

# KOMMISSION

## SECHSTE RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 20. Dezember 1974

zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln

(75/84/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln <sup>(1)</sup>, zuletzt geändert durch die dem am 22. Januar 1972 in Brüssel unterzeichneten Vertrag über den Beitritt neuer Mitgliedstaaten zur Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft und zur Europäischen Atomgemeinschaft <sup>(2)</sup> beigefügte Akte <sup>(3)</sup>, und insbesondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die obengenannte Richtlinie bestimmt, daß die amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Feststellung, ob die auf Grund der Rechts- oder Verwaltungsvorschriften festgelegten Anforderungen hinsichtlich Beschaffenheit und Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind, nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und Analysemethoden durchgeführt werden.

Die Richtlinien Nrn. 71/250/EWG, 71/393/EWG, 72/199/EWG, 73/46/EWG und 74/203/EWG der Kommission vom 15. Juni 1971 <sup>(4)</sup>, vom 18. November 1971 <sup>(5)</sup>, vom 27. April 1972 <sup>(6)</sup>, vom 5. Dezember 1972 <sup>(7)</sup> und vom 25. März 1974 <sup>(8)</sup> haben bereits eine Reihe von Analysemethoden festgelegt. Der Stand der seitdem durchgeführten Arbeiten ermöglicht es nunmehr, eine sechste Reihe von Analysemethoden festzulegen.

<sup>(1)</sup> ABl. Nr. L 170 vom 3. 8. 1970, S. 2.

<sup>(2)</sup> ABl. Nr. L 73 vom 27. 3. 1972, S. 5.

<sup>(3)</sup> ABl. Nr. L 73 vom 27. 3. 1972, S. 14.

<sup>(4)</sup> ABl. Nr. L 155 vom 12. 7. 1971, S. 13.

<sup>(5)</sup> ABl. Nr. L 279 vom 20. 12. 1971, S. 7.

<sup>(6)</sup> ABl. Nr. L 123 vom 29. 5. 1972, S. 6.

<sup>(7)</sup> ABl. Nr. L 83 vom 30. 3. 1973, S. 21.

<sup>(8)</sup> ABl. Nr. L 108 vom 22. 4. 1974, S. 7.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermittelausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

### Artikel 1

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln auf ihren Gehalt an Buquinolat, Sulfachinoxalin und Fuzolidon nach den in der Anlage zu dieser Richtlinie beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

Die allgemeinen Bestimmungen des Teils 1 (Einführung) der Anlage zur Ersten Richtlinie Nr. 71/250/EWG der Kommission vom 15. Juni 1971, mit Ausnahme des die Vorbereitung der Analyseprobe betreffenden Teils, finden auf die in der Anlage zu dieser Richtlinie beschriebenen Methoden Anwendung.

### Artikel 2

Die Mitgliedstaaten setzen spätestens zum 1. November 1975 die erforderlichen Rechts- oder Verwaltungsvorschriften in Kraft, um den Bestimmungen dieser Richtlinie nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich hiervon in Kenntnis.

### Artikel 3

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 20. Dezember 1974

*Für die Kommission*

*Der Präsident*

François-Xavier ORTOLI

## ANLAGE

## 1. BESTIMMUNG VON BUQUINOLAT

(Äthyl-4-hydroxy-6, 7-diisobutoxy-3-chinolincarboxylat)

## 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung von Buquinolat in Futtermitteln, Konzentraten und Vormischungen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 10 mg/kg. Decoquinat stört bei der Bestimmung.

## 2. Prinzip

Die Probe wird mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Chloroform gelöst und die Lösung dünnschicht-chromatographisch untersucht. Das Buquinolat wird mit Äthanol eluiert und spektralphotofluorimetrisch im Vergleich mit Standardlösungen bestimmt.

## 3. Reagenzien

- 3.1. Chloroform p. a.
- 3.2. Äthanol 96 v. H. (V/V) p. a.
- 3.3. Mischung aus Chloroform und Äthanol: 10 Vol. Chloroform (3.1) werden mit 1 Vol. Äthanol (3.2) gemischt
- 3.4. Äthanol 80 v. H. (V/V) p. a.
- 3.5. Kieselgel G für Dünnschicht-Chromatographie
- 3.6. Standardsubstanz: reines Buquinolat
- 3.7. Standardlösungen:
  - 3.7.1. Standardlösung 0,2 mg Buquinolat/ml:

50 mg der Standardsubstanz (3.6) werden auf 0,1 mg genau abgewogen und in einem 250-ml-Meßkolben in Chloroform (3.1) durch Erhitzen im Wasserbad bei 50 ° C gelöst. Man läßt die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen, füllt mit Chloroform (3.1) zur Marke auf und mischt.
  - 3.7.2. Standardarbeitslösung:

Von der Lösung (3.7.1) werden 5,0 — 10,0 — 15,0 — 20,0 und 25,0 ml jeweils in einen 25-ml-Meßkolben pipettiert, mit Chloroform (3.1) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese Lösungen sind unmittelbar vor Gebrauch herzustellen. Sie enthalten 0,04 — 0,08 — 0,12 — 0,16 und 0,20 mg Buquinolat pro ml.

## 4. Geräte

- 4.1. Erlenmeyerkolben von 50 und 250 ml Inhalt, mit eingeschliffenem Stopfen
- 4.2. Schüttelmaschine
- 4.3. Zentrifuge, dazu Gläser mit eingeschliffenem Stopfen, 15 ml Inhalt
- 4.4. Wasserbad, 50 ° C
- 4.5. Ausrüstung für Dünnschicht-Chromatographie
- 4.6. Glasplatten für Dünnschicht-Chromatographie, 200×200 mm. Sie werden wie folgt vorbereitet:

Die Platten werden mit einer 0,5-mm-Kieselgel-G(3.5)-Schicht gleichmäßig beschichtet. Man läßt die Platten 15 Minuten an der Luft trocknen und stellt sie danach 2 Stunden in den Trockenschrank (4.11). Anschließend werden die Platten in einem mit Kieselgel als Trocknungsmittel beschickten Exsikkator aufbewahrt. Fertig-Platten können verwendet werden, sofern sie zu denselben Ergebnissen führen wie die in der oben beschriebenen Weise vorbereiteten Platten.
- 4.7. 0,50-ml-Mikropipetten
- 4.8. Zonen-Kollektor für Dünnschicht-Chromatographie

- 4.9. Analysenlampe für kurzwelligen UV-Bereich
- 4.10. Spektralphotofluorimeter mit Xenon-Lampe und zwei Monochromatoren
- 4.11. Trockenschrank mit Ventilator, auf 100 ° C eingestellt
- 4.12. Vakuum-Rotations-Verdampfer mit Rundkolben von 250 ml Inhalt.

## 5. Ausführung

### 5.1. Vorbereitung der Probe

Die Probe wird soweit zerkleinert, daß sie vollständig durch ein Sieb von 1-mm-Maschenweite (gemäß Empfehlung ISO R 565) hindurchgeht.

### 5.2. Extraktion

Eine Menge der fein zerkleinerten und homogenisierten Probe, die etwa 1,25 mg Buquinolat enthält, wird auf 1 mg genau abgewogen und in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben (4.1) gegeben. Nach Zugabe von 100,0 ml Chloroform (3.1) wird gemischt. Der Kolben wird verschlossen und 1 Stunde unter Verwendung einer Schüttelmaschine (4.2) geschüttelt. Dann läßt man absetzen und filtriert; die ersten ml des Filtrats werden verworfen.

80,0 ml des klaren Filtrats werden in ein 150-ml-Becherglas oder in den Kolben des Vakuum-Rotations-Verdampfers (4.12) gegeben und im Wasserbad (4.4) bis fast zur Trockne eingedampft. Der ölige Rückstand wird mit wenigen ml Chloroform (3.1) aufgenommen und unter mehrmaligem Nachspülen mit wenig Chloroform quantitativ mit Hilfe eines Trichters in einen 10-ml-Meßkolben überführt. Dann wird mit Chloroform (3.1) zur Marke aufgefüllt und gemischt. Wenn die Lösung nicht klar sein sollte, zentrifugiert man 3 Minuten bei 3000 U/Min. im verschlossenen Glas.

### 5.3. Dünnschicht-Chromatographie

Auf einer Dünnschicht-Platte (4.6) werden mit einer Mikropipette (4.7) in Abständen von 2 cm jeweils 0,25 ml des nach 5.2 gewonnenen Extrakts und der fünf Standardarbeitslösungen (3.7.2) *punktförmig* aufgetragen.

Das Chromatogramm wird mit Chloroform (3.1) entwickelt, bis die Lösungsmittelfront praktisch den oberen Rand der Platte erreicht hat. Man trocknet die Platte unter einem Luftstrom und entwickelt dann mit Chloroform/Äthanol-Mischung (3.3), bis die Lösungsmittelfront etwa 12 cm weit gewandert ist. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird das Chromatogramm mit UV-Licht (4.9) bestrahlt und die Buquinolatflecken (Rf-Wert: 0,4 bis 0,6) mittels einer Nadel abgegrenzt.

### 5.4. Elution

Das Kieselgel der einzelnen abgegrenzten Zonen wird mit Hilfe eines Zonenkollektors (4.8) jeweils in ein Zentrifugenglas (4.3) überführt. Nach Zusatz von 10,0 ml Äthanol (3.4) werden die Gläser 20 Minuten geschüttelt, dann 5 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Die klaren Lösungen werden in 50-ml-Erlenmeyerkolben (4.1) dekantiert.

### 5.5. Messung der Fluoreszenz

Die Empfindlichkeit des Spektralphotofluorimeters (4.10) wird so eingestellt, daß das Eluat (5.4) der konzentriertesten Standardlösung einen Ausschlag von 100 Skalenteilen ergibt. Für die Anregung wird dabei diejenige Wellenlänge zwischen 200 und 280 nm verwendet, die die optimale Fluoreszenz ergibt. Die Messung der Emission erfolgt bei 375 nm.

Unter diesen Bedingungen wird die Fluoreszenz-Intensität der übrigen Eluate (5.4) gemessen. Aus den ermittelten Werten wird die in den 10 ml des Probeneluats enthaltene Menge *A* an Buquinolat bestimmt.

## 6. Berechnung der Ergebnisse

Der Gehalt an Buquinolat der Probe in mg/kg wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A}{P} \cdot 50\,000$$

wobei

A = durch spektralfluorimetrische Messung ermittelte Menge Buquinolat in mg,

P = Einwaage in g.

## 7. Wiederholbarkeit

Der Unterschied zwischen zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe bei Gehalten von

10 bis 20 mg/kg Buquinolat 50 v. H. des höheren Resultats,  
mehr als 20 bis 100 mg/kg 10 mg/kg absolut,  
mehr als 100 bis 5 000 mg/kg 10 v. H. des höheren Resultats,  
mehr als 5 000 bis 10 000 mg/kg 500 mg/kg absolut,  
mehr als 10 000 mg/kg 5 v. H. des höheren Resultats  
nicht überschreiten.

## 2. BESTIMMUNG VON SULFACHINOXALIN

(2-Sulfanilamidochinoxalin)

### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung von Sulfachinoxalin in Futtermitteln, Konzentraten und Vormischungen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 20 mg/kg. Sonstige Sulfonamide und Arsanilsäure stören die Bestimmung.

### 2. Prinzip

Die Probe wird mit Dimethylformamid und Chloroform extrahiert. Das Sulfachinoxalin wird in alkalischer Lösung hydrolysiert. Nach dem Neutralisieren wird das gebildete Aminoderivat diazotiert und mit N-[Naphthyl-(1)]-äthylendiamin gekuppelt. Die Extinktion der Lösung wird bei 545 nm gemessen.

### 3. Reagenzien

3.1. N,N-Dimethylformamid p. a.

3.2. Chloroform p. a.

3.3. Äthanol, absolut

3.4. Natronlauge:

10 g Natriumhydroxid p. a. und 25 g Natriumchlorid p. a. werden in Wasser gelöst, mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt und gemischt

3.5. Salzsäure p. a. (D = 1,18)

3.6. Natriumnitritlösung 0,1 v. H. (G/V)

100 mg Natriumnitrit p. a. werden in Wasser gelöst, mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und gemischt. Die Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch herzustellen.

3.7. Ammoniumamidosulfonatlösung 0,5 v. H. (G/V):

500 mg Ammoniumamidosulfonat p. a. werden in Wasser gelöst, mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und gemischt. Die Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch herzustellen.

3.8. N-[Naphthyl-(1)]-äthylendiammoniumdichloridlösung 0,1 v. H. (G/V):

100 mg N-[Naphthyl-(1)]-äthylendiammoniumchlorid werden in 0,1 v. H. (V/V) Salzsäure gelöst, auf 100 ml mit derselben Säure aufgefüllt und gemischt. Die Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch herzustellen.

3.9. Standardsubstanz: reines Sulfachinoxalin

3.10. Standardlösung:

250 mg der Standardsubstanz (3.9) werden auf 0,1 mg genau eingewogen, in 50 ml Natriumhydroxidlösung (250 ml 0,1 N Natriumhydroxidlösung p. a. + 25 ml Wasser) gelöst, auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt und gemischt. 5,0 ml dieser Lösung werden auf 100 ml mit Wasser verdünnt. 1 ml dieser Lösung enthält 25 µg Sulfachinoxalin.

### 4. Geräte

4.1. Erlenmeyerkolben mit Schliff, 250 ml Inhalt

4.2. Schüttelmaschine

4.3. Filternutsche, Porosität 3, Durchmesser: 80 mm, mit Saugflasche

4.4. Scheidetrichter, 250 ml Inhalt

- 4.5. Meßkolben, 50, 100, 250 und 500 ml Inhalt
- 4.6. Reagenzgläser, 150 mm × 25 mm
- 4.7. Wasserbad
- 4.8. Spektralphotometer mit 20-mm-Küvetten.

## 5. Ausführung

### 5.1. Vorbereitung der Probe

Die Probe wird so weit zerkleinert, daß sie vollständig durch ein Sieb von 1 mm Maschenweite (entsprechend ISO R 565 Empfehlung) hindurchgeht.

### 5.2. Extraktion

Eine Menge der fein zerkleinerten und homogenisierten Probe, die 0,25 bis 1,25 mg Sulfachinoxalin enthält, wird auf 1 mg genau abgewogen und in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben (4.1) gegeben. Nach Zugabe von 20 ml N,N-Dimethylformamid (3.1) wird gemischt und 20 Min. im siedenden Wasserbad (4.7) erhitzt. Danach läßt man unter kaltem Wasser abkühlen, versetzt mit 60 ml Chloroform (3.2), verschließt den Kolben und schüttelt 30 Min. unter Verwendung der Schüttelmaschine (4.2).

Die Lösung wird durch eine Filternutsche (4.3) unter leichtem Vakuum abgesaugt, der Erlenmeyerkolben wird mit vier Portionen von jeweils 5 ml Chloroform (3.2) ausgespült und die Waschflüssigkeit auf die Filternutsche gegeben. Anschließend wird das Filtrat in einen Scheidetrichter (4.4) überführt, die Saugflasche mit etwa 15 ml Chloroform (3.2) ausgewaschen und die Waschflüssigkeit gleichfalls in den Scheidetrichter verbracht.

### 5.3. Hydrolyse

50 ml Natronlauge (3.4) und 5 ml Äthanol (3.3) werden in den Scheidetrichter gegeben. Man mischt gründlich unter Vermeidung einer Emulsionsbildung, entweder indem man den Trichter ungefähr 20mal auf- und abkippt oder indem man ihn in horizontaler Lage um die Achse Stopfen-Auslauf dreht. Dann läßt man bis zur Phasentrennung stehen (die Trennung ist im allgemeinen nach etwa 15 Min. beendet).

Die obere Phase (wäßrige Phase) wird in einen 250-ml-Meßkolben (4.5) überführt. Die Chloroformphase wird dreimal mit jeweils 50 ml Natronlauge (3.4) extrahiert; nach jeder Extraktion wird der wäßrige Extrakt in den Meßkolben überführt. Dann wird mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gemischt.

25,0 ml dieser Lösung werden in einen 50-ml-Meßkolben (4.5) gegeben. Nach Zusatz von 5,0 ml Salzsäure (3.5) wird mit Wasser zum Volumen aufgefüllt und gemischt. Wenn erforderlich, wird filtriert, wobei die ersten 15 ml des Filtrats verworfen werden. Jeweils 10,0 ml dieser Lösung werden in zwei Reagenzgläser (4.6) A und B abpipettiert.

### 5.4. Entwicklung der Färbung und Messung der Extinktion

Man gibt in jedes Reagenzglas 2,0 ml Natriumnitritlösung (3.6), schüttelt und läßt 3 Min. stehen; dann gibt man 2,0 ml Ammoniumamidosulfonatlösung (3.7) hinzu, schüttelt und läßt 2 Min. stehen; anschließend gibt man noch 1,0 ml N-[Naphthyl-(1)]-äthylendiammoniumdichloridlösung (3.8) in Reagenzglas A und 1,0 ml Wasser in Reagenzglas B und mischt gründlich. Die Reagenzgläser werden mit einer Gummiverbindung an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen, durch Anwendung eines leichten Vakuums wird der gelöste Stickstoff entfernt.

Nach 10 Min. werden die Extinktionen  $E_A$  und  $E_B$  der Lösungen im Spektralphotometer (4.8) bei 545 nm gegen Wasser gemessen. Der Wert  $E_A - E_B$  dient zur Ermittlung der Sulfachinoxalinmenge (A) aus der zuvor gezeichneten Eichkurve (5.5).

### 5.5. Eichkurve

Von der Standardlösung (3.10) werden 2,0 — 4,0 — 6,0 — 8,0 und 10,0 ml (entsprechend 50 — 100 — 150 — 200 und 250  $\mu\text{g}$  Sulfachinoxalin) in einen 100-ml-Meßkolben (4.5) pipettiert. Man gibt jeweils 8 ml Salzsäure (3.5) hinzu, füllt mit Wasser zur Marke auf und mischt.

Jeweils 10,0 ml dieser Lösungen (entsprechend 5, 10, 15, 20 und 25  $\mu\text{g}$  Sulfachinoxalin) werden in Reagenzgläser (4.6) abpipettiert. Die Entwicklung der Färbung wird wie unter Punkt 5.4 erster Absatz beschrieben durchgeführt. Man mißt die Extinktionen bei 545 nm gegen Wasser. Zum Zeichnen der Eichkurve werden die Extinktionswerte auf der Ordinate und die entsprechenden Sulfachinoxalin-Mengen in Mikrogramm auf der Abszisse aufgetragen.

## 6. Berechnung der Ergebnisse

Der Gehalt an Sulfachinoxalin der Probe in mg/kg wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A}{P} \cdot 50$$

wobei

A = durch photometrische Messung ermittelte Menge an Sulfachinoxalin in Mikrogramm

P = Einwaage in Gramm.

## 7. Wiederholbarkeit

Der Unterschied zwischen zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe bei Gehalten von

20 bis 100 mg/kg Sulfachinoxalin 10 mg/kg absolut,  
mehr als 100 bis 5 000 mg/kg 10 v. H. des höheren Resultats,  
mehr als 5 000 bis 10 000 mg/kg 500 mg/kg absolut,  
mehr als 10 000 mg/kg 5 v. H. des höheren Resultats  
nicht überschreiten.

## 3. BESTIMMUNG VON FURAZOLIDON

[3-(5-Nitrofurfurylidenamino)-oxazolidin-2-on]

### 1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode erlaubt die Bestimmung von Furazolidon in Futtermitteln, Konzentraten und Vormischungen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 10 mg/kg.

### 2. Prinzip

Nach vorhergehender Entfettung der Probe mit Petroläther wird das Furazolidon mit Aceton extrahiert. Der Extrakt wird durch Chromatographie an einer Aluminiumoxidsäule gereinigt und das Furazolidon durch Aceton eluiert. Das Eluat wird zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Amylalkohol gelöst. Aus dieser Lösung wird das Furazolidon mit einer Harnstofflösung extrahiert und die Extinktion des Extrakts bei 375 nm gemessen.

### 3. Reagenzien

3.1. Aceton p.a.

3.2. Aluminiumoxid zur Chromatographie, neutral, Teilchengröße 100 bis 240 mesh. Es wird wie folgt vorbereitet:

500 g Aluminiumoxid werden mit 1 l heißem destilliertem Wasser geschüttelt, die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert. Diese Behandlung wird noch zweimal wiederholt, dann wird über einen Büchner-Trichter filtriert. Das Aluminiumoxid wird bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

3.3. Amylacetat p.a.

3.4. Amylalkohol p.a. (Isomergemische können verwendet werden)

3.5. Petroläther, Siedebereich 40 — 60 °C

3.6. Harnstofflösung:

90 g Harnstoff p.a. werden mit 100 ml Wasser versetzt und durch leichtes Erhitzen vollständig gelöst.

3.7. Standardsubstanz: reines Furazolidon

3.8. Standardlösung:

25 mg der Standardsubstanz (3.7) werden auf 0,1 mg genau abgewogen und in einem 250-ml-Meßkolben (4.1) in Aceton (3.1) gelöst. Man füllt mit Aceton (3.1) zur Marke auf und mischt. 1 ml dieser Lösung enthält 100 µg Furazolidon.

### 4. Geräte

4.1. Meßkolben aus braunem Glas, 100 und 250 ml Inhalt

4.2. Scheidetrichter aus braunem Glas, 100 ml Inhalt

- 4.3. Extraktionsapparatur, z. B. Soxhlet oder Twisselmann
- 4.4. Extraktionshülsen, 25 x 80 mm oder 28 x 100 mm
- 4.5. Chromatographierohr aus Glas (innerer Durchmesser 10 mm, Länge 300 mm)
- 4.6. Wasserbad
- 4.7. Spektralphotometer mit 10-mm-Küvetten.

## 5. Ausführung

*NB* Alle Arbeiten sollten stets vor direkter Lichteinwirkung geschützt durchgeführt werden.

### 5.1. Vorbereitung und Probe

Die Probe wird so weit zerkleinert, daß sie vollständig durch ein Sieb von 1 mm Maschenweite (entsprechend der ISO-Empfehlung R 565) hindurchgeht.

### 5.2. Extraktion

5 bis 20 g der fein zerkleinerten und homogenisierten Probe (höchstens 1 mg Furazolidon enthaltend) werden, auf 1 mg genau, in eine Extraktionshülse (4.4) eingewogen. Man bringt die Hülse in die Extraktionsapparatur (4.3) und extrahiert mit Petroläther (3.5). Bei Verwendung einer Soxhlet-Apparatur sind 13 bis 17 Lösungsmittelzyklen erforderlich; bei anderen Apparaturen beträgt die Extraktionsdauer mindestens 30 Min. Man entfernt die Hülse aus der Extraktionsapparatur, läßt die Lösungsmittelreste ablaufen und trocknet Hülse samt Inhalt in einem warmen Luftstrom.

Anschließend wird die getrocknete Hülse samt Inhalt in eine saubere Extraktionsapparatur eingesetzt und mit Aceton (3.1) extrahiert. Bei Verwendung einer Soxhlet-Apparatur sind mindestens 25 Lösungsmittelzyklen erforderlich; bei anderen Apparaturen sind die zur Erzielung einer vollständigen Extraktion erforderlichen Bedingungen vorher zu ermitteln. Der Acetonextrakt wird auf einem siedenden Wasserbad (4.6) bis zu einem Volumen von 5 bis 10 ml eingedampft. Anschließend läßt man auf Zimmertemperatur abkühlen.

### 5.3. Chromatographie

In das untere Ende eines Chromatographierohrs (4.5) wird ein Glaswollepfropfen eingeführt und mit einem Stab auf eine Dicke von etwa 2 bis 3 mm zusammengedrückt. Man schlämmt das nach 3.2 vorbereitete Aluminiumoxid in Aceton (3.1) auf, gießt die Aufschlammung in das Chromatographierohr und läßt absetzen. Die fertige Säule sollte eine Höhe von etwa 200 mm haben. Man läßt das Aceton bis zur Oberkante der Aluminiumoxidsäule ablaufen.

Der nach Punkt 5.2 erhaltene Acetonextrakt wird auf die Säule gegeben. Man spült den Kolben mehrmals mit Aceton (3.1) aus und gibt die Spülflüssigkeit gleichfalls auf die Säule. Unter die Säule wird ein passender Kolben gesetzt und das Furazolidon mit Aceton (3.1) eluiert. Insgesamt sind für die Elution — einschließlich der Waschflüssigkeit — etwa 150 ml Aceton zu verwenden.

### 5.4. Extraktion und Messung der Extinktion

Das nach 5.3 gewonnene Eluat wird auf dem siedenden Wasserbad (4.6) zur Trockne eingedampft. (Geringe Mengen Diacetonalkohol, die durch Kondensation des Acetons am Aluminiumoxid entstanden sein können, stören die anschließende Extraktion nicht.) Der Rückstand wird in 10 ml Amylalkohol (3.4) gelöst und die Lösung in einen Scheidetrichter (4.2) überführt. Man spült den Kolben nacheinander mit 10 ml Amylacetat (3.3) und 10 ml Harnstofflösung (3.6) aus, überführt die Lösungen gleichfalls in den Scheidetrichter und schüttelt 2 Min. kräftig.

Anschließend läßt man 3 bis 4 Min. stehen und überführt dann die wäßrige Phase in einen 100-ml-Meßkolben (4.1). Man wiederholt das Waschen und die Extraktion noch viermal mit jeweils 10 ml Harnstofflösung (3.6), die wäßrigen Phasen werden im Meßkolben gesammelt. Der Meßkolben wird anschließend mit Harnstofflösung (3.6) zur Marke aufgefüllt und umgeschüttelt. Die Extinktion der Lösung wird im Spektralphotometer (4.7) bei 375 nm gegen Harnstofflösung (3.6) gemessen. Die Furazolidonmenge wird mit Hilfe einer Eichkurve (5.5) ermittelt.

### 5.5. Eichkurve

Man bereitet vier Chromatographiesäulen vor, wie unter Punkt 5.3 (erster Absatz) beschrieben. Auf die Säulen gibt man mit der Pipette 2,5 — 5,0 — 7,5 und 10,0 ml der Standardlösung. Jede Säule wird mit 150 ml Aceton (3.1) eluiert; dann verfährt

man weiter wie unter 5.4 beschrieben. Zum Zeichnen der Eichkurve werden die Extinktionswerte auf der Ordinate, die entsprechenden Furazolidonmengen in Mikrogramm auf der Abszisse aufgetragen.

#### 6. Berechnung der Ergebnisse

Der Gehalt an Furazolidon der Probe wird in mg/kg nach der Formel

$$\frac{A}{P}$$

berechnet, wobei

A = durch photometrische Messung ermittelte Menge Furazolidon in Mikrogramm,

P = Gewicht der Einwaage in Gramm.

#### 7. Wiederholbarkeit

Der Unterschied zwischen zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe bei Gehalten von

10 bis 20 mg/kg Furazolidon 50 v. H. des höheren Resultats,

mehr als 20 bis 100 mg/kg 10 mg/kg absolut,

mehr als 100 bis 5 000 mg/kg 10 v. H. des höheren Resultats,

mehr als 5 000 bis 10 000 mg/kg 500 mg/kg absolut,

mehr als 10 000 mg/kg 5 v. H. des höheren Resultats

nicht überschreiten.

---