

Methodenentwicklung im Rahmen eines SM&T-Projektes anhand der Bestimmung von Maduramycin

B. STOISSER

Titel des Projektes: Entwicklung und Validierung von HPLC-Methoden zur Bestimmung von Kokzidiostatika und Antibiotika für die offizielle Futtermittelkontrolle (CANFAS)

Das Projekt wird durch die Europäische Kommission (Standards, Measurement and Testing Programme (SMT)) finanziert.

Das Ergebnis – validierte Methoden – soll in die EU-Gesetzgebung einfließen. Die Notwendigkeit zur Erarbeitung der Methoden wurde vom “Committee of Experts on Methods of Analysis for Feedingstuffs” (CEMA) bestätigt.

Koordinator des Gesamtprojektes: Dr. Jacob de Jong (RIKILT)

Leiter der Arbeitsgruppen für die einzelnen Zusatzstoffe:

- LUFA, Karlsruhe, für Narasin und Olaquinox/Carbadox (niedrige Gehalte)
- BFL, Wien, für Maduramycin
- RIKILT, Wageningen, für Nicarbazin und Viginiamycin

Die Zwischen-Labor-Validierungen werden von Laboratorien aus Dublin (IR), Rom (IT), Hamburg (GE), Uppsala (SW) und Lyngby (DK) durchgeführt.

Arbeitsumfang

Das Projekt ist für eine Zeitdauer von 3 Jahren geplant und in 5 Arbeitsschritte unterteilt (Beginn 01.05.1998).

	<i>Zeitdauer/Monate</i>
Arbeitsprogramm 1	
Entwicklung und laborinterne Validierung der Methoden	1 - 12
Arbeitsprogramm 2	
Validierung zwischen den Laboratorien	13 - 17
Arbeitsprogramm 3	
Test-Herstellung der Proben für Ringversuch	13 - 18
Homogenitätstest, Stabilitätstest	20 - 22, 27 - 29

Arbeitsprogramm 4:
Ringversuche mit den HPLC-Methoden 23 - 25, 30 - 32

Arbeitsprogramm 5:
Publizieren der Methode Abfassung in international anerkanntem Format 34 - 36

Arbeitsprogramm 1

Prinzip der Methode zur Bestimmung von Maduramycin:

Der Wirkstoff wird aus der Probe mit Methanol extrahiert und durch HPLC mit Nachsäulenderivatisierung mit Vanillin und Detektion bei 520 nm bestimmt. Als geeignetste Trennsäule wurde die BDS-Hypersil 5µ (250 x 4,6) diagnostiziert.

Validierung:

Die **Kalibrationskurve** ist zwischen 0,2 µg/ml (1 mg/kg) und 2,0 µg/ml (10 mg/kg) **linear** und die Verteilung der Varianzen homogen.

Spezifität: Keine Interferenz (eine Ausnahme) mit 24 Futtermitteln aus ganz Europa, **Basislinientrennung** mit allen anderen Ionophoren.

Die **Wiederfindung** beträgt zwischen 89% und 112% (Wiederfindungsfunktion 97% bzw 104%).

Wiederholvariationskoeffizient CVr ist < 8% (Bei Premix auch gering darüber)

Bestimmungsgrenze wurde mit 2mg/kg festgelegt (1mg/kg errechnet)

Robustheit: Die Methode erwies sich als **robust** bezüglich Säulentemperatur und Extraktionstemperatur, Reihenfolge des Zusammenmischens der Vanillinlösung, leichte Erwärmung des Eisbades der Vanillinlösung und Extraktion mit Magnetrührer bzw Ultraschallbad. Ein Wassergehalt im Extraktionsmittel (Methanol) bewirkt eine Herabsetzung der Wiederfindung.

Arbeitsprogramm 2

Um mögliche Schwierigkeiten und Unklarheiten während der Ringversuche zu verhindern, wurde eine **Validierung** von 2 Laboratorien, die nicht an der Methodenentwicklung beteiligt waren, vorgeesehen.

Im Falle des Maduramycins waren dies die Abteilung “Angewandte Botanik” der **Universität Hamburg** und das “**Nationale Veterinärinstitut**” in Uppsala. Die Validierung beinhaltet folgende Punkte: Wiederfindung (= 80%), Wiederholbarkeit (CVr = 8%), Spezifität mit Rücksicht auf Matrixeffekte und Bestimmungsgrenze. Die vom BFL erarbeiteten Ergebnisse konnten von den beiden Anstalten bestätigt werden.

Arbeitsprogramm 3

Mit 4 von Hoffmann La Roche produzierten Futtermitteln (2 Broilerfutter, 1 Truthahnfutter, 1 Premix mit Nominalgehalten von 5 2,5 5 und 500 mg/kg Maduramycin) wurden Homogenitätstests und Stabilitätstests durchgeführt (BFL).

Die Futtermittel erwiesen sich als homogen (ANOVA).

Die Futtermittel wurden über 4 Monate bei 4°C, Zimmertemperatur und 37°C aufbewahrt und monatlich der Maduramycingehalt bestimmt.

Dabei zeigte sich eine Abnahme des Gehaltes bei Zimmertemperatur und bei 37°C bis auf 20% (Neue Produktionsstätte von Maduramycin).

Als Konsequenz werden die Proben für den Ringtest mit Trockeneis versendet.

Arbeitsprogramm 4

Die HPLC-Methoden werden mit den im Arbeitsprogramm 3 getesteten Proben (neue Produktion) unter Verwendung der im Arbeitsprogramm 1 erarbeiteten Vor-

Autor: Dr. Bernd STOISSER, Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft, Spargelfeldstr. 191, 1226 WIEN

schriften getestet. Ein zweiter Ringversuch wird nur dann durchgeführt, wenn gewisse Kriterien bezüglich Vergleichs- und Wiederholvariationskoeffizient nicht erfüllt werden.

Von 30 Ringtestteilnehmern aus ganz Europa sind bei den jeweiligen Parametern zwischen 13 und 23 Teilnehmer angemel-

det (Maduramycin 14 Teilnehmer). Bei einem sog. kickoff-meeting werden die Modalitäten des Ringversuchs unter Teilnahme aller Interessenten besprochen.

Genauere Arbeitsanweisungen bezüglich Analyse und Aufbewahrung werden mitgeliefert. Die Ergebnisse werden über e-mail mittels eines EXCEL-Formblattes

nach Wageningen gesendet und dort ausgewertet.

Arbeitsprogramm 5

Für den Ringtest ist die Methode im bei EU-Methoden üblichen Format abgefasst. Eine Publikation in einer internationalen Fachzeitschrift ist nach Beendigung des Projektes vorgesehen.