

ZWÖLFTE RICHTLINIE 93/117/EG DER KOMMISSION
vom 17. Dezember 1993
zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersu-
chung von Futtermitteln

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN
GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen
Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 70/373/EWG des Rates vom
20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher
Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die
amtliche Untersuchung von Futtermitteln ⁽¹⁾, zuletzt geän-
dert durch die Verordnung (EWG) Nr. 3768/85 ⁽²⁾, insbe-
sondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe :

Gemäß der Richtlinie 70/373/EWG werden die
amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Fest-
stellung, ob die aufgrund der Rechts- und Verwaltungs-
vorschriften festgelegten Anforderungen an Beschaffen-
heit und Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind,
nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und
Analysemethoden durchgeführt.

Für die Kontrolle der Einhaltung der Bedingungen des
Einsatzes von Robinidin und von Methylbenzoquat in
Futtermitteln sollte eine gemeinschaftliche Analyseme-
thode festgelegt werden.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen
entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermit-
telausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN :

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für
die amtliche Untersuchung von Futtermitteln auf ihren

Gehalt an Robenedin und Methylbenzoquat nach der im
Anhang beschriebenen Methode durchgeführt werden.

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten erlassen die erforderlichen Rechts-
und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie bis
spätestens 30. November 1994 nachzukommen. Sie unter-
richten die Kommission unverzüglich davon.

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

Artikel 3

Diese Richtlinie tritt am dritten Tag nach ihrer Veröffent-
lichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*
in Kraft.

Brüssel, den 17. Dezember 1993

Für die Kommission

René STEICHEN

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. Nr. L 170 vom 3. 8. 1970, S. 2.

⁽²⁾ ABl. Nr. L 362 vom 31. 12. 1985, S. 8.

ANHANG

1. BESTIMMUNG VON ROBENIDIN

1,3-bis[(4-Chlorobenzyliden)-amino]-guanidin-hydrochlorid

1. Zweck und Anwendungsbereich

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

2. Prinzip

Die Probe wird mit salzsaurem Methanol extrahiert. Der Extrakt wird getrocknet, ein aliquoter Teil wird zur Reinigung auf eine Aluminiumoxidsäule gegeben. Robenidin wird mit Methanol von der Säule eluiert, eingengt und mit der mobilen Phase auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Der Robenidingehalt wird mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung eines UV-Detektors bestimmt.

3. Reagenzien

3.1. Methanol

3.2. Salzsaures Methanol

4,0 ml Salzsäure (p_{20} ca 1,18 g/ml) werden in einen 500-ml-Meßkolben überführt. Es wird mit Methanol (3.1) zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Diese Lösung ist vor Gebrauch frisch herzustellen.

3.3. Acetonitril für die HPLC

3.4. Molekularsieb

Typ 3A, 8—12 mesh (Korngröße 1,6—2,5 mm, kristallines Aluminiumsilicat, Porendurchmesser 0,3 nm)

3.5. Aluminiumoxid sauer, Aktivitätsstufe I, für die Säulenchromatographie

100 g Aluminiumoxid werden in ein geeignetes Gefäß gegeben und mit 2,0 ml Wasser versetzt. Das Gefäß wird verschlossen und etwa 20 Minuten geschüttelt. Das Aluminiumoxid wird in einem gut verschlossenen Behälter aufbewahrt.

3.6. Kaliumdihydrogenphosphatlösung, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

3,40 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in einem 1 000-ml-Meßkolben in Wasser (für die HPLC) gelöst. Es wird zur Marke aufgefüllt und durchmischt.

3.7. Dinatriumhydrogenphosphatlösung, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

3,55 g wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat (oder 4,45 g Dihydrat oder 8,95 g Dodecahydrat) werden in einem 1 000-ml-Meßkolben in Wasser (für die HPLC) 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 (für die HPLC)

50 ml Kaliumdihydrogenphosphatlösung (3.6)

50 ml Dinatriumhydrogenphosphatlösung (3.7).

Die Lösung wird über ein 0,22- μm -Filter (4.6) filtriert und entgast (z. B. durch zehnmündige Ultraschallbehandlung).

3.9. Standardsubstanz

Robenidin 1,3-bis[(4-Chlorobenzyliden)-amino]-guanidin-hydrochlorid, E 758, rein

3.9.1. Robenidin-Standard-Stammlösung, 300 µg/ml

30 mg Standardsubstanz (3.9) werden auf 0,1 mg genau eingewogen, in einem 100-ml-Meßkolben in salzsaurem Methanol (3.2) gelöst, mit demselben Lösungsmittel zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Der Meßkolben wird mit Aluminiumfolie umhüllt und im Dunkeln aufbewahrt.

3.9.2. Robenidin-Standardlösung, 12 µg/ml

10,0 ml Robenidin-Standard-Stammlösung (3.9.1) werden 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 und 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 µg/ml. Die Lösungen sind vor Gebrauch frisch herzustellen.

4. Geräte**4.1. Glassäule**

Braunglas mit Auslaufhahn und Reservoir mit einem Fassungsvermögen von ca. 150 ml, Innendurchmesser 10—15 mm, Länge 250 mm.

4.2. Schüttelmaschine**4.3. Rotationsverdampfer****4.4. HPLC-Einrichtung mit UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung oder Diodenarray-Detektor mit einem Wellenlängenbereich von 250—400 nm****4.4.1. Trennsäule, 300 mm × 4 mm, C₁₈-Füllmaterial, Teilchengröße 10 µm oder vergleichbare Säule****4.5. Glasfaserfilterpapier (Whatman GF/A oder gleichwertig)****4.6. Membranfilter, 0,22 µm****4.7. Membranfilter, 0,45 µm****5. Durchführung**

Anmerkung: Robenidin ist lichtempfindlich. Bei allen Verfahrensschritten sind Glasgeräte aus Braunglas zu verwenden.

5.1. Allgemeines

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

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. Um auf einen Gehalt von 60 mg/kg anzureichern, werden 3,0 ml der Standardlösung (3.9.1) in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben überführt und im 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) fortgefahren wird.

Anmerkung: Für den Zweck dieser Methode sollte die Blindprobe ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Robenidin soll nicht nachweisbar sein.

5.2. Extraktion

15 g der vorbereiteten Probe werden auf 0,01 g genau in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 100,0 ml salzsaurem Methanol (3.2) versetzt und nach Verschließen des Kolbens 1 Std. auf der Schüttelmaschine (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, der Kolben wird verschlossen und 5 min geschüttelt. Anschließend wird sofort über ein Glasfaserfilterpapier filtriert. Diese Lösung wird für die Reinigung (5.3) aufbewahrt.

5.3. *Reinigung*

5.3.1. Vorbereiten der Aluminiumoxidsäule

Das untere Ende der Glassäule (4.1) wird mit einem Glaswattebausch versehen, der mit einem Glasstab zusammengedrückt wird. 11,0 g des vorbereiteten Aluminiumoxids (3.5) werden in die Säule gegeben. 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 Säule wird das Aluminiumoxid verdichtet.

5.3.2. Reinigen der Probe

5,0 ml des Probenextrakts (5.2) werden 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 Fließgeschwindigkeit von 2—3 ml/min 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 Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird mit 3—4 ml der mobilen Phase (3.8) gelöst und quantitativ in einen 10-ml-Meßkolben überführt. Der Kolben wird mehrmals mit je 1—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 über ein 0,45-µm-Filter (4.7) filtriert. Diese Lösung wird für die HPLC-Bestimmung (5.4) aufbewahrt.

5.4. *HPLC-Bestimmung*

5.4.1. Bedingungen

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

HPLC-Trennsäule (4.4.1)

Mobile Phase für die HPLC (3.8)

Durchflußrate: 1,5—2 ml/min

Detektionswellenlänge: 317 nm

Einspritzvolumen: 20—50 µl.

Die Stabilität des chromatographischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.9.3), die 3,6 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erhalten werden.

5.4.2. Kalibrierkurve

Jede Kalibrierlösung (3.9.3) wird mehrmals eingespritzt, und die Peakhöhen (-flächen) für die einzelnen Konzentrationen werden gemessen. Es wird eine Kalibrierkurve erstellt, indem die mittleren Peakhöhen (-flächen) auf der Ordinate und die dazugehörigen Konzentrationen in µg/ml auf der Abszisse aufgetragen werden.

5.4.3. 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 Kalibrierkurve (5.4.2) die Konzentration der Probenlösung in µg/ml bestimmt.

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

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

Hierin bedeuten:

c = Robenidinkonzentration der Probenlösung in µg/ml

m = Probeneinwaage in g.

7. *Überprüfung der Ergebnisse*

7.1. *Identität*

Die Identität des Analyten kann durch Co-Chromatographie oder mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors bestätigt werden, wobei die Spektren der Probenlösung und der Kalibrierlösung (3.9.3), die 6,0 µg/ml enthält, verglichen werden.

7.1.1. Co-Chromatographie

Ein Probenextrakt wird mit einer geeigneten Menge Kalibrierlösung (3.9.3) versetzt. Die Menge des zugesetzten Robenidins sollte dem erwarteten Robenidingehalt des Probenextrakts entsprechen.

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

7.1.2. Diodenarray-Detektion

Die Ergebnisse werden gemäß den nachstehenden Kriterien beurteilt:

- Die Wellenlängen bei maximaler Absorption des Proben- und des Standardspektrums an der Peakspitze des Chromatogramms müssen innerhalb eines Bereichs übereinstimmen, der durch das Auflösungsvermögen des Detektionssystems bestimmt wird. Für die Diodenarray-Detektion beträgt dieser Bereich ± 2 nm.
- Zwischen 250 und 400 nm dürfen das Proben- und Standardspektrum an den Peakspitzen des Chromatogramms in den Bereichen, die zwischen 10 % und 100 % relativer Absorption liegen, keine Unterschiede aufweisen. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung zwischen den beiden Spektren an keiner Stelle mehr als 15 % der Absorption des Standards beträgt.
- Zwischen 250 und 400 nm dürfen sich die Spektren des Probenextrakts im Anstieg, am Maximum und im Abstieg des Probenpeaks in den Bereichen des Spektrums zwischen 10 % und 100 % relativer Absorption nicht unterscheiden. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung der Spektren an keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Spektrums am Peakmaximum beträgt.

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

7.2. Wiederholbarkeit

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

7.3. Wiederfindungsrate

Für eine angereicherte Blindprobe soll die Wiederfindungsrate mindestens 85 % betragen.

8. Ergebnisse eines Ringversuchs

Bei einem EWG-Ringversuch wurden vier Proben von Geflügel- und Kaninchenfutter in Form von Mehl und Pellets von zwölf Laboratorien analysiert, wobei mit jeder Probe zwei Parallelbestimmungen durchgeführt wurden. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

	Geflügel		Kaninchen	
	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.

2. BESTIMMUNG VON METHYLBENZOQUAT

7-Benzyl-oxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-chinolon

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode dient der Bestimmung von Methylbenzoquat in Futtermitteln. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 1 mg/kg.

2. Prinzip

Methylbenzoquat wird mit methanolischer Methansulfonsäurelösung aus der Probe extrahiert. Der Extrakt wird mit Dichlormethan, mittels Ionenaustauschchromatographie und anschließend erneut mit Dichlormethan gereinigt. Der Methylbenzoquatgehalt wird mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung eines UV-Detektors bestimmt.

3. Reagenzien

3.1. Dichlormethan

3.2. Methanol für die HPLC

3.3. Mobil-Phase für die HPLC

Gemisch aus Methanol (3.2) und Wasser (für die HPLC) 75 + 25 (v + v).

Die Lösung wird über ein 0,22- μ m-Filter (4.5) filtriert und entgast (z. B. durch zwanzigminütige Ultraschallbehandlung).

3.4. Methanolische Methansulfonsäurelösung, $\sigma = 2\%$

20,0 ml Methansulfonsäure werden mit Methanol (3.2) auf 1 000 ml verdünnt.

3.5. Salzsäure, $\sigma = 10\%$

100 ml Salzsäure (p_{20} ca. 1,18 g/ml) werden mit Wasser 1 000 ml verdünnt.

3.6. Kationenaustauschharz Amberlite CG-120 (Na), 100—200 mesh

Das Harz wird vor der Verwendung behandelt: 100 g Harz werden 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 über ein Papierfilter unter Vakuum filtriert. Das Harz wird zweimal 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-Benzyl-oxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-chinolon), rein

3.7.1. Methylbenzoquat-Standard-Stammlösung, 500 μ g/ml

50 mg Standardsubstanz (3.7) werden 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 μ g/ml

5,0 ml Methylbenzoquat-Standard-Stammlösung (3.7.1) werden in einen 50-ml-Meßkolben überführt. Es wird mit Methanol (3.2) zur Marke aufgefüllt und durchmischt.

3.7.3. Kalibrierlösungen

Von der Methylbenzoquat-Standardlösung (3.7.2) werden 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 und 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 μ g/ml. Die Lösungen sind vor Gebrauch frisch herzustellen.

4. Geräte

4.1. Schüttelmaschine

- 4.2. *Rotationsverdampfer*
- 4.3. *Glassäule (250 mm × 15 mm) mit Auslaufbahn 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. *Trennsäule, 300 mm × 4 mm, C₁₈-Füllmaterial, Teilchengröße 10 µm oder vergleichbare Säule*
- 4.5. *Membranfilter, 0,22 µm*
- 4.6. *Membranfilter, 0,45 µm*
5. **Durchführung**
 - 5.1. *Allgemeines*
 - 5.1.1. Eine Blindprobe wird untersucht, um zu prüfen, daß weder Methylbenzoat noch Störsubstanzen vorhanden sind.
 - 5.1.2. Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe untersucht wird, die mit Methylbenzoat angereichert wurde. Die zugesetzte Menge an Methylbenzoat sollte der in der Probe vorhandenen Menge entsprechen. Um auf einen Gehalt von 15 mg/kg anzureichern, 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.

Anmerkung: Für den Zweck dieser Methode sollte die Blindprobe ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Methylbenzoat soll nicht nachweisbar sein.
 - 5.2. *Extraktion*

20 g der vorbereiteten Probe werden auf 0,01 g genau in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 100,0 methanolischer Methansulfonsäure (3.4) versetzt und 30 min auf der Schüttelmaschine (4.1) geschüttelt. Die Lösung wird filtriert und das Filtrat für die Flüssig-Flüssig-Trennung (5.3) aufbewahrt.
 - 5.3. *Flüssig-Flüssig-Trennung*

25,0 ml des Filtrats (5.2) werden in einen 500-ml-Scheidetrichter überführt, der 100 ml Salzsäure (3.5) enthält. Nach der Zugabe von 100 ml Dichlormethan (3.1) wird 1 min lang geschüttelt, die Phasentrennung abgewartet und die untere Phase (Dichlormethan) in einen 500-ml-Rundkolben ablaufen gelassen. Die Extraktion der wäßrigen Phase wird zweimal mit je 40 ml Dichlormethan wiederholt. Die vereinigten Dichlormethanextrakte werden am Rotationsverdampfer (4.2) bei 40 °C und vermindertem Druck bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 20—25 ml Methanol (3.2) gelöst und der Kolben verschlossen. Der gesamte Extrakt wird für die Ionenaustauschchromatographie (5.4) aufbewahrt.
 - 5.4. *Ionenaustauschchromatographie*
 - 5.4.1. *Vorbereitung der Kationenaustauschsäule*

Das untere Ende der Glassäule (4.3) wird mit einem Glaswattebausch versehen. 5,0 g des behandelten Kationenaustauschharzes (3.6) werden mit 50 ml Salzsäure (3.5) aufgeschlämmt, in die Glassäule gegeben und absetzen gelassen. Der Säureüberschuß wird bis knapp über die Harzoberfläche ablaufen gelassen und 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. *Säulenchromatographie*

Der Extrakt (5.3) wird mittels einer Pipette vorsichtig auf die Säule gegeben. Der Rundkolben wird zweimal mit je 5—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 (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—10 ml Methanol (3.2) gespült und die anfallende Spülflüssigkeit ebenfalls in den Scheidetrichter gegeben. Dann werden 300 ml Salzsäure (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 zweimal mit je 70 ml Dichlormethan wiederholt, und diese Extrakte werden mit dem ersten Extrakt im Rundkolben vereinigt.

Der Dichlormethanextrakt wird am Rotationsverdampfer (4.2) bei 40 °C und vermindertem Druck bis zur Trockene eingengt. 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 zweimal mit je 1—2 ml Methanol gespült, und die Spüllösungen werden in den Meßkolben überführt. Es wird mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Ein aliquoter Teil wird über ein Membranfilter (4.6) filtriert. Die Lösung wird für die HPLC-Bestimmung (5.6) aufbewahrt.

5.6. HPLC-Bestimmung

5.6.1. Bedingungen

Die folgenden Angaben sind Richtwerte; andere Bedingungen 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—1,5 ml/min

Detektionswellenlänge: 265 nm

Einspritzvolumen: 20—50 µl.

Die Stabilität des chromatographischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.7.3), die 4 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erhalten werden.

5.6.2. Kalibrierkurve

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

5.6.3. 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 Kalibrierkurve (5.6.2) die Konzentration der Probenlösung in µg/ml bestimmt.

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

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

Hierin bedeuten:

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-Chromatographie oder mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors bestätigt werden, wobei die Spektren der Probenlösung und der Kalibrierlösung (3.7.3), die 10,0 µg/ml enthält, verglichen werden.

7.1.1. Co-Chromatographie

Ein Probenextrakt wird mit einer geeigneten Menge Kalibrierlösung (3.7.2) versetzt. Die Menge des zugesetzten Methylbenzoquats sollte dem erwarteten Methylbenzoquatgehalt des Probenextrakts entsprechen.

Unter Berücksichtigung der zugesetzten Menge und der Verdünnung des Extraktes darf nur die Höhe des Methylbenzoquatpeaks vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe aus dem Zusatzversuchs sollte nicht mehr als $\pm 10\%$ von der des Peaks der Probenlösung abweichen.

7.1.2. Diodenarray-Detektion

Die Ergebnisse werden gemäß den nachstehenden Kriterien beurteilt:

- Die Wellenlängen bei maximaler Absorption des Proben- und des Standardspektrums an der Peakspitze des Chromatogramms müssen innerhalb eines Bereiches übereinstimmen, der durch das Auflösungsvermögen des Detektionssystems bestimmt wird. Für die Diodenarray-Detektion beträgt dieser Bereich ± 2 nm.
- Zwischen 220 und 350 nm dürfen das Proben- und das Standardspektrum an den Peakspitzen des Chromatogramms in den Bereichen, die zwischen 10 % und 100 % relativer Absorption liegen, keine Unterschiede aufweisen. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung zwischen den beiden Spektren an keiner Stelle mehr als 15 % der Absorption des Standards beträgt.
- Zwischen 220 und 350 nm dürfen sich die Spektren des Probenextrakts im Anstieg, am Maximum und im Abstieg des Probenpeaks in den Bereichen des Spektrums zwischen 10 % und 100 % relativer Absorption nicht unterscheiden. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung der Spektren an keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Spektrums am Peakmaximum beträgt.

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

7.2. Wiederholbarkeit

Der Unterschied zwischen Ergebnissen von zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe bei Methylbenzoquatgehalten von 4—20 mg/kg 10 % des höheren Resultats nicht überschreiten.

7.3. Wiederfindungsrate

Für eine angereicherte Blindprobe soll die Wiederfindungsrate mindestens 90 % betragen.

8. Ergebnisse eines Ringversuchs

Fünf Proben wurden von zehn Laboratorien analysiert, wobei mit jeder Probe zwei Parallelbestimmungen durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Blindprobe	Mehl 1	Pellets 1	Mehl 2	Pellets 2
Mittelwert (mg/kg)	n.d.	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
Wdf (%)	—	92,00	93,00	92,00	89,00

Wdf = Wiederfindungsrate.

S_r = Standardabweichung der Wiederholbarkeit.

VK_r = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit.

S_R = Standardabweichung der Vergleichbarkeit.

VK_R = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit.