

DIN EN 16158

ICS 65.120

**Futtermittel –
Bestimmung des Semduramicingehalts –
Flüssigkeitschromatographisches Verfahren mit verzweigter
analytischer Vorgehensweise;
Deutsche Fassung EN 16158:2012**

Animal feeding stuffs –
Determination of semduramicin content –
Liquid chromatographic method using a "tree" analytical approach;
German version EN 16158:2012

Aliments pour animaux –
Dosage de la semduramicine –
Chromatographie liquide utilisant une approche analytique en arbre;
Version allemande EN 16158:2012

Gesamtumfang 24 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16158:2012) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN (Niederlande) gehalten wird.

Die Mitarbeit des DIN beim Europäischen Komitee für Normung (CEN) wird für den Bereich des CEN/TC 327 über das nationale Spiegelgremium, den Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), wahrgenommen.

Deutsche Fassung

**Futtermittel - Bestimmung des Semduramicingehalts -
Flüssigkeitschromatographisches Verfahren mit verzweigter
analytischer Vorgehensweise**

Animal feeding stuffs - Determination of semduramicin
content - Liquid chromatographic method using a "tree"
analytical approach

Aliments pour animaux - Dosage de la semduramicine -
Chromatographie liquide utilisant une approche analytique
en arbre

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 30. Dezember 2011 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien	4
5 Geräte	7
6 Probenahme	8
7 Herstellung der Untersuchungsprobe	9
7.1 Allgemeines	9
7.2 Laborprobe	9
7.3 Untersuchungsprobe	9
7.4 Prüfmenge	9
8 Durchführung	9
8.1 Herstellung von positiven und negativen Kontrollproben	9
8.2 Probenextraktion	9
8.3 Filtration	9
8.4 HPLC-Analyse	9
8.5 HPLC-Bestimmung	12
9 Berechnung	13
9.1 LC-MS-Verfahren	13
9.2 LC-PCD-UV-Verfahren	14
10 Präzision	15
10.1 Ringversuch	15
10.2 Wiederholpräzision	15
10.3 Vergleichpräzision	15
11 Untersuchungsbericht	15
Anhang A (informativ) Ringversuchsergebnisse	16
A.1 Durchführung	16
A.2 Statistische Auswertung der Ergebnisse	17
A.3 Beispielchromatogramm	20
Literaturhinweise	22

Vorwort

Dieses Dokument (EN 16158:2012) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis August 2012, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2012 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein hochleistungsflüssigkeitschromatographisches (HPLC) Verfahren zur Bestimmung des Semduramingehaltes bei einem zugelassenen Gehalt in Futtermitteln [2] mittels massenspektrometrischer Detektion oder Nachsäulenderivatisierung und (UV)-VIS-Detektion (nachstehend UV-Detektion) fest. Das Verfahren gilt für Geflügelfutter. Bei der Anwendung von Massenspektrometrie zum Nachweis beträgt die Bestimmungsgrenze 1,0 mg/kg und beim Nachweis mittels UV mit Nachsäulenderivatisierung 3,0 mg/kg. Niedrigere Bestimmungsgrenzen sind erreichbar, das ist jedoch vom Anwender zu validieren.

Das Verfahren ermöglicht es, Semduramicin von Monensin, Salinomycin, Narasin, Maduramicin und Lasalocid zu unterscheiden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

prEN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung (ISO/DIS 6498)*

3 Kurzbeschreibung

Semduramicin wird mit Acetonitril unter mechanischem Schütteln 30 min extrahiert. Die Extrakte werden durch 0,2-µm-Nylonfilter filtriert. Semduramicin wird durch Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie entweder mit Detektion durch Elektrospray(ESI)-Single-Quadrupol-Massenspektrometrie (ESI-MS, en: Electrospray Ionisation — Mass Spectrometry) im Einzelionennachweis (SIM, en: single ion monitoring)-Modus, in der Methode als LC-MS-Verfahren [4] (en: Liquid Chromatography — Mass Spectrometry) bezeichnet, oder unter Anwendung einer Nachsäulenderivatisierung mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB) und spektrometrischer Detektion bei 598 nm, in der Methode als LC-PCD-UV-Verfahren (en: Liquid Chromatography — Post Column Reaction — (UV-)VIS Detection) [5] bezeichnet, bestimmt. Wenn das angewendete Detektionsverfahren ESI-MS ist, erfolgt die quantitative Bestimmung durch ein Verfahren der Standardaddition. Wenn das LC-PCD-UV-Verfahren angewendet wird, erfolgt die quantitative Bestimmung durch Kalibrierung mit einem externen Standard.

4 Reagenzien

Sofern nicht anders festgelegt, sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit zu verwenden.

4.1 LC-MS.

4.1.1 Wasser, Reinheitsgrad für HPLC oder von gleichwertiger Reinheit (z. B. mit Milli-Q gereinigtes Wasser).

4.1.2 Acetonitril, Reinheitsgrad für HPLC-Gradienten, Reinheitsgrad mindestens 99,9 %.

4.1.3 Methanol, Reinheitsgrad für HPLC oder Hypergrade für LC-MS.

4.1.4 Ammoniumformiat, Reinheitsgrad für HPLC.

4.1.5 Mobile Phase.

4.1.5.1 Ammoniumformiat-Lösung, $c = 20 \text{ mmol/l}$.

1,25 g Ammoniumformiat (4.1.4) sind auf 0,01 g genau in einen 1 000-ml-Messkolben einzuwiegen. Es ist in Wasser (4.1.1) aufzulösen, und der Kolben ist mit diesem Wasser auf 1 000 ml aufzufüllen. Monatlich sind frische Lösungen herzustellen.

4.1.5.2 Mobile Phase für HPLC.

Methanol (4.1.3) und Ammoniumformiat-Lösung (4.1.5.1) sind im Verhältnis 90 + 10 (Volumenanteil) zu mischen. Die Lösung ist unter einem Vakuum mit einem Filtrationssystem für Lösemittel (5.11) und Nylonfiltern (5.13) zu filtrieren.

4.2 LC-PCD-UV.

Zusätzlich zu den Reagenzien 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 und 4.1.4:

4.2.1 Schwefelsäure, Reinheitsgrad mindestens 98 %.

4.2.2 Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB), Reinheitsgrad mindestens 99 %.

4.2.3 Ameisensäure, Reinheitsgrad mindestens 98 %.

4.2.4 Mobile Phase.

4.2.4.1 Reagens für die Nachsäulenreaktion.

In einen 500-ml-Messkolben (5.7) sind zuerst etwa 250 ml kaltes Methanol (4.1.3), anschließend 15 ml Schwefelsäure (4.2.1) zu geben. In dem Gemisch sind 15 g DMAB (4.2.2) zu lösen. Das Gemisch ist abzukühlen und mit Methanol (4.1.3) auf 500 ml aufzufüllen. Unter Vakuum ist mit der Ausrüstung nach (5.11) und einem Membranfilter (5.12) zu filtrieren. Das Reagens ist im Kühlschrank (von +2 °C bis +8 °C) aufzubewahren. Dieses Reagens ist 28 Tage stabil.

ANMERKUNG Das zur Herstellung des Reagens für die Nachsäulenreaktion verwendete Methanol sollte gekühlt aufbewahrt werden (von +2 °C bis +8 °C).

4.2.4.2 Ammoniumformiat-Lösung, $c = 100 \text{ mmol/l}$ und $\text{pH} = 3$.

6,30 g Ammoniumformiat (4.1.4) sind auf 0,01 g genau in einen 1 000-ml-Messkolben (5.7) einzuwiegen. Es ist in 900 ml Wasser (4.1.1) aufzulösen. Der pH-Wert ist mit Ameisensäure (4.2.3) auf 3,0 einzustellen und der Kolben ist mit gereinigtem Wasser auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lösung ist monatlich frisch herzustellen.

4.2.4.3 Mobile Phase für die HPLC (Blindlösung).

Methanol (4.1.3) und Ammoniumformiat-Lösung (4.2.4.2) sind im Verhältnis 90 + 10 (Volumenanteil) zu mischen. Die Lösung ist unter einem Vakuum mit einem Filtrationssystem für Lösemittel (5.11) und Nylonfiltern (5.13) zu filtrieren.

4.3 Referenzstandards für das LC-PCD-UV-Verfahren.

WARNUNG — Die Inhalation von und das Aussetzen gegenüber toxischen Standardmaterialien und Lösungen davon ist zu vermeiden. Bei der Handhabung von Lösemitteln und Lösungen ist in einem Abzugsschrank zu arbeiten. Sicherheitsbrille und Schutzkleidung sind zu tragen.

Die Angabe der Reinheit ist für jede Charge des Referenzstandards erforderlich.

4.3.1 Semduramicin-Natrium-Standard, Reinheitsgrad mindestens 93 %, angegeben als Semduramicin.

ANMERKUNG Erhältlich bei Phibro Animal Health Corporation, Third Floor 65 Challenger Road Ridgefield Park, NJ 07660-2103 USA. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

4.4 Referenzstandards für das LC-MS-Verfahren.

Zusätzlich zum Referenzstandard 4.3.1:

4.4.1 Nigericin-Natrium-Standard, Reinheitsgrad mindestens 98 %, als interner Standard (I.S.) zu verwenden.

ANMERKUNG Erhältlich bei Calbiochem, A Brand of EMD Biosciences, Inc. 10394 Pacific Center Court, San Diego, CA 92121 USA. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

4.5 Standardlösungen.

Sämtliche Standardlösungen sind vor Tageslicht zu schützen.

4.5.1 Semduramicin-Standardstammlösung, etwa 1 mg/ml.

10 mg Semduramicin-Natrium-Standard (4.3.1) sind möglichst genau auf 0,1 mg in einen 10-ml-Messkolben (5.7) einzuwiegen. Das genaue Gewicht von Semduramicin-Natrium ist aufzuzeichnen. Der Standard ist in Methanol (4.1.3) zu lösen und der Kolben mit Methanol auf 10 ml aufzufüllen. Die Lösung ist lichtgeschützt bei –20 °C aufzubewahren. Die Lösung ist alle 3 Monate frisch herzustellen.

Die empirische Konzentration der Semduramicin-Stammlösung ist unter Verwendung des Wertes für die Reinheit des Referenzstandards, der vom Lieferanten als Semduramicin angegeben ist, nach Gleichung (1) zu berechnen.

$$C_s = \frac{m}{10} \cdot P \quad (1)$$

Dabei ist

C_s die empirische Konzentration von Semduramicin im Stammstandard, in mg/ml;

P die Reinheit des Semduramicin-Standards, angegeben vom Lieferanten als Semduramicin, in Prozent, z. B. 0,934;

m die eingewogene Masse des Semduramicin-Natrium-Standards (4.3.1), in mg.

4.5.2 Nigericin-Natrium-Standardstammlösung (für das LC-MS-Verfahren), etwa 1 mg/ml.

10 mg Nigericin-Natrium-Standard (4.4.1) sind auf 0,1 mg genau in einen 10-ml-Messkolben (5.7) einzuwiegen. Das genaue Gewicht von Nigericin-Natrium ist aufzuzeichnen. Der Standard ist in Methanol (4.1.3) zu lösen und der Kolben mit Methanol auf 10 ml aufzufüllen. Die Lösung ist lichtgeschützt bei –20 °C aufzubewahren. Die Lösung ist alle 3 Monate frisch herzustellen.

Die empirische Konzentration der Nigericin-Natrium-Stammlösungen ist unter Verwendung des Wertes für die Reinheit des Referenzstandards, der vom Lieferanten angegeben ist, nach Gleichung (2) zu berechnen.

$$C_n = \frac{m}{10} \cdot P \quad (2)$$

Dabei ist

C_n die empirische Konzentration von Nigericin-Natrium im Stammstandard, in mg/ml;

P die Reinheit des Nigericin-Natrium-Standards, angegeben vom Lieferanten, in Prozent, z. B. 0,98;

m die eingewogene Masse des Nigericin-Natrium-Standards (4.4.1), in mg.