

DIN EN 16162

ICS 65.120

**Futtermittel –
Bestimmung von Decoquinat mit
Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) und
Fluoreszenzdetektion;
Deutsche Fassung EN 16162:2012**

Animal feeding stuffs –
Determination of decoquinate by HPLC with fluorescence detection;
German version EN 16162:2012

Aliments des animaux –
Determination du décoquinate par chromatographie liquide haute performance avec
détection fluorimétrique;
Version allemande EN 16162:2012

Gesamtumfang 25 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16162:2012) 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.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 5725 (all parts) siehe DIN ISO 5725 (alle Teile)

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 1 bis Teil 6*

Deutsche Fassung

**Futtermittel - Bestimmung von Decoquinat mit Hochleistungs-
Flüssigchromatographie (HPLC) und Fluoreszenzdetektion**

Animal feeding stuffs - Determination of decoquinat by
HPLC with fluorescence detection

Aliments des animaux - Dosage du décoquinat par
chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec
détection par fluorescence

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 4. Februar 2012 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	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Kurzbeschreibung	5
4 Reagenzien	5
5 Geräte	7
6 Probenahme	7
7 Vorbereitung der Probe	7
8 Durchführung	7
8.1 Allgemeines	7
8.2 Extraktion der Futtermittel (Decoquingatgehalt zwischen 10 mg/kg und 500 mg/kg)	7
8.3 Extraktion von Ergänzungsfuttermitteln, Vormischungen und Futtermittelzusatzstoffen (Decoquingatgehalt höher als 500 mg/kg)	8
8.4 Extraktion von Futtermittel mit Spuren von Decoquingat (Gehalt geringer als 10 mg/kg)	8
8.5 Aufgestockte Futtermittel zur Qualitätskontrolle	8
8.5.1 Blindwertprobe des Futtermittels zum Aufstocken auf 30 mg/kg	8
8.5.2 Blindwertprobe des Futtermittels zum Aufstocken auf 9 mg/kg	8
8.6 HPLC-Parameter	8
8.7 Injektionen der Standards und Kalibrierkurve	9
8.8 Probenextrakte	9
8.9 Bestätigungsverfahren	9
9 Berechnungen	9
10 Präzision	10
10.1 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze	10
10.2 Ringversuch	10
10.3 Wiederholpräzision	10
10.4 Vergleichpräzision	10
11 Untersuchungsbericht	11
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	12
Anhang B (informativ) Zusätzliche Ergebnisse der Wiederfindung	15
B.1 Wiederfindungen während der Einarbeitungsphase	15
B.2 Vor-Ringversuch; Wiederfindungsprüfung an einem Milchaustauschfutter	16
B.3 Wiederfindungen aus der Validierung des Einzel-Laboratoriums	17
Anhang C (informativ) Zusätzliche Ergebnisse für eine Aussage zur Robustheit	18
C.1 Robustheit hinsichtlich der Anregungswellenlänge während des abschließenden Ringversuchs	18
C.2 Vergleich zwischen gemahlenen und ungemahlenen Proben während des abschließenden Ringversuchs	18
C.3 Robustheit aufgrund der Ergebnisse eines Laboratoriums während des Ringversuches	19
Anhang D (informativ) HPLC-Parameter und Beispiele für Chromatogramme	21
D.1 Allgemeines	21
D.2 Beispiel für ein Chromatogramm: Kalibrierpunkt bei 0,6 µg/ml	21
D.3 Beispiel für ein Chromatogramm: Handelsübliches Lämmerfutter mit einem Decoquingatgehalt von etwa 50 mg/kg	21
D.4 Beispiel für ein Chromatogramm: Gleiches Lämmerfutter wie in D.3, mit einem Decoquingatgehalt von etwa 50 mg/kg	22
Literaturhinweise	23

Vorwort

Dieses Dokument (EN 16162:2012) 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 September 2012, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis September 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.

Einleitung

Diese Europäische Norm wurde zur quantitativen Bestimmung von Decoquinat in Futtermitteln entwickelt, um der Europäischen Kommission die Kontrolle des Gehaltes in Futtermitteln zu ermöglichen. Dieses Verfahren kann jedoch auch zur Beurteilung der Kreuzkontamination aus dem Medizinalfutter in Futtermittel angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung von Decoquinat fest. Dieses hochleistungsflüssigchromatographische (HPLC) Verfahren mit Fluoreszenzdetektion ist für die Quantifizierung des Decoquinatgehaltes in Allein- und Ergänzungsfuttermitteln, Medizinalfutter, semi-Flüssigfutter, Vormischungen und Futterzusatzstoffen geeignet.

Das Verfahren wurde vollständig für verschiedene Matrices für den Bereich von LOQ bis 60 000 mg/kg während eines international durchgeführten Ringversuches [11] validiert, besonders für Alleinfuttermittel für Geflügel, bei einem Spurenverunreinigungsgehalt von 3 mg/kg und bei einem europäisch zugelassenen Gehalt von 20 mg/kg bis 40 mg/kg [12].

Die Nachweisgrenze liegt zwischen 0,1 mg/kg und 0,3 mg/kg und die Bestimmungsgrenze ungefähr bei 0,5 mg/kg. Diese Grenzen wurden während des Ringversuchs [11] anhand der mit dem Kontrollfuttermittel ohne Zusatz erzielten Ergebnisse validiert. Niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen könnten erreicht werden, jedoch ist dann eine Validierung durch ein Einzellaboratorium erforderlich.

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

Decoquinat wird aus den Proben mit einer Lösung von 1%igem Calciumchlorid in Methanol durch mechanisches Schütteln oder Rühren für 60 min extrahiert. Nach dem Zentrifugieren oder Filtrieren wird, falls notwendig, ein Aliquot mit dem Extraktionsmittel verdünnt und durch Umkehrphasen-HPLC mit Fluoreszenzdetektion analysiert. Im Spurenbereich positive Befunde sollten durch HPLC-Analyse der Proben mit einer alternativen Anregungswellenlänge bestätigt werden.

4 Reagenzien

Wenn nicht anders festgelegt, sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und nur destilliertes oder demineralisiertes Wasser oder Wasser gleichwertiger Reinheit zu verwenden.

WARNUNG — Dieses Verfahren erfordert die Handhabung von gefährlichen Substanzen. Die Anwendung der entsprechenden Vorschriften für möglicherweise gefährliche Chemikalien wird empfohlen. Maßnahmen hinsichtlich der organisatorischen, technischen und persönlichen Sicherheit müssen eingehalten werden.

4.1 Methanol, HPLC-Reinheit.

4.2 Methanol, technische Reinheit.

4.3 Calciumchlorid, wasserfrei, Reinheit > 99 %.

4.4 HPLC-Verdünnungslösung.

Eine 10 g wasserfreiem Calciumchlorid (4.3) entsprechende Menge Calciumsalz ist in Methanol (4.1) zu lösen. Die Lösung ist gut zu mischen und auf 1 000 ml aufzufüllen.

4.5 Extraktionslösung

Eine 10 g wasserfreiem Calciumchlorid (4.3) entsprechende Menge Calciumsalz ist in Methanol (4.2) zu lösen. Die Lösung ist gut zu mischen und auf 1 000 ml aufzufüllen.

4.6 Decoquinat-Standards.

4.6.1 Decoquinatpuder-Referenzstandard mit garantierter Reinheit.

Die Reinheit muss durch ein Analysenzertifikat zertifiziert sein.

ANMERKUNG Reiner Referenzstandard ist z. B. bei Alpharma® verfügbar.

4.6.2 Decoquinat-Standard-Stammlösung, etwa 300 µg/ml.

Möglichst auf 0,1 mg genau sind 30 mg des Decoquinat-Referenzstandards (4.6.1) in einen 100-ml-Messkolben einzuwiegen und in der Verdünnungslösung (4.4) aufzulösen. Zur Unterstützung der Auflösung ist, falls erforderlich, ein Ultraschallbad zu benutzen. Die genaue Konzentration ist unter Berücksichtigung der im Zertifikat angegebenen Reinheit der Standardsubstanz (4.6.1) zu berechnen. Die Lösung ist monatlich frisch herzustellen. Sie ist im Dunkeln bei 0 °C bis 10 °C aufzubewahren.

4.6.3 HPLC-Standardlösungen.

4.6.3.1 Standard-Zwischenlösung, etwa 6 µg/ml.

Mit einer Pipette sind 2,0 ml Standard-Stammlösung (4.6.2) in einen 100-ml-Messkolben zu überführen und mit der Verdünnungslösung (4.4) bis zur Marke aufzufüllen. Die Standard-Zwischenlösung ist für jede Analysenserie zu überprüfen. Die Extinktionsdichte der Zwischenlösung kann mit der Verdünnungslösung (4.4) als Bezug für die optische Dichtemessung bei 265 nm überprüft werden. Unter diesen Bedingungen liegt der Extinktionsbereich zwischen 0,67 und 0,73. Diese Standard-Zwischenlösung wird täglich frisch hergestellt.

4.6.3.2 HPLC-Kalibrierstandardlösungen, etwa 0,15 µg/ml, 0,30 µg/ml, 0,60 µg/ml und 1,2 µg/ml.

Es sind 4 Konzentrationen der HPLC-Standardlösungen, wie in Tabelle 1 (Standard A/B/C/D) dargelegt, herzustellen. Mit einer Pipette ist das erforderliche Volumen der Standard-Zwischenlösung (4.6.3.1) in Messkolben zu überführen und mit der Verdünnungslösung (4.4) bis zur Marke aufzufüllen. Die Lösungen sind gut zu durchmischen.

Tabelle 1 — Herstellung der Kalibrierstandardlösungen

Standard	Anteile der Zwischenlösung (4.6.3.1) ml	Messkolben ml	Verdünnungsfaktor	≅ µg/ml
A	5	200	40	0,15
B	5	100	20	0,30
C	10	100	10	0,60
D	10	50	5	1,20

Die genaue Konzentration der Kalibrierstandardlösungen ist unter Berücksichtigung der genauen Konzentration der Stammlösung (4.6.2) zu berechnen.

Alle hier beschriebenen Lösungen (Standard A/B/C/D) werden täglich frisch hergestellt.

4.7 Mobile Phase für die HPLC.

Eine 10 g wasserfreiem Calciumchlorid (4.3) entsprechende Menge Calciumsalz ist in 1 l eines Lösemittelgemischs aus Methanol (4.1)/Wasser im Verhältnis von 825/175 Volumenanteil aufzulösen. Die Lösung ist vor der Verwendung unter Vakuum (5.2) zu filtrieren.

ANMERKUNG HPLC-Spül- und Reinigungslösung.

Zum Spülen der HPLC-Säule und -ausrüstung am Ende eines jeden Analysentages ist eine Lösung aus Methanol (4.1) und Wasser im Verhältnis von 85/15 Volumenanteil ohne Calciumsalz herzustellen.