

DIN EN 17294

ICS 65.120

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung organischer Säuren mittels Ionenchromatographie mit
Leitfähigkeitsdetektion (IC-CD);
Deutsche Fassung EN 17294:2019**

Animal feeding stuffs –
Methods of sampling and analysis –
Determination of organic acids by Ion Chromatography with Conductivity Detection (IC-CD);
German version EN 17294:2019

Aliments des animaux –
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Dosage des acides organiques par chromatographie ionique avec détection conductimétrique
(CI-DC);
Version allemande EN 17294:2019

Gesamtumfang 37 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17294:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probe-
nahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

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

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechen-
den deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-2 siehe DIN ISO 5725-2

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2:
Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten
Messverfahrens*

Deutsche Fassung

Futtermittel —
Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung organischer Säuren mittels Ionenchromatographie
mit Leitfähigkeitsdetektion (IC-CD)

Animal feeding stuffs —
Methods of sampling and analysis —
Determination of organic acids by Ion Chromatography
with Conductivity Detection (IC-CD)

Aliments des animaux —
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse —
Dosage des acides organiques par chromatographie
ionique avec détection conductimétrique (CI-DC)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 24. Juni 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	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	6
6 Geräte	8
7 Probenahme	11
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	11
9 Durchführung	12
9.1 Allgemeines	12
9.2 Kalibrierung	13
9.3 Messung der Kalibrierstandards und der Probenlösungen	14
9.4 Bestätigung der Identität	14
10 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	15
11 Präzision	15
11.1 Ringversuch	15
11.2 Wiederholpräzision	16
11.3 Vergleichpräzision	16
12 Untersuchungsbericht	20
Anhang A (normativ) Ablaufplan	21
Anhang B (informativ) Beispiele für Messgeräte und geeignete Eluenten	22
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	26
Literaturhinweise	35

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17294:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probe-
nahme- 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 Februar 2020, und etwaige entgegenstehende natio-
nale Normen müssen bis Februar 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

Organische Säuren und ihre Salze, wie Zitronensäure, Ameisensäure, Milchsäure, Essigsäure, Propionsäure, Fumarsäure, Benzoessäure und Sorbinsäure, sind Futtermittelzusatzstoffe, die bei der Tierernährung eine wichtige Rolle spielen, indem sie die Leistung der Tiere verbessern und die Entwicklung (pathogener) Mikroorganismen im Darm insbesondere bei der Schweineproduktion verringern. Bezüglich der Gesetzgebung zu Futtermitteln können die Stoffe in Abhängigkeit von ihren Funktionen und Eigenschaften für verschiedene Zwecke eingesetzt werden. Entsprechend ihres Funktionsprinzips oder ihrer Funktion könnte die entsprechende organische Säure einer oder mehreren Funktionsgruppen zugeordnet werden, die in der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003, Anhang I, als Konservierungsmittel, Säureregulatoren, Aromastoffe, Silierzusatzstoffe oder als sonstige zootechnische Zusatzstoffe aufgeführt werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung organischer Säuren in Futtermitteln mittels Ionenchromatographie mit Leitfähigkeitsdetektion (en: IC-CD, ion chromatography with conductivity detection) fest.

Das Verfahren ist für die Verwendung zur Bestimmung von Ameisensäure, Milchsäure, Propionsäure, Zitronensäure, Fumarsäure und Apfelsäure als Wirkstoffe in Futtermittelzusatzstoffen, Vormischungen, Futtermittel-Ausgangserzeugnissen, Mischfuttermitteln und Wasser sowie für Essigsäure in begrenztem Maße in denselben Matrices vorgesehen. Dieses Verfahren ermittelt die extrahierbare Gesamtkonzentration der vorstehend aufgeführten organischen Säuren und ihrer Salze.

Dem Anwender dieser Norm wird empfohlen, den Arbeitsbereich des Verfahrens für jede organische Säure zu ermitteln. Der untere Grenzwert des Arbeitsbereiches hängt von der Matrix und den aufgetretenen Störungen ab. Es wird empfohlen, dass ein Arbeitsbereich zwischen 10 mg/l und 100 mg/l eingehalten wird.

Das Verfahren wurde im Rahmen einer Ringversuchsstudie bei Konzentrationen von 0,02 % bis zu 27 % der vorgenannten organischen Säuren erfolgreich geprüft.

ANMERKUNG Bei der gleichzeitigen Bestimmung einer hohen Konzentration von Milchsäure und einer niedrigen Konzentration von Essigsäure tritt eine Einschränkung auf. Wenn das Verhältnis der Konzentration der Milchsäure zu der von Essigsäure den Faktor 20 überschreitet, ist die Bestimmung der Essigsäure nicht sichergestellt.

Auf der Grundlage des zugehörigen Arbeitsbereichs, der Probenmasse und des Extraktionsvolumens können Bestimmungsgrenzen (en: LOQ, limits of quantification) wie berechnet (Tabelle 1) erreichbar sein.

Tabelle 1 — Bestimmungsgrenzen (LOQ)

Organische Säure	LOQ mg/kg
Ameisensäure	200
Milchsäure	200
Propionsäure	200
Zitronensäure	200
Fumarsäure	200
Essigsäure	200
Apfelsäure	200

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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).

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696)*

EN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung (ISO 6498)*

EN ISO 10304-1, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung von gelösten Anionen mittels Flüssigkeits-Ionenchromatographie — Teil 1: Bestimmung von Bromid, Chlorid, Fluorid, Nitrat, Nitrit, Phosphat und Sulfat (ISO 10304-1)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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>

3.1

Futtermittelzusatzstoffe

Stoffe, Mikroorganismen oder Zubereitungen, die keine Futtermittel-Ausgangserzeugnisse oder Vormischungen sind und bewusst Futtermitteln oder Wasser zugesetzt werden

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 1831/2003/Artikel 2/2 a [1]]

3.2

Futtermittel

Stoffe oder Erzeugnisse, auch Zusatzstoffe, verarbeitet, teilweise verarbeitet oder unverarbeitet, die zur oralen Tierfütterung bestimmt sind

[QUELLE: Verordnung (EG) Nr. 178/2002/Artikel 2/4 [2]]

4 Kurzbeschreibung

Die Probe wird mit Wasser extrahiert. Der Extrakt wird filtriert oder zentrifugiert und – falls erforderlich – verdünnt. Die aus der Probe extrahierte Menge organischer Säuren wird mittels Ionenchromatographie (IC) in Verbindung mit Leitfähigkeitsdetektion (en: CD, conductivity detection) unter Anwendung externer Kalibrierung bestimmt.

Bei Anwendung der CD ist es entscheidend, dass der Eluent eine ausreichend niedrige Leitfähigkeit aufweist. Aus diesem Grund wird die CD gewöhnlich mit einer Suppressoreinrichtung (Kationenaustauscher) kombiniert, mit der die Leitfähigkeit des Eluenten verringert wird und die Probesäuren in ihre entsprechenden Salze umgewandelt werden.

Die Beschreibung des Verfahrens folgt einem bewährten Ansatz, bei dem die chromatographische Auflösung *R* überprüft werden muss, um sicherzustellen, dass sie mit den geforderten Trennbedingungen nach EN ISO 10304-1 übereinstimmt.

WARNUNG — Die Anwendung dieser Europäischen Norm kann die Anwendung gefährlicher Stoffe, Arbeitsgänge und Geräte mit sich bringen. Diese Norm beansprucht nicht, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Europäischen Norm, vor ihrer Anwendung geeignete Maßnahmen für die Sicherheit und den Gesundheitsschutz zu ergreifen, und die Anwendbarkeit behördlicher Einschränkungen zu prüfen.

5 Reagenzien

Sofern nichts anderes festgelegt ist, werden ausschließlich Reagenzien anerkannter analytischer Reinheit verwendet.

5.1 Wasser, Qualität 1 nach EN ISO 3696.

5.2 Ameisensäure-, Milchsäure-, Propionsäure-, Zitronensäure-, Essigsäure-, Apfelsäure-Standardlösung, $c = 1\,000$ [mg/l].

Einzel säuren-Standardlösungen mit angemessener und geforderter Spezifikation sind im Handel erhältlich (gebrauchsfertige Lösungen).

5.3 Alternative Zubereitung der Stammlösung auf Basis von Einzel-Standardsubstanzen

ANMERKUNG Die Unterscheidung zwischen den Enantiomeren (D, L, DL) ist nicht von Interesse.

5.3.1 Zitronensäure, Reinheit mindestens 99 %.

5.3.2 Apfelsäure, Reinheit mindestens 99 %.

5.3.3 Ameisensäure, Reinheit mindestens 98 %.

5.3.4 Milchsäure, Reinheit mindestens 85 %.

ANMERKUNG Lithiumlactat mit einer Reinheit von mindestens 95 % kann ebenfalls verwendet werden.

5.3.5 Essigsäure, Reinheit mindestens 99 %.

5.3.6 Fumarsäure, Reinheit mindestens 99 %.

5.3.7 Propionsäure, Reinheit mindestens 99 %.

5.3.8 Einzel-Standard-Stammlösungen, etwa 2 500 [mg/l].

250 mg Säure (5.3.1 bis 5.3.7) werden jeweils in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Diese wird mit etwa 80 ml Wasser (5.1) gelöst, gemischt und bis zur Marke mit Wasser (5.1) aufgefüllt.

Bei Fumarsäure (5.3.6) werden 250 mg in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Es werden 80 ml Wasser (5.1) hinzugefügt und sie wird 10 min in einem Ultraschallbad bei 60 °C gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Die maximale Lagerdauer beträgt 6 Monate bei 4 °C.

ANMERKUNG Die Zugabe von 1 % Isopropanol wirkt sich positiv auf die Stabilität dieser Lösung aus.

Die genaue Konzentration der Stammlösung wird mittels des vom Lieferanten angegebenen Reinheitsgrades des Referenzstandards nach Gleichung (1) ermittelt:

$$C_S = \frac{m \times P}{V} \quad (1)$$

Dabei ist

C_S die experimentelle Konzentration der organischen Säure in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;

P die vom Lieferanten angegebene Reinheit des organischen Säurestandards, in Prozent geteilt durch 100;

ANMERKUNG Zum Beispiel 0,98.

m die eingewogene Masse der organischen Säure, in mg;

V das Volumen des Messkolbens, in ml.

5.4 Gemischte Standardlösung, (etwa) 100 [mg/l].

Es werden 4,0 ml jeder Einzel-Standard-Stammlösung (5.3.8) sorgfältig in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Wasser (5.1) aufgefüllt. Die exakte Konzentration jeder organischen Säure muss entsprechend der tatsächlichen Konzentration der Einzel-Standard-Stammlösungen berechnet werden.

Im Falle gebrauchsfertiger Lösungen (5.2) werden jeweils 10,0 ml in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Wasser (5.1) aufgefüllt.

Die maximale Lagerdauer beträgt 2 Monate bei 4 °C.

5.5 Mobile Phase der Ionenchromatographie (IC)

Das gesamte Wasser, das für die Zubereitung des Eluenten verwendet wird, wird entgast.

Die Wahl des Eluenten hängt von der gewählten Säule und vom Detektor ab (Beispiele in Anhang B, Tabelle B.1). Die gewählte Kombination von Ionenchromatographie-Säule (IC-Säule) und Eluent muss die Anforderungen an die Auflösung, die in 6.11 angegeben sind, erfüllen.

Eine Auswahl von Reagenzien für gebräuchliche Eluenten ist in Anhang B angegeben.

6 Geräte

Übliche Laborgeräte, insbesondere Folgendes.

6.1 Labormahlwerk, das in der Lage ist, bis zu einer Partikelgröße von 1,0 mm oder kleiner zu mahlen.

6.2 Analysenwaage, die geeignet ist, präzise zwischen 0 g und 10 g mit einer Fehlergrenze von 0,1 mg zu wiegen.

6.3 Magnetrührer, mit Polytetrafluorethylen(PTFE)-beschichtetem Rührstab.

6.4 Ultraschallbad.

6.5 Pipetten (elektronisch oder manuell), im Bereich von 100 µl bis 5 000 µl.

6.6 Zentrifuge, etwa 5 000 × g.

6.7 Faltenfilter, Porengröße 4 µm bis 7 µm (aschefreies Papierfilter).

6.8 Membranfilter, für die HPLC-Anwendung, 0,45-µm (beispielsweise gebrauchsfertige Filtereinheit mit einer hydrophilen Membran mit geringer Proteinbindung aus regenerierter Cellulose).

6.9 Umkehrphasen-Festphasenextrakt (en: RP-SPE, reversed phase solid phase extract).

Optional zum Schutz der IC-Säule, z. B. OnGuard II RP (Dionex).

6.10 Ionenchromatograph (Pumpe, Probengeber) mit unterdrückter Leitfähigkeitsdetektion.

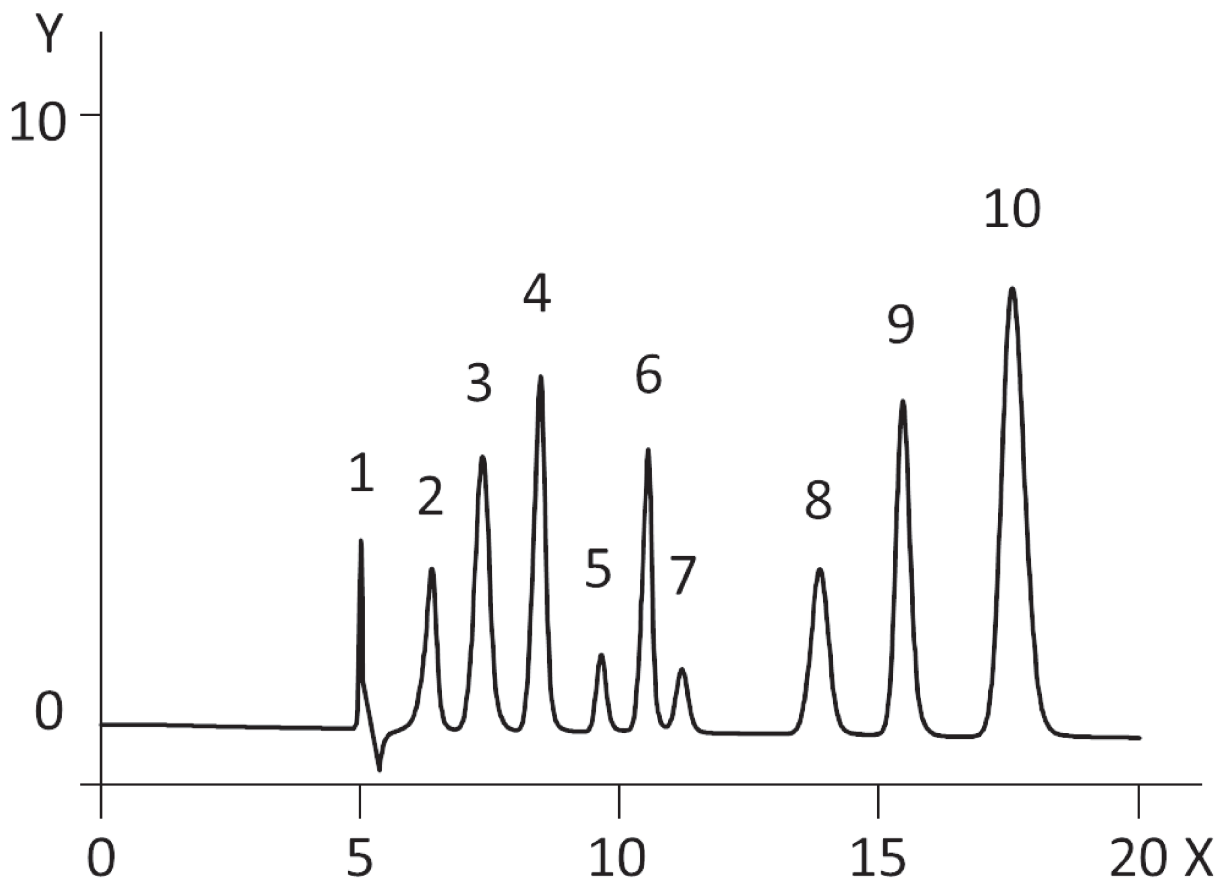
6.10.1 IC-Säule, mit festgelegter Trennleistung (6.11).

6.10.2 Vorsäule.

6.11 Qualitätsanforderungen an die Trennsäule

In Chromatogrammen von Proben und Standardlösungen (siehe Bild 1) darf die Peakauflösung R zwischen der betreffenden Säure und ihrem nächstgelegenen Peak den Wert 1,3 nicht unterschreiten [siehe Gleichung (2) oder Gleichung (3) sowie Bild 2].

Die Trennbedingungen müssen so sein, dass mögliche störende organische Säuren oder Substanzen die betreffenden organischen Säuren nicht beeinträchtigen.



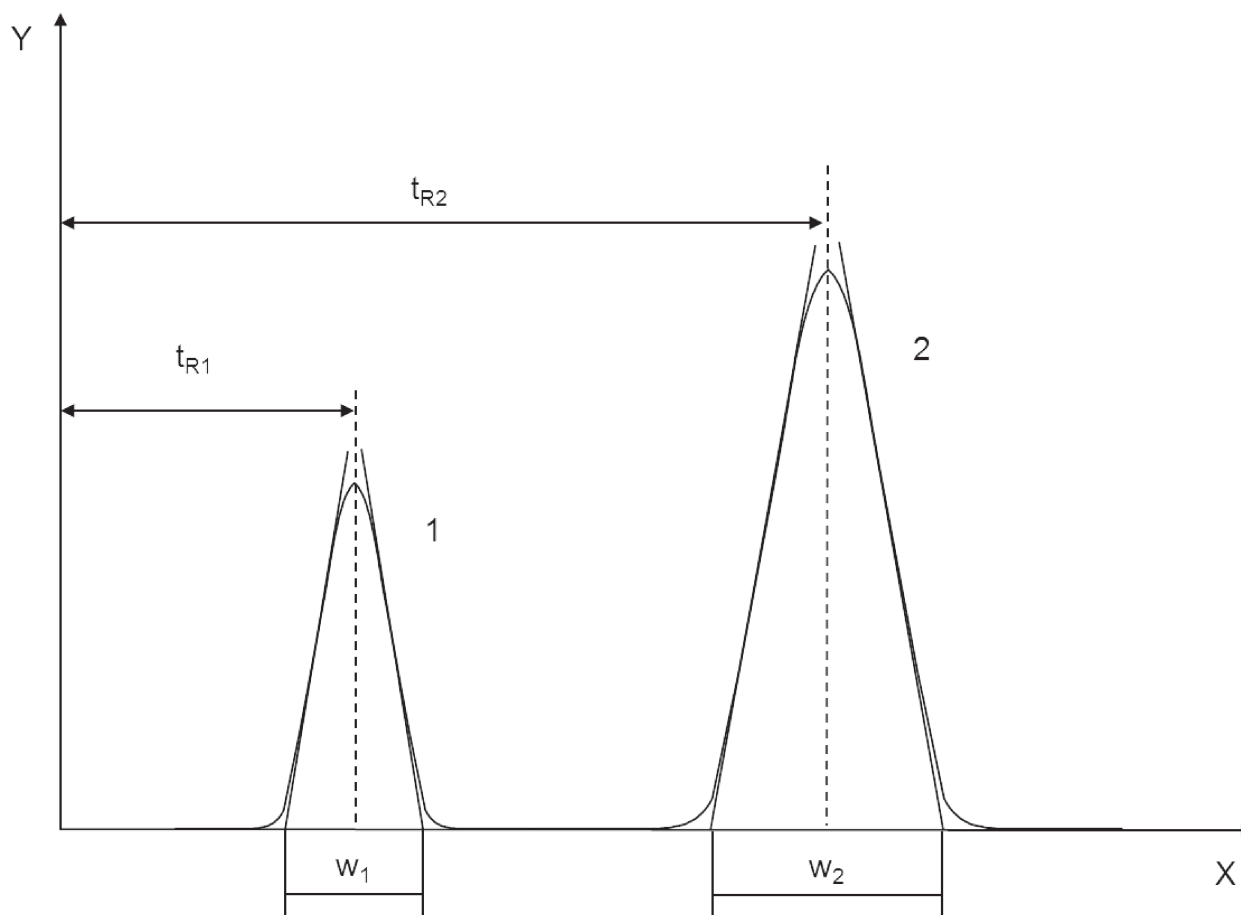
Legende

X = Retentionszeit t_R (s)

1 bis 10 = Peak 1 bis Peak 10

Y = Signal

Bild 1 — Beispielchromatogramm organischer Säuren mit ausreichender Peak-Auflösung



Legende

X	Retentionszeit t_R (s)	1	Peak 1
Y	Signal	2	Peak 2
W	Peak-Breite (s)		

Bild 2 — Graphische Darstellung der Parameter zur Berechnung der Peakauflösung R

Die Basis-Peakbreiten w_1 und w_2 werden durch Konstruktion von gleichschenkeligen Dreiecken über den Gauß-Peaks erhalten.

Die Peakauflösung R wird nach Gleichung (2) berechnet.

$$R_{2,1} = \frac{2 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_2 + w_1} \quad (2)$$

Dabei ist

- $R_{2,1}$ die Peakauflösung;
- t_{R1} die Retentionszeit des ersten Peaks, in s;
- t_{R2} die Retentionszeit des zweiten Peaks, in s;
- W_1 die Peakbreite des ersten Peaks auf der Zeitachse, in s;
- W_2 die Peakbreite des zweiten Peaks auf der Zeitachse, in s.

ANMERKUNG Meist kann die Chromatographie-Software R selbständig berechnen.