

DIN EN 17270



ICS 65.120

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Theobromin in Einzel- und Mischfuttermitteln,
einschließlich aus Kakao gewonnenen Bestandteilen, mittels
Flüssigchromatographie;
Deutsche Fassung EN 17270:2019**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of theobromine in feed materials and compound feed, including cocoa derived
ingredients, by liquid chromatography;
German version EN 17270:2019

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Détermination par chromatographie en phase liquide de la teneur en théobromine dans les
matières premières destinées aux aliments des animaux et dans les aliments composés pour
animaux, y compris les ingrédients issus du cacao;
Version allemande EN 17270:2019

Gesamtumfang 26 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17270:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Deutsche Fassung

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung von Theobromin in Einzel- und Mischfuttermitteln,
einschließlich aus Kakao gewonnenen Bestandteilen, mittels
Flüssigchromatographie**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis —
Determination of theobromine in feed materials and
compound feed, including cocoa derived ingredients, by
liquid chromatography

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et
d'analyse —
Détermination par chromatographie en phase liquide de la
teneur en théobromine dans les matières premières
destinées aux aliments des animaux et dans les aliments
composés pour animaux, y compris les ingrédients issus
du cacao

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 28. Juli 2019 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 CEN-CENELEC-Management-Zentrum 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, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, 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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Reagenzien	5
6 Geräte	8
7 Durchführung	8
8 Chromatografische Analyse	9
9 Berechnung der Ergebnisse	9
10 Präzision	10
11 Untersuchungsbericht	11
Anhang A (informativ) Beispiel für HPLC-UV-Bedingungen	12
Anhang B (informativ) Beispiel für LC-MS/MS-Bedingungen	15
Anhang C (informativ) Während der Einzellabor-Validierung erhaltene Verfahrensleistungsdaten	21
Anhang D (informativ) Während des Ringversuchs erhaltene Verfahrensleistungsdaten	22
Literaturhinweise	24

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17270:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis April 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis April 2020 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben.

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

Einleitung

Theobromin kommt im Kakaobaum und seinen Samen und folglich auch in Kakaoprodukten und Nebenprodukten natürlicherweise vor. Kakaobohnenschalen, Kakaobohnenmehl, Kakaokeime und verworfene Konditorwaren werden in Europa zu Futterzwecken verwendet. Die Theobromin-Höchstwerte in Futtermitteln werden durch EU-Vorschriften kontrolliert.

WARNUNG — Die Anwendung dieses Protokolls bringt den Einsatz gefährlicher Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte mit sich. Dieses Protokoll erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Protokolls, vor Anwendung angemessene Sicherheits- und Gesundheitsvorkehrungen zu treffen und zu prüfen, welche einschränkenden Vorschriften zu berücksichtigen sind.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für die Bestimmung von Theobromin in Einzelfuttermittel oder in Mischfuttermitteln mittels Flüssigchromatographie, gekoppelt mit einem UV-Detektor (HPLC-UV) im Arbeitsbereich von 27 mg/kg bis 307 mg/kg oder mittels Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) im Arbeitsbereich von 49 mg/kg bis 307 mg/kg fest.

Dieses Verfahren wurde unter Verwendung von Ergänzungsmischfuttermittel für erwachsene Hunde und Ergänzungsmischfuttermittel für Pferde vollständig validiert.

Dieses Verfahren gilt ebenfalls als für die Bestimmung von Theobromin in Blockschokolade, entweder mittels HPLC-UV- oder LC-MS/MS-Systeme anwendbar.

Der Arbeitsbereich kann erweitert werden, vorausgesetzt der erweiterte Bereich ist validiert.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Es werden keine Begriffe in diesem Dokument angegeben.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>

4 Kurzbeschreibung

Eine Prüfmenge von fein gemahlenem und homogenem Material wird mit Hexan entfettet, ein Interner Standard hinzugefügt und das Theobromin in einen Ammoniumacetat-Puffer extrahiert. Das Extrakt wird unter Zusatz von Carrez-Reagenzien gereinigt, gefiltert und das Extrakt mittels Flüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion analysiert. Alternativ kann der Theobromingehalt mittels Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) bestimmt werden, vorausgesetzt, es kann nachgewiesen werden, dass keine Störung durch die Probenmatrix besteht.

5 Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit zu verwenden. Es dürfen auch handelsübliche Lösungen mit Eigenschaften, die den aufgeführten Eigenschaften entsprechen, verwendet werden. Verweisungen auf Produkte oder Anbieter dienen lediglich zu Informationszwecken und schließen die Verwendung von Produkten mit ähnlicher Qualität von alternativen Anbietern nicht aus.

Für Reagenzien, die spezifisch für die Analyse der Extrakte mittels HPLC-UV sind, siehe Anhang A. Für Reagenzien, die spezifisch für die Analyse der Extrakte mittels LC-MS/MS sind, siehe Anhang B.

WARNUNG — Lösemittelabfälle sind nach den geltenden Umweltschutzregeln und -bestimmungen zu entsorgen.

5.1 Ammoniumacetat, Reagens von Analysenreinheit

5.2 Eisessig, 99,5 %

5.3 Essigsäure, 1 mol/l

In einem 100-ml-Messkolben werden 5,7 ml Eisessig (5.2) zu 60 ml Reinstwasser (5.4) hinzugegeben, es wird sorgfältig gemischt und bis zur Markierung mit Wasser (5.4) aufgefüllt. Vor der Verwendung wird der Messkolbeninhalt nochmals sorgfältig durch Umdrehen gemischt.

5.4 Wasser, LC-MS-Qualität oder von vergleichbarer Reinheit, z. B. mit einem Widerstand von 18,2 MΩ cm oder einer Leitfähigkeit von 55 nS/cm bei 20 °C

5.5 2,5 mol/l Ammoniumacetatpuffer, pH 5,5

192,7 g ± 0,1 g Ammoniumacetat (5.1) werden in einen 1-l-Becher eingewogen und in etwa 600 ml Reinstwasser (5.4) gelöst. Der pH-Wert des Puffers wird unter Verwendung eines geeichten pH-Meters (6.13) eingestellt, zunächst mit Eisessig (5.2) und dann mit 1 mol/l Essigsäure (5.3), bis er sich im Bereich von pH 5,4 bis pH 5,6 befindet.

Der pH-eingestellte Puffer wird quantitativ vom Becher in einen 1-l-Messkolben gegeben, und das Volumen wird mit Wasser (5.4) aufgefüllt. Vor der Verwendung wird sorgfältig durch Umdrehen gemischt. Diese Lösung ist, bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis zu 1 Monat haltbar.

5.6 Hexan, analysenrein

5.7 Zinkacetat-Dihydrat, analysenrein

5.8 Kaliumferrocyanid-Trihydrat, analysenrein

5.9 Carrez-Reagenz I

219 g ± 1 g Zinkacetat-Dihydrat (5.7) werden in einen 1-l-Becher eingewogen und 30 ml Eisessig (5.2) sowie etwa 800 ml Wasser (5.4) hinzugefügt. Die Lösung wird durchmischt, in einen 1-l-Messkolben überführt und das Volumen wird mit Wasser (5.4) aufgefüllt. Vor der Verwendung wird gut gemischt. Diese Lösung ist, bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis zu 3 Monate haltbar.

5.10 Carrez-Reagenz II

106 g ± 1 g Kaliumferrocyanid-Trihydrat (5.8) werden in einen 1-l-Becher eingewogen und etwa 800 ml Wasser (5.4) hinzugefügt. Die Lösung wird durchmischt, in einen 1-l-Messkolben überführt und das Volumen wird mit Wasser (5.4) aufgefüllt. Vor der Verwendung wird gut gemischt. Diese Lösung ist, bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis zu 3 Monate haltbar.

5.11 Theobromin, ≥ 98,5 %

5.12 Theobromin-Stammlösung, 125 µg/ml

62,5 mg ± 1 mg Theobromin (5.11) werden in einen 500 ml-Messkolben eingewogen und etwa 400 ml Wasser (5.4) hinzugefügt. Der Messkolben wird in ein Ultraschallbad gegeben, bis das Theobromin sich vollständig aufgelöst hat, dann wird das Volumen mit Wasser (5.4) aufgefüllt. Vor der Verwendung wird gut gemischt. Das exakte Gewicht des verwendeten Theobromins sollte aufgezeichnet und die Konzentration der Lösung berechnet werden. Diese Lösung ist, bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt, bis zu 1 Monat haltbar.

5.13 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin, ≥ 98 %