLC-Bestimmung (5.3) durchgeführt.

5.2.2. *Vormischungen*

Von der Probe wird 1 g 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,

**▼ B**

und der Kolben wird verschlossen. Die Mischung wird über Nacht auf dem Schüttler (4.1) geschüttelt und anschließend 10 min stehen gelassen. Ein 10 000/p-ml-Aliquot ( $p$  = Diclazuril-Sollgehalt in der Vormischung in mg/kg) der überstehenden Lösung wird in einen Rundkolben geeigneter Größe überführt. Es wird mithilfe eines Rotationsverdampfers (4.3) bei vermindertem Druck und 60 °C zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 10,0 ml DMF (3.6) gelöst; es werden 15,0 ml Wasser (3.1) hinzugefügt 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:

HPLC-Trennsäule (4.2.1.):	100 × 4,6 mm, Hypersil ODS, 3 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule
Mobile Phase:	Elutionsmittel A wässrige Lösung von Ammoniumacetat und Tetrabutylammonium-Hydrogensulfat (3.13.1):
	Elutionsmittel B Acetonitril (3.13.2):
	Elutionsmittel C Methanol (3.13.3):
Elutionsmodus:	— linearer Gradient — Anfangsbedingungen: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V+V+V) — nach 10 min Gradientenelution 30 min lang: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V+V+V) Mit Elutionsmittel B 10 min spülen.
Durchflussrate:	1,5 bis 2 ml/min
Einspritzvolumen:	20 µl
Detektionswellenlänge:	280 nm

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

5.3.2. *Bestimmung der Kalibrierlösung*

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

5.3.3. *Bestimmung der Probenlösung*

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

6. **Berechnung der Ergebnisse**6.1. *Futtermittel*

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

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

**▼ B**

wobei:

$h_{d,s}$  = 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),  
 $c_{d,c}$  = Diclazurilkonzentration in der Kalibrierlösung in  $\mu\text{g/ml}$  (3.10),  
 $m$  = Probeneinwaage in g,  
 $V$  = Volumen der Probenextrakts gemäß 5.2.1 (d. h. 2,5 ml).

## 6.2. *Vormischungen*

Der Diclazurilgehalt  $w$  (in  $\text{mg/kg}$ ) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

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

wobei:

$h_{d,c}$  = Peakhöhe (-fläche) von Diclazuril in der Kalibrierlösung (3.10),  
 $h_{i,c}$  = Peakhöhe (-fläche) des internen Standards in der Kalibrierlösung (3.10),  
 $h_{d,s}$  = Peakhöhe (-fläche) von Diclazuril in der Probenlösung (5.2.2),  
 $h_{i,s}$  = Peakhöhe (-fläche) des internen Standards in der Probenlösung (5.2.2),  
 $c_{d,c}$  = Diclazurilkonzentration in der Kalibrierlösung in  $\mu\text{g/ml}$  (3.10),  
 $m$  = Probeneinwaage in g,  
 $V$  = Volumen des Probenextrakts gemäß 5.2.2 (d. h. 25 ml),  
 $p$  = Diclazuril-Sollgehalt in der Vormischung in  $\text{mg/kg}$ .

## 7. **Überprüfung der Ergebnisse**

### 7.1. *Identität*

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

#### 7.1.1. *Co-Chromatografie*

Eine nach 5.2.1 oder 5.2.2 hergestellte Probenlösung wird mit einer geeigneten Menge Kalibrierlösung (3.10) angereichert. Die Menge des zugesetzten Diclazurils muss dem erwarteten Diclazurilgehalt der Probenlösung entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extrakts darf nur die Höhe des Diclazurilpeaks und des Peaks des internen Standards vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe darf höchstens  $\pm 10\%$  von der des ursprünglichen Diclazurilpeaks oder Standardpeaks des nicht angereicherten Probenextrakts 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 in der Regel  $\pm 2$  nm.

**▼ B**

- 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. 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 Standardanalyten beträgt.
- c) Zwischen 230 und 320 nm dürfen sich die Spektren des Probenextrakts im Anstieg, an der Spitze und im Abstieg des Probenpeaks 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 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*

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

- 30 % relativ zum höheren Wert bei Diclazurilgehalten zwischen 0,5 und 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg bei Diclazurilgehalten zwischen 2,5 und 5 mg/kg,
- 15 % relativ zum höheren Wert bei Diclazurilgehalten von mehr als 5 mg/kg.

7.3. *Wiederfindungsrate*

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

8. **Ergebnisse eines Ringversuchs**

Bei einem Ringversuch wurden 5 Proben von 11 Laboratorien untersucht. Diese Proben bestanden aus 2 Vormischungen, von denen eine mit einer organischen Matrix (O 100) und die andere mit einer anorganischen Matrix (A 100) gemischt war. Der theoretische Diclazurilgehalt liegt bei 100 mg/kg. Die 3 Geflügelmischfuttermittel stammten von 3 verschiedenen Herstellern (NL) (L1/Z1/K1). Der theoretische Diclazurilgehalt liegt bei 1 mg/kg. Die Laboratorien wurden beauftragt, jede der Proben 1- oder 2-mal zu untersuchen. (Nähere Informationen zu diesem Ringversuch sind dem *Journal of AOAC International*, Band 77, Nr. 6, 1994, S. 1359-1361, zu entnehmen.) Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

	Probe 1 A 100	Probe 2 O 100	Probe 3 L1	Probe 4 Z1	Probe 5 K1
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
$VK_r$ (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
$s_R$ (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
$VK_R$ (%)	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

$VK_r$  = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit

**▼ B**

$s_R$  = Standardabweichung der Vergleichbarkeit

$VK_R$  = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit

9. **Bemerkungen**

Es muss vorab erwiesen sein, dass das Diclazurilsignal im linearen Konzentrationsbereich liegt.

G. BESTIMMUNG DES GEHALTS AN LASALOCID-NATRIUM

*Monocarboxylsäure-Polyether-Natriumsalz, gebildet durch Streptomyces lasaliensis*

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an Lasalocid-Natrium in Futtermitteln und Vormischungen. Die Nachweisgrenze beträgt 5 mg/kg, die Bestimmungsgrenze 10 mg/kg.

2. **Prinzip**

Lasalocid-Natrium wird aus der Probe mit angesäuertem Methanol extrahiert und mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatografie (RP-HPLC) unter Verwendung eines spektrofluorometrischen Detektors bestimmt.

3. **Reagenzien**

3.1. Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ ).

3.2. Orthophosphorsäure, w (Massenanteil) = 85 %.

3.3. Orthophosphorsäurelösung, c = 20 %

23,5 ml Orthophosphorsäure (3.2) werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3.4. 6-Methyl-2-Heptylamin (1,5-Dimethylhexylamin), w (Massenanteil) = 99 %.

3.5. Methanol, HPLC-Qualität.

3.6. Salzsäure, Dichte = 1,19 g/ml.

3.7. Phosphatpufferlösung, c = 0,01 mol/l

In 500 ml Wasser (3.11) werden 1,36 g  $KH_2PO_4$  (3.1) gelöst, und es werden 3,5 ml Orthophosphorsäure (3.2) sowie 10,0 ml 6-Methyl-2-Heptylamin (3.4) hinzugefügt. Den pH-Wert mit Orthophosphorsäurelösung (3.3) auf pH 4,0 einstellen und mit Wasser (3.11) auf 1 000 ml auffüllen.

3.8. Angesäuertes Methanol

In einen 1 000-ml-Messkolben werden 5,0 ml Salzsäure (3.6) gegeben, und es wird mit Methanol (3.5) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese Lösung muss vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

3.9. Mobile Phase für die HPLC: Phosphatpuffer-Methanollösung 5 + 95 (V+V)

Von der Phosphatpufferlösung (3.7) werden 5 ml mit 95 ml Methanol (3.5) vermischt.

3.10. Lasalocid-Natrium-Standardsubstanz, garantiert rein,  $C_{34}H_{53}O_8Na$  (Monocarboxylsäure-Polyether-Natriumsalz, gebildet durch *Streptomyces lasaliensis*), E 763

3.10.1. Lasalocid-Natrium-Standard-Stammlösung, 500  $\mu g/ml$

Von Lasalocid-Natrium (3.10) werden 50 mg auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und in angesäuertem Methanol (3.8) gelöst. Es wird mit demselben Lösungsmittel zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese Lösung muss vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

**▼ B**

## 3.10.2. Lasalocid-Natrium-Standardlösung, 50 µg/ml

Von der Standard-Stammlösung (3.10.1) werden 10,0 ml in einen 100-ml-Messkolben pipettiert; es wird mit angesäuertem Methanol (3.8) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese Lösung muss vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

## 3.10.3. Kalibrierlösungen

Von der Lasalocid-Natrium-Standardlösung (3.10.2) werden 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 bzw. 10,0 ml in jeweils einen 50-ml-Messkolben überführt. Es wird mit angesäuertem Methanol (3.8) zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Diese Kalibrierlösungen enthalten jeweils 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 bzw. 10,0 µg Lasalocid-Natrium je ml. Die Lösungen müssen vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

## 3.11. Wasser, HPLC-Qualität.

4. **Geräte**

## 4.1. Ultraschallbad (oder Schüttel-Wasserbad) mit Temperaturregung.

## 4.2. Membranfilter, 0,45 µm Porengröße.

## 4.3. HPLC-Einrichtung mit Injektionssystem für Einspritzvolumina von 20 µl

4.3.1. HPLC-Trennsäule, 125 × 4 mm, mit Umkehrphase C<sub>18</sub>, 5 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule.

## 4.3.2. Spektrofluorometer mit variabler Einstellung für Anregungs- und Emissionswellenlängen.

5. **Verfahren**5.1. *Allgemeines*5.1.1. *Blindprobe*

Für die Durchführung des Wiederfindungstests (5.1.2) ist zur Prüfung, dass weder Lasalocid-Natrium noch Störsubstanzen vorhanden sind, eine Blindprobe zu untersuchen. Die Blindprobe muss ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Lasalocid-Natrium oder Störsubstanzen dürfen nicht nachweisbar sein.

5.1.2. *Wiederfindungstest*

Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe untersucht wird, die mit Lasalocid-Natrium angereichert wurde. Die zugesetzte Menge sollte in etwa der in der Probe vorhandenen Menge entsprechen. Zur Anreicherung auf einen Gehalt von 100 mg/kg werden 10,0 ml der Standard-Stammlösung (3.10.1) in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben überführt. Die Lösung wird auf ca. 0,5 ml eingeengt. Dann werden 50 g der Blindprobe zugegeben. Es wird gründlich gemischt, 10 min stehen gelassen und erneut mehrmals gemischt, bevor mit der Extraktion (5.2) fortgefahren wird.

Ist eine der zu untersuchenden Probe ähnliche Blindprobe nicht verfügbar (siehe 5.1.1), so kann ein Wiederfindungstest mithilfe des Additionsverfahrens durchgeführt werden. In diesem Fall wird die zu untersuchende Probe mit einer Lasalocid-Natrium-Menge angereichert, die in etwa 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*

Von der Probe werden 5 bis 10 g auf 0,01 g genau in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben mit Stopfen eingewogen und 100,0 ml angesäuertes

**▼ B**

Methanol (3.8) mit einer Pipette hinzugefügt. Der Stopfen wird lose aufgesetzt und der Inhalt zum Dispergieren geschwenkt. Der Kolben wird 20 min in ein Ultraschallbad (4.1) mit einer Temperatur von ca. 40 °C gestellt, dann entnommen und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Der Kolben wird etwa 1 h stehen gelassen, bis die Schwebstoffe sich abgesetzt haben. Dann wird ein aliquoter Teil über einen 0,45-µm-Membranfilter (4.2) in ein geeignetes Gefäß filtriert. Anschließend wird die HPLC-Bestimmung (5.3) durchgeführt.

### 5.2.2. Vormischungen

Rund 2 g der nicht gemahlene(n) Vormischung(en) werden auf 0,001 g genau in einen 250-ml-Messkolben gegeben. Es werden 100,0 ml angesäuertes Methanol (3.8) hinzugefügt; der Inhalt wird zum Dispergieren geschwenkt. Der Kolben wird mit Inhalt 20 min lang in ein Ultraschallbad (4.1) mit einer Temperatur von ca. 40 °C gestellt, dann entnommen und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Es wird mit angesäuertem Methanol (3.8) zur Marke aufgefüllt und sorgfältig gemischt. Der Kolben wird etwa 1 h stehen gelassen, bis die Schwebstoffe sich abgesetzt haben. Dann wird ein aliquoter Teil durch einen 0,45-µm-Membranfilter (4.2) filtriert. Ein aliquoter Teil des klaren Filtrats wird mit angesäuertem Methanol (3.8) verdünnt, um eine Lösung mit einer Konzentration von etwa 4 µg/ml Lasalocid-Natrium zu erhalten. 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:

HPLC-Trennsäule (4.3.1):	125 × 4 mm, Umkehrphase C <sub>18</sub> , 5 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule
Mobile Phase (3.9)	Mischung aus Phosphatpufferlösung (3.7) und Methanol (3.5), 5 + 95 (V+V)
Durchflussrate:	1,2 ml/min
Detektionswellenlänge:	
Anregung:	310 nm
Emission:	419 nm
Einspritzvolumen:	20 µl

Die Stabilität des chromatografischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.10.3), die 4,0 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erreicht sind.

#### 5.3.2. Erstellung der Kalibrationskurve

Jede Kalibrierlösung (3.10.3) wird mehrmals eingespritzt, und es werden die mittleren Peakhöhen (-flächen) für die einzelnen Konzentrationen gemessen. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt, indem die mittleren Peakhöhen (-flächen) auf der Ordinate und die dazugehörigen Konzentrationen in µg/ml auf der Abszisse aufgetragen werden.

#### 5.3.3. Bestimmung der Probenlösung

Die nach 5.2.1 bzw. 5.2.2 gewonnenen Probenextrakte werden mehrmals eingespritzt, wobei dasselbe Volumen wie für die Einspritzung der Kalibrierlösungen verwendet wird. Die mittlere Peakhöhe (-fläche) der Lasalocid-Natrium-Peaks wird ermittelt.

### 6. Berechnung der Ergebnisse

Aus der mittleren Peakhöhe (-fläche) der Probenlösung (5.3.3) wird anhand der Kalibrationskurve die Konzentration an Lasalocid-Natrium (µg/ml) bestimmt.

**▼ B**6.1. *Futtermittel*

Der Gehalt an Lasalocid-Natrium  $w$  (in mg/kg) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

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

wobei:

$c$  = Lasalocid-Natrium-Konzentration der Probenlösung (5.2.1) in  $\mu\text{g/ml}$ ,

$V_1$  = Volumen des Probenextrakts gemäß 5.2.1 (d. h. 100 ml),

$m$  = Probeneinwaage in g.

6.2. *Vormischungen*

Der Gehalt an Lasalocid-Natrium  $w$  (in mg/kg) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

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

wobei:

$c$  = Lasalocid-Natrium-Konzentration der Probenlösung (5.2.2) in  $\mu\text{g/ml}$ ,

$V_2$  = Volumen des Probenextrakts gemäß 5.2.2 in ml (d. h. 250 ml),

$f$  = Verdünnungsfaktor gemäß 5.2.2,

$m$  = Probeneinwaage in g.

7. **Überprüfung der Ergebnisse**7.1. *Identität*

Nachweis- und Bestimmungsverfahren, denen die Fluoreszenzdetektion zugrunde liegt, sind im Vergleich zur UV-Detektion weniger interferenzanfällig. Die Identität des Analyten kann durch Co-Chromatografie bestätigt werden.

7.1.1. *Co-Chromatografie*

Ein Probenextrakt (5.2.1 oder 5.2.2) wird mit einer entsprechenden Menge Kalibrierlösung (3.10.3) angereichert. Die zugesetzte Lasalocid-Natrium-Menge muss in etwa dem Lasalocid-Natrium-Gehalt des Probenextrakts entsprechen. Unter Berücksichtigung der zugesetzten Lasalocid-Natrium-Menge und der Verdünnung des Extrakts darf nur die Höhe des Lasalocid-Natrium-Peaks vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe darf höchstens  $\pm 10\%$  von der ursprünglichen Peakbreite abweichen, die sich bei dem nicht angereicherten Probenextrakt ergibt.

7.2. *Wiederholbarkeit*

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf die folgenden Werte nicht überschreiten:

— 15 % relativ zum höheren Wert bei Lasalocid-Natrium-Gehalten zwischen 30 und 100 mg/kg,

— 15 mg/kg bei Lasalocid-Natrium-Gehalten zwischen 100 und 200 mg/kg,

— 7,5 % des höheren Werts bei Lasalocid-Natrium-Gehalten von mehr als 200 mg/kg.

7.3. *Wiederfindungsrate*

Bei einer angereicherten (Blind-)Probe muss die Wiederfindungsrate bei Futtermitteln mindestens 80 % betragen. Bei angereicherten Vormischungsproben muss die Wiederfindungsrate mindestens 90 % betragen.

**▼B****8. Ergebnisse eines Ringversuchs**

In einem Ringversuch (\*) wurden 2 Vormischungen (Proben 1 und 2) und 5 Futtermittel (Proben 3 bis 7) in 12 Laboratorien untersucht. Jede Probe wurde doppelt analysiert. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst:

	Probe 1 Vormischung Hühnerfüt- ter	Probe 2 Vormi- schung Trut- hahnfutter	Probe 3 Truthahn- pellets	Probe 4 Hühner- krümel- füt- ter	Probe 5 Truthahn- füt- ter	Probe 6 Geflügel- fütter A	Probe 7 Geflügel- fütter B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Mittelwert [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
$s_r$ [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
$VK_r$ [ %]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
$s_R$ [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
$VK_R$ [ %]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Sollgehalt [mg/kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(\*) Gehalt nach Angabe des Herstellers.

(\*\*) Im Laboratorium zubereitetes Futter.

L = Anzahl der Laboratorien

n = Anzahl der Einzelwerte

$s_r$  = Standardabweichung der Wiederholbarkeit

$s_R$  = Standardabweichung der Vergleichbarkeit

$VK_r$  = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit

$VK_R$  = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit



## ANHANG V

## ANALYSEMETHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON FUTTERMITTELN AUF UNERWÜNSCHTE STOFFE

## A. BESTIMMUNG DES GEHALTS AN FREIEM UND GESAMTGOSSYPOL

## 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Gehalts an freiem Gossypol, Gesamtgossypol und chemisch verwandten Substanzen in Samen, Mehl und Kuchen von Baumwollsaat sowie in Mischfuttermitteln, die diese Futtermittel-Ausgangsstoffe enthalten, sofern mehr als 20 mg/kg an freiem Gossypol, Gesamtgossypol und chemisch verwandten Substanzen vorhanden sind.

## 2. Prinzip

Gossypol wird in Gegenwart von 3-Amino-1-Propanol entweder mit einer Isopropanol-Hexan-Mischung (zur Bestimmung des Gehalts an freiem Gossypol) oder mit Dimethylformamid (zur Bestimmung des Gesamtgossypolgehalts) extrahiert und mittels Anilin zu Gossypoldianilin umgesetzt, dessen Extinktion bei 440 nm gemessen wird.

## 3. Reagenzien

3.1. Isopropanol-Hexan-Mischung: Isopropanol (Volumenanteil = 60 %) wird mit *n*-Hexan (Volumenanteil = 40 %) gemischt.

3.2. Lösungsmittel A: In einen 1-l-Messkolben werden ca. 500 ml Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1), 2 ml 3-Amino-1-Propanol, 8 ml Eisessig und 50 ml Wasser gegeben, und es wird mit Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt. Dieses Reagenz ist 1 Woche lang haltbar.

3.3. Lösungsmittel B: In einen 100-ml-Messkolben werden 2 ml 3-Amino-1-Propanol und 10 ml Eisessig pipettiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit N, N-Dimethylformamid zur Marke aufgefüllt. Dieses Reagenz ist 1 Woche lang haltbar.

3.4. Anilin: Wenn die Extinktion im Blindversuch 0,022 überschreitet, ist das Anilin über Zinkstaub unter Verwerfung der ersten und der letzten 10 % des Destillats zu destillieren. In einem braunen, geschlossenen Gefäß ist dieses Reagenz im Kühlschrank einige Monate haltbar.

3.5. Gossypol-Standardlösung A: In einen 250-ml-Messkolben werden 27,9 mg Gossypol-Acetat eingewogen und mit Lösungsmittel A (3.2) gelöst. Dann wird mit Lösungsmittel A (3.2) zur Marke aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 50 ml in einen 250-ml-Messkolben pipettiert, und es wird mit Lösungsmittel A (3.2) zur Marke aufgefüllt. Die Gossypol-Konzentration dieser Lösung beträgt 0,02 mg/ml. Vor Gebrauch 1 h lang bei Raumtemperatur stehen lassen.

3.6. Gossypol-Standardlösung B: In einen 50-ml-Messkolben werden 27,9 mg Gossypol-Acetat eingewogen und mit Lösungsmittel B (3.3) gelöst. Dann wird mit Lösungsmittel B (3.3) zur Marke aufgefüllt. Die Gossypol-Konzentration dieser Lösung beträgt 0,5 mg/ml.

Die Standard-Gossypol-Lösungen A und B sind vor Lichteinwirkung geschützt 24 h lang haltbar.

## 4. Geräte

4.1. Mechanisches Schüttelgerät, ca. 35 min<sup>-1</sup>.

**▼ B**

4.2. Spektralfotometer.

5. **Verfahren**

5.1. *Einwaage*

Die Menge der Einwaage richtet sich nach dem vermuteten Gehalt an Gossypol in der Probe. Dabei sollte vorzugsweise mit einer geringen Einwaage und einem relativ großen aliquoten Teil des Filtrats gearbeitet werden, um genügend Gossypol für eine genaue fotometrische Messung zu erhalten. Für die *Bestimmung des Gehalts an freiem Gossypol* in Samen, Mehl und Kuchen von Baumwollsaat darf höchstens 1 g eingewogen werden; bei Mischfuttermitteln bis zu 5 g. Ein aliquoter Teil des Filtrats von 10 ml ist in den meisten Fällen geeignet; er muss 50 bis 100 µg Gossypol enthalten. Für die *Bestimmung des Gehalts an Gesamtgossypol* muss 0,5 bis 5 g eingewogen werden, so dass in einem aliquoten Teil des Filtrats von 2 ml 40 bis 200 µg Gossypol enthalten sind.

*Die Analyse ist bei einer Raumtemperatur von etwa 20 °C auszuführen.*

5.2. *Bestimmung des Gehalts an freiem Gossypol*

Die Einwaage wird in einen 250-ml-Kolben mit Schliffhals, dessen Boden mit Glassplittern bedeckt ist, überführt. Mit Hilfe einer Pipette werden 50 ml des Lösungsmittels A (3.2) hinzugegeben. Anschließend wird der Kolben verschlossen und 1 h lang im Schüttelgerät geschüttelt. Dann wird durch einen trockenen Filter filtriert und das Filtrat in einem kleinen Kolben mit Schliffhals aufgefangen. Während der Filtration wird der Trichter mit einem Uhrglas bedeckt.

Es werden gleich große aliquote Teile des Filtrats, die 50 bis 100 µg Gossypol enthalten, in 2 25-ml-Messkolben (A und B) pipettiert und gegebenenfalls mit Lösungsmittel A (3.2) auf 10 ml aufgefüllt. Dann wird der Inhalt des Kolbens (A) mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung wird als Vergleichslösung für die Messung der Probenlösung verwendet.

Danach werden je 10 ml des Lösungsmittels A (3.2) in 2 weitere 25-ml-Messkolben (C und D) pipettiert. Der Inhalt des Kolbens (C) wird mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung wird als Vergleichslösung für die Messung der Blindprobenlösung verwendet.

Zu den Messkolben (D) und (B) werden je 2 ml Anilin (3.4) zugegeben. Die Kolben werden dann 30 min lang über einem Bad mit siedendem Wasser zur Entwicklung der Färbung erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) jeweils zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und 1 h lang stehen gelassen.

Dann werden im Spektralfotometer bei 440 nm unter Verwendung von 1-cm-Glasküvetten die Extinktion der Blindprobe (D) im Vergleich mit der Vergleichslösung (C) und die Extinktion der Probenlösung (B) im Vergleich mit der Vergleichslösung (A) gemessen.

Die Extinktion der Blindprobenlösung wird von der Extinktion der Probenlösung subtrahiert (= korrigierte Extinktion). Anhand des so ermittelten Werts wird der Gehalt an freiem Gossypol, wie unter 6 angegeben, berechnet.

5.3. *Bestimmung des Gehalts an Gesamtgossypol*

Eine Einwaage, die 1 bis 5 mg Gossypol enthält, wird in einen 50-ml-Messkolben gegeben; dann werden 10 ml des Lösungsmittels B (3.3) hinzugefügt. Gleichzeitig wird ein Blindversuch mit 10 ml des Lösungsmittels B (3.3) in einem anderen 50-ml-Messkolben vorbereitet. Beide Messkolben werden 30 min lang über einem Bad mit siedendem Wasser

**▼ B**

erhitzt, auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) jeweils zur Marke aufgefüllt. Es wird geschüttelt, 10 bis 15 min stehen gelassen, dann filtriert und das Filtrat in Kolben mit Schliffhals aufgefangen.

Es werden jeweils 2 ml des Filtrats der Probe in 2 25-ml-Messkolben und jeweils 2 ml des Filtrats des Blindversuchs in 2 andere 25-ml-Messkolben pipettiert. Je 1 Kolben jeder Versuchsreihe wird mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) auf 25 ml aufgefüllt. Diese Lösungen werden als Vergleichslösungen verwendet.

Zu den beiden anderen Messkolben werden je 2 ml Anilin (3.4) hinzugefügt. Anschließend werden die Kolben 30 min lang über einem Bad mit siedendem Wasser zur Entwicklung der Färbung erhitzt, auf Raumtemperatur abkühlen gelassen, mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) auf jeweils 25 ml aufgefüllt, geschüttelt und 1 h lang stehen gelassen.

Die Extinktionen werden, wie unter 5.2 für freies Gossypol angegeben, gemessen. Anhand des so ermittelten Werts wird der Gehalt an Gesamtgossypol, wie unter 6 angegeben, berechnet.

## 6. Berechnung der Ergebnisse

Die Berechnung der Ergebnisse kann anhand der spezifischen Extinktion (6.1) oder anhand einer Kalibrationskurve (6.2) erfolgen.

### 6.1. Anhand der spezifischen Extinktion

Die spezifischen Extinktionen berechnen sich unter den beschriebenen Bedingungen wie folgt:

$$\text{Freies Gossypol} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{Gesamtgossypol:} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Der Gehalt an freiem bzw. an Gesamtgossypol der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Gossypol} : \frac{E \times 1\,250}{E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \times p \times a}$$

wobei:

E = korrigierte Extinktion, ermittelt gemäß 5.2,

p = Einwaage in g,

a = aliquoter Teil des Filtrats in ml.

### 6.2. Anhand einer Kalibrationskurve

#### 6.2.1. Freies Gossypol

Es werden 2 Reihen von je 5 25-ml-Messkolben vorbereitet. In beide Reihen werden jeweils 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 bzw. 10,0 der Gossypol-Standardlösung A (3.5) pipettiert; das Volumen wird mit dem Lösungsmittel A (3.2) auf 10 ml aufgefüllt. Jeder Reihe wird ein weiterer 25-ml-Messkolben hinzugefügt, der nur 10 ml des Lösungsmittels A (3.2) enthält (Blindversuch).

Die Kolben der ersten Reihe einschließlich des Kolbens für den Blindversuch werden mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) auf 25 ml aufgefüllt (Vergleichsreihe).

**▼B**

Den Kolben der zweiten Reihe, einschließlich des Blindversuchs, werden jeweils 2 ml Anilin (3.4) zugesetzt. Anschließend werden die Kolben 30 min lang über einem Bad mit siedendem Wasser zur Entwicklung der Färbung erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und 1 h lang stehen gelassen (Standardreihe).

Die Extinktion der Lösungen der Standardreihe wird gemäß 5.2 durch einen Vergleich mit den entsprechenden Lösungen der Vergleichsreihe ermittelt. Die Kalibrationskurve wird aufgestellt, indem die Extinktionswerte auf der Ordinate und die entsprechende Gossypolmenge (in µg) auf der Abszisse aufgetragen werden.

**6.2.2. Gesamtgossypol**

Es werden 6 50-ml-Messkolben vorbereitet. In den ersten werden 10 ml des Lösungsmittels B (3.3) und in die übrigen je 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 bzw. 10,0 ml der Gossypol-Standardlösung B (3.6) pipettiert. Der Inhalt eines jeden Kolbens wird mit dem Lösungsmittel B (3.3) auf 10 ml aufgefüllt. Anschließend werden die Kolben 30 min lang über einem Bad mit siedendem Wasser erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt und geschüttelt.

In 2 Reihen von je 6 25-ml Messkolben werden jeweils 2,0 ml dieser Lösung pipettiert. Die Kolben der ersten Reihe werden mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) auf 25 ml aufgefüllt. (Vergleichsreihe).

Den Kolben der zweiten Reihe werden jeweils 2 ml Anilin (3.4) zugesetzt. Dann werden sie 30 min lang über einem Bad mit siedendem Wasser erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, mit der Isopropanol-Hexan-Mischung (3.1) zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und 1 h lang stehen gelassen (Standardreihe).

Die Extinktion der Lösungen der Standardreihe wird gemäß 5.2 durch einen Vergleich mit den entsprechenden Lösungen der Vergleichsreihe ermittelt. Die Kalibrationskurve wird aufgestellt, indem die Extinktionswerte auf der Ordinate und die entsprechende Gossypolmenge (in µg) auf der Abszisse aufgetragen werden.

**6.3. Wiederholbarkeit**

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf die folgenden Werte nicht überschreiten:

- 15 % relativ zum höheren Wert bei Gossypol-Gehalten unter 500 ppm,
- 75 ppm absolut bei Gossypol-Gehalten zwischen 500 und 750 ppm,
- 10 % relativ zum höheren Wert bei Gossypol-Gehalten über 750 ppm.

▼ **M6****B. BESTIMMUNG DES GEHALTS AN DIOXINEN (PCDD/PCDF)  
UND PCB***KAPITEL I**Probenahmeverfahren und Auswertung von Analyseergebnissen***1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Proben für die amtliche Untersuchung des Gehalts an polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen (PCDD), polychlorierten Dibenzofuranen (PCDF) sowie dioxinähnlichen polychlorierten Biphenylen (PCB)<sup>(1)</sup> und nicht dioxinähnlichen PCB in Futtermitteln werden nach den in Anhang I beschriebenen Verfahren genommen. Hinsichtlich der Untersuchung auf Stoffe oder Erzeugnisse, die in Futtermitteln gleichmäßig verteilt sind, gelten die quantitativen Anforderungen gemäß Anhang I Nummer 5.1. Die mit diesem Verfahren gewonnenen Sammelproben sind als repräsentativ für die betreffenden Partien oder Teilpartien anzusehen. Anhand der bei den Laborproben bestimmten Gehalte wird festgestellt, ob die in der Richtlinie 2002/32/EG festgesetzten Höchstgehalte eingehalten wurden.

Für die Zwecke dieses Teils B gelten die Begriffsbestimmungen in Anhang I der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission<sup>(2)</sup>.

<sup>(1)</sup> Tabelle der TEF (= Toxizitätsäquivalenzfaktoren) für PCDD, PCDF und dioxinähnliche PCB: TEF der WHO zur Bewertung des Risikos beim Menschen auf Grundlage der Schlussfolgerungen der Experten-Sitzung der Weltgesundheitsorganisation und des Internationalen Programms für Chemikaliensicherheit (IPCS — International Programme for Chemical Safety) in Genf im Juni 2005 (Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Kongener	TEF-Wert	Kongener	TEF-Wert
Dibenzo-p-dioxine (PCDD) und Dibenzo-p-furane (PCDF)		„Dioxinähnliche PCB“ Non-ortho-PCB + Mono-ortho-PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-ortho PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Mono-ortho PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Abkürzungen: „T“ = tetra; „Pe“ = penta; „Hx“ = hexa; „Hp“ = hepta; „O“ = octa; „CDD“ = Chlordibenzodioxin; „CDF“ = Chlordibenzofuran; „CB“ = Chlorbiphenyl.

<sup>(2)</sup> Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom 14. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen (ABl. L 221 vom 17.8.2002, S. 8).

▼ **M6**

Darüber hinaus gelten für die Zwecke dieses Teils B folgende Begriffsbestimmungen:

„Screening-Verfahren“ sind Verfahren, die zur Auswahl derjenigen Proben genutzt werden, deren Gehalt an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB die Höchstgehalte oder die Aktionsgrenzwerte überschreitet. Sie müssen auf kostengünstige Weise einen hohen Probendurchsatz erlauben, was die Chancen erhöht, neue Vorfälle mit hoher Exposition und Gesundheitsgefahren für die Verbraucher aufzudecken. Screening-Verfahren beruhen auf bioanalytischen oder GC-MS-Verfahren. Ergebnisse von Proben, in denen der Cut-off-Wert für die Überprüfung der Konformität mit dem Höchstgehalt überschritten wird, sind durch eine erneute vollständige Analyse der ursprünglichen Probe mittels eines Bestätigungsverfahrens zu überprüfen.

„Bestätigungsverfahren“ sind Verfahren, die vollständige oder ergänzende Daten liefern, mit denen die PCDD/F und dioxinähnlichen PCB am Höchstgehalt oder erforderlichenfalls am Aktionsgrenzwert eindeutig identifiziert und quantifiziert werden können. Bei diesen Verfahren kommen Gaschromatografie/hochauflösende Massenspektrometrie (GC-HRMS) oder Gaschromatografie/Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS) zum Einsatz.

## 2. **Übereinstimmung der Partie bzw. Teilpartie mit den Anforderungen in Bezug auf die Höchstgehalte**

### 2.1. *Nicht dioxinähnliche PCB*

Die Partie oder Teilpartie entspricht den Anforderungen in Bezug auf den Höchstgehalt, wenn das Ergebnis der Untersuchung für die Summe von PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 und PCB 180 (im Folgenden „nicht dioxinähnliche PCB“) den in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalt unter Berücksichtigung der Messunsicherheit nicht überschreitet<sup>(1)</sup>. Die Partie oder Teilpartie entspricht dem Höchstgehalt gemäß der Richtlinie 2002/32/EG nicht, wenn das Mittel der durch Zweitanalyse<sup>(2)</sup> ermittelten Obergrenzen („upper-bound<sup>(3)</sup>“) zweier Untersuchungsergebnisse unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit den Höchstgehalt zweifelsfrei überschreitet, d. h. zur Beurteilung, ob die Höchstgehalte eingehalten werden, wird die gemessene Konzentration nach Abzug der erweiterten Messungenauigkeit herangezogen.

Die erweiterte Messunsicherheit wird mithilfe eines Erweiterungsfaktors von 2 berechnet, der zu einem Grad des Vertrauens von ca. 95 % führt. Eine Partie oder Teilpartie entspricht nicht den Vorgaben, wenn das Mittel der gemessenen Werte abzüglich der erweiterten Messunsicherheit des Mittels über dem Höchstgehalt liegt.

<sup>(1)</sup> Falls zutreffend, ist den im „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry“ ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)) beschriebenen Grundsätzen zu folgen.

<sup>(2)</sup> „Zweitanalyse“: getrennte Untersuchung der interessierenden Analyten anhand eines zweiten Aliquots derselben homogenisierten Probe. Grundsätzlich gelten für Zweitanalysen die Anforderungen gemäß Anhang II Kapitel C Nummer 3. Bei Verfahren, bei denen <sup>13</sup>C-markierte interne Standards für die relevanten Analyten verwendet werden, ist die Zweitanalyse jedoch nur erforderlich, wenn das Ergebnis der ersten Bestimmung nicht konform ist. Sie ist erforderlich, um eine interne Kreuzkontamination oder eine versehentliche Vermischung der Proben auszuschließen. Bei einer Untersuchung im Verlauf eines Kontaminationsfalls kann auf die Bestätigung durch Zweitanalyse verzichtet werden, wenn sich die untersuchten Proben auf den Kontaminationsfall zurückverfolgen lassen und der gemessene Wert deutlich über dem Höchstgehalt liegt.

<sup>(3)</sup> Nach dem Konzept der „Obergrenze“ („upper-bound“) wird der Beitrag jedes nicht bestimmbarer Kongeners der Bestimmungsgrenze gleichgesetzt. Beim Konzept der „Untergrenze“ („lower-bound“) wird der Beitrag jedes nicht bestimmbarer Kongeners gleich null gesetzt. Beim Konzept des „Mittelwerts“ („medium-bound“) wird der Beitrag jedes nicht bestimmbarer Kongeners der Hälfte der Bestimmungsgrenze gleichgesetzt.

▼ **M6**

Die in den oben stehenden Absätzen unter dieser Nummer genannten Bestimmungen gelten für das Untersuchungsergebnis der für die amtliche Kontrolle entnommenen Probe. Im Falle einer Analyse für Rechtfertigungs- oder Referenzzwecke gelten die einzelstaatlichen Bestimmungen.

2.2. *Für PCDD/F und dioxinähnliche PCB*

Die Partie oder Teilpartie entspricht den Anforderungen in Bezug auf die Höchstgehalte, wenn das Ergebnis einer einzelnen Untersuchung,

- durchgeführt mit einem Screening-Verfahren, dessen Falsch-negativ-Rate unter 5 % liegt, ergibt, dass der Wert den in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalt für PCDD/F und für die Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB nicht überschreitet;
- durchgeführt mit einem Bestätigungsverfahren, den in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalt für PCDD/F und für die Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit nicht überschreitet.

Für Screening-Assays ist ein Cut-off-Wert festzulegen, anhand dessen entschieden wird, ob eine Probe den jeweiligen Höchstgehalten für PCDD/F bzw. die Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB entspricht.

Die Partie oder Teilpartie entspricht den Anforderungen in Bezug auf den Höchstgehalt gemäß der Richtlinie 2002/32/EG nicht, wenn das Mittel der durch Zweitanalyse <sup>(1)</sup> mit einem Bestätigungsverfahren ermittelten Obergrenzen („upper-bound <sup>(2)</sup>“) zweier Untersuchungsergebnisse unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit den Höchstgehalt zweifelsfrei überschreitet, d. h., zur Beurteilung, ob die Höchstgehalte eingehalten werden, wird die gemessene Konzentration nach Abzug der erweiterten Messungenauigkeit herangezogen.

Die erweiterte Messunsicherheit wird mithilfe eines Erweiterungsfaktors von 2 berechnet, der zu einem Grad des Vertrauens von ca. 95 % führt. Eine Partie oder Teilpartie entspricht nicht den Vorgaben, wenn das Mittel der gemessenen Werte abzüglich der erweiterten Messunsicherheit des Mittels über dem Höchstgehalt liegt.

Die Summe der geschätzten erweiterten Messunsicherheiten der getrennten Analyseergebnisse der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB ist für die Summe der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB zu verwenden.

Die in den oben stehenden Absätzen unter dieser Nummer genannten Bestimmungen gelten für das Untersuchungsergebnis der für die amtliche Kontrolle entnommenen Probe. Im Falle einer Analyse für Rechtfertigungs- oder Referenzzwecke gelten die einzelstaatlichen Bestimmungen.

<sup>(1)</sup> Grundsätzlich gelten für Zweitanalysen die Anforderungen gemäß Anhang II Kapitel C Nummer 2. Bei Bestätigungsverfahren, bei denen <sup>13</sup>C-markierte interne Standards für die relevanten Analyten verwendet werden, ist die Zweitanalyse jedoch nur erforderlich, wenn das Ergebnis der ersten Bestimmung nicht konform ist. Sie ist erforderlich, um eine interne Kreuzkontamination oder eine versehentliche Vermischung der Proben auszuschließen. Bei einer Untersuchung im Verlauf eines Kontaminationsfalls kann auf die Bestätigung durch Zweitanalyse verzichtet werden, wenn sich die untersuchten Proben auf den Kontaminationsfall zurückverfolgen lassen und der gemessene Wert deutlich über dem Höchstgehalt liegt.

<sup>(2)</sup> Für Zweitanalysen zur Kontrolle der Aktionsgrenzwerte gelten die gleichen Erklärungen und Anforderungen wie die für Höchstgehalte in Fußnote 2 oben genannten.

**▼ M6****3. Ergebnisse, die die Aktionsgrenzwerte gemäß Anhang II der Richtlinie 2002/32/EG überschreiten**

Aktionsgrenzwerte dienen als Instrument zur Auswahl der Proben in Fällen, in denen eine Kontaminationsquelle gefunden wird und Maßnahmen zu deren Eindämmung oder Beseitigung getroffen werden müssen. Durch Screening-Verfahren sind die geeigneten Cut-off-Werte für die Auswahl dieser Proben festzulegen. Wenn die Bestimmung einer Kontaminationsquelle und deren Eindämmung oder Beseitigung erhebliche Anstrengungen erfordert, ist es angezeigt, die Überschreitung der Aktionsgrenzwerte durch eine Zweitanalyse im Bestätigungsverfahren und unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit zu bestätigen<sup>(1)</sup>.

*KAPITEL II****Probenvorbereitung und Anforderungen an Untersuchungsverfahren zur amtlichen Kontrolle des Gehalts an Dioxinen (PCDD/F) und dioxinähnlichen PCB in Futtermitteln*****1. Anwendungsbereich**

Die in diesem Kapitel beschriebenen Anforderungen gelten, wenn Futtermittel zur amtlichen Kontrolle des Gehalts an 2,3,7,8-substituierten PCDD/F und dioxinähnlichen PCB sowie für die Probenvorbereitung und Untersuchungsanforderungen zu anderen regulatorischen Zwecken, darunter die Kontrollen der Futtermittelunternehmer zur Gewährleistung der Vorschriftsmäßigkeit gemäß der Verordnung (EG) Nr. 183/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates<sup>(2)</sup>, untersucht werden.

Die Überwachung von Futtermitteln auf Vorhandensein von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB kann mit zwei unterschiedlichen Verfahrensarten erfolgen:

**a) Screening-Verfahren**

Ziel der Screening-Verfahren ist die Auswahl derjenigen Proben, deren Gehalt an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB die Höchstgehalte oder die Aktionsgrenzwerte überschreitet. Screening-Verfahren sollen auf kostengünstige Weise einen hohen Probendurchsatz erlauben, was die Chancen erhöht, neue Vorfälle mit hoher Exposition und Gesundheitsgefahren für die Verbraucher aufzudecken. Ihre Anwendung hat insbesondere die Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse zum Ziel. Sie können bioanalytische und GC-MS-Verfahren umfassen.

Bei Screening-Verfahren wird das Analyseergebnis mit einem Cut-off-Wert verglichen und angegeben, ob der Höchstgehalt oder Aktionsgrenzwert möglicherweise überschritten wird oder nicht. Die Konzentration von PCDD/F und der Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB in Proben, in denen eine Überschreitung des Höchstgehalts vermutet wird, muss durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt oder bestätigt werden.

Darüber hinaus können Screening-Verfahren Hinweise auf den in der Probe vorhandenen Gehalt an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB liefern. Bei bioanalytischen Screening-Verfahren wird das Ergebnis in bioanalytischen Äquivalenten (BEQ) und bei physikalisch-chemischen GC-MS-Verfahren in Toxizitätsäquivalenten (TEQ) ausgedrückt. Die in Zahlen ausgedrückten Ergebnisse von Screening-Verfahren sind geeignet, die Konformität bzw. die vermutete

<sup>(1)</sup> Für Zweitanalysen zur Kontrolle der Aktionsgrenzwerte gelten die gleichen Erklärungen und Anforderungen wie die für Höchstgehalte in Fußnote 6 genannten.

<sup>(2)</sup> Verordnung (EG) Nr. 183/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Januar 2005 mit Vorschriften für die Futtermittelhygiene (ABl. L 35 vom 8.2.2005, S. 1).

**▼ M6**

Nichtkonformität oder das Überschreiten von Aktionsgrenzwerten anzuzeigen und weisen außerdem für den Fall einer Weiterverfolgung mittels Bestätigungsverfahren auf die Gehaltsbereiche hin. Sie sind nicht für Zwecke wie die Bewertung von Hintergrundgehalten, die Schätzung der Aufnahme, die Verfolgung der zeitlichen Entwicklung von Gehalten oder die Neubewertung von Aktionsgrenzwerten und Höchstgehalten geeignet.

b) *Bestätigungsverfahren*

Bestätigungsverfahren ermöglichen die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung von in einer Probe vorhandenen PCDD/F und dioxinähnlichen PCB und liefern vollständige Informationen auf Kongenerenebene. Sie erlauben somit die Kontrolle von Höchstgehalten und Aktionsgrenzwerten, einschließlich der Bestätigung von mittels Screening-Verfahren erzielten Ergebnissen. Außerdem können die Ergebnisse für weitere Zwecke genutzt werden, wie die Bestimmung der Belastung im niedrigen Hintergrundbereich bei der Futtermittelüberwachung, die Verfolgung der zeitlichen Entwicklung, die Expositionsbewertung und für den Aufbau einer Datenbank im Hinblick auf eine mögliche Neubewertung der Aktionsgrenzwerte und Höchstgehalte. Sie sind außerdem bei der Feststellung von Kongeneren-Mustern zur Bestimmung der Quelle einer möglichen Kontamination von Bedeutung. Solche Verfahren verwenden GC-HRMS. Zur Bestätigung der Konformität oder Nichtkonformität mit dem Höchstgehalt kann auch die GC-MS/MS verwendet werden.

2. **Hintergrund**

Zur Berechnung der TEQ-Konzentrationen werden die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in einer bestimmten Probe mit den jeweiligen Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) (siehe Fußnote 1 in Kapitel I) multipliziert und dann addiert, woraus sich die Gesamtkonzentration an dioxinähnlichen Verbindungen, ausgedrückt in TEQ, ergibt.

Für die Zwecke dieses Teils B entspricht die akzeptierte spezifische Bestimmungsgrenze eines einzelnen Kongeners dem niedrigsten Analytgehalt, der sich mit angemessener statistischer Zuverlässigkeit quantifizieren lässt und die Identifizierungskriterien erfüllt, wie sie in international anerkannten Normen, z. B. in der Norm EN 16215:2012 (Futtermittel — Bestimmung von Dioxinen und dioxinähnlichen PCB mittels GC-HRMS und von Indikator-PCB mittels GC-HRMS) und/oder in den überarbeiteten EPA-Methoden 1613 und 1668, beschrieben sind.

Die Bestimmungsgrenze eines einzelnen Kongeners lässt sich bestimmen als

- a) die Konzentration eines Analyten in einem Probenextrakt, die ein Signal des Messgeräts bei zwei verschiedenen Ionen hervorruft, die mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 bei dem weniger empfindlichen Rohdatensignal verbunden sind; oder
- b) wenn die Signal-Rausch-Berechnung aus technischen Gründen keine zuverlässigen Ergebnisse ergibt, der niedrigste Konzentrationspunkt auf einer Kalibrierkurve, der eine annehmbare ( $\leq 30\%$ ) und konsistente (Messung mindestens zu Beginn und am Ende einer analytischen Probensequenz) Abweichung vom mittleren relativen Responsefaktor aufweist, der bei jeder Probensequenz für alle Punkte auf der Kalibrierkurve berechnet wurde. Die Bestimmungsgrenze wird auf der Grundlage des niedrigsten Konzentrationspunktes unter Berücksichtigung der Wiederfindung interner Standards und der Probeneinwaage berechnet.

**▼ M6**

Mit bioanalytischen Methoden erhält man kein Ergebnis auf Ebene der Kongeneren, sondern lediglich einen Hinweis<sup>(1)</sup> auf den TEQ-Gehalt, der in BEQ ausgedrückt wird, wodurch der Tatsache Rechnung getragen wird, dass möglicherweise nicht alle in einem Probenextrakt vorliegenden Verbindungen, die ein Signal erzeugen, allen Voraussetzungen des TEQ-Prinzips genügen.

Screening- und Bestätigungsverfahren können nur dann zur Kontrolle einer bestimmten Matrix verwendet werden, wenn sie empfindlich genug sind, Gehalte im Bereich der Aktionsgrenzwerte oder Höchstgehalte zuverlässig zu bestimmen.

3. **Anforderungen an die Qualitätssicherung**
- 3.1. Auf jeder Stufe des Probenahme- und Analyseverfahrens sind Maßnahmen zur Vermeidung von Kreuzkontamination zu treffen.
- 3.2. Die Proben sind in hierfür geeigneten Glas-, Aluminium-, Polypropylen- oder Polyethylen-Behältnissen zu lagern und zu transportieren, sodass der Gehalt der Proben an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB nicht verfälscht wird. Spuren von Papierstaub sind vom Probenbehälter zu entfernen.
- 3.3. Lagerung und Transport der Proben haben so zu erfolgen, dass die Futtermittelprobe unversehrt erhalten bleibt.
- 3.4. Sofern zutreffend, sind die einzelnen Laborproben mithilfe eines Verfahrens, mit dem nachweislich eine vollständige Homogenisierung erreicht wird, fein zu mahlen und gründlich zu mischen (z. B. so fein gemahlen, dass die Probe durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm passt). Falls die Proben einen zu hohen Feuchtigkeitsgehalt aufweisen, sind sie vor dem Mahlen zu trocknen.
- 3.5. Die Reagenzien, Glasgeräte und die weitere Ausrüstung sind auf Faktoren, die möglicherweise die TEQ- und BEQ-basierten Ergebnisse verfälschen könnten, zu kontrollieren.
- 3.6. Es ist eine Methodenleerwert-Untersuchung durchzuführen, bei der das gesamte Analyseverfahren durchgeführt und nur die Probe weggelassen wird.
- 3.7. Bei Anwendung bioanalytischer Methoden ist zu überprüfen, dass sämtliche Glasgeräte und Lösungsmittel, die bei der Analyse verwendet werden, frei von Verbindungen sind, die die Erkennung der Zielverbindungen im Arbeitsbereich beeinträchtigen könnten. Glasgeräte sind mit Lösungsmitteln zu spülen oder auf Temperaturen zu erhitzen, die geeignet sind, alle Spuren von PCDD/F, dioxinähnlichen Verbindungen und interferierenden Verbindungen von der Oberfläche der Geräte zu entfernen.
- 3.8. Die Menge der für die Extraktion verwendeten Probe muss ausreichend groß sein, um die Anforderungen hinsichtlich eines ausreichend niedrigen Arbeitsbereichs, der den Konzentrationsbereich der Höchstgehalte oder Aktionsgrenzwerte beinhaltet, zu erfüllen.
- 3.9. Zur spezifischen Vorbereitung der Proben der zu untersuchenden Erzeugnisse sind Verfahren gemäß international anerkannten Leitlinien zu verwenden.

<sup>(1)</sup> Bioanalytische Methoden sind nicht spezifisch für diejenigen Kongenere, die in das TEF-Schema fallen. Im Probenextrakt können auch andere, strukturverwandte AhR-aktive Verbindungen vorliegen, die zur Gesamt-Zellantwort beitragen. Daher erlauben bioanalytische Ergebnisse keine Schätzung des TEQ-Gehalts, sondern stellen eher einen Hinweis auf den TEQ-Gehalt in einer Probe dar.

▼ **M6****4. Anforderungen an Laboratorien**

- 4.1. Gemäß den Bestimmungen der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 müssen die Laboratorien von einer anerkannten Stelle akkreditiert sein, die nach ISO Guide 58 arbeitet, damit sichergestellt ist, dass die Laboratorien bei der Untersuchung Qualitätssicherungsverfahren anwenden. Die Laboratorien müssen gemäß der Norm EN ISO/IEC 17025 akkreditiert sein. Falls zutreffend, ist den in den technischen Leitlinien für die Schätzung der Messunsicherheit und der Bestimmungsgrenzen für die Untersuchung auf PCDD/F und PCB beschriebenen Grundsätzen zu folgen <sup>(1)</sup>.
- 4.2. Die Laborleistung ist durch die kontinuierliche erfolgreiche Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen zur Ermittlung des Gehalts an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB in den entsprechenden Futtermittelmatrices und Konzentrationsbereichen unter Beweis zu stellen.
- 4.3. Laboratorien, die zur Routinekontrolle von Proben Screening-Verfahren verwenden, müssen eng mit Laboratorien zusammenarbeiten, die Bestätigungsverfahren anwenden, sowohl zur Qualitätssicherung als auch zur Bestätigung der Ergebnisse verdächtiger Proben.

**5. Grundlegende Anforderungen an Verfahren zur Untersuchung auf Dioxine (PCDD/F) und dioxinähnliche PCB****5.1. Niedriger Arbeitsbereich und niedrige Bestimmungsgrenzen**

Bei PCDD/F müssen die nachweisbaren Mengen wegen der extrem hohen Toxizität einiger dieser Verbindungen im oberen Femtogramm-Bereich ( $10^{-15}$ g) liegen. Bei den meisten PCB-Kongeneren ist eine Bestimmungsgrenze im Bereich Nanogramm ( $10^{-9}$ g) bereits ausreichend. Zur Messung der toxischeren dioxinähnlichen PCB-Kongeneren (insbesondere der non-orthosubstituierten Kongeneren) muss das untere Ende des Arbeitsbereichs bis in den unteren Pikogramm-Bereich ( $10^{-12}$ g) reichen. Bei allen anderen PCB-Kongeneren ist eine Bestimmungsgrenze im Nanogramm-Bereich ( $10^{-9}$ g) ausreichend.

**5.2. Hohe Selektivität (Spezifität)**

- 5.2.1. PCDD/F und dioxinähnliche PCB müssen von einer Vielzahl anderer, gemeinsam extrahierter und möglicherweise interferierender Verbindungen unterschieden werden, die in Konzentrationen von bis zu mehreren Größenordnungen höher als diejenigen der interessierenden Analyten vorhanden sind. Bei GC-MS-Verfahren ist eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Kongeneren erforderlich, beispielsweise zwischen toxischen (z. B. die siebzehn 2,3,7,8-substituierten PCDD/F sowie die zwölf dioxinähnlichen PCB) und anderen Kongeneren.

- 5.2.2. Bioanalytische Methoden müssen einen Nachweis der Zielverbindungen als Summe der PCDD/F und/oder dioxinähnlichen PCB ermöglichen. Ziel der Probenaufreinigung muss sein, Verbindungen, die falsch-positive Ergebnisse verursachen könnten oder Verbindungen, die das Signal schwächen und dadurch falsch-negative Ergebnisse verursachen könnten, zu entfernen.

**5.3. Hohe Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision, beobachtete Bioassay-Wiederfindung)**

- 5.3.1. Bei Anwendung von GC-MS-Verfahren muss die Bestimmung eine valide Schätzung der tatsächlichen Konzentration in einer Probe ermöglichen. Hohe Genauigkeit ist notwendig, damit die Zurückweisung eines Ergebnisses einer Probenuntersuchung aufgrund der geringen Zuverlässigkeit des bestimmten TEQ-Gehalts vermieden wird. Die Genauigkeit

<sup>(1)</sup> „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry“ („Leitlinien zur Bestimmung der Messunsicherheit von Laboratorien, die PCDD/F und PCB Analysen mittels ID/MS durchführen“) ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)), „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food“ („Leitlinien zur Schätzung des LOD und LOQ für Bestimmungen von Kontaminanten in Lebens- und Futtermitteln“) ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)).

▼ M6

des Analyseverfahrens wird angegeben durch die *Richtigkeit* (Differenz zwischen dem gemessenen Mittelwert eines Analyten in einem zertifizierten Material und seinem zertifizierten Wert, ausgedrückt als Prozentsatz dieses Wertes) und die *Präzision* ( $RSD_R$ ; relative Standardabweichung, berechnet aus unter Wiederholbarkeitsbedingungen ermittelten Ergebnissen).

- 5.3.2. Für bioanalytische Methoden ist die beobachtete Bioassay-Wiederfindung zu bestimmen. Die beobachtete Bioassay-Wiederfindung ist der BEQ-Gehalt, berechnet anhand einer TCDD-Kalibrierkurve oder einer PCB-126-Kalibrierkurve nach Korrektur um den Blindwert, geteilt durch den mittels Bestätigungsverfahren bestimmten TEQ-Wert. Dadurch sollen Faktoren wie der Verlust von PCDD/F und dioxinähnlichen Verbindungen während der einzelnen Extraktions- bzw. Reinigungsschritte, die Verstärkung oder Abschwächung des Signals durch mitextrahierte Verbindungen (agonistische bzw. antagonistische Wirkung), die Qualität der Kurvenanpassung oder Unterschiede zwischen TEF- und REP-(Relative-Potency-)Werten korrigiert werden. Die beobachtete Bioassay-Wiederfindung wird anhand geeigneter Referenzproben berechnet, die im Bereich der interessierenden Konzentration liegen und repräsentative Kongeneren-Muster aufweisen.
- 5.4. *Validierung im Bereich des Höchstgehalts und allgemeine Qualitätssicherungsmaßnahmen*
- 5.4.1. Die Laboratorien haben im Rahmen der Validierung und während der Routineanalytik den Nachweis der Leistungsfähigkeit eines Verfahrens im Bereich des Höchstgehalts, z. B. 0,5 x, 1 x und 2 x Höchstgehalt mit einem akzeptablen Variationskoeffizienten für wiederholte Untersuchung, zu führen.
- 5.4.2. Als interne Qualitätssicherungsmaßnahmen müssen regelmäßige Methodenleerwert-Kontrollen und Experimente mit dotierten Proben oder Analysen von Kontrollproben (sofern erhältlich, vorzugsweise zertifiziertes Referenzmaterial) durchgeführt werden. Für Methodenleerwert-Kontrollen, Experimente mit dotierten Proben und Analysen von Kontrollproben sind Qualitätskontroll-Charts anzufertigen und zu prüfen, damit sichergestellt ist, dass die Analyseleistungsfähigkeit den Anforderungen genügt.
- 5.5. *Bestimmungsgrenze*
- 5.5.1. Bei einem bioanalytischen Screening-Verfahren ist eine Ermittlung der Bestimmungsgrenze (LOQ) nicht unbedingt erforderlich; es muss jedoch nachgewiesen sein, dass mit dem Verfahren eine Unterscheidung zwischen dem Methodenleerwert und dem Cut-off-Wert möglich ist. Wird ein BEQ-Gehalt angegeben, ist eine Konzentration festzulegen, ab der Ergebnisse mitgeteilt werden (Meldewert), um Proben, die ein Ergebnis unterhalb davon aufweisen, entsprechend einstuft zu können. Der Meldewert muss sich mindestens um den Faktor 3 von Methodenleerwert-Proben mit einem Signal unterhalb des Arbeitsbereichs unterscheiden. Er ist daher auf der Grundlage von Proben zu berechnen, die ungefähr den erforderlichen Mindestgehalt an Zielverbindungen enthalten, und nicht aus dem Signal/Rausch-Verhältnis oder einem Assay-Leerwert.
- 5.5.2. Die LOQ liegt beim Bestätigungsverfahren bei etwa einem Fünftel des Höchstgehalts.
- 5.6. *Analysekriterien*
- Damit die Ergebnisse der Bestätigungs- oder Screening-Verfahren zuverlässig sind, müssen folgende Kriterien im Bereich des Höchstgehalts für den TEQ-Wert bzw. den BEQ-Wert erfüllt sein, entweder bestimmt als Gesamt-TEQ bzw. Gesamt-BEQ (Summe der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB) oder separat für PCDD/F und dioxinähnliche PCB.

▼ **M6**

	Screening mit bioanalytischen oder physikalisch-chemischen Verfahren	Bestätigungsverfahren
Falsch-negativ-Rate <sup>(1)</sup>	< 5 %	
Richtigkeit		– 20 % bis + 20 %
Wiederholbarkeit (RSD <sub>r</sub> )	< 20 %	
Laborpräzision (RSD <sub>R</sub> )	< 25 %	< 15 %

<sup>(1)</sup> Bezogen auf die Höchstgehalte.

### 5.7. Besondere Anforderungen an Screening-Verfahren

5.7.1. Sowohl GC-MS-Verfahren als auch bioanalytische Methoden dürfen zum Screening verwendet werden. Bei GC-MS-Verfahren sind die unter Nummer 6 festgelegten Anforderungen zu erfüllen. Für zellbasierte bioanalytische Methoden sind unter Nummer 7 spezifische Anforderungen festgelegt.

5.7.2. Laboratorien, die zur Routinekontrolle von Proben Screening-Verfahren verwenden, müssen eng mit Laboratorien zusammenarbeiten, die das Bestätigungsverfahren anwenden.

5.7.3. Der Nachweis der Leistungsfähigkeit des Screening-Verfahrens ist während der Routineanalyse durch Qualitätssicherung und permanente Methodenvalidierung zu erbringen. Es muss ein kontinuierliches Programm zur Kontrolle der als konform beurteilten Analysenergebnisse geben.

5.7.4. Prüfung auf eine mögliche Unterdrückung der Zellantwort und auf Zytotoxizität:

20 % der Probenextrakte sind während des Routine-Screenings sowohl ohne als auch mit Zusatz einer dem Höchstgehalt oder dem Aktionsgrenzwert entsprechenden Menge von 2,3,7,8-TCDD zu analysieren, damit überprüft werden kann, ob das Signal möglicherweise durch interferierende Stoffe im Probenextrakt unterdrückt wird. Die gemessene Konzentration der dotierten Probe ist mit der Summe aus der Konzentration der nicht dotierten Probe und der Konzentration der Dotierung zu vergleichen. Liegt die gemessene Konzentration mehr als 25 % unter der berechneten (Summen-)Konzentration, ist dies ein Hinweis auf eine mögliche Signalunterdrückung und die entsprechende Probe ist einem GC-HRMS-Bestätigungsverfahren zu unterziehen. Die Ergebnisse sind anhand von Qualitätskontroll-Charts zu überwachen.

5.7.5. Qualitätssicherung bei als konform beurteilten Proben

Etwa 2-10 % der konformen Proben sind, je nach Probenmatrix und Laborerfahrung, mittels GC-HRMS zu bestätigen.

5.7.6. Bestimmung der Falsch-negativ-Raten auf Grundlage der Qualitätssicherungsdaten:

Die Rate falsch-negativer Ergebnisse beim Screening von Proben unter und oberhalb der Höchstgehalte oder Aktionsgrenzwerte ist zu bestimmen. Der tatsächliche Anteil der falsch-negativen Ergebnisse muss unter 5 % liegen. Wenn im Rahmen der Qualitätssicherung je Matrix/Matrixgruppe mindestens 20 Proben bestätigt wurden, ist aus dieser Datenbasis

▼ **M6**

die Falsch-negativ-Rate zu ermitteln. Die zur Ermittlung der Falsch-negativ-Rate mindestens erforderlichen 20 Ergebnisse können auch die Ergebnisse von in Ringversuchen oder im Rahmen eines Kontaminationsereignisses untersuchten Proben mit einschließen, die einen Konzentrationsbereich von beispielsweise bis zum doppelten Höchstgehalt abdecken. Die Proben müssen die häufigsten Kongeneren-Muster abdecken, die verschiedene Kontaminationsquellen repräsentieren.

Obwohl Screening-Verfahren hauptsächlich auf die Ermittlung derjenigen Proben abzielen, in denen der Aktionsgrenzwert überschritten wird, ist das ausschlaggebende Kriterium zur Bestimmung der Falsch-negativ-Rate der Höchstgehalt, unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit des Bestätigungsverfahrens.

- 5.7.7. Alle Proben, die im Screening-Verfahren als möglicherweise nicht konform beurteilt werden, müssen durch eine erneute vollständige Untersuchung der ursprünglichen Probe im Rahmen eines Bestätigungsverfahrens überprüft werden. Diese Proben dürfen auch zur Bewertung der Rate der falsch-positiven Ergebnisse herangezogen werden. Im Rahmen von Screening-Verfahren entspricht die Falsch-Positiv-Rate dem Anteil derjenigen Ergebnisse, von denen sich im Bestätigungsverfahren herausstellt, dass sie konform sind, nachdem sie zunächst als möglicherweise nicht konform eingestuft worden waren. Die Vorteile des Screening-Verfahrens sind auf Grundlage eines Vergleichs zwischen der Zahl der falsch-positiven Proben und der Gesamtzahl der untersuchten Proben zu bewerten. Dabei muss der Anteil der falsch-positiven Proben so gering sein, dass ein Screening vorteilhaft ist.
- 5.7.8. Unter Validierungsbedingungen müssen bioanalytische Methoden einen stichhaltigen Hinweis auf den TEQ-Gehalt ergeben, berechnet und ausgedrückt als BEQ.

Bei unter wiederholten Bedingungen angewandten bioanalytischen Methoden wäre in der Regel die laborinterne Wiederholbarkeit  $RSD_r$  geringer als die unter Reproduzierbarkeitsbedingungen ( $RSD_R$ ).

6. **Besondere Anforderungen an GC-MS-Verfahren für Screening- oder Bestätigungszwecke**
- 6.1. *Annehmbare Differenzen zwischen Obergrenze („upper-bound“) und Untergrenze („lower-bound“) (WHO-TEQ-Ergebnisse)*
- Zur Bestätigung der Überschreitung von Höchstgehalten oder erforderlichenfalls von Aktionsgrenzwerten darf die Differenz zwischen Ober- und Untergrenze nicht mehr als 20 % betragen.
- 6.2. *Kontrolle der Wiederfindungsrate*
- 6.2.1. Die Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -markierten 2,3,7,8-chlorsubstituierten internen PCDD/F-Standards und  $^{13}\text{C}$ -markierten internen dioxinähnlichen PCB-Standards ist ganz zu Anfang des Analyseverfahrens, z. B. vor der Extraktion, durchzuführen, damit das Analyseverfahren validiert werden kann. Bei jeder der tetra- bis octachlorierten homologen Gruppen von PCDD/F und bei jeder der homologen Gruppen von dioxinähnlichen PCB muss mindestens ein Kongener zugegeben werden (alternativ dazu mindestens ein Kongener je massenspektrometrisch ausgewählter Ionenaufzeichnungsfunktion zur Überwachung von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB). Im Fall der Bestätigungsverfahren sind alle 17  $^{13}\text{C}$ -markierten 2,3,7,8-substituierten internen PCDD/F-Standards und alle 12  $^{13}\text{C}$ -markierten internen dioxinähnlichen PCB-Standards zu verwenden.

▼ **M6**

6.2.2. Die relativen Responsefaktoren sind mittels geeigneter Kalibrierlösungen auch für diejenigen Kongenere zu bestimmen, bei denen kein <sup>13</sup>C-markiertes Analogon zugegeben ist.

6.2.3. Bei Futtermitteln pflanzlichen Ursprungs und Futtermitteln tierischen Ursprungs, die weniger als 10 % Fett enthalten, ist die Zugabe der internen Standards vor der Extraktion obligatorisch. Bei Futtermitteln tierischen Ursprungs, die mehr als 10 % Fett enthalten, können die internen Standards entweder vor oder nach der Fettextraktion zugegeben werden. Die Extraktionseffizienz ist auf geeignete Weise zu validieren, abhängig davon, auf welcher Stufe die internen Standards zugegeben werden.

6.2.4. Vor der GC-MS-Analyse sind 1 oder 2 Wiederfindungs-(Surrogat-)Standard(s) zuzugeben.

6.2.5. Es ist eine Kontrolle der Wiederfindungsrate erforderlich. Bei Bestätigungsverfahren müssen die Wiederfindungsraten der einzelnen internen Standards zwischen 60 und 120 % liegen. Geringere oder höhere Wiederfindungsraten für einzelne Kongenere, insbesondere für einige hepta- und octachlorierte Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane, werden unter der Bedingung akzeptiert, dass ihr Beitrag zum TEQ-Wert 10 % des gesamten TEQ-Werts (basierend auf der Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB) nicht übersteigt. Bei GC-MS-Screening-Verfahren müssen die Wiederfindungen zwischen 30 und 140 % liegen.

6.3. *Entfernung interferierender Stoffe*

— Die PCDD/F sind von interferierenden chlorierten Verbindungen, wie z. B. nicht dioxinähnlichen PCB und chlorierten Diphenylethern, mittels geeigneter chromatografischer Verfahren abzutrennen (vorzugsweise mit Florisil-, Aluminiumoxid- und/oder Aktivkohlesäule).

— Die gaschromatografische Auftrennung der Isomere ist < 25 % von Peak zu Peak zwischen 1,2,3,4,7,8-HxCDF und 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Kalibrierung mittels Standardkurve*

Die Kalibrierkurve muss alle jeweils relevanten Bereiche der Höchstgehalte oder Aktionsgrenzwerte abdecken.

6.5. *Besondere Kriterien für Bestätigungsverfahren*

— Für GC-HRMS:

Bei der HRMS muss die Auflösung für den gesamten Massenbereich bei 10 % Tal in der Regel gleich oder größer als 10 000 sein.

Erfüllung weiterer Identifizierungs- und Bestätigungskriterien, wie sie in international anerkannten Normen, z. B. in der Norm EN 16215:2012 (Futtermittel — Bestimmung von Dioxinen und dioxinähnlichen PCB mittels GC-HRMS und von Indikator-PCB mittels GC-HRMS) und/oder in den überarbeiteten EPA-Methoden 1613 und 1668, beschrieben sind.

— Für GC-MS/MS:

Messung von mindestens 2 spezifischen Vorläufer-Ionen, jeweils mit einem spezifischen dazugehörigen Übergangs-Produkt-Ion für alle markierten und nicht markierten Analyten im Untersuchungsbereich.

Zulässige Höchsttoleranz für relative Ionenintensitäten von ± 15 % für ausgewählte Übergangs-Produkt-Ionen im Vergleich zu berechneten oder gemessenen Werten (Mittelwert aus Kalibrierstandards) unter Anwendung identischer MS/MS-Bedingungen, insbesondere Kollisionsenergie und Kollisionsgasdruck, für jeden Übergang eines Analyts.

▼ **M6**

Festlegung der Auflösung für jeden Quadrupol gleichwertig oder besser als die Einheitsmassenauflösung (Einheitsmassenauflösung: ausreichende Auflösung zur Auftrennung zweier Peaks, die sich um eine Masseneinheit unterscheiden), um mögliche Auswirkungen von Interferenzen auf die interessierenden Analyten zu minimieren.

Erfüllung der weiteren Kriterien, wie sie in international anerkannten Normen, z. B. in der Norm EN 16215:2012 (Futtermittel — Bestimmung von Dioxinen und dioxinähnlichen PCB mittels GC-HRMS und von Indikator-PCB mittels GC-HRMS) und/oder in den überarbeiteten EPA-Methoden 1613 und 1668, beschrieben sind, die Pflicht zur Verwendung von GC-HRMS ausgenommen.

## 7. **Besondere Anforderungen an bioanalytische Methoden**

Bioanalytische Methoden sind Verfahren, die auf der Anwendung biologischer Grundsätze beruhen, beispielsweise zellbasierte Assays, Rezeptor-Assays oder Immunoassays. In Nummer 7 werden allgemeine Anforderungen an bioanalytische Methoden festgelegt.

Mit einem Screening-Verfahren wird eine Probe prinzipiell entweder als konform oder als vermutlich nicht konform eingestuft. Dazu wird der berechnete BEQ-Wert mit dem Cut-off-Wert verglichen (siehe Nummer 7.3). Proben, die unter dem Cut-off-Wert liegen, gelten als konform, Proben, die dem Cut-off-Wert entsprechen oder diesen überschreiten, gelten als vermutlich nicht konform und müssen mit einem Bestätigungsverfahren untersucht werden. In der Praxis kann ein BEQ-Gehalt, der zwei Drittel des Höchstgehalts entspricht, als Cut-off-Wert dienen, sofern eine Falsch-negativ-Rate von unter 5 % sowie eine annehmbare Rate von falsch-positiven Ergebnissen gewährleistet wird. Da für PCDD/F und für die Summe von PCDD/F und dioxinähnliche PCB unterschiedliche Höchstgehalte gelten, ist zur Prüfung der Konformität der Proben ohne Fraktionierung ein geeigneter Bioassay-Cut-off-Wert für PCDD/F erforderlich. Zur Überprüfung von Proben, in denen die Aktionsgrenzwerte überschritten werden, eignet sich ein entsprechender Prozentsatz des jeweiligen Aktionsgrenzwerts als Cut-off-Wert.

Wird ein ungefährender Gehalt in BEQ ausgedrückt, müssen die Probenergebnisse angegeben werden, die im Arbeitsbereich liegen und den Meldewert überschreiten (siehe Nummern 7.1.1 und 7.1.6).

### 7.1. *Signalauswertung*

#### 7.1.1. *Allgemeine Anforderungen*

- Berechnet man die Konzentrationen anhand einer TCDD-Kalibrierkurve, so weisen die Werte am oberen Ende der Kurve eine große Variabilität (hoher Variationskoeffizient — VK) auf. Der Arbeitsbereich ist der Bereich, in dem der VK weniger als 15 % beträgt. Das untere Ende des Arbeitsbereichs (Meldegrenze) muss mindestens um den Faktor drei über den Methodenleerwerten liegen. Der  $EC_{70}$ -Wert (70 % der maximalen effektiven Konzentration) stellt normalerweise das obere Ende des Arbeitsbereichs dar; es liegt aber niedriger, wenn der VK in diesem Bereich über 15 % liegt. Der Arbeitsbereich wird im Rahmen der Validierung festgelegt. Die Cut-off-Werte (siehe Nummer 7.3) müssen vollständig innerhalb des Arbeitsbereichs liegen.
- Standardlösungen und Probenextrakte sind dreifach oder mindestens zweifach zu messen. Werden Zweifachmessungen durchgeführt, müssen eine Standardlösung oder ein Kontrollextrakt in vier bis sechs über die Platte verteilten Vertiefungen getestet werden und ein Signal oder eine Konzentration (nur im Arbeitsbereich möglich) auf Grundlage eines  $VK < 15 \%$  hervorbringen.

**▼ M6****7.1.2. Kalibrierung****7.1.2.1. Kalibrierung mittels Standardkurve**

- Die Gehalte in Proben werden durch Vergleich der im Assay gemessenen Zellantwort mit einer TCDD-Kalibrierkurve (oder einer PCB-126-Kalibrierkurve oder einer Kalibrierkurve aus einer Standardmischung aus PCDD/F und dioxinähnlichen PCB) geschätzt, um den BEQ-Gehalt im Extrakt und somit in der Probe zu berechnen.
- Eine Kalibrierkurve muss aus 8 bis 12 Konzentrationen bestehen (jeweils mindestens zweifach) und über eine ausreichende Zahl von Konzentrationen am unteren Ende der Kurve (Arbeitsbereich) verfügen. Besondere Aufmerksamkeit ist der Qualität der Kurvenanpassung im Arbeitsbereich zu widmen. Der  $R^2$ -Wert als solcher hilft wenig oder gar nicht bei der Einschätzung der Qualität der Anpassung bei nicht linearer Regression. Eine bessere Anpassung erhält man durch die Minimierung des Unterschieds zwischen dem berechneten und dem beobachteten Gehalt im Arbeitsbereich der Kurve, z. B. durch Minimierung der Summe der Abweichungsquadrate.
- Der geschätzte BEQ-Gehalt in der Probe muss anschließend um den für eine Matrix-/Reagenzienleerwert-Probe (zur Berücksichtigung von Verunreinigungen durch die verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien) errechneten BEQ-Wert und um die beobachtete Wiederfindung (errechnet aus dem BEQ-Gehalt geeigneter Referenzproben mit repräsentativen Kongeneren-Mustern im Bereich des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwertes) korrigiert werden. Bei der Wiederfindungskorrektur muss die beobachtete Wiederfindung sich im geforderten Bereich befinden (siehe Nummer 7.1.4). Die für die Wiederfindungskorrektur verwendeten Referenzproben müssen den unter Nummer 7.2 aufgeführten Anforderungen entsprechen.

**7.1.2.2. Kalibrierung anhand von Referenzproben**

Alternativ kann eine Kalibrierkurve auf Grundlage von mindestens vier Referenzproben verwendet werden (siehe Nummer 7.2.4): eine Matrixleerwert-Probe sowie drei Referenzproben, die jeweils 0,5 x, 1 x und 2 x den Höchstgehalt oder den Aktionsgrenzwert enthalten, wodurch keine Notwendigkeit zur Korrektur um Blindwerte und Wiederfindung besteht, wenn sich die Matrixeigenschaften bei Referenzproben und unbekanntem Proben decken. In diesem Fall kann das Signal, das 2/3 des Höchstgehalts entspricht (siehe Nummer 7.3), direkt auf Grundlage dieser Proben berechnet und als Cut-off-Wert verwendet werden. Zur Überprüfung von Proben, in denen die Aktionsgrenzwerte überschritten werden, eignet sich ein entsprechender Prozentsatz dieser Aktionsgrenzwerte als Cut-off-Wert.

**7.1.3. Separate Bestimmung von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB**

Extrakte können in Fraktionen, welche PCDD/F und dioxinähnliche PCB enthalten, aufgetrennt werden, sodass PCDD/F-TEQ und TEQ der dioxinähnlichen PCB-Verbindungen (jeweils als BEQ) getrennt angegeben werden können. Zur Bewertung der Ergebnisse für die Fraktion, die dioxinähnliche PCB enthält, ist vorzugsweise eine PCB-126-Standardkalibrierkurve zu verwenden.

**7.1.4. Beobachtete Bioassay-Wiederfindung**

Die „beobachtete Bioassay-Wiederfindung“ ist auf Grundlage geeigneter Referenzproben mit repräsentativen Kongeneren-Mustern im Bereich des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwert zu berechnen und wird als Prozentsatz des BEQ-Gehalts im Vergleich zum TEQ-Gehalt ausgedrückt. Je nachdem, welche Art von Assay oder TEF<sup>(1)</sup> verwendet wird, können die Unterschiede zwischen TEF- und REP-Faktoren in

<sup>(1)</sup> Die derzeitigen Anforderungen basieren auf den in M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223-241 (2006) veröffentlichten TEF.

▼ M6

dioxinähnlichen PCB zu niedrigeren Wiederfindungswerten für dioxinähnliche PCB im Vergleich zu PCDD/F führen. Daher muss die beobachtete Bioassay-Wiederfindung bei einer getrennten Bestimmung von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB für dioxinähnliche PCB 20 bis 60 % und für PCDD/F 50 bis 130 % betragen (bei Verwendung einer TCDD-Kalibrierkurve). Der Beitrag der dioxinähnlichen PCB zur Summe der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB kann je nach Matrices und Proben unterschiedlich sein; dies spiegelt sich in den Bereichen der beobachteten Bioassay-Wiederfindung für die Summe der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB wider, die zwischen 30 und 130 % liegen müssen. Jede wesentliche Änderung der TEF-Werte für PCDD/F und dioxinähnliche PCB in den EU-Rechtsvorschriften erfordert eine Überarbeitung dieser Bereiche.

#### 7.1.5. Kontrolle der Wiederfindung nach Reinigung der Probenextrakte

Der Verlust von Verbindungen während der Reinigung ist im Rahmen der Validierung zu überprüfen. Eine Matrixleerprobe, dotiert mit einem Gemisch verschiedener Kongenere, ist dem Reinigungsverfahren zu unterziehen (mindestens  $n = 3$ ), und Wiederfindung und Streuung sind mittels eines Bestätigungsverfahrens zu untersuchen. Die Wiederfindung muss zwischen 60 und 120 % betragen, insbesondere für Kongenere, die in verschiedenen Gemischen jeweils mehr als 10 % des TEQ-Gehalts ausmachen.

#### 7.1.6. Meldegrenze

Werden BEQ-Gehalte angegeben, ist auf der Grundlage relevanter Matrix-Proben, die typische Kongeneren-Muster aufweisen, eine Meldegrenze zu ermitteln; dabei ist die Kalibrierkurve der Standards aufgrund ihrer geringen Präzision im unteren Bereich nicht heranzuziehen. Die Einflüsse aus Extraktion und Reinigung müssen berücksichtigt werden. Die Meldegrenze muss mindestens um den Faktor drei über den Methodenleerwerten liegen.

### 7.2. Verwendung von Referenzproben

7.2.1. Referenzproben müssen repräsentativ für Probenmatrix, Kongeneren-Muster und Konzentrationen für PCDD/F und dioxinähnliche PCB im Bereich des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts sein.

7.2.2. Bei jeder Test-Reihe ist eine Matrixleerprobe, oder, sofern dies nicht möglich ist, eine Methodenleerwert-Probe, sowie eine Referenzprobe im Bereich des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts einzubeziehen. Diese Proben müssen zur gleichen Zeit und unter identischen Bedingungen extrahiert und analysiert werden. Die Referenzprobe muss im Vergleich zu der Matrixleerprobe ein deutlich höheres Signal aufweisen, wodurch die Eignung des Analyseverfahrens gewährleistet ist. Solche Proben können zur Korrektur um Leerwert und Wiederfindung verwendet werden.

7.2.3. Referenzproben, die zur Korrektur um die Wiederfindung herangezogen werden, müssen repräsentativ für die untersuchten Proben sein, d. h., die Kongeneren-Muster dürfen nicht zu einer Unterschätzung der Gehalte führen.

7.2.4. Zusätzliche Referenzproben, deren Konzentration z. B. das 0,5- und 2-Fache des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts beträgt, können einbezogen werden, damit die ordnungsgemäße Durchführung der Untersuchungen in dem für die Kontrolle des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts relevanten Bereich nachgewiesen werden kann. In Kombination können diese Proben zur Berechnung der BEQ-Gehalte in den untersuchten Proben verwendet werden (siehe Nummer 7.1.2.2).

▼ **M6**7.3. *Bestimmung der Cut-off-Werte*

Die Beziehung zwischen den in BEQ ausgedrückten Ergebnissen der bioanalytischen Methode und den in TEQ ausgedrückten Ergebnissen von Bestätigungsverfahren ist zu ermitteln, z. B. durch matrixbezogene Kalibrierexperimente unter Verwendung von Referenzproben, die mit 0, 0,5 x, 1 x und 2 x HG dotiert sind und auf jeder Konzentrationsstufe jeweils 6 Mal untersucht werden (n = 24). Korrekturfaktoren (Leerwert und Wiederfindung) können auf der Grundlage dieses Verhältnisses geschätzt werden, sind jedoch gemäß Nummer 7.2.2 zu überprüfen.

Für die Entscheidung, ob eine Probe den Höchstgehalten entspricht, oder gegebenenfalls zur Überprüfung der Aktionsgrenzwerte sind Cut-off-Werte zu ermitteln, wobei die jeweiligen Höchstgehalte bzw. Aktionsgrenzwerte entweder einzeln für PCDD/F und dioxinähnliche PCB oder aber für die Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB festgelegt sein können. Sie stellen den *unteren* Endpunkt der Verteilung bioanalytischer Ergebnisse (korrigiert um Leerwert und Wiederfindung) von Proben dar, die Gehalte an der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens aufweisen, berechnet auf Grundlage eines Vertrauensniveaus von 95 %, was eine Falsch-negativ-Rate von < 5 % impliziert, und auf Basis einer RSD<sub>R</sub> unter 25 %. Die Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens entspricht dem Höchstgehalt zuzüglich der erweiterten Messunsicherheit.

Der Cut-off-Wert (in BEQ) kann gemäß einem der unter den Nummern 7.3.1, 7.3.2 oder 7.3.3 beschriebenen Ansätze berechnet werden. (siehe Abbildung 1).

7.3.1. Verwendung des *unteren* Bands des Prognoseintervalls von 95 % an der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens:

$$\text{Cut-off-Wert} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

Dabei ist

$\text{BEQ}_{\text{DL}}$  der BEQ-Wert, der der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens entspricht, die wiederum dem Höchstgehalt unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit entspricht.

$s_{y,x}$  die Reststandardabweichung

$t_{\alpha, f=m-2}$  der Student-Faktor ( $\alpha = 5 \%$ ,  $f = \text{Freiheitsgrade}$ , einseitig)

$m$  die Gesamtzahl der Kalibrierpunkte (Laufzahl  $j$ )

$n$  die Anzahl der Wiederholungen auf jeder Ebene

$x_i$  die Probenkonzentration (in TEQ) des Kalibrierpunkts  $i$ , durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt

$\bar{x}$  der Mittelwert der Konzentrationen (in TEQ) aller Kalibrierproben

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2 \text{ Quadratsummenparameter, } i = \text{Laufzahl des Kalibrierpunkts } i$$

7.3.2. Berechnung aus bioanalytischen Ergebnissen (korrigiert um Leerwert und Wiederfindung) aus der Mehrfachuntersuchung ( $n \geq 6$ ) von Proben, die Gehalte an der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens aufweisen, als *unterer* Endpunkt der Datenverteilung am entsprechenden BEQ-Mittelwert:

$$\text{Cut-off-Wert} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

Dabei ist

$\text{SD}_R$  die Standardabweichung der Bioassay-Ergebnisse am  $\text{BEQ}_{\text{DL}}$ , gemessen unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen.

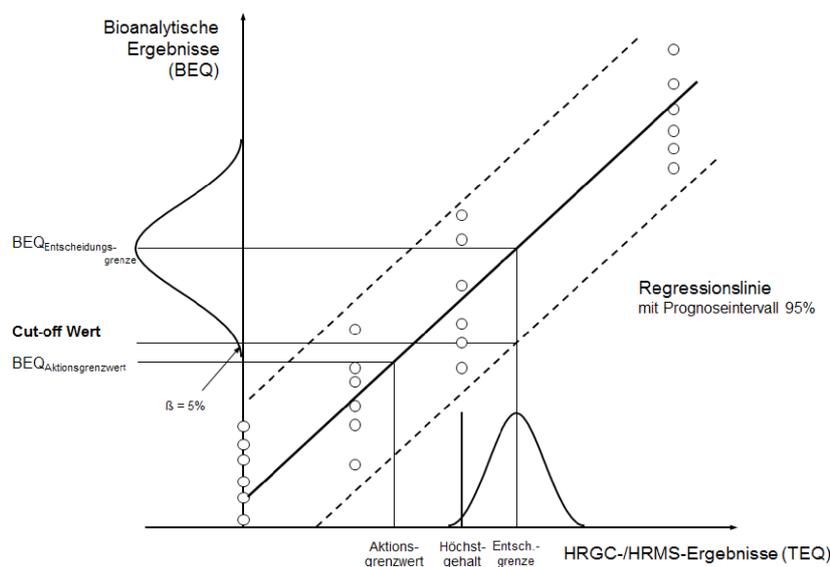
▼ **M6**

- 7.3.3. Berechnung als Mittelwert der bioanalytischen Ergebnisse (in BEQ, korrigiert um Leerwert und Wiederfindung) auf der Grundlage mehrfacher Untersuchungen ( $n \geq 6$ ) von Proben, die mit zwei Dritteln des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts kontaminiert sind, auf Grundlage der Beobachtung, dass dieser Wert in der Nähe des gemäß Nummer 7.3.1 oder 7.3.2 bestimmten Cut-off-Wertes liegt.

Berechnung der Cut-off-Werte auf der Grundlage eines Vertrauensniveaus von 95 %, was eine Falsch-negativ-Rate von  $< 5$  % impliziert, und auf Basis einer  $RSD_R < 25$  %:

1. vom *unteren* Band des 95 %igen Prognoseintervalls an der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens,
2. aus Mehrfachuntersuchungen ( $n \geq 6$ ) von Proben mit Gehalten an der Entscheidungsgrenze des Bestätigungsverfahrens, als *unterer* Endpunkt der Datenverteilung (in der Abbildung durch eine glockenförmige Kurve dargestellt) am entsprechenden BEQ-Mittelwert.

Abbildung 1



- 7.3.4. Beschränkungen der Cut-off-Werte

Auf BEQ basierende Cut-off-Werte, die anhand der im Rahmen der Validierung und unter Verwendung einer begrenzten Anzahl von Proben mit unterschiedlichen Matrix-/Kongeneren-Mustern erzielten  $RSD_R$  berechnet wurden, können höher sein als die auf TEQ basierenden Höchstgehalte oder Aktionsgrenzwerte, da hier die Präzision höher ist, als es in einer Routine möglich ist, in der ein unbekanntes Spektrum möglicher Kongeneren-Muster überprüft werden muss. In solchen Fällen ist der Berechnung der Cut-off-Werte eine  $RSD_R = 25$  % zugrunde zu legen, oder aber es sind zwei Drittel des Höchstgehalts oder des Aktionsgrenzwerts als Cut-off-Wert zu verwenden.

7.4. *Leistungsmerkmale*

- 7.4.1. Da bei bioanalytischen Methoden keine internen Standards verwendet werden können, sind Tests zur Wiederholbarkeit bioanalytischer Methoden durchzuführen, um Informationen über die Standardabweichung innerhalb einer Testreihe bzw. zwischen Testreihen zu erhalten. Die Wiederholbarkeit muss unter 20 % liegen, die laborinterne Reproduzierbarkeit unter 25 %. Grundlage dafür müssen die nach Korrektur um Blindwert und Wiederfindung als BEQ berechneten Konzentrationen sein.

**▼ M6**

- 7.4.2. Während der Validierung muss nachgewiesen werden, dass mit dem Testverfahren zwischen einer Leerprobe und einem Gehalt am Cut-off-Wert unterschieden werden kann, sodass Proben, deren Gehalt über dem entsprechenden Cut-off-Wert liegt, identifiziert werden können (siehe Nummer 7.1.2).
- 7.4.3. Die zu bestimmenden Verbindungen, mögliche auftretende Störungen und der maximal akzeptable Leerwert müssen festgelegt werden.
- 7.4.4. Die Standardabweichung in Prozent, mit der die Signalwerte oder die aus den Signalwerten berechneten Konzentrationen (nur möglich im Arbeitsbereich) behaftet sind, darf bei einer dreifachen Bestimmung eines Probenextrakts nicht mehr als 15 % betragen.
- 7.4.5. Zur Bewertung der Leistungsfähigkeit einer bioanalytischen Methode über einen konstanten Zeitraum hinweg sind die unkorrigierten Ergebnisse der Referenzprobe(n), ausgedrückt in BEQ (Leerwert und Höchstgehalt oder Aktionsgrenzwert), heranzuziehen.
- 7.4.6. Für Leerwert-Proben und für jede Art von Referenzproben sind Qualitätskontroll-Charts anzufertigen und zu prüfen, damit sichergestellt ist, dass die analytische Leistungsfähigkeit den Anforderungen genügt, insbesondere bei Leerwert-Proben im Hinblick auf den erforderlichen Mindestabstand zum unteren Ende des Arbeitsbereichs und für Referenzproben hinsichtlich der laborinternen Reproduzierbarkeit. Leerwert-Proben sind so zu prüfen, dass falsch-negative Ergebnisse bei Abzug der Werte vermieden werden.
- 7.4.7. Die Ergebnisse der in Bezug auf verdächtige Proben durchgeführten Bestätigungsverfahren und von 2 bis 10 % der konformen Proben (mindestens 20 Proben je Matrix) sind zu sammeln und zur Bewertung der Leistungsfähigkeit des Screening-Verfahrens und der Beziehung zwischen BEQ und TEQ zu verwenden. Diese Datenbank kann zur Neubewertung der Cut-off-Werte für Routineproben der validierten Matrices genutzt werden.
- 7.4.8. Die Leistungsfähigkeit eines Verfahrens kann auch durch Teilnahme an Ringversuchen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von in Ringversuchen analysierten Proben, die einen Konzentrationsbereich bis zum doppelten Höchstgehalt abdecken, können zur Bewertung der Falsch-negativ-Rate herangezogen werden, wenn ein Laboratorium seine Leistungsfähigkeit unter Beweis gestellt hat. Die Proben müssen die häufigsten Kongeneren-Muster abdecken, die verschiedene Kontaminationsquellen repräsentieren.
- 7.4.9. Bei Kontaminationsfällen können die Cut-off-Werte neu ermittelt werden, um den Besonderheiten von Matrix und Kongeneren-Muster des jeweiligen Zwischenfalls Rechnung zu tragen.

**8. Bericht über die Ergebnisse****8.1. Bestätigungsverfahren**

- 8.1.1. Die Untersuchungsergebnisse müssen die Werte der einzelnen Kongenere von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB enthalten, und die TEQ-Werte müssen als Untergrenze („lower-bound“), Obergrenze („upper-bound“) und Mittelwert („medium-bound“) gemeldet werden, damit möglichst viele Informationen in den Untersuchungsberichten enthalten sind und die Ergebnisse somit entsprechend den speziellen Anforderungen interpretiert werden können.
- 8.1.2. In dem Bericht muss das zur Extraktion der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB verwendete Verfahren genannt werden.

▼ **M6**

- 8.1.3. Die Wiederfindungsraten der einzelnen internen Standards sind zur Verfügung zu stellen, falls die Wiederfindungen außerhalb des unter Nummer 6.2.5 genannten Bereichs liegen, falls die Gehalte in den Proben den Höchstgehalt überschreiten (in diesem Fall die Wiederfindungen aus einer der beiden Untersuchungen) sowie in anderen Fällen auf Nachfrage.
- 8.1.4. Da bei der Entscheidung über die Konformität einer Probe die erweiterte Messunsicherheit zu berücksichtigen ist, ist dieser Parameter vorzulegen. Das Analyseergebnis ist als  $x \pm U$  anzugeben, wobei  $x$  das Analyseergebnis darstellt und  $U$  die erweiterte Messunsicherheit unter Verwendung eines Erweiterungsfaktors von 2, was einem Vertrauensniveau von ca. 95 % entspricht. Bei einer getrennten Bestimmung des Gehalts an PCDD/F und dioxinähnlichen PCB ist die Summe der geschätzten erweiterten Messunsicherheit der getrennten Analyseergebnisse der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB für die Berechnung der Summe der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB zu verwenden.
- 8.1.5. Die Ergebnisse sind in denselben Einheiten und mit mindestens derselben Anzahl signifikanter Stellen anzugeben wie die in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalte.
- 8.2. *Bioanalytische Screening-Verfahren*
- 8.2.1. Das Ergebnis des Screenings ist anzugeben als „konform“ oder „vermutlich nicht konform“ („verdächtig“).
- 8.2.2. Außerdem können annähernde Ergebniswerte für PCDD/F und/oder dioxinähnliche PCB in BEQ, nicht in TEQ, angegeben werden.
- 8.2.3. Proben, deren Gehalt unterhalb der Meldegrenze liegt, sind als solche zu bezeichnen. Proben, deren Gehalt „oberhalb des Arbeitsbereichs“ liegt, sind mit dieser Angabe zu melden, und der der Obergrenze des Arbeitsbereichs entsprechende Gehalt ist in BEQ anzugeben.
- 8.2.4. In dem Bericht muss für jede Art von Probenmatrix der Höchstgehalt oder der Aktionsgrenzwert genannt werden, auf dem die Bewertung beruht.
- 8.2.5. Aus dem Bericht müssen die Art des verwendeten Tests, die grundlegenden Testprinzipien und die Art der Kalibrierung hervorgehen.
- 8.2.6. In dem Bericht muss das zur Extraktion der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB verwendete Verfahren genannt werden.
- 8.2.7. Für Proben, die vermutlich nicht konform sind, muss der Bericht einen Hinweis auf die zu ergreifenden Maßnahmen enthalten. Die Konzentration von PCDD/F und der Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB in diesen Proben mit erhöhten Gehalten muss durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt/bestätigt werden.
- 8.2.8. Nicht konforme Ergebnisse werden nur gemeldet, wenn sie in einem Bestätigungsverfahren ermittelt wurden.
- 8.3. *Physikalisch-chemische Screening-Verfahren*
- 8.3.1. Das Ergebnis des Screenings ist anzugeben als „konform“ oder „vermutlich nicht konform“ („verdächtig“).
- 8.3.2. In dem Bericht muss für jede Art von Probenmatrix der Höchstgehalt oder der Aktionsgrenzwert genannt werden, auf dem die Bewertung beruht.

**▼M6**

- 8.3.3. Zudem können Werte der einzelnen Kongenere von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB sowie als Untergrenze, Obergrenze und Mittelwert gemeldete TEQ-Werte angegeben werden. Die Ergebnisse sind in denselben Einheiten und mit mindestens derselben Anzahl signifikanter Stellen anzugeben wie die in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalte.
- 8.3.4. Die Wiederfindungsraten der einzelnen internen Standards sind zur Verfügung zu stellen, falls die Wiederfindungen außerhalb des unter Nummer 6.2.5 genannten Bereichs liegen, falls die Gehalte in den Proben den Höchstgehalt überschreiten (in diesem Fall die Wiederfindungen aus einer der beiden Untersuchungen) sowie in anderen Fällen auf Nachfrage.
- 8.3.5. Aus dem Bericht muss hervorgehen, welches GC-MS-Verfahren verwendet wurde.
- 8.3.6. In dem Bericht muss das zur Extraktion der PCDD/F und dioxinähnlichen PCB verwendete Verfahren genannt werden.
- 8.3.7. Für Proben, die vermutlich nicht konform sind, muss der Bericht einen Hinweis auf die zu ergreifenden Maßnahmen enthalten. Die Konzentration von PCDD/F und der Summe von PCDD/F und dioxinähnlichen PCB in diesen Proben mit erhöhten Gehalten muss durch ein Bestätigungsverfahren ermittelt/bestätigt werden.
- 8.3.8. Ob ein Wert nicht konform ist, kann nur in einem Bestätigungsverfahren entschieden werden.

*KAPITEL III****Probenvorbereitung und Anforderungen an Untersuchungsverfahren zur amtlichen Kontrolle des Gehalts an nicht dioxinähnlichen PCB in Futtermitteln*****1. Anwendungsbereich**

Die in diesem Kapitel beschriebenen Anforderungen gelten, wenn Futtermittel zur amtlichen Kontrolle des Gehalts an nicht dioxinähnlichen PCB sowie für die Probenvorbereitung und Untersuchungsanforderungen zu anderen regulatorischen Zwecken, darunter die Kontrollen der Futtermittelunternehmer zur Gewährleistung der Vorschriftsmäßigkeit gemäß der Verordnung (EG) Nr. 183/2005, untersucht werden.

**2. Anzuwendende Nachweisverfahren**

Gaschromatografie/Elektroneneinfangdetektor (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS oder gleichwertige Verfahren.

**3. Bestimmung und Bestätigung der interessierenden Analyten**

- 3.1. Relative Retentionszeit im Verhältnis zu internen Standards oder Referenzstandards (akzeptable Abweichung  $\pm 0,25$  %).
- 3.2. Gaschromatografische Trennung der nicht dioxinähnlichen PCB von interferierenden Stoffen, insbesondere von koeluirenden PCB und insbesondere dann, wenn die Gehalte der Proben an der gesetzlichen Grenze liegen und bestätigt werden muss, dass sie nicht konform sind<sup>(1)</sup>.
- 3.3. Anforderungen an GC-MS-Techniken

Messung von mindestens der folgenden Anzahl an Molekül-Ionen oder charakteristischen Ionen des Molekül-Clusters:

- a) zwei spezifische Ionen bei HRMS;

<sup>(1)</sup> Kongenere, die oft koeluirieren, sind beispielsweise PCB 28/31, PCB 52/69 und PCB 138/163/164. Bei GC-MS-Verfahren muss auch die Möglichkeit von Störungen durch Fragmente höher chlorierter Kongenere berücksichtigt werden.

**▼ M6**

- b) drei spezifische Ionen bei LRMS,
- c) zwei spezifische Vorläufer-Ionen, jeweils mit einem spezifischen dazugehörigen Übergangsprodukt-Ion bei MS-MS.

Zulässige Höchsttoleranzen für das Isotopenhäufigkeitsverhältnis für ausgewählte Massenfragmente:

Relative Abweichung des Isotopenhäufigkeitsverhältnisses ausgewählter Massenfragmente von der theoretischen Häufigkeit oder dem Kalibrierstandard für das Zielion (das am häufigsten vorkommende Ion) und das/die Qualifizier-Ion/-en:  $\pm 15 \%$

#### 3.4. Anforderungen an GC-ECD-Techniken

Ergebnisse, die den Höchstgehalt überschreiten, sind anhand von zwei GC-Säulen mit stationären Phasen unterschiedlicher Polarität zu bestätigen.

#### 4. Nachweis der Leistungsfähigkeit des Verfahrens

Die Leistungsfähigkeit der Methode im Bereich des Höchstgehalts (0,5- bis 2facher Höchstgehalt) mit einem akzeptablen Variationskoeffizienten für wiederholte Analysen (siehe Anforderungen an die Laborpräzision unter Nummer 9) ist zu validieren.

#### 5. Bestimmungsgrenze

Die Summe der Bestimmungsgrenzen (LOQ) <sup>(1)</sup> nicht dioxinähnlicher PCB darf ein Drittel des Höchstgehalts nicht übersteigen <sup>(2)</sup>.

#### 6. Qualitätssicherung

Regelmäßige Blindkontrollen, Analysen dotierter Proben, Qualitätssicherungsproben, Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen zu relevanten Matrices.

#### 7. Kontrolle der Wiederfindungsrate

7.1. Es sind geeignete interne Standards mit physikalisch-chemikalischen Eigenschaften, die denen der interessierenden Analyten vergleichbar sind, zu verwenden.

7.2. Zugabe interner Standards:

Zugabe zu Erzeugnissen (vor Extraktion und Clean-up).

7.3. Anforderungen an Verfahren, in denen alle sechs isotoopenmarkierten Indikator-PCB-Kongenere verwendet werden:

a) Die Ergebnisse sind um die Wiederfindung interner Standards zu korrigieren;

b) Die Wiederfindung isotoopenmarkierter interner Standards muss zwischen 60 und 120 % betragen;

c) geringere oder höhere Wiederfindungsraten für einzelne Kongenere, die weniger als 10 % der Summe der nicht dioxinähnlichen PCB ausmachen, sind akzeptabel.

7.4. Anforderungen an Verfahren, in denen nicht alle sechs isotoopenmarkierten internen Standards oder andere interne Standards verwendet werden:

a) die Wiederfindung des/der internen Standards ist in jeder Probe zu überprüfen;

<sup>(1)</sup> Falls zutreffend, ist den im „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food“ ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)) beschriebenen Grundsätzen zu folgen.

<sup>(2)</sup> Ein geringerer Beitrag der Methodenleerwerte zum Kontaminationsgehalt der Probe ist äußerst empfehlenswert. Das Labor ist dafür zuständig, die Variation der Methodenleerwerte zu überwachen, insbesondere, wenn die Methodenleerwerte abgezogen werden.

**▼ M6**

- b) die Wiederfindungen des/der internen Standard(s) müssen zwischen 60 und 120 % betragen;
- c) die Ergebnisse sind um die Wiederfindungen interner Standards zu korrigieren.

7.5. Die Wiederfindungen nicht markierter Kongenere sind mittels dotierter Proben oder Qualitätskontrollproben mit Konzentrationen im Bereich des Höchstgehalts zu prüfen. Für diese Kongenere sind Wiederfindungsraten zwischen 60 und 120 % akzeptabel.

#### 8. Anforderungen an Laboratorien

Gemäß den Bestimmungen der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 müssen die Laboratorien von einer anerkannten Stelle akkreditiert sein, die nach ISO Guide 58 arbeitet, damit sichergestellt ist, dass die Laboratorien bei der Untersuchung Qualitätssicherungsverfahren anwenden. Die Laboratorien müssen gemäß der Norm EN ISO/IEC 17025 akkreditiert sein. Zudem ist den in den technischen Leitlinien für die Schätzung der Messunsicherheit und der Bestimmungsgrenzen für die Untersuchung auf PCB beschriebenen Grundsätzen — falls zutreffend — zu folgen <sup>(1)</sup>.

#### 9. Leistungsmerkmale: Kriterien für die Summe der nicht dioxinähnlichen PCB im Bereich des Höchstgehalts:

	Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie <sup>(1)</sup>	Andere Techniken
Richtigkeit	– 20 bis + 20 %	– 30 bis + 30 %
Laborpräzision (RSD%)	≤ 15 %	≤ 20 %
Differenz zwischen berechneter Obergrenze („upper-bound“) und Untergrenze („lower-bound“)	≤ 20 %	≤ 20 %

<sup>(1)</sup> Alle sechs <sup>13</sup>C-markierten Analoga müssen als interne Standards verwendet werden.

#### 10. Bericht über die Ergebnisse

- 10.1. Die Untersuchungsergebnisse müssen die Werte der einzelnen nicht dioxinähnlichen PCB und der Summe solcher PCB-Kongenere enthalten, angegeben als Untergrenze („lower-bound“), Obergrenze („upper-bound“) und Mittelwert („medium-bound“), damit möglichst viele Informationen in den Untersuchungsberichten enthalten sind und die Ergebnisse somit entsprechend den speziellen Anforderungen interpretiert werden können.
- 10.2. In dem Bericht muss das zur Extraktion der PCB verwendete Verfahren genannt werden.
- 10.3. Die Wiederfindungsraten der einzelnen internen Standards sind zur Verfügung zu stellen, falls die Wiederfindungen außerhalb des unter Nummer 7 genannten Bereichs liegen, falls die Gehalte in den Proben den Höchstgehalt überschreiten sowie in anderen Fällen auf Nachfrage.
- 10.4. Da bei der Entscheidung über die Konformität einer Probe die erweiterte Messunsicherheit zu berücksichtigen ist, ist dieser Parameter ebenfalls vorzulegen. Das Analyseergebnis ist als  $x \pm U$  anzugeben, wobei  $x$  das Analyseergebnis darstellt und  $U$  die erweiterte Messunsicherheit unter Verwendung eines Erweiterungsfaktors von 2, was einem Vertrauensniveau von ca. 95 % entspricht.
- 10.5. Die Ergebnisse sind in denselben Einheiten und mit mindestens derselben Anzahl signifikanter Stellen anzugeben wie die in der Richtlinie 2002/32/EG festgelegten Höchstgehalte.

<sup>(1)</sup> Die derzeitigen Anforderungen basieren auf den in M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223-241 (2006) veröffentlichten TEF.

▼ **M2**

## ANHANG VI

ANALYSEMETHODEN ZUR BESTIMMUNG DER BESTANDTEILE  
TIERISCHEN URSPRUNGS BEI DER AMTLICHEN UNTERSUCHUNG  
VON FUTTERMITTELN▼ **M8**

## 1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Die Bestimmung von Bestandteilen tierischen Ursprungs in Futtermitteln wird nach den Bestimmungen dieses Anhangs mithilfe der Lichtmikroskopie oder der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vorgenommen.

Mit diesen beiden Methoden können Bestandteile tierischen Ursprungs in Vormischungen, Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln nachgewiesen werden. Die Berechnung der Menge solcher Bestandteile in Vormischungen, Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln ist mit ihnen jedoch nicht möglich. Bei beiden Methoden liegt die Nachweisgrenze unter 0,1 % (m/m).

Mit der PCR-Methode lässt sich die taxonomische Gruppe der in Vormischungen, Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln vorhandenen Bestandteile tierischen Ursprungs ermitteln.

Die Methoden werden eingesetzt, um die Anwendung der Verbote gemäß Artikel 7 Absatz 1 der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates<sup>(1)</sup>, Anhang IV der genannten Verordnung sowie Artikel 11 Absatz 1 der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates<sup>(2)</sup> zu überwachen.

Abhängig von der Art des zu untersuchenden Futtermittels können diese Methoden für eine Untersuchung entweder einzeln oder kombiniert nach der Standardarbeitsanweisung (SOP) angewandt werden, die das EU-Referenzlabor für tierische Proteine in Futtermitteln (EURL-AP) erstellt und auf seiner Website<sup>(3)</sup> veröffentlicht hat.

▼ **M2**

## 2. METHODEN

▼ **M8**2.1. **Lichtmikroskopie**2.1.1. *Grundsatz*

Die Bestandteile tierischen Ursprungs, die in zur Analyse versandten Vormischungen, Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln vorhanden sein können, werden anhand charakteristischer und mikroskopisch erkennbarer Merkmale, zum Beispiel Muskelfasern und andere Fleischpartikel, Knorpel, Knochen, Horn, Haare, Borsten, kutikuläre Fragmente von Wirbellosen, tracheale Strukturen von Insekten, Blutprodukte, Milchkügelchen, Laktosekristalle, Federn, Eierschalen, Gräten und Schuppen identifiziert.

<sup>(1)</sup> Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien (ABl. L 147 vom 31.5.2001, S. 1).

<sup>(2)</sup> Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (Verordnung über tierische Nebenprodukte) (ABl. L 300 vom 14.11.2009, S. 1).

<sup>(3)</sup> <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>

**▼ M8**

Mikroskopische Untersuchungen werden nach Vorbereitung der Proben mittels Sedimentation durchgeführt.

Die Proben durchlaufen eine Sedimentationsphase wie folgt:

- a) zum Nachweis anderer Bestandteile tierischen Ursprungs als von wirbellosen Landtieren: eine einmalige Sedimentation mit Tetrachlorethylen (TCE) gemäß der Beschreibung unter Nummer 2.1.3.4.3;
- b) zum Nachweis von Bestandteilen wirbelloser Landtiere: eine zweimalige Sedimentation mit Petrolether/Tetrachlorethylen (PE/TCE) gemäß der Beschreibung unter Nummer 2.1.3.4.4.

## 2.1.2. Reagenzien und Geräte

### 2.1.2.1. Reagenzien

#### 2.1.2.1.1. Konzentrationsmittel

- Tetrachlorethylen (Dichte 1,62).
- Petrolether (PE), Siedepunkt 40-60 °C (Dichte 0,65)

#### 2.1.2.1.2. Nachweisreagenz

- Alizarinrot-Lösung (2,5 ml 1 M Salzsäure in 100 ml Wasser lösen und dieser Lösung 200 mg Alizarinrot zufügen)

#### 2.1.2.1.3. Einbettungsmedien

- Lauge (NaOH, Massenkonzentration = 2,5 %, oder KOH, Massenkonzentration = 2,5 %)
- Glycerin (unverdünnt, Viskosität: 1 490 cP) oder ein Einbettungsmedium mit gleichwertigen Eigenschaften für Nicht-Dauerpräparate
- Norland ® Optical Adhesive 65 (Viskosität: 1 200 cP) oder ein Harz mit gleichwertigen Eigenschaften für Dauerpräparate

#### 2.1.2.1.4. Färbende Einbettungsmedien

- Lugolsche Lösung (2 g Kaliumiodid in 100 ml Wasser lösen und unter häufigem Schütteln 1 g Iod zufügen)
- Cystin-Reagenz (2 g Bleiacetat, 10 g NaOH/100 ml Wasser)
- Fehlingsche Lösung (vor Gebrauch aus äquivalenten Teilen zweier Stammlösungen A und B zubereitet. Lösung A: 6,9 g Kupfer(II)-sulfatpentahydrat in 100 ml Wasser lösen. Lösung B: 34,6 g Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat und 12 g NaOH in 100 ml Wasser lösen)
- Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxid (1 g 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in 100 ml Eisessig und 150 ml Wasser lösen. Vor Gebrauch 4 Teile dieser TMB-Lösung mit 1 Teil 3%igem Wasserstoffperoxid mischen)

#### 2.1.2.1.5. Spülmittel

- Ethanol  $\geq$  96 % (technische Qualität)
- Aceton (technische Qualität)

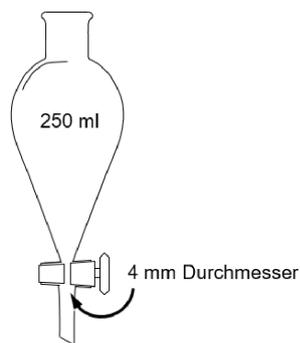
#### 2.1.2.1.6. Bleichmittel

- Handelsübliche Natriumhypochlorit-Lösung (9-14 % aktives Chlor)

▼ **M8**

## 2.1.2.2. Geräte

- Analysenwaage mit einer Genauigkeit von 0,001 g
- Zerkleinerungsgeräte: Messer oder Rotormühle. Wird eine Rotormühle verwendet, so sind Siebe von  $\leq 0,5$  mm verboten.
- Siebe mit rechteckigen Maschen von 0,25 und 1 mm Weite. Außer für das Vorsieben der Proben darf der Durchmesser der Siebe höchstens 10 cm betragen, um Materialverluste zu vermeiden. Die Kalibrierung der Siebe ist nicht erforderlich.
- Gläserner Scheidetrichter von 250 ml mit konischem Boden, unten verschlossen mit einem Absperrhahn aus Teflon oder Schliffglas. Öffnung im Absperrhahn  $\geq 4$  mm Durchmesser. Alternativ kann — nur für eine einmalige Sedimentation mit TCE — auch ein Absetzbecher mit konischem Boden verwendet werden, wenn das Labor bewiesen hat, dass die Nachweisgrenzen denjenigen bei Verwendung des Scheidetrichters gleichwertig sind.

*Scheidetrichter*

- Stereo-Auflicht-Mikroskop mit mindestens 6,5- bis 40-facher Vergrößerung
- Zusammengesetztes Mikroskop mit mindestens 100- bis 400-facher Vergrößerung, mit Hellfeld-Durchlicht. Zusätzlich können auch Verfahren mit polarisiertem Licht und Differenzial-Interferenzkontrast eingesetzt werden.
- Standardmäßige Laborglasausrüstung
- Ausrüstung für die Objektträgervorbereitung: herkömmliche Objektträger, Hohlschliff-Objektträger, Deckgläser (20 × 20 mm), Pinzette, feiner Spatel
- Laborofen
- Zentrifuge
- Filterpapier: qualitativer Zellulosefilter (Porengröße 4-11  $\mu\text{m}$ )

2.1.3. *Probenahme und Probenvorbereitung*

## 2.1.3.1. Probenahme

Untersucht wird eine repräsentative Probe, die gemäß Anhang I entnommen wurde.

**▼ M8**

- 2.1.3.1.1. Trocknung der Proben  
Proben mit einem Feuchtigkeitsgehalt > 14 % werden vor Gebrauch gemäß Anhang III getrocknet.
- 2.1.3.1.2. Vorsieben der Proben  
Um Informationen über eine mögliche Verunreinigung der Futtermittel durch die Umwelt (Umweltkontamination) zu erhalten, wird empfohlen, pelletierte Futtermittel und Kerne bis zu einer Größe von 1 mm vorzusieben und die beiden Fraktionen, die als unterschiedliche Proben zu betrachten sind, dann getrennt zu präparieren, zu untersuchen und zu melden.
- 2.1.3.2. Vorsichtsmaßnahmen  
Um eine Kreuzkontamination im Labor zu vermeiden, sind sämtliche wiederverwendbaren Geräte vor Gebrauch sorgfältig zu reinigen. Scheidetrichter werden vor dem Reinigen in ihre Einzelteile zerlegt. Glas- und sonstige Teile der Scheidetrichter werden von Hand vorgewaschen und dann in der Spülmaschine gewaschen. Siebe sind mit einer Bürste mit steifen Synthetikborsten zu reinigen. Nach dem Sieben von fetthaltigem Material wie Fischmehl ist eine abschließende Reinigung der Siebe mit Aceton und Druckluft zu empfehlen.
- 2.1.3.3. Vorbereitung von Proben aus Fett oder Öl  
Für die Vorbereitung von Proben aus Fett gilt folgender Ablauf:
- Handelt es sich um festes Fett, so wird es in einem Ofen erhitzt, bis es flüssig ist;
  - der Probe werden mittels einer Pipette am Boden 40 ml Fett entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben;
  - die Probe wird 10 Minuten bei 4 000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert;
  - ist das Fett nach dem Zentrifugieren fest, so wird es in einem Ofen erhitzt, bis es flüssig ist;
  - die Probe wird erneut 5 Minuten bei 4 000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert;
  - mithilfe eines kleinen Löffels oder eines Spatels wird eine Hälfte der abgossenen Verunreinigungen zur mikroskopischen Untersuchung auf Objektträger aufgebracht; als Einbettungsmedium wird Glycerin empfohlen;
  - der Rest der Verunreinigungen wird zur Vorbereitung des Sediments nach der Beschreibung unter Nummer 2.1.3.4.3, erster Gedankenstrich, verwendet.
- Derselbe Untersuchungsablauf — mit Ausnahme des ersten und des vierten Gedankenstrichs — ist bei der Vorbereitung von Proben aus Öl zu befolgen.
- 2.1.3.4. Vorbereitung anderer Proben als Fett oder Öl
- 2.1.3.4.1. Herstellung von Teilproben und Zerkleinern: Von mindestens 50 g der Probe werden Teilproben für die Untersuchung hergestellt und anschließend zerkleinert.
- 2.1.3.4.2. Vorbereitung von Ausgangsmaterial: Eine Menge von mindestens 5 g der zerkleinerten Teilprobe ist zu präparieren. Das Material wird auf eine Partikelgröße von 0,25 mm heruntergesiebt; beide Fraktionen werden untersucht.

**▼ M8**

## 2.1.3.4.3. Einmalige Sedimentation mit TCE zum Nachweis anderer Bestandteile tierischen Ursprungs als von wirbellosen Landtieren.

## — Extraktion und Vorbereitung des Sediments:

10 g (bis auf 0,01 g genau) der zerkleinerten Teilprobe werden in den Scheidetrichter bzw. Absetzbecher mit konischem Boden gegeben und mit 50 ml TCE ergänzt. Bei Fischmehl oder anderen reinen tierischen Erzeugnissen, mineralischen Zutaten oder Vormischungen mit mehr als 10 % Sediment wird nur eine Menge von 3 g in den Trichter gegeben. Das Gemisch mindestens 30 s lang kräftig schütteln; dann vorsichtig mindestens 50 ml TCE hinzugeben, wobei darauf zu achten ist, dass von der Innenwand des Trichters sämtliche anhaftenden Partikel abgespült werden. Die entstandene Lösung mindestens 5 min stehen lassen und dann das Sediment durch Öffnen des Absperrhahns abscheiden.

Bei Gebrauch eines Absetzbeckers mit konischem Boden das Gemisch mindestens 15 s kräftig schütteln; an der Innenseite des Bechers haftende Partikel mit mindestens 10 ml reinem TCE sorgfältig in das Gefäß hineinspülen. Die Lösung 3 min stehen lassen und wieder 15 s schütteln; noch an der Innenseite des Bechers haftende Partikel mit mindestens 10 ml reinem TCE sorgfältig hineinspülen. Die entstandene Lösung mindestens 5 min stehen lassen; dann die flüssige Fraktion durch vorsichtiges Abgießen trennen und beseitigen, wobei das Sediment vollständig erhalten bleiben muss.

Das Sediment wird auf einem in einen Trichter eingelegten Filterpapier aufgefangen, damit das verbleibende TCE getrennt werden kann, ohne dass sich Fett in das Sediment ablagert. Das Sediment wird getrocknet. Es wird empfohlen, das Sediment anschließend (auf 0,001 g genau) auszuwiegen, um die Sedimentationsphase zu kontrollieren. Schließlich wird das Sediment auf eine Partikelgröße von 0,25 mm heruntergesiebt und beide Fraktionen werden untersucht, es sei denn, das Sieben wird nicht für notwendig erachtet.

## — Extraktion und Vorbereitung des Flotats:

Nach Erhalt des Sediments mit der oben beschriebenen Methode müssen zwei Phasen im Scheidetrichter verbleiben: eine aus TCE bestehende flüssige Phase und eine aus aufschwimmendem Material bestehende feste Phase. Diese feste Phase ist das Flotat, das gewonnen wird, indem man das TCE durch Öffnen des Absperrhahns vollständig ablaufen lässt. Das Flotat wird aus dem Scheidetrichter in eine große Petrischale gekippt und im Abzug luftgetrocknet. Es wird auf eine Partikelgröße von 0,25 mm heruntergesiebt, und beide Fraktionen werden untersucht.

## — Gebrauch von Nachweisreagenzien:

Zur korrekten Bestimmung der Bestandteile tierischen Ursprungs kann der Untersuchende bei der Probenvorbereitung Färbereagenzien verwenden, wie vom EURL-AP in den auf seiner Website veröffentlichten Leitlinien beschrieben.

▼ **M8**

Bei Verwendung von Alizarinrot-Lösung zum Färben des Sediments gilt folgender Ablauf:

- Das getrocknete Sediment in ein Reagenzglas füllen und 2-mal mit etwa 5 ml Ethanol spülen (jedes Mal 30 s durchmischen, nach etwa 1 min 30 s Absetzzeit wird das Lösungsmittel abgegossen).
- Das Sediment durch Zusatz von mindestens 1 ml Natriumhypochloritlösung bleichen. 10 min reagieren lassen. Danach das Reagenzglas mit Wasser füllen, nach einer Absetzzeit des Sediments von 2-3 min das Wasser und die suspendierten Partikel vorsichtig abschütten.
- Das Sediment noch 2-mal mit etwa 10 ml Wasser spülen (30 s durchmischen, absetzen lassen und das Wasser jedes Mal abgießen).
- 2 bis 10 Tropfen Alizarinrot-Lösung hinzugeben und durchmischen. 30 s reagieren lassen, dann das gefärbte Sediment 2-mal mit etwa 5 ml Ethanol und einmal mit Aceton spülen (jedes Mal 30 s durchmischen, die Lösung etwa 1 min absetzen lassen und abgießen).
- Das gefärbte Sediment trocknen.

#### 2.1.3.4.4. Zweimalige Sedimentation mit PE/TCE zum Nachweis von Bestandteilen wirbelloser Landtiere

Alle Phasen müssen in einem gläsernen Scheidetrichter von 250 ml mit konischem Boden stattfinden, wie unter Nummer 2.1.2.2 vierter Gedankenstrich beschrieben.

- 10 g (bis auf 0,01 g genau) der zerkleinerten Teilprobe werden in den Scheidetrichter gegeben und zunächst einer einmaligen Sedimentation mit TCE gemäß der Beschreibung unter Nummer 2.1.3.4.3 unterzogen; das Sediment wird auf einem auf einen Trichter gelegten Filterpapier aufgefangen. Dieses Sediment kann so verwendet werden wie das gemäß der Beschreibung unter Nummer 2.1.3.4.3 gewonnene Sediment.
- Die zusammen mit dem Sediment abgeschiedene geringe Menge an TCE wird in einen Messzylinder gegeben. Durch Öffnen des Absperrhahns des Scheidetrichters muss der Messzylinder weiter gefüllt werden, bis eine Menge von 30 ml TCE erreicht ist. Nach Erreichen dieser Menge wird der Absperrhahn geschlossen.
- Diese TCE-Menge wird durch Zugabe von 30 ml Petrolether, Siedepunkt 40-60 °C, in den Scheidetrichter ergänzt. Der Inhalt des Scheidetrichters wird gründlich gemischt, um ein Gemisch von 30 % PE/70 % TCE (mit einer Dichte von etwa 1,26 g/cm<sup>3</sup>) zu erhalten. 10 min absetzen lassen. Es entstehen zwei neue Fraktionen: ein zweites Sediment und ein endgültiges Flotat (< 1,26 g/cm<sup>3</sup>). Das zweite Sediment wird in einer Petrischale (oder auf einem auf einen Trichter gelegten Filterpapier) aufgefangen, indem der Absperrhahn geöffnet wird, bis nur noch eine geringe Menge des Lösungsgemischs und das endgültige Flotat im Scheidetrichter verbleiben. Die übrige Flüssigkeit und das endgültige Flotat sind getrennt auf einem auf einen Trichter gelegten Filterpapier aufzufangen. Die Innenwand des Scheidetrichters wird mit PE abgespült, um das gesamte Material aus dem endgültigen Flotat aufzufangen. Das endgültige Flotat trocknen lassen. Anschließend wird das endgültige Flotat auf eine Partikelgröße von 0,25 mm heruntergesiebt und beide Fraktionen werden im Hinblick auf den Nachweis von Bestandteilen wirbelloser Landtiere untersucht, es sei denn, das Sieben wird nicht für notwendig erachtet.

▼ **M8**2.1.4. *Mikroskopische Untersuchung*

## 2.1.4.1. Vorbereitung der Objektträger

Von dem Sediment und, je nach Präferenz des Untersuchenden, von dem Flotat oder dem Ausgangsmaterial werden Objektträger präpariert. Gegebenenfalls sind — ausschließlich zum Nachweis von Bestandteilen wirbelloser Landtiere — auch Objektträger von dem gemäß der Beschreibung unter Nummer 2.1.3.4.4 gewonnenen endgültigen Flotat zu präparieren. Die beiden entstandenen Fraktionen (fein und grob) werden präpariert. Die zur Untersuchung auf die Träger gestrichenen Teile der Fraktionen sind repräsentativ für die gesamte Fraktion.

Die Zahl der präparierten Träger muss ausreichen, damit ein kompletter Untersuchungsablauf nach Nummer 2.1.4.2 ausgeführt werden kann.

Die Objektträger werden nach der vom EURL-AP ausgearbeiteten und auf seiner Website veröffentlichten SOP mit dem passenden Einbettungsmedium eingedeckt. Auf den Trägern werden Deckgläser platziert.

## 2.1.4.2. Untersuchungsablaufplan für den Nachweis tierischer Partikel in Mischfuttermitteln, Einzelfuttermitteln und Vormischungen

Die präparierten Objektträger werden gemäß den Untersuchungsablaufplänen in den Abbildungen 1 und 2 untersucht.

Die mikroskopische Untersuchung des Sediments und, je nach Präferenz des Untersuchenden, des Flotats oder des Ausgangsmaterials wird mit dem zusammengesetzten Mikroskop durchgeführt. Im Fall des Nachweises von Bestandteilen wirbelloser Landtiere sind zusätzlich mikroskopische Untersuchungen des gemäß der Beschreibung unter Nummer 2.1.3.4.4 entsprechend Abbildung 3 gewonnenen endgültigen Flotats durchzuführen. Für die groben Fraktionen kann zusätzlich auch ein Stereomikroskop verwendet werden. Jedes Präparat wird mit unterschiedlicher Vergrößerung vollständig abgesucht. Genaue Erläuterungen zur Verwendung der Ablaufpläne sind in einer SOP enthalten, die das EURL-AP erstellt und auf seiner Website veröffentlicht hat.

In jedem Schritt des Untersuchungsablaufplans ist die festgelegte Mindestzahl von Präparaten zu untersuchen, es sei denn, das gesamte Material der Fraktion reicht dafür nicht aus, beispielsweise wenn kein Sediment erzielt wird. Bei jeder Bestimmung werden höchstens 6 Präparate zur Aufzeichnung der Partikelzahl untersucht.

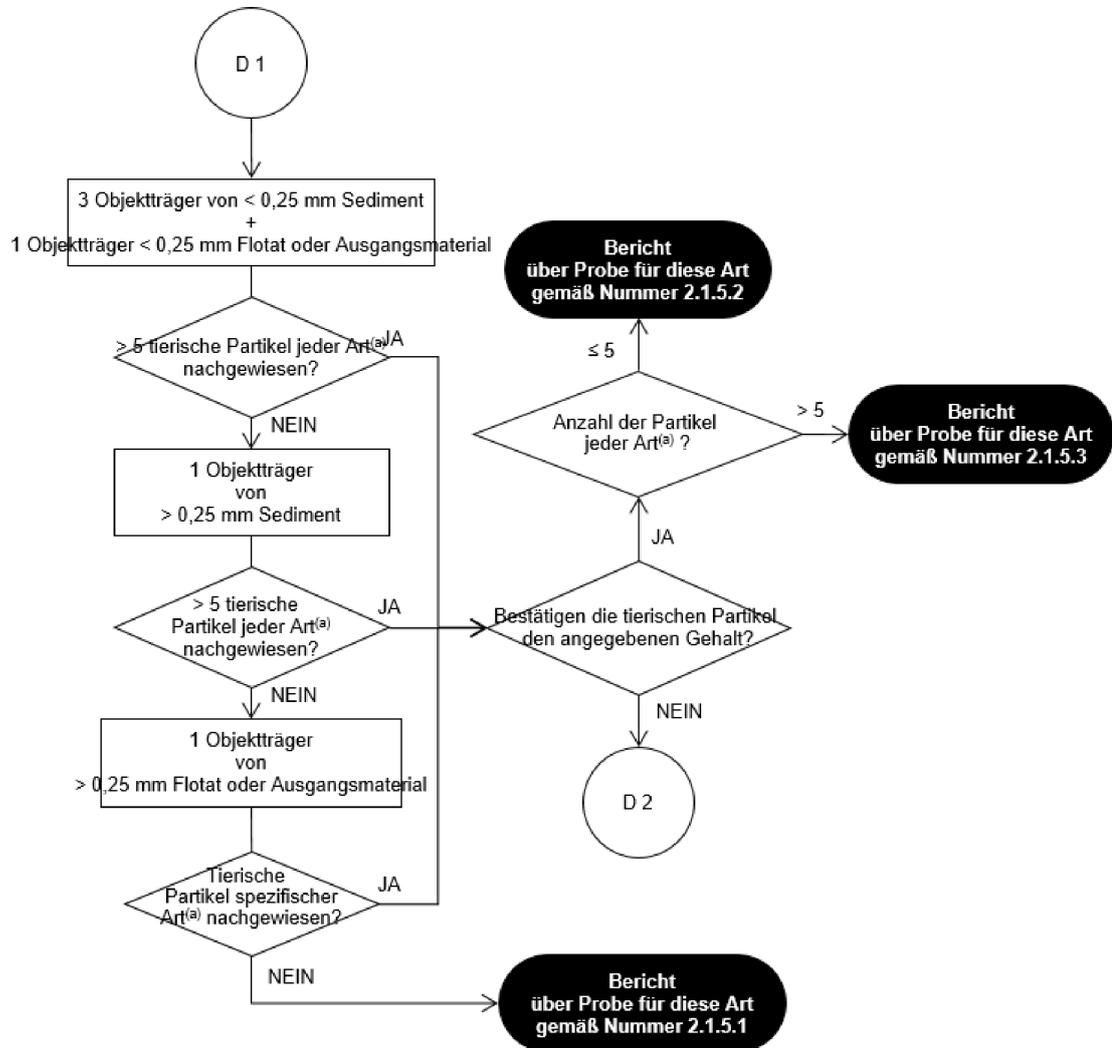
Werden von dem Flotat oder dem Ausgangsmaterial zusätzliche Objektträger mit einem spezifischeren färbenden Einbettungsmedium gemäß Nummer 2.1.2.1.4 präpariert, um Strukturen (z. B. Federn, Haare, Muskel- oder Blutpartikel) näher zu charakterisieren, die auf mit anderen Einbettungsmedien gemäß Nummer 2.1.2.1.3 präparierten Objektträgern nachgewiesen wurden, so wird die Anzahl der Partikel auf der Grundlage einer Anzahl von höchstens 6 Objektträgern pro Bestimmung gezählt, einschließlich der zusätzlichen Objektträger mit einem spezifischeren Einbettungsmedium. Die zusätzlichen von dem gemäß der Beschreibung unter Nummer 2.1.3.4.4 gewonnenen endgültigen Flotat präparierten Objektträger zum Nachweis von Bestandteilen wirbelloser Landtiere werden für die Bestimmung anderer Arten (Landwirbeltiere und Fische) nicht berücksichtigt.

Für die Bestimmung von Art und Ursprung der Partikel kann der Untersuchende Hilfsinstrumente wie Systeme zur Unterstützung der Entscheidungsfindung, Bildarchive und Referenzproben hinzuziehen.

## ▼ M8

Abbildung 1

Untersuchungsablaufplan nach einmaliger Sedimentation mit TCE für den Nachweis anderer tierischer Partikel als von wirbellosen Landtieren in Mischfuttermitteln, Einzelfuttermitteln und Vormischungen (erste Bestimmung)

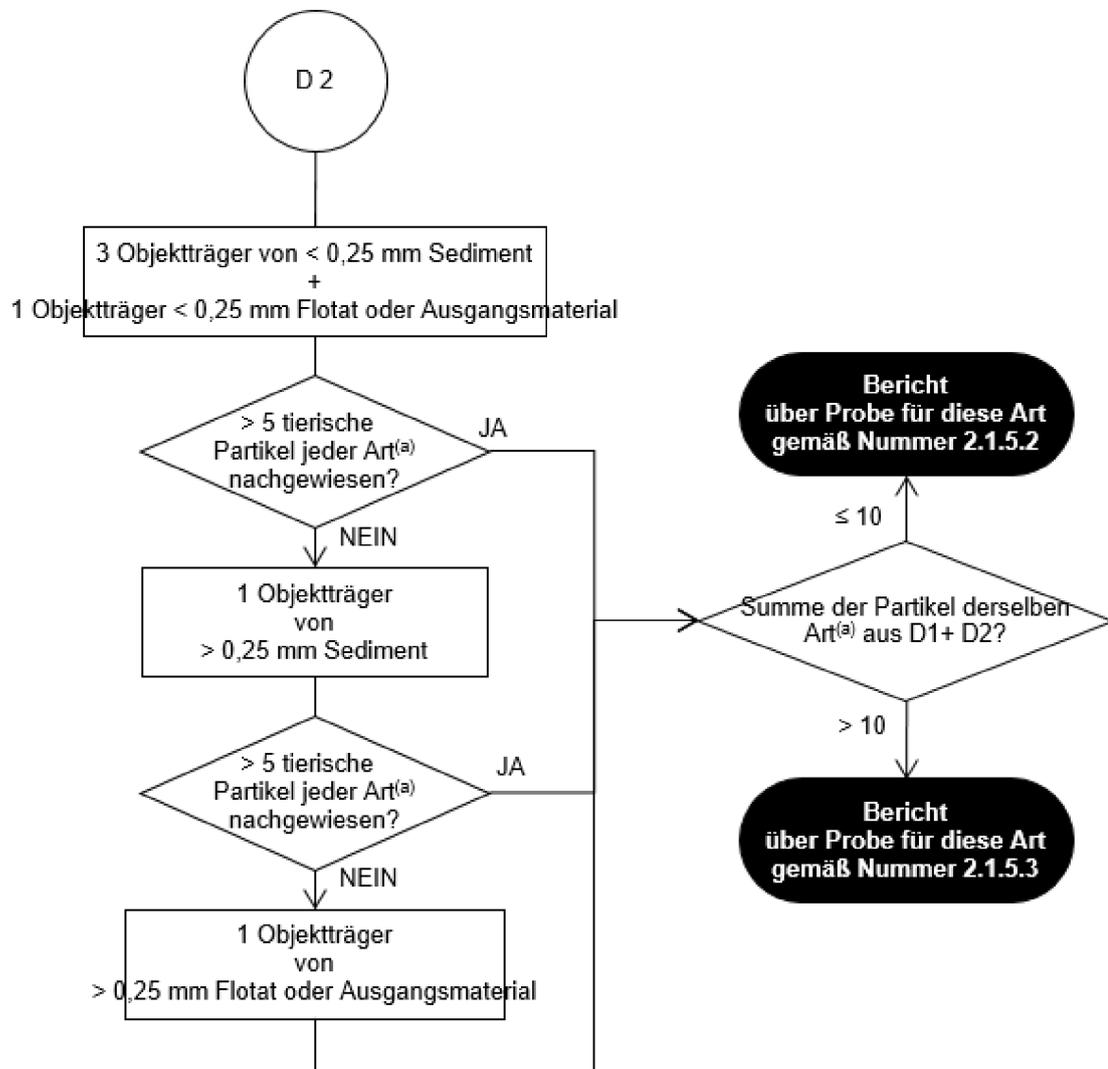


(D1 und D2 beziehen sich jeweils auf die erste und auf die zweite Bestimmung; <sup>(a)</sup>: Landwirbeltiere, Fische)

▼ M8

Abbildung 2

Untersuchungsablaufplan nach einmaliger Sedimentation mit TCE für den Nachweis anderer tierischer Partikel als von wirbellosen Landtieren in Mischfuttermitteln, Einzelfuttermitteln und Vormischungen (zweite Bestimmung)

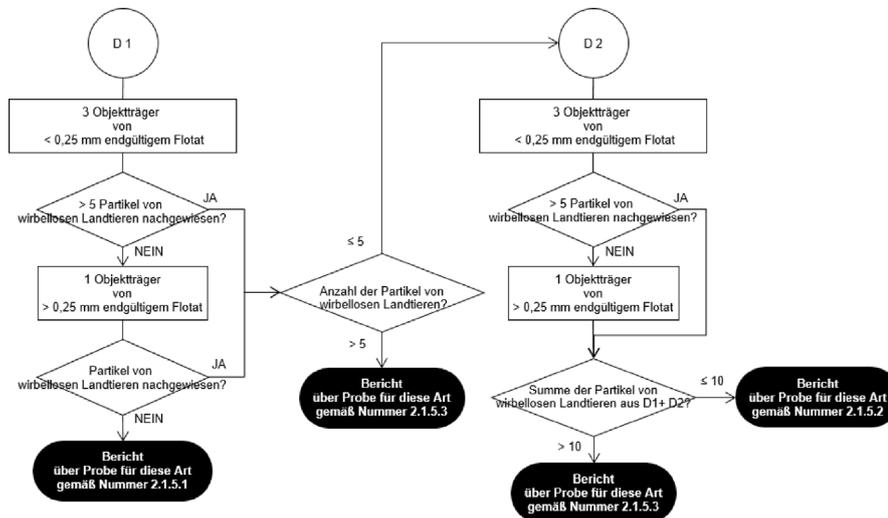


(D1 und D2 beziehen sich jeweils auf die erste und auf die zweite Bestimmung; (a): Landwirbeltiere, Fische)

## ▼ M8

Abbildung 3

**Untersuchungsablaufplan nach zweimaliger Sedimentation mit PE/TCE für den Nachweis von Bestandteilen wirbelloser Landtiere in Mischfuttermitteln, Einzelfuttermitteln und Vormischungen**



(D1 und D2 beziehen sich jeweils auf die erste und auf die zweite Bestimmung)

#### 2.1.4.3. Anzahl der Bestimmungen

Die Bestimmungen sind mit verschiedenen Teilproben von jeweils 50 g durchzuführen.

Werden bei der ersten Bestimmung gemäß dem Untersuchungsablaufplan in Abbildung 1 bzw. Abbildung 3 keine tierischen Partikel nachgewiesen, so ist keine weitere Bestimmung erforderlich, und über das Ergebnis der Analyse wird unter Verwendung der Formulierung in Nummer 2.1.5.1 berichtet.

Werden bei der ersten Bestimmung gemäß dem Untersuchungsablaufplan in Abbildung 1 ein oder mehrere tierische Partikel spezifischer Art (d. h. von Landwirbeltieren oder Fischen) nachgewiesen und bestätigt die Art der gefundenen Partikel den für die Probe angegebenen Gehalt, so ist keine zweite Bestimmung erforderlich. Liegt bei der ersten Bestimmung die Anzahl der nachgewiesenen tierischen Partikel spezifischer Art über 5, so wird über das Ergebnis der Analyse pro Art der Tiere unter Verwendung der Formulierung in Nummer 2.1.5.3 berichtet. Andernfalls wird über das Ergebnis der Analyse pro Art der Tiere unter Verwendung der Formulierung in Nummer 2.1.5.2 berichtet.

Werden bei der ersten Bestimmung gemäß dem Untersuchungsablaufplan in Abbildung 3 mehr als 5 Partikel wirbelloser Landtiere nachgewiesen, so ist keine zweite Bestimmung erforderlich, und über das Ergebnis der Analyse für diese Art wird unter Verwendung der Formulierung in Nummer 2.1.5.3 berichtet.

▼ **M8**

In allen anderen Fällen, einschließlich wenn dem Labor keine Angabe zum Gehalt vorgelegt wurde, wird eine zweite Bestimmung mit einer neuen Teilprobe durchgeführt. Liegt nach der zweiten Bestimmung gemäß dem Untersuchungsablaufplan in Abbildung 2 bzw. Abbildung 3 die Summe der in den zwei Durchgängen nachgewiesenen tierischen Partikel spezifischer Art über 10, so wird über das Ergebnis der Analyse pro Art der Tiere unter Verwendung der Formulierung in Nummer 2.1.5.3 berichtet. Andernfalls wird über das Ergebnis der Analyse pro Art der Tiere unter Verwendung der Formulierung in Nummer 2.1.5.2 berichtet.

2.1.5. *Formulierung der Ergebnisse*

In seinem Bericht über die Ergebnisse gibt das Labor an, welche Art von Material (Sediment, Flotat, endgültiges Flotat oder Ausgangsmaterial) analysiert wurde. Aus dem Bericht muss eindeutig hervorgehen, wie viele Bestimmungen durchgeführt wurden und ob die Fraktionen vor der Vorbereitung der Objektträger nicht gemäß Nummer 2.1.3.4.3 erster Gedankenstrich dritter Absatz oder Nummer 2.1.3.4.4 dritter Gedankenstrich gesiebt wurden.

Der Laborbericht enthält zumindest Informationen über das Vorhandensein von Bestandteilen, die von Landwirbeltieren und von Fischen stammen.

Die verschiedenen Fälle werden wie folgt dargestellt:

## 2.1.5.1. Kein tierisches Partikel spezifischer Art nachgewiesen:

- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurde in der vorliegenden Probe kein Partikel von Landwirbeltieren nachgewiesen.“
- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurde in der vorliegenden Probe kein Partikel von Fischen nachgewiesen.“
- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurde in der vorliegenden Probe kein Partikel von wirbellosen Landtieren nachgewiesen.“

## 2.1.5.2. Zwischen 1 und 5 tierische Partikel spezifischer Art nachgewiesen, wenn nur eine Bestimmung durchgeführt wurde, oder zwischen 1 und 10 Partikel spezifischer Art nachgewiesen, wenn zwei Bestimmungen durchgeführt wurden (die Anzahl der festgestellten Partikel liegt unter der Entscheidungsgrenze, die in den SOP des EURL-AP festgelegt und auf seiner Website veröffentlicht wurde):

Wenn nur eine Bestimmung durchgeführt wurde:

- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurden in der vorliegenden Probe nicht mehr als 5 Partikel von Landwirbeltieren nachgewiesen. Die Partikel wurden als ... [Knochen, Knorpel, Muskelgewebe, Haare, Horn, Sonstiges (bitte angeben)] erkannt. Diese geringe Zahl liegt unter der für diese mikroskopische Methode festgelegten Entscheidungsgrenze.“
- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurden in der vorliegenden Probe nicht mehr als 5 Partikel von Fischen nachgewiesen. Die Partikel wurden als ... [Gräten, Schuppen, Knorpel, Muskelgewebe, Otolith, Kiemen, Sonstiges (bitte angeben)] erkannt. Diese geringe Zahl liegt unter der für diese mikroskopische Methode festgelegten Entscheidungsgrenze.“

▼ **M8**

Wenn zwei Bestimmungen durchgeführt wurden:

- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurden in der vorliegenden Probe in den zwei Durchgängen nicht mehr als 10 Partikel von Landwirbeltieren nachgewiesen. Die Partikel wurden als ... [Knochen, Knorpel, Muskelgewebe, Haare, Horn, Sonstiges (bitte angeben)] erkannt. Diese geringe Zahl liegt unter der für diese mikroskopische Methode festgelegten Entscheidungsgrenze.“
- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurden in der vorliegenden Probe in den zwei Durchgängen nicht mehr als 10 Partikel von Fischen nachgewiesen. Die Partikel wurden als ... [Gräten, Schuppen, Knorpel, Muskelgewebe, Otolith, Kiemen, Sonstiges (bitte angeben)] erkannt. Diese geringe Zahl liegt unter der für diese mikroskopische Methode festgelegten Entscheidungsgrenze.“
- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurden in der vorliegenden Probe in den zwei Durchgängen nicht mehr als 10 Partikel von wirbellosen Landtieren nachgewiesen. Die Partikel wurden als ... [kutikuläre Fragmente, Mundwerkzeuge, Muskeln, tracheale Strukturen, Sonstiges (bitte angeben)] erkannt. Diese geringe Zahl liegt unter der für diese mikroskopische Methode festgelegten Entscheidungsgrenze.“

Außerdem gilt Folgendes:

- Wurde die Probe zuvor gesiebt, so gibt das Labor an, in welcher Fraktion (gesiebt, pelletiert oder Kerne) die tierischen Partikel nachgewiesen wurden, da nur in der gesiebten Fraktion nachgewiesene tierische Partikel auf eine Umweltkontamination hindeuten können.
- Werden nur tierische Partikel nachgewiesen, die weder als Landwirbeltiere noch als Fische eingestuft werden können (z. B. Muskelfasern), so ist in dem Bericht anzugeben, dass nur solche tierische Partikel nachgewiesen wurden und nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie von Landwirbeltieren stammen.

- 2.1.5.3. Mehr als 5 tierische Partikel spezifischer Art nachgewiesen, wenn nur eine Bestimmung durchgeführt wurde, oder mehr als 10 Partikel spezifischer Art nachgewiesen, wenn zwei Bestimmungen durchgeführt wurden:

Wenn nur eine Bestimmung durchgeführt wurde:

- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurden in der vorliegenden Probe mehr als 5 Partikel von Landwirbeltieren nachgewiesen. Die Partikel wurden als ... [Knochen, Knorpel, Muskelgewebe, Haare, Horn, Sonstiges (bitte angeben)] erkannt.“
- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurden in der vorliegenden Probe mehr als 5 Partikel von Fischen nachgewiesen. Die Partikel wurden als ... [Gräten, Schuppen, Knorpel, Muskelgewebe, Otolith, Kiemen, Sonstiges (bitte angeben)] erkannt.“
- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurden in der vorliegenden Probe mehr als 5 Partikel von wirbellosen Landtieren nachgewiesen. Die Partikel wurden als ... [kutikuläre Fragmente, Mundwerkzeuge, Muskeln, tracheale Strukturen, Sonstiges (bitte angeben)] erkannt.“

**▼ M8**

Wenn zwei Bestimmungen durchgeführt wurden:

- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurden in der vorliegenden Probe in den zwei Durchgängen mehr als 10 Partikel von Landwirbeltieren nachgewiesen. Die Partikel wurden als ... [Knochen, Knorpel, Muskelgewebe, Haare, Horn, Sonstiges (bitte angeben)] erkannt.“
- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurden in der vorliegenden Probe in den zwei Durchgängen mehr als 10 Partikel von Fischen nachgewiesen. Die Partikel wurden als ... [Gräten, Schuppen, Knorpel, Muskelgewebe, Otolith, Kiemen, Sonstiges (bitte angeben)] erkannt.“
- „Soweit mit dem Lichtmikroskop erfassbar, wurden in der vorliegenden Probe in den zwei Durchgängen mehr als 10 Partikel von wirbellosen Landtieren nachgewiesen. Die Partikel wurden als ... [kutikuläre Fragmente, Mundwerkzeuge, Muskeln, tracheale Strukturen, Sonstiges (bitte angeben)] erkannt.“

Außerdem gilt Folgendes:

- Wurde die Probe zuvor gesiebt, so gibt das Labor an, in welcher Fraktion (gesiebt, pelletiert oder Kerne) die tierischen Partikel nachgewiesen wurden, da nur in der gesiebten Fraktion nachgewiesene tierische Partikel auf eine Umweltkontamination hindeuten können.
- Werden nur tierische Partikel nachgewiesen, die weder als Landwirbeltiere noch als Fische eingestuft werden können (z. B. Muskelfasern), so ist in dem Bericht anzugeben, dass nur solche tierische Partikel nachgewiesen wurden und nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie von Landwirbeltieren stammen.

**▼ M2**2.2. **PCR**2.2.1. *Grundsatz*

Aus Desoxyribonucleinsäure (DNA) bestehende Fragmente tierischen Ursprungs, die in Einzelfuttermittel und Mischfuttermitteln vorhanden sein können, werden durch PCR mit einer Genamplifikationstechnik nachgewiesen, die nach tierartspezifischen DNA-Sequenzen sucht.

Für die PCR-Methode muss zunächst DNA extrahiert werden. Der Amplifikationsschritt wird anschließend an dem so erhaltenen DNA-Extrakt durchgeführt, um die Tierart nachzuweisen, auf die untersucht wird.

2.2.2. *Reagenzien und Geräte*

## 2.2.2.1. Reagenzien

## 2.2.2.1.1. Reagenzien für die DNA-Extraktion

Nur vom EURL-AP genehmigte und auf dessen Website veröffentlichte Reagenzien dürfen verwendet werden.

## 2.2.2.1.2. Reagenzien für die genetische Amplifikation

▼ **M2**

- 2.2.2.1.2.1. Primer und Sonden  
Nur Primer und Sonden mit vom EURL-AP validierten Oligonucleotid-Sequenzen dürfen verwendet werden <sup>(1)</sup>.
- 2.2.2.1.2.2. Master Mix  
Nur Master-Mix-Lösungen ohne Reagenzien, die zu falschen Ergebnissen führen können, dürfen verwendet werden <sup>(2)</sup>.
- 2.2.2.1.2.3. Dekontaminations-Reagenzien
- 2.2.2.1.2.3.1. Salzsäure-Maßlösung (0,1 N)
- 2.2.2.1.2.3.2. Bleichmittel (Natriumhypochlorit-Lösung, 0,15 % aktives Chlor)
- 2.2.2.1.2.3.3. Nicht ätzende Reagenzien für die Dekontamination kostspieliger Geräte wie Analysewaagen (z. B. DNA Erase<sup>TM</sup> von MP Biomedicals)
- 2.2.2.2. Geräte
- 2.2.2.2.1. Analysenwaage mit einer Genauigkeit von 0,001 g
- 2.2.2.2.2. Zerkleinerungsgeräte
- 2.2.2.2.3. Thermocycler für Echtzeit-PCR
- 2.2.2.2.4. Mikrozentrifuge für entsprechende Reaktionsgefäße
- 2.2.2.2.5. Satz von Mikropipetten für das Pipettieren von 1 bis 1 000 µl
- 2.2.2.2.6. In der Molekularbiologie übliche Verbrauchsmaterialien: Mikrozentrifugen-Röhrchen, Kunststofffilterspitzen für Mikropipetten, geeignete Reaktionsgefäße für den Thermocycler
- 2.2.2.2.7. Kühlschränke für die Lagerung von Proben und Reagenzien
- 2.2.3. *Probenahme und Probenvorbereitung*
- 2.2.3.1. Probenahme  
Untersucht wird eine repräsentative Probe, die nach der Beschreibung in Anhang I entnommen wurde.
- 2.2.3.2. Probenvorbereitung  
Die Vorbereitung von Laborproben bis hin zur Extraktion der DNA entspricht den Anforderungen in Anhang II. Von mindestens 50 g der Probe werden Teilproben für die Untersuchung hergestellt und anschließend zerkleinert.  
  
Die Proben werden gemäß ISO 24276 in einem anderen als den Räumen vorbereitet, in denen DNA extrahiert und vermehrt wird.  
  
Es werden zwei Testmengen zu je mindestens 100 mg vorbereitet.
- 2.2.4. *Extraktion der DNA*  
Die DNA wird nach der vom EURL-AP ausgearbeiteten und auf seiner Website veröffentlichten SOP aus beiden Testmengen extrahiert.  
  
Für jede Extraktionsserie werden nach ISO 24276 zwei Extraktionskontrollen vorbereitet:  
  
— eine Extraktionsblindkontrolle,  
  
— eine positive DNA-Extraktionskontrolle.

<sup>(1)</sup> Die Liste dieser Primer und Sonden für die einzelnen gesuchten Tierarten findet sich auf der Website des EURL-AP.

<sup>(2)</sup> Beispiele brauchbarer Master Mixes finden sich auf der Website des EURL-AP.

▼ M22.2.5. *Genetische Amplifikation*

Die genetische Amplifikation geschieht anhand von Methoden, die für die zu bestimmenden Tierarten validiert wurden. Diese Methoden sind in der vom EURL-AP ausgearbeiteten und auf seiner Website veröffentlichten SOP beschrieben. Jedes DNA-Extrakt ist in mindestens zwei unterschiedlichen Verdünnungen zu untersuchen, um die Inhibition zu bewerten.

Für jede Zieltierart werden nach ISO 24276 zwei Amplifikationskontrollen vorbereitet:

- für jede Schale oder PCR-Versuchsreihe eine positive DNA-Zielkontrolle,
- für jede Schale oder PCR-Versuchsreihe eine Kontrolle der Amplifikationsreagenzien (auch *no template control*).

2.2.6. *Interpretation und Formulierung der Ergebnisse*

Bei der Berichterstattung über die Ergebnisse gibt das Labor zumindest das Gewicht der Testmengen, die Extraktionstechnik, die Zahl der durchgeführten Bestimmungen und die Nachweisgrenze der Methode an.

Ergebnisse werden nicht interpretiert und berichtet, wenn die positive DNA-Extraktionskontrolle und die positiven DNA-Zielkontrollen keine positiven Ergebnisse für das gesuchte Ziel ergeben und die Amplifikationsreagenz-Kontrolle gleichzeitig negativ ist.

Stimmen die Ergebnisse der beiden Testmengen nicht überein, ist zumindest die genetische Amplifikation zu wiederholen. Geht das Labor davon aus, dass dies an den DNA-Extrakten liegen kann, wird vor der Interpretation der Ergebnisse erneut DNA extrahiert und vermehrt.

Die abschließende Formulierung der Ergebnisse stützt sich auf die Integration und Interpretation der Ergebnisse der beiden Testmengen nach der vom EURL-AP ausgearbeiteten und auf seiner Website veröffentlichten SOP.

## 2.2.6.1. Negatives Ergebnis

Über ein negatives Ergebnis wird wie folgt berichtet:

In der vorliegenden Probe wurde keine DNA von X nachgewiesen (wobei X die Tierart oder Gruppe von Tierarten ist, auf die untersucht wird).

## 2.2.6.2. Positives Ergebnis

Über ein positives Ergebnis wird wie folgt berichtet:

In der vorliegenden Probe wurde DNA von X nachgewiesen (wobei X die Tierart oder Gruppe von Tierarten ist, auf die untersucht wird).



## ANHANG VII

**METHODE ZUR BERECHNUNG DES ENERGIEGEHALTS VON  
FUTTERMITTELN FÜR GEFLÜGEL****1. Berechnungsmethode und Formel des Energiegehalts**

Der Energiegehalt von Mischfuttermitteln für Geflügel wird anhand der prozentualen Anteile bestimmter analytischer Bestandteile der Futtermittel nach nachstehender Formel berechnet. Dieser Wert wird in Megajoules (MJ) umsetzbarer, N-korrigierter Energie (ME) je kg Mischfuttermittel ausgedrückt und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{MJ ME/kg} = 0,1551 \times \% \text{ Rohprotein} + 0,3431 \times \% \text{ Rohfett} + 0,1669 \times \% \text{ Stärke} + 0,1301 \times \% \text{ Gesamtzucker (ausgedrückt als Saccharose)}$$

**2. Toleranzen auf die angegebenen Gehalte**

Ergibt sich bei den amtlichen Untersuchungen eine energieerhöhende oder energievermindernde Abweichung zwischen dem Kontrollergebnis und dem angegebenen Gehalt, so gilt eine Mindesttoleranz von 0,4 MJ ME/kg.

**3. Ausdruck der Ergebnisse**

Das nach vorstehender Formel errechnete Ergebnis ist mit nur einer Dezimalstelle anzugeben.

**4. Probenahmeverfahren und Analysemethoden**

Die Probenahme beim Mischfuttermittel und die Bestimmung des Gehalts an der Berechnungsmethode zugrundeliegenden analytischen Bestandteilen erfolgt in Übereinstimmung mit den gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren bzw. Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln.

Anzuwenden sind:

- für die Bestimmung des Rohfettgehalts: Verfahren B der Methode zur Bestimmung des Gehalts an Rohölen und -fetten, wie in Anhang III Teil H beschrieben;
- für die Bestimmung des Stärkegehalts: die polarimetrische Methode wie in Anhang III Teil L beschrieben.



ANHANG VIII

ANALYSEMETHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON FUTTERMITTELN AUF DAS VORHANDENSEIN NICHT MEHR ZUGELASSENER ZUSATZSTOFFE

*Wichtigerhinweis:*

Zum Nachweis des Vorhandenseins nicht mehr zugelassener Zusatzstoffe in Futtermitteln können empfindlichere Analysemethoden als die in diesem Anhang beschriebenen verwendet werden.

Die in diesem Anhang aufgeführten Analysemethoden werden für Bestätigungszwecke herangezogen.

A. BESTIMMUNG DES METHYLBENZOQUATGEHALTS

*7-Benzoyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-chinolon*

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Methylbenzoquatgehalts von Futtermitteln. Die Bestimmungsgrenze beträgt 1 mg/kg.

2. **Prinzip**

Methylbenzoquat wird mit methanolischer Methansulfonsäure-Lösung aus der Probe extrahiert. Der Extrakt wird mit Dichlormethan, mittels Ionenaustauschchromatografie und anschließend erneut mit Dichlormethan gereinigt. Der Methylbenzoquatgehalt wird mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) unter Verwendung eines UV-Detektors bestimmt.

3. **Reagenzien**

3.1. Dichlormethan.

3.2. Methanol, HPLC-Qualität.

3.3. Mobile Phase für die HPLC

Gemisch aus Methanol (3.2) und Wasser (HPLC-Qualität) 75 + 25 (V+V).

Die Lösung wird durch einen 0,22- $\mu$ m-Filter (4.5) filtriert und entgast (z. B. durch 10-minütige Ultraschallbehandlung).

3.4. Methansulfonsäure-Lösung, c = 2 %

20,0 ml Methansulfonsäure werden mit Methanol (3.2) auf 1 000 ml verdünnt.

3.5. Salzsäure, c = 10 %

100 ml Salzsäure ( $\rho_{20}$  1,18 g/ml) werden mit Wasser auf 1 000 ml verdünnt.

3.6. Kationenaustauschharz Amberlit CG-120 (Na), 100 bis 200 Mesh

Dieses Harz wird vor der Verwendung vorbehandelt. Von dem Harz werden 100 g mit 500 ml verdünnter Salzsäure (3.5) aufgeschlämmt und auf einer Heizplatte unter ständigem Rühren zum Sieden gebracht. Es wird abkühlen gelassen, und die Säure wird dekantiert. Anschließend wird durch einen Papierfilter unter Vakuum filtriert. Das Harz wird 2-mal mit je 500 ml Wasser und danach mit 250 ml Methanol (3.2) gewaschen. Anschließend wird das Harz nochmals mit 250 ml Methanol gespült und der Filterkuchen trocken gesaugt. Das getrocknete Harz wird in einer verschlossenen Flasche aufbewahrt.

3.7. Standardsubstanz: Methylbenzoquat (7-Benzoyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-chinolon), rein

**▼B**

## 3.7.1. Methylbenzoquat-Standard-Stammlösung, 500 µg/ml

Von der Standardsubstanz (3.7) werden 50 mg auf 0,1 mg genau eingewogen, in einem 100-ml-Messkolben in methanolischer Methansulfonsäure (3.4) gelöst, zur Marke aufgefüllt und gemischt.

## 3.7.2. Methylbenzoquat-Standardlösung, 50 µg/ml

Von der Methylbenzoquat-Standard-Stammlösung (3.7.1) werden 5,0 ml in einen 50-ml-Messkolben überführt. Es wird mit Methanol (3.2) zur Marke aufgefüllt und gemischt.

## 3.7.3. Kalibrierlösungen

Von der Methylbenzoquat-Standardlösung (3.7.2) werden 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 bzw. 5,0 ml jeweils in einen 25-ml-Messkolben überführt. Mit der mobilen Phase (3.3) wird zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Diese Lösungen enthalten Methylbenzoquat in Konzentrationen von 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 bzw. 10,0 µg/ml. Die Lösungen müssen vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

**4. Geräte**

## 4.1. Laborschüttler.

## 4.2. Rotationsfilmverdampfer.

## 4.3. Glassäule (250 × 15 mm) mit Absperrhahn und Reservoir mit einem Fassungsvermögen von ca. 200 ml.

## 4.4. HPLC-Einrichtung mit UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung oder Diodenarray-Detektor

4.4.1. HPLC-Trennsäule, 300 × 4 mm, C<sub>18</sub>, 10 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule.

## 4.5. Membranfilter, 0,22 µm Porengröße.

## 4.6. Membranfilter, 0,45 µm Porengröße.

**5. Verfahren**5.1. *Allgemeines*

## 5.1.1. Zur Prüfung, dass weder Methylbenzoquat noch Störsubstanzen vorhanden sind, wird eine Blindprobe untersucht.

## 5.1.2. Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe untersucht wird, die mit Methylbenzoquat angereichert wurde. Die zugesetzte Menge an Methylbenzoquat sollte der in der Probe vorhandenen Menge entsprechen. Zur Anreicherung auf einen Gehalt von 15 mg/kg werden 20 g der Blindprobe mit 600 µl Standard-Stammlösung (3.7.1) versetzt. Es wird gemischt und 10 min stehen gelassen, bevor mit der Extraktion (5.2) fortgefahren wird.

Für den Zweck dieser Methode muss die Blindprobe ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Methylbenzoquat darf nicht nachweisbar sein.

5.2. *Extraktion*

Von der vorbereiteten Probe werden 20 g auf 0,01 g genau in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Nach Zugabe von 100,0 ml Methansulfonsäure-Lösung (3.4) wird mechanisch (4.1) 30 min geschüttelt. Die Lösung wird durch ein Filterpapier filtriert und das Filtrat für die Flüssig-Flüssig-Trennung (5.3) aufbewahrt.

5.3. *Flüssig-Flüssig-Trennung*

Von dem durch 5.2 erhaltenen Filtrat werden 25,0 ml in einen 500-ml-Scheidetrichter überführt, der 100 ml Salzsäure (3.5) enthält. Nach Zugabe von 100 ml Dichlormethan (3.1) wird 1 min geschüttelt, die

**▼ B**

Phasentrennung abgewartet und die untere Phase (Dichlormethan) in einen 500-ml-Rundkolben ablaufen gelassen. Die Extraktion der wässrigen Phase wird 2-mal mit je 40 ml Dichlormethan wiederholt und die Extrakte werden zum ersten Extrakt im Rundkolben gegeben. Das Dichlormethanextrakt wird am Rotationsverdampfer (4.2) bei 40 °C und vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in 20 bis 25 ml Methanol (3.2) gelöst und der Kolben verschlossen. Der gesamte Extrakt wird für die Ionenaustauschchromatografie (5.4) aufbewahrt.

#### 5.4. *Ionenaustauschchromatografie*

##### 5.4.1. *Vorbereitung der Kationenaustauschsäule*

In das untere Ende der Glassäule (4.3) wird ein Glaswattebausch eingebracht. Von dem behandelten Kationenaustauschharz (3.6) werden 5,0 g mit 50 ml Salzsäure (3.5) aufgeschlämmt, in die Glassäule gegeben und absetzen gelassen. Nachdem der Säureüberschuss bis knapp zur Harzoberfläche abgelaufen ist, wird die Säule so lange mit Wasser gewaschen, bis die Waschflüssigkeit neutral gegen Lackmus ist. Dann werden 50 ml Methanol (3.2) auf die Säule gegeben und bis zur Harzoberfläche ablaufen gelassen.

##### 5.4.2. *Säulenchromatografie*

Der Extrakt (5.3) wird mittels einer Pipette vorsichtig auf die Säule gegeben. Der Rundkolben wird 2-mal mit je 5 bis 10 ml Methanol (3.2) gespült. Die anfallenden Spüllösungen werden ebenfalls auf die Säule gegeben. Nachdem der Extrakt bis zur Harzoberfläche abgelaufen ist, wird die Säule mit 50 ml Methanol gewaschen, wobei die Flussrate höchstens 5 ml/min betragen darf. Die Waschflüssigkeit wird verworfen. Das Methylbenzoat wird mit 150 ml methanolischer Methansulfonsäure-Lösung (3.4) von der Säule eluiert und das Eluat in einem 250-ml-Erlenmeyerkolben aufgefangen.

#### 5.5. *Flüssig-Flüssig-Trennung*

Das Eluat (5.4.2) wird in einen 1-l-Scheidetrichter überführt. Der Erlenmeyerkolben wird mit 5 bis 10 ml Methanol (3.2) gespült und die anfallende Spülflüssigkeit ebenfalls in den Scheidetrichter gegeben. Dann werden 300 ml Salzsäure-Lösung (3.5) und 130 ml Dichlormethan (3.1) zugefügt. Es wird 1 min geschüttelt und die Phasentrennung abgewartet. Die untere Phase (Dichlormethan) wird in einen 500-ml-Rundkolben abgelassen. Die Extraktion der wässrigen Phase wird 2-mal mit je 70 ml Dichlormethan wiederholt, und diese Extrakte werden zum ersten Extrakt im Rundkolben gegeben.

Der Dichlormethanextrakt wird am Rotationsverdampfer (4.2) bei 40 °C und vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand im Rundkolben wird in ca. 5 ml Methanol (3.2) gelöst und die Lösung quantitativ in einen 10-ml-Messkolben überführt. Der Rundkolben wird 2-mal mit je 1 bis 2 ml Methanol gespült, und die Spüllösungen werden in den Messkolben überführt. Es wird mit Methanol zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Ein aliquoter Teil wird durch einen Membranfilter (4.6) filtriert. Die Lösung wird für die HPLC-Bestimmung (5.6) aufbewahrt.

#### 5.6. *HPLC-Bestimmung*

##### 5.6.1. *Parameter*

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

- HPLC-Trennsäule (4.4.1),
- mobile Phase für die HPLC: Methanol-Wasser-Gemisch (3.3),
- Durchflussrate: 1 bis 1,5 ml/min,
- Detektionswellenlänge: 265 nm,
- Einspritzvolumen: 20 bis 50 µl.

**▼ B**

Die Stabilität des chromatografischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.7.3), die 4 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erreicht sind.

**5.6.2. Erstellung der Kalibrationskurve**

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

**5.6.3. Bestimmung der Probenlösung**

Der Probenextrakt (5.5) wird mehrmals eingespritzt, wobei dasselbe Volumen wie für die Einspritzung der Kalibrierlösungen verwendet wird, und die mittlere Peakhöhe (-fläche) der Methylbenzoquatpeaks wird ermittelt.

**6. Berechnung der Ergebnisse**

Aus der mittleren Höhe (Fläche) der Methylbenzoquatpeaks der Probenlösung wird anhand der Kalibrationskurve (5.6.2) die Konzentration der Probenlösung in µg/ml bestimmt.

Der Methylbenzoquatgehalt  $w$  (in mg/kg) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

wobei:

$c$  = Methylbenzoquatkonzentration der Probenlösung in µg/ml.  
 $m$  = Probeneinwaage in g.

**7. Überprüfung der Ergebnisse****7.1. Identität**

Die Identität des Analyten kann durch Co-Chromatografie oder mithilfe eines Diodenarray-Detektors bestätigt werden, wobei die Spektren der Probenlösung und der Kalibrierlösung (3.7.3), die 10 µg/ml enthält, verglichen werden.

**7.1.1. Co-Chromatografie**

Ein Probenextrakt wird mit einer geeigneten Menge Methylbenzoquat-Standardlösung (3.7.2) versetzt. Die Menge des zugesetzten Methylbenzoquats muss dem erwarteten Methylbenzoquatgehalt des Probenextrakts entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extrakts darf nur die Höhe des Methylbenzoquatpeaks vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe darf höchstens  $\pm 10\%$  von der des Peaks der nicht angereicherten 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 in der Regel  $\pm 2$  nm.

**▼ B**

- b) Zwischen 220 und 350 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 keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Standardanalyten beträgt.
- c) Zwischen 220 und 350 nm dürfen sich die Spektren des Probenextrakts im Anstieg, an der Spitze und im Abstieg des Probenpeaks 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 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*

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf bei Methylbenzoatgehalten von 4-20 mg/kg 10 % des höheren Wertes nicht überschreiten.

### 7.3. *Wiederfindungsrate*

Für eine angereicherte Blindprobe muss die Wiederfindungsrate mindestens 90 % betragen.

## 8. **Ergebnisse eines Ringversuchs**

Es wurden 5 Proben von 10 Laboratorien untersucht. Jede Probe wurde doppelt analysiert.

	Blindprobe	Mehl 1	Pellets 1	Mehl 2	Pellets 2
Mittelwert [mg/kg]	NN	4,50	4,50	8,90	8,70
$s_r$ [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50
$VK_r$ [ % ]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
$s_R$ [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
$VK_R$ [ % ]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Wiederfindung [ % ]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

NN = Nicht nachweisbar

$s_r$  = Standardabweichung der Wiederholbarkeit

$VK_r$  = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit

$s_R$  = Standardabweichung der Vergleichbarkeit

$VK_R$  = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit

## B. BESTIMMUNG DES OLAQUINDOXGEHALTS

N-(2-Hydroxyethyl)-3-methyl-2-chinoxalin-carbamid-1,4-dioxid

### 1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Olaquinoxgehalts von Futtermitteln. Die Bestimmungsgrenze beträgt 5 mg/kg.

### 2. **Prinzip**

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

**▼ B****3. Reagenzien**

3.1. Methanol.

3.2. Methanol, HPLC-Qualität.

3.3. Wasser, HPLC-Qualität.

3.4. Mobile Phase für die HPLC:

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

3.5. Standardsubstanz: Olaquinox, rein, N-(2-Hydroxyethyl)-3-methyl-2-chinoxalin-carbamid-1,4-dioxid, E 851

3.5.1. Olaquinox-Standard-Stammlösung, 250 µg/ml

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

3.5.2. Olaquinox-Standardlösung, 25 µg/ml

Von der Standard-Stammlösung (3.5.1) werden 10,0 ml in einen 100-ml-Messkolben überführt. Es wird mit der mobilen Phase (3.4) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Der Messkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lösung muss täglich frisch hergestellt werden.

3.5.3. Kalibrierlösungen

Von der Standardlösung (3.5.2) werden 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 bzw. 20,0 ml jeweils in einen 50-ml-Messkolben überführt. Mit der mobilen Phase (3.4) wird zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Der Kolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt. Diese Kalibrierlösungen enthalten jeweils 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 bzw. 10,0 µg Olaquinox je ml.

Die Lösungen müssen vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

**4. Geräte**

4.1. Ultraschallbad.

4.2. Mechanisches Schüttelgerät.

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

4.3.1. HPLC-Trennsäule, 250 × 4 mm, C<sub>18</sub>, 10 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule.

4.4. Membranfilter, 0,45 µm Porengröße.

**5. Verfahren**

*Anmerkung:* Olaquinox ist lichtempfindlich. Alle Analysenschritte sind deshalb bei gedämpftem Licht oder unter Verwendung von Braunglasgeräten durchzuführen.

5.1. *Allgemeines*

5.1.1. Zur Prüfung, dass weder Olaquinox noch Störsubstanzen vorhanden sind, wird eine Blindprobe untersucht.

5.1.2. Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe untersucht wird, die mit Olaquinox angereichert wurde. Die zugesetzte Menge an Olaquinox sollte der in der Probe vorhandenen Menge entsprechen. Zur Anreicherung auf einen Gehalt von 50 mg/kg werden 10,0 ml der

**▼ B**

Standard-Stammlösung (3.5.1) in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben überführt und im Stickstoffstrom auf ca. 0,5 ml eingengt. Dann werden 50 g der Blindprobe zugegeben. Es wird gründlich gemischt und 10 min stehen gelassen, bevor mit der Extraktion (5.2) fortgefahren wird.

*Anmerkung:* Für den Zweck dieser Methode muss die Blindprobe ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Olaquinox darf nicht nachweisbar sein.

5.2. *Extraktion*

Von der Probe werden 50 g 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 Probenlösung wird weitere 15 min mit Ultraschall behandelt. Danach wird der Kolben aus dem Ultraschallbad genommen, und es wird 30 min auf dem Schüttelgerät (4.2) geschüttelt. Die Probenlösung wird durch einen Faltenfilter filtriert. Von dem Filtrat werden 10,0 ml in einen 20-ml-Messkolben überführt, es wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gemischt. Ein aliquoter Teil wird durch einen Membranfilter (4.4) filtriert (siehe Bemerkung 9). 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:

Analysensäule (4.3.1)	
Mobile Phase (3.4):	Wasser (3.3)-Methanol (3.2)- Gemisch 900 + 100 (V+V)
Durchflussrate:	1,5 bis 2 ml/min
Detektionswellenlänge:	380 nm
Einspritzvolumen:	20 bis 100 µl

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

5.3.2. *Erstellung der Kalibrationskurve*

Jede Kalibrierlösung (3.5.3) wird mehrmals eingespritzt, und die Peakhöhen (-flächen) für die einzelnen Konzentrationen werden gemessen. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt, indem die mittleren Peakhöhen (-flächen) 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 Olaquinoxpeaks wird ermittelt.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

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

Der Olaquinoxgehalt  $w$  (in mg/kg) der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

**▼ B**

wobei:

$c$  = Olaquinoxkonzentration des Probenextrakts (5.2) in  $\mu\text{g/ml}$ .

$m$  = Probeneinwaage in g.

## 7. Überprüfung der Ergebnisse

### 7.1. Identität

Die Identität des Analyten kann durch Co-Chromatografie oder mithilfe eines Diodenarray-Detektors bestätigt werden, wobei die Spektren der Probenlösung (5.2) und der Kalibrierlösung (3.5.3), die  $5,0 \mu\text{g/ml}$  enthält, verglichen werden.

#### 7.1.1. Co-Chromatografie

Ein Probenextrakt (5.2) wird mit einer geeigneten Menge Kalibrierlösung (3.5.3) versetzt. Die zugesetzte Olaquinoxmenge muss dem erwarteten Olaquinoxgehalt des Probenextrakts entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extrakts darf nur die Höhe des Olaquinoxpeaks vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe darf höchstens  $\pm 10 \%$  von der des Peaks des nicht angereicherten Probenextrakts 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 in der Regel  $\pm 2 \text{ nm}$ .
- b) Zwischen 220 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 keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Standardanalyten beträgt.
- c) Zwischen 220 und 400 nm dürfen sich die Spektren des Probenextrakts im Anstieg, an der Spitze und im Abstieg des Probenpeaks 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 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

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an ein und derselben Probe darf bei einem Olaquinoxgehalt zwischen 10 und 200 mg/kg 15 % des höheren Wertes nicht überschreiten.

### 7.3. Wiederfindungsrate

Für eine angereicherte Blindprobe muss die Wiederfindungsrate mindestens 90 % betragen.

**▼ B****8. Ergebnisse eines Ringversuchs**

Es wurde ein EG-Ringversuch durchgeführt, bei dem 4 Ferkelfuttermittel einschließlich eines Blindfuttermittels von bis zu 13 Laboratorien untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

	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  
 $s_r$  = Standardabweichung der Wiederholbarkeit  
 $s_R$  = Standardabweichung der Vergleichbarkeit  
 $VK_r$  = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit  
 $VK_R$  = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit

**9. Bemerkung**

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

**C. BESTIMMUNG DES AMPROLIUMGEHALTS**

*1-[(4-Amino-2-propylpyrimidin-5-yl)methyl]-2-methyl-pyridiniumchlorid-hydrochlorid*

**1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Amproliumgehalts von Futtermitteln und Vormischungen. Die Nachweisgrenze beträgt 1 mg/kg, die Bestimmungsgrenze 5 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 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (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

Von dem Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat werden 13,80 g in einem 1 000-ml-Messkolben in Wasser (3.3) gelöst. Es wird mit Wasser (3.3) zur Marke aufgefüllt und gemischt.

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

Von dem Natriumperchloratmonohydrat werden 224,74 g in einem 1 000-ml-Messkolben in Wasser (3.3) gelöst. Es wird mit Wasser (3.3) zur Marke aufgefüllt und gemischt.

**▼ B**

## 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- $\mu$ m-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-pyridiniumchlorid-hydrochlorid, E 750 (siehe 9.2)

3.7.1. Amprolium-Standard-Stammlösung, 500  $\mu$ g/ml

Von Amprolium (3.7) werden 50 mg auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, in 80 ml Methanol (3.1) gelöst und 10 min in ein Ultraschallbad (4.4) gestellt. Nach der Ultraschallbehandlung wird die Lösung auf Raumtemperatur gebracht; es wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gemischt. Bei einer Temperatur von  $\leq 4$  °C ist diese Lösung 1 Monat lang haltbar.

3.7.2. Amprolium-Standardlösung, 50  $\mu$ g/ml

Von der Standard-Stammlösung (3.7.1) werden 5,0 ml in einen 50-ml-Messkolben pipettiert; es wird mit der Extraktionslösung (3.8) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Bei einer Temperatur von  $\leq 4$  °C ist diese Lösung 1 Monat lang haltbar.

## 3.7.3. Kalibrierlösungen

Von der Amprolium-Standardlösung (3.7.2) werden 0,5, 1,0 bzw. 2,0 ml jeweils in einen 50-ml-Messkolben überführt. Mit der mobilen Phase (3.6) wird zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Diese Lösungen enthalten jeweils 0,5, 1,0 bzw. 2,0  $\mu$ g Amprolium je 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  $\mu$ l4.1.1. HPLC-Trennsäule für die Kationenaustauschchromatografie, 125  $\times$  4 mm, z. B. Nucleosil 10 SA, 5 oder 10  $\mu$ m Korngröße, oder vergleichbare Säule.

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

4.2. Membranfilter, PTFE-Material, 0,45  $\mu$ m Porengröße.4.3. Membranfilter, 0,22  $\mu$ m Porengröße.

## 4.4. Ultraschallbad.

## 4.5. Mechanisches Schüttelgerät oder Magnetrührer.

## 5. Verfahren

## 5.1. Allgemeines

## 5.1.1. Blindprobe

Für die Durchführung des Wiederfindungstests (5.1.2) muss zur Prüfung, dass weder Amprolium noch Störsubstanzen vorhanden sind, eine Blindprobe untersucht werden. Die Blindprobe muss ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Amprolium oder Störsubstanzen dürfen nicht nachweisbar sein.

**▼B**5.1.2. **Wiederfindungstest**

Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe untersucht wird, die mit Amprolium angereichert wurde. Die zugesetzte Menge an Amprolium sollte der in der Probe vorhandenen Menge entsprechen. Zur Anreicherung auf einen Gehalt von 100 mg/kg werden 10,0 ml der Standard-Stammlösung (3.7.1) in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben überführt und auf ca. 0,5 ml eingeengt. Dann werden 50 g der Blindprobe zugegeben. Es wird gründlich gemischt, 10 min stehen gelassen und nochmals mehrfach gemischt, bevor mit der Extraktion (5.2) fortgefahren wird.

Ist eine der zu untersuchenden Probe ähnliche Blindprobe nicht verfügbar (siehe 5.1.1), so kann ein Wiederfindungstest mithilfe des Additionsverfahrens durchgeführt werden. In diesem Fall wird die zu untersuchende Probe mit einer Amproliummengemenge 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. **Vormischungen (Amproliumgehalt < 1 %) und Futtermittel**

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 15 min in ein Ultraschallbad (4.4) gestellt und anschließend 60 min auf dem Schüttelgerät geschüttelt oder auf dem Magnetrührer (4.5) gerührt. Ein aliquoter Teil des Extrakts wird mit der mobilen Phase (3.6) auf einen Amproliumgehalt von 0,5 bis 2 µg/ml verdünnt und gemischt (siehe Bemerkung 9.3). Von dieser verdünnten Lösung werden 5 bis 10 ml durch einen Membranfilter (4.2) filtriert. Anschließend wird die HPLC-Bestimmung (5.3) durchgeführt.

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 15 min in ein Ultraschallbad (4.4) gestellt und anschließend 1 h auf dem Schüttelgerät geschüttelt oder auf dem Magnetrührer gerührt (4.5). Ein aliquoter Teil des Extrakts wird mit der mobilen Phase (3.6) auf einen Amproliumgehalt von 0,5 bis 2 µg/ml verdünnt und gemischt. Von dieser verdünnten Lösung werden 5 bis 10 ml durch einen Membranfilter (4.2) filtriert. 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:

HPLC-Trennsäule (4.1.1):	125 × 4 mm, Kationenaustausch Nucleosil 10 SA, 5 oder 10 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule
Mobile Phase (3.6):	Mischung aus Acetonitril (3.2), Natriumdihydrogenphosphat-Lösung (3.4) und Natriumperchlorat-Lösung (3.5), 450 + 450 + 100 (V+V+V)
Durchflussrate:	0,7 bis 1 ml/min
Detektionswellenlänge:	264 nm
Einspritzvolumen:	100 µl

**▼ B**

Die Stabilität des chromatografischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.7.3), die 1,0 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erreicht sind.

### 5.3.2. Erstellung der Kalibrationskurve

Jede Kalibrierlösung (3.7.3) wird mehrmals eingespritzt, und die mittleren Peakhöhen (-flächen) werden für die einzelnen Konzentrationen gemessen. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt, indem die mittleren Peakhöhen (-flächen) 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 Probenlösung wird anhand der Kalibrationskurve (5.3.2) die Konzentration der Probenlösung in µg/ml bestimmt.

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

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

wobei:

$V$  = Volumen der Extraktionslösung (3.8) in ml gemäß 5.2 (d. h. 200 ml),

$c$  = 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-Chromatografie oder mithilfe 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-Chromatografie

Eine Probenlösung (5.2) wird mit einer geeigneten Menge Kalibrierlösung (3.7.3) angereichert. Die zugesetzte Amproliummengemenge muss dem Amproliumgehalt des Probenextrakts entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extrakts darf nur die Höhe des Amproliumpeaks vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe darf höchstens  $\pm 10$  % von der des Peaks der nicht angereicherten 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 in der Regel  $\pm 2$  nm.

**▼ B**

- 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 keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Standardanalyten beträgt.
- c) Zwischen 210 und 320 nm dürfen sich die Spektren des Probenextrakts im Anstieg, an der Spitze und im Abstieg des Probenpeaks 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 Spektren an keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Spektrums am Peakmaximum 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 an ein und derselben Probe darf die folgenden Werte nicht überschreiten:

- 15 % des höheren Werts bei einem Amproliumgehalt zwischen 25 und 500 mg/kg,
- 75 mg/kg bei einem Amproliumgehalt zwischen 500 und 1 000 mg/kg,
- 7,5 % des höheren Werts bei einem Amproliumgehalt von über 1 000 mg/kg.

7.3. *Wiederfindungsrate*

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

8. **Ergebnisse eines Ringversuchs**

Bei einem Ringversuch wurden 3 Geflügelfuttermittel (Proben 1 bis 3), 1 Mineralfuttermittel (Probe 4) und 1 Vormischung (Probe 5) untersucht. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden 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
VK <sub>r</sub> [ %]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
$s_R$ [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
VK <sub>R</sub> [ %]	—	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  
VK<sub>r</sub> = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit  
 $s_R$  = Standardabweichung der Vergleichbarkeit  
VK<sub>R</sub> = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit

**▼ B****9. Bemerkungen**

- 9.1. Enthält die Probe Thiamin, so erscheint der Thiaminpeak in der Chromatografie kurz vor dem Amproliumpeak. Bei Anwendung dieser Methode müssen Amprolium und Thiamin getrennt werden. Sind Amprolium und Thiamin nicht durch die bei dieser Methode verwendete Säule (4.1.1) getrennt, 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 ( $c = 0,02 \text{ mol/l}$ ) in Salzsäure ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ) Maxima bei 246 nm und 262 nm. Die Absorption beträgt 0,84 bei 246 nm bzw. 0,80 bei 262 nm.
- 9.3. Der Extrakt muss immer mit der mobilen Phase verdünnt werden, da sich sonst die Retentionszeit des Amproliumpeaks durch Veränderungen der Ionenstärke beträchtlich verschieben kann.

**D. BESTIMMUNG DES CARBADOXGEHALTS**

*Methyl 3-(2-chinoxalinylmethylen)carbazat  $N^l, N^t$  -dioxid*

**1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode erlaubt die Bestimmung des Carbadoxgehalts von Futtermitteln, Vormischungen und Zubereitungen. Die Nachweisgrenze beträgt 1 mg/kg, die Bestimmungsgrenze 5 mg/kg.

**2. Prinzip**

Die Probe wird mit Wasser äquilibriert und anschließend mit Methanol-Acetonitril extrahiert. Bei Futtermitteln wird ein aliquoter Teil des filtrierten Extrakts auf einer Aluminiumoxid-Säule gereinigt. Bei Vormischungen und Zubereitungen wird ein aliquoter Teil des filtrierten Extrakts mit einem Gemisch aus Wasser, Methanol und Acetonitril auf eine geeignete Konzentration verdünnt. Der Carbadoxgehalt wird mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) 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, Aktivitätsstufe 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,  $\sigma = 10 \%$   
10 ml Essigsäure (3.3) werden auf 100 ml in Wasser gelöst.
- 3.7. Natriumacetat.
- 3.8. Wasser, HPLC-Qualität.
- 3.9. Acetat-Pufferlösung,  $c = 0,01 \text{ mol/l}$ ,  $\text{pH} = 6,0$   
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 mit Wasser (3.8) zur Marke 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 durch einen 0,22- $\mu\text{m}$ -Filter (4.5) filtriert und entgast (z. B. durch 10-minütige Ultraschallbehandlung);

**▼B**

## 3.11. Standardsubstanz

Carbadox, rein: Methyl 3-(2-chinoxalinylmethylen)carbazat N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioxid, E 850

## 3.11.1. Carbadox-Standard-Stammlösung, 100 µg/ml (siehe Anmerkung unter „5. Verfahren“)

Von der Carbadox-Standardsubstanz (3.11) werden 25 mg 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, 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 ist diese Lösung 1 Monat lang haltbar.

## 3.11.2. Kalibrierlösungen

Von der Standard-Stammlösung (3.11.1) werden 2,0, 5,0, 10,0 bzw. 20,0 ml jeweils in einen 100-ml-Messkolben überführt. Es werden jeweils 30 ml Wasser hinzugefügt; es wird mit Methanol-Acetonitril (3.5) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Die Kolben werden mit Aluminiumfolie umhüllt. Diese Lösungen enthalten jeweils 2,0, 5,0, 10,0 bzw. 20,0 µg/ml Carbadox.

Kalibrierlösungen müssen vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

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

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

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

## 4. Geräte

## 4.1. Laborschüttler oder Magnetrührer.

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

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

*Anmerkung:* Eine Glassäule mit Absperrhahn oder eine konisch zulauende Glassäule können ebenfalls verwendet werden; in diesem Fall wird ein kleiner Glaswattebausch in den unteren Teil der Säule eingebracht und mit einem Glasstab zusammengedrückt.

## 4.4. HPLC-Einrichtung mit Injektionssystem für Einspritzvolumina von 20 µl

4.4.1. HPLC-Trennsäule, 300 × 4 mm, C<sub>18</sub>, 10 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule.

## 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.

**▼ B****5. Verfahren**

*Anmerkung:* Carbadox ist lichtempfindlich. Alle Analysenschritte sind daher bei gedämpftem Licht oder unter Verwendung von Braunglasgeräten durchzuführen. Alternativ können die Glaswaren mit Aluminiumfolie umwickelt werden.

**5.1. Allgemeines****5.1.1. Blindprobe**

Für die Durchführung des Wiederfindungstests (5.1.2) muss zur Prüfung, dass weder Carbadox noch Störsubstanzen vorhanden sind, eine Blindprobe untersucht werden. Die Blindprobe muss ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Carbadox oder Störsubstanzen dürfen nicht nachweisbar sein.

**5.1.2. Wiederfindungstest**

Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe (5.1.1) untersucht wird, die mit Carbadox angereichert wurde. Die zugesetzte Menge an Carbadox sollte der in der Probe vorhandenen Menge entsprechen. Zur Anreicherung auf einen Gehalt von 50 mg/kg 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 eingengt. Dann werden 10 g der Blindprobe zugegeben. Es wird gemischt und 10 min stehen gelassen, bevor mit dem Extraktionsschritt (5.2) fortgefahren wird.

Ist eine der zu untersuchenden Probe ähnliche Blindprobe nicht verfügbar (siehe 5.1.1), so kann ein Wiederfindungstest mithilfe des Standard-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**

Von der Probe werden 10 g auf 0,01 g genau in einen 200-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Nach Zugabe von 15,0 ml Wasser wird gemischt und 5 min stehen gelassen. 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 Glasfaser-Filterpapier (4.2) filtriert. Diese Lösung wird für die Reinigung (5.3) aufbewahrt.

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

Von der nicht gemahlene Probe wird 1 g auf 0,001 g genau in einen 200-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Nach Zugabe von 15,0 ml Wasser wird gemischt und 5 min stehen gelassen. 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 Glasfaser-Filterpapier (4.2) filtriert.

Ein aliquoter Teil des Filtrats wird in einen 50-ml-Messkolben pipettiert. Es werden 15,0 ml Wasser hinzugefügt; es wird zur Marke mit Methanol-Acetonitril (3.5) aufgefüllt und gemischt. Die Carbadox-Konzentration der fertigen Lösung muss bei etwa 10 µg/ml liegen. Ein aliquoter Teil wird durch einen 0,45-µm-Membranfilter (4.6) filtriert.

Anschließend wird die HPLC-Bestimmung (5.4) durchgeführt.

**5.2.3. Zubereitungen (> 2 %)**

Von der nicht gemahlene Probe werden 0,2 g auf 0,001 g genau in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Es werden 45,0 ml Wasser

**▼ B**

hinzugefügt, gemischt und 5 min stehen gelassen. Dann werden 105,0 ml Methanol-Acetonitril (3.5) hinzugefügt. Der Kolben wird verschlossen, geschüttelt, 15 min in ein Ultraschallbad (4.7) gestellt 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 aliquoter Teil des Filtrats wird mit dem Wasser-Methanol-Acetonitril-Gemisch (3.12) verdünnt, bis eine endgültige Carbadoxkonzentration von 10 bis 15 µg/ml erreicht ist. (Verdünnungsfaktor 10 für eine 10 %ige Zubereitung). Ein aliquoter Teil wird durch einen 0,45-µm-Membranfilter (4.6) filtriert.

Anschließend wird die HPLC-Bestimmung (5.4) durchgeführt.

5.3. *Reinigung*5.3.1. *Vorbereitung der Aluminiumoxid-Säule*

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

5.3.2. *Reinigung der Probe*

Von dem filtrierten Extrakt (5.2.1) werden 15 ml auf die Aluminiumoxid-Säule gegeben, und die ersten 2 ml des Eluats werden verworfen. Die folgenden 5 ml werden aufgefangen und ein aliquoter Teil davon durch einen 0,45-µm-Membranfilter (4.6) filtriert.

Anschließend wird die HPLC-Bestimmung (5.4) durchgeführt.

5.4. *HPLC-Bestimmung*5.4.1. *Parameter*

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

Ergebnissen führen:

HPLC-Trennsäule (4.4.1):	300 × 4 mm, C <sub>18</sub> , 10 µm Korngröße, oder vergleichbare Säule
Mobile Phase (3.10):	Gemisch aus Acetat-Pufferlösung (3.9) und Acetonitril (3.2), 825 + 175 (V+V)
Durchflussrate:	1,5 bis 2 ml/min
Detektionswellenlänge:	365 nm
Einspritzvolumen:	20 µl

Die Stabilität des chromatografischen 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. *Erstellung der Kalibrationskurve*

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

5.4.3. *Bestimmung der 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.

**▼ B****6. Berechnung der Ergebnisse**

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

**6.1. Futtermittel**

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

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

wobei:

$c$  = Carbadoxkonzentration der Probenlösung (5.3.2) in µg/ml,  
 $V_1$  = Extraktionsvolumen in ml (d. h. 50),  
 $m$  = Probeneinwaage in g.

**6.2. Vormischungen und Zubereitungen**

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

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

wobei:

$c$  = Carbadoxkonzentration der Probenlösung (5.2.2 oder 5.2.3) in µg/ml,  
 $V_2$  = Extraktionsvolumen in ml (d. h. 50 für Vormischungen; 150 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-Chromatografie oder mithilfe eines Diodenarray-Detektors bestätigt werden, wobei die Spektren des Probenextrakts und der Kalibrierlösung (3.11.2), die 10,0 µg/ml enthält, verglichen werden.

**7.1.1. Co-Chromatografie**

Ein Probenextrakt wird mit einer geeigneten Menge Kalibrierlösung (3.11.2) angereichert. Die zugesetzte Carbadoxmenge muss in etwa dem vermuteten Carbadoxgehalt des Probenextrakts entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extrakts darf nur die Höhe des Carbadoxpeaks vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe darf höchstens ± 10 % von der des Peaks der nicht angereicherten 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 in der Regel ± 2 nm.

**▼ B**

- 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 keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Standardanalyten beträgt.
- c) Zwischen 225 und 400 nm dürfen sich die Spektren des Probenextrakts im Anstieg, an der Spitze und im Abstieg des Probenpeaks in den Bereichen 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*

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen an 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 muss 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 doppelt analysiert. (Nähere Informationen zu diesem Ringversuch sind dem *Journal of the AOAC*, Band 71, 1988, S. 484-490, zu entnehmen.) Die Ergebnisse (mit Ausnahme von Ausreißern) sind in der nachstehenden Tabelle 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
$VK_r$ [%]	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
$VK_R$ [%]	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
$VK_r$ [%]	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

**▼B**

	Vormischungen				Zubereitungen		
	A	B	C	D	A	B	C
VK <sub>R</sub> [%]	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Sollgehalt [mg/kg]	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = Anzahl der Laboratorien

n = Anzahl der Einzelwerte

s<sub>F</sub> = Standardabweichung der Wiederholbarkeit

VK<sub>r</sub> = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit

s<sub>R</sub> = Standardabweichung der Vergleichbarkeit

VK<sub>R</sub> = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit