

DIN EN 17547



ICS 65.120

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung des Gehalts an Vitamin A, E und D –
Verfahren mittels Reinigung durch Festphasenextraktion und
Hochleistungs-Flüssigchromatographie;
Deutsche Fassung EN 17547:2021**

Animal feeding stuffs:

Methods of sampling and analysis –

Determination of vitamin A, E and D content –

Method using solid phase extraction (SPE) clean-up and high-performance liquid chromatography (HPLC);

German version EN 17547:2021

Aliments des animaux –

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –

Détermination de la teneur en vitamines A, E et D –

Méthode utilisant la purification par extraction en phase solide (SPE) et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP);

Version allemande EN 17547:2021

Gesamtumfang 44 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17547:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird, erarbeitet.

Das zuständige deutsche Gremium 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 entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-1	siehe	DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 5725-3	siehe	DIN ISO 5725-3
ISO 5725-5	siehe	DIN ISO 5725-5
ISO 5725-6	siehe	DIN ISO 5725-6

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

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*

DIN ISO 5725-3, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 3: Präzisionsmaße eines vereinheitlichten Messverfahrens unter Zwischenbedingungen*

DIN ISO 5725-5, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 5: Alternative Methoden für die Ermittlung der Präzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN ISO 5725-6, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 6: Anwendung von Genauigkeitswerten in der Praxis*

Deutsche Fassung

Futtermittel —
Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung des Gehalts an Vitamin A, E und D —
Verfahren mittels Reinigung durch Festphasenextraktion und
Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Animal feeding stuffs:
Methods of sampling and analysis —
Determination of vitamin A, E and D content —
Method using solid phase extraction (SPE) clean-up and
high-performance liquid chromatography (HPLC)

Aliments des animaux —
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse —
Détermination de la teneur en vitamines A, E et D —
Méthode utilisant la purification par extraction en
phase solide (SPE) et la chromatographie liquide à
haute performance (CLHP)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 27. September 2021 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	6
5 Reagenzien und Materialien	8
6 Prüfeinrichtung	9
7 Probenahme	10
8 Probenvorbereitung	11
9 Durchführung	11
10 Angabe der Ergebnisse	23
11 Bemerkungen	27
12 Präzision	27
13 Prüfbericht	29
Anhang A (informativ) Beispiele für Kombinationen von Einwaagemenge, Aliquotierung und Verdünnung zum Erhalt von Konzentrationen im Bereich der Kalibrierkurve	30
Anhang B (informativ) Herstellung der Standard-Stammlösung von Vitamin E (α -Tocopherol) aus α -Tocopherolacetat	33
B.1 Allgemeines	33
B.2 Reagenzien	33
B.3 Herstellung der Standard-Stammlösung	33
B.4 Standardisierung der Standard-Stammlösung von Vitamin E (α -Tocopherol) in Cyclohexan	33
B.5 Kalibrierlösungen und Erstellung einer Kalibrierkurve für Vitamin A (Retinol) und E (α -Tocopherol)	34
Anhang C (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	35
Literaturhinweise	41

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17547:2021) 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 Mai 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2022 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 Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

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

WARNUNG — Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren beinhaltet die Verwendung von Reagenzien, die eine Gefahr für die Gesundheit darstellen. Die Norm erhebt nicht den Anspruch, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, vor der Anwendung dieser Norm geeignete Maßnahmen für den Gesundheitsschutz und die Sicherheit des Personals zu ergreifen und sicherzustellen, dass behördliche und gesetzliche Anforderungen eingehalten werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts an Vitamin A (Retinol), Vitamin E (α -Tocopherol) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol) in Futtermitteln mittels Reinigung durch Festphasenextraktion (SPE; en: solid phase extraction) und Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC; en: high performance liquid chromatography) fest.

ANMERKUNG Das Verfahren ermöglicht auch die Bestimmung von Vitamin D₂, jedoch unter Verwendung eines anderen internen Standards. Das Verfahren ist nur für Vitamin D₃ vollständig validiert.

Das Verfahren wurde in einem Ringversuch für Alleinfuttermittel für Hähnchen, Schweine und Puten, für Vormischungen für Hähnchen und für Ferkel, für Ergänzungsfuttermittel für Kühe sowie für mineralische Futtermittel innerhalb folgender Bereiche erfolgreich geprüft:

- Vitamin A: 4 365 IE/kg – 4 118 352 IE/kg;
- Vitamin E: 22 mg/kg – 13 800 mg/kg
- Vitamin D₃: 1 668 IE/kg – 1 638 150 IE/kg.

Die Bestimmungsgrenzen wurden nicht im Rahmen der Validierungsstudie bestimmt. Üblicherweise sollten Bestimmungsgrenzen von 1 100 IE für Vitamin A/kg (mittels UV-Detektion), 4 mg für Vitamin E/kg (mittels UV-Detektion), 2 mg für Vitamin E/kg (mittels Fluoreszenzdetektion) und 2 000 IE für Vitamin D/kg (mittels UV-Detektion) erreicht werden. Niedrigere Grenzen sind möglich, sofern sie vom Anwender validiert werden.

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 3696:1995, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696:1987)*

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

3.1

Vitamin-A-Gehalt

Retinol

Gehalt an all-trans- und cis-Isomeren von Retinol, der in Übereinstimmung mit diesem Dokument bestimmt wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Vitamin-A-Gehalt (Retinolgehalt) wird in Internationalen Einheiten je Kilogramm (IE/kg) angegeben.

Anmerkung 2 zum Begriff: 1 IE Vitamin A (Retinol) entspricht 0,300 µg all-trans-Retinol oder 0,344 µg all-trans-Retinylnacetat oder 0,546 µg all-trans-Retinylnpalmitat oder 0,359 µg all-trans-Retinylnpropionat.

3.2

Vitamin-E-Gehalt α -Tocopherol

Gehalt an α -Tocopherol, der in Übereinstimmung mit diesem Dokument bestimmt wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt an Vitamin E (α -Tocopherol) kann auch als mg α -Tocopherolacetat je kg ausgedrückt werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: 1 mg Vitamin E (α -Tocopherolacetat) entspricht 0,91 mg Vitamin E (α -Tocopherol).

Anmerkung 3 zum Begriff: In den Proben können auch β -, γ -, δ -Tocopherol und α -, β -, γ -, δ -Tocotrienol vorhanden sein. Dieses Verfahren nutzt die Umkehrphasentrennung, welche die einzelnen Formen von Tocopherol nicht voneinander trennt. Daher umfasst der als α -Tocopherol oder α -Tocopherolacetat ausgedrückte Vitamin-E-Gehalt alle Formen, ohne die Unterschiede der Vitaminaktivitäten und die entsprechenden Anteile der einzelnen Formen zu berücksichtigen. Mit einer Normalphasensäule ist die Trennung von α -, β -, γ - und δ -Tocopherolen möglich (siehe Bemerkung 11.6).

3.3

Vitamin-D₃-Gehalt Cholecalciferol

Gehalt an Cholecalciferol, der in Übereinstimmung mit diesem Dokument bestimmt wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt an Vitamin D₃ wird in Internationalen Einheiten je Kilogramm (IE/kg) angegeben. Die Aktivität von 1 IE entspricht 0,025 μ g Vitamin D₃ (Cholecalciferol).

Anmerkung 2 zum Begriff: Für Futtermittel ist gemäß Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 [1] nur Vitamin D₃ als Futtermittel-Zusatzstoff zugelassen. Der Zusatz von Vitamin D₂ ist nicht erlaubt. Daher kann Vitamin D₂ als interner Standard verwendet werden.

Anmerkung 3 zum Begriff: Für eine genaue Berechnung der Ergebnisse ist es wichtig, dass die Probe kein anderes Vitamin D₂ außer dem als internen Standard hinzugefügten Vitamin D₂ enthält.

4 Kurzbeschreibung

Die Probe wird mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung verseift. Für den Fall, dass Vitamin D₃ (Cholecalciferol) bestimmt werden soll, wird der interne Standard vor der Verseifung hinzugefügt. Die Vitamine werden mittels einer SPE-Säule und Elution mit Cyclohexan extrahiert und gereinigt. Das Cyclohexan wird durch Verdampfung entfernt und der Rückstand wird in Methanol (bei der Bestimmung von Vitamin A (Retinol) und Vitamin E (α -Tocopherol)) oder in *n*-Hexan (bei der Bestimmung von Vitamin D₃ (Cholecalciferol)) gelöst.

Die Konzentrationen von Vitamin A (Retinol) und Vitamin E (α -Tocopherol) im methanolischen Extrakt werden mittels Umkehrphasen-Flüssigchromatographie unter Verwendung einer externen Kalibrierung und unter HPLC-Bedingungen, die einen einzigen Peak für alle Retinol-Isomere sowie für alle Tocopherole ergeben, bestimmt.

Der *n*-Hexan-Extrakt für die Bestimmung von Vitamin D₃ wird mittels semipräparativer Normalphasen-HPLC auf Kieselgel gereinigt. Der gereinigte Extrakt wird mittels Umkehrphasen-HPLC unter Bedingungen, die eine Basislinientrennung zwischen Vitamin D₂ und Vitamin D₃ ergeben, getrennt. Die Quantifizierung des Vitamin D₃ erfolgt durch externe Standardkalibrierung unter Berücksichtigung der Wiederfindungsrate des internen Standards.

ANMERKUNG Bild 1 stellt die Bestimmung der Vitamine A, D und E in einem Flussdiagramm dar.

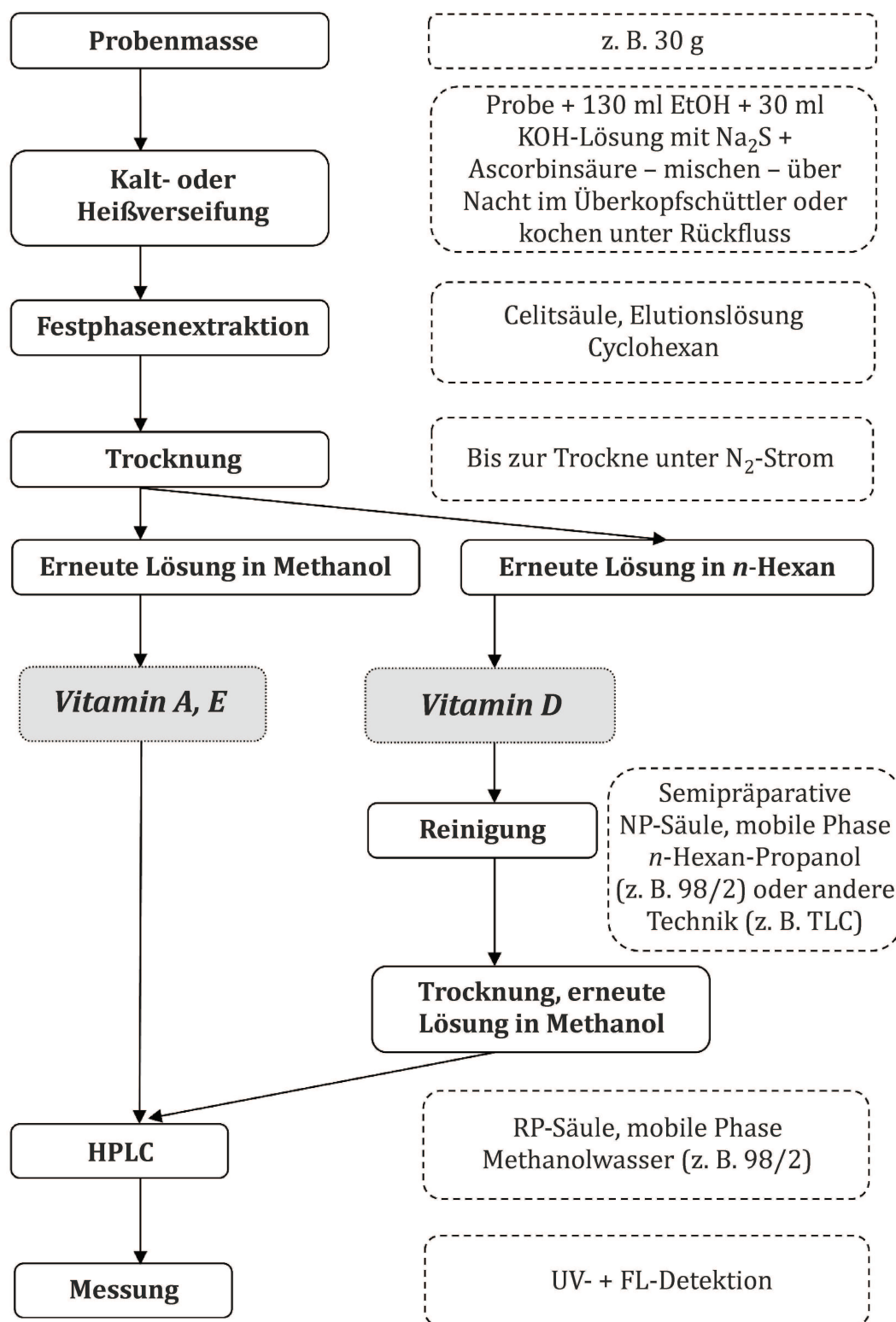


Bild 1 — Flussdiagramm für die Bestimmung der Vitamine A, D und E

5 Reagenzien und Materialien

Es werden ausschließlich Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit verwendet.

5.1 Wasser, mindestens Reinheitsgrad 3 nach EN ISO 3696:1995.

5.2 Kaliumhydroxid (KOH), $w \approx 850$ g/kg.

5.3 Ethanol (C_2H_5OH), $w = 950$ ml/l, oder ein gleichwertiger industrieller Brennspritus (mit Methanol oder Hexan vergälltes Ethanol).

5.4 Ascorbinsäure ($C_6H_8O_6$).

5.5 Ascorbinsäure, Lösung, $\rho = 200$ g/l.

5.6 Natriumsulfid ($Na_2S \cdot 9 H_2O$).

5.7 Natriumsulfid, alkalische Lösung (siehe 11.1 Bemerkungen).

2 000 g Kaliumhydroxid (5.2) werden so lange in 1 200 ml Wasser (5.1) gelöst, bis sich so viel KOH wie möglich aufgelöst hat. Gleichzeitig werden 224 g Natriumsulfid (5.6) in einem Ultraschallbad in 800 ml Wasser (5.1) gelöst. Beide Lösungen werden miteinander vermischt und die Mischung wird so lange gerührt, bis sich das Kaliumhydroxid (5.2) vollständig gelöst hat.

5.8 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), (siehe 11.2 Bemerkungen).

5.9 Inertgas, z. B. Stickstoff.

5.10 Methanol (CH_3OH), HPLC-Qualität.

5.11 Ethanol (CH_3CH_2OH), HPLC-Qualität.

5.12 Cyclohexan (C_6H_{12}), HPLC-Qualität.

5.13 2-Propanol (C_3H_7OH), HPLC-Qualität.

5.14 *n*-Hexan (C_6H_{14}), HPLC-Qualität.

5.15 Mobile Phase für die semipräparative HPLC-Reinigung von Vitamin D₃.

Mischung von *n*-Hexan (5.14) und Propanol (5.13) mit Anteilen von bspw. 980 + 20 (Volumenanteil). Das Mischverhältnis muss an die verwendete HPLC-Säule angepasst werden. Falls notwendig, wird durch einen Membranfilter gefiltert (6.8).

5.16 Mobile Phase für die analytische HPLC.

Methanol (5.10) und Wasser (5.1) werden mit Anteilen von 980 + 20 (Volumenanteil) gemischt. Das genaue Verhältnis wird durch die Eigenschaften der verwendeten Säule bestimmt. Die Verwendung von anders zusammengesetzten mobilen Phasen ist unter der Voraussetzung erlaubt, dass die Trennung von Vitaminen in Übereinstimmung mit dem Anwendungsbereich dieses Dokuments möglich ist. Falls notwendig, wird durch einen Membranfilter gefiltert (6.8).

5.17 Vitamin-A-Standardsubstanzen.

5.17.1 All-*trans*-Retinylacetat ($C_{22}H_{32}O_2$), CAS = 127-47-9, MW = 328,49 g/mol, extra rein, mit zertifizierter Aktivität, z. B. $2,80 \times 10^6$ IE/g.

5.17.2 All-*trans*-Retinylpalmitat ($C_{36}H_{60}O_2$), CAS = 79-81-2, MW = 524,86 g/mol, extra rein, mit zertifizierter Aktivität, z. B. $1,80 \times 10^6$ IE/g.

5.18 Vitamin-E-Standardsubstanz.

5.18.1 DL- α -Tocopherol ($C_{29}H_{50}O_2$), CAS = 10191-41-0, MW = 430,72 g/mol, extra rein, mit zertifizierter Reinheit.

5.19 Vitamin-D-Standardsubstanzen.

5.19.1 Vitamin D₂ (Ergocalciferol; $C_{28}H_{44}O$), CAS = 50-14-6, MW = 384,62 g/mol, extra rein, mit zertifizierter Aktivität, z. B. 40×10^6 IE/g.

5.19.2 Vitamin D₃ (Cholecalciferol; $C_{27}H_{44}O$), CAS = 67-97-0; MW = 384,62 g/mol, extra rein, mit zertifizierter Aktivität, z. B. 40×10^6 IE/g.

5.20 Celit für die SPE-Säule.

Basismaterial grobkörniges Kieselgur (auch als Diatomeenerde, Hydromatrix oder Celit bekannt); Teilchengröße: max. 10 % < 100 μ m, max. 90 % < 500 μ m, max. 5 % > 800 μ m; große Porenweite, hohes Porenvolumen, konstant hohe Chargenqualität.

6 Prüfeinrichtung

Übliche Laborausrüstung und insbesondere die folgenden Geräte:

6.1 Siedendes Wasserbad mit Magnetrührer oder elektrisches Heizgerät mit Rührfunktion (für die Heißverseifung).

6.2 Überkopfschüttler mit Drehbewegung (für die Kaltverseifung).

6.3 Braunglasgeräte (siehe Bemerkung 11.3).

6.3.1 Steh- oder Erlenmeyerkolben, 250 ml und 500 ml, mit Schliffhülse.

6.3.2 Allihnkühler, Mantellänge 300 mm, mit Schliffverbindung, mit Adapter für Gaszuleitung.

6.3.3 Messkolben mit Schliffstopfen, enghalsig, 20 ml, 25 ml, 50 ml und 100 ml.

6.3.4 Spitzkolben mit Schliffstopfen, 100 ml.

6.4 Fläschchen, für Probenkonzentrator geeignet.

6.5 Säule für SPE, mit Celit gefüllt (z. B. Chromabond XTR¹, 70 ml Volumen), die die Wasserphase aus der Verseifungslösung (9.4.2) adsorbieren und die Vitamine A, E und D durch Elution mit organischen

¹ Chromabond XTR ist ein Beispiel eines geeigneten handelsüblichen Produkts. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN.

Lösemitteln vollständig freisetzen kann. Die Säule muss eine Kapazität von nicht weniger als 20 ml wässriger Lösung aufweisen und die Auslauföffnung muss mit einem Ventil verschlossen werden können.

6.6 Vakuumrotationsverdampfer, mit auf 40 °C eingestelltem Wasserbad.

6.7 Stickstoffprobenkonzentrator, auf 50 °C erhitzbar.

6.8 Membranfilter, mit Methanol verträglich, 0,45 µm Porengröße; z. B. Chromafil PET²- 45/15 MS, oder ein geeigneter Filter mit kleinerer Porengröße.

6.9 Spritzenfilter, mit einer Nylon- oder PVDF-Membran, 0,2 µm (oder 0,45 µm) Porengröße oder gleichwertig, d. h. vollständig chemisch kompatibel mit Methanol und passend für 2-5-ml-Spritzen.

6.10 HPLC-System, semipräparativ, für die Reinigung von Vitamin D, bestehend aus:

6.10.1 HPLC-Pumpe, auf eine konstante Fließrate des Elutionsmittels von bspw. 2,5 ml/min eingestellt.

6.10.2 HPLC-Injektionsvorrichtung, Injektionsvolumen von 500 µl.

6.10.3 Semipräparative Normalphasen-HPLC-Säule mit Vorsäule (siehe 9.7.2).

6.10.4 Säulenofen, auf eine konstante Säulentemperatur eingestellt.

6.10.5 UV-Detektor

6.11 HPLC-System zur analytischen Trennung, bestehend aus:

6.11.1 HPLC-Pumpe, auf eine konstante Fließrate des Elutionsmittels von bspw. 1 ml/min eingestellt.

6.11.2 HPLC-Injektionsvorrichtungen, Injektionsvolumen von 20 µl und 100 µl.

6.11.3 HPLC-Umkehrphasensäule, mit Vorsäule (siehe 9.8.1).

6.11.4 Säulenofen, auf eine konstante Säulentemperatur eingestellt.

6.11.5 Detektoren zur UV- und Fluoreszenzdetektion.

6.11.6 Datenintegrator/Datenverarbeitungssystem.

6.12 UV- (oder UV-VIS-) Spektralphotometer, geeignet zur Messung der Absorption bei den in 9.2.1.4, 9.2.2.4 und 9.2.3.5 definierten Wellenlängen, mit Zellen von 10 mm Schichtdicke ausgestattet.

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Labor eine Probe erhält, die tatsächlich repräsentativ ist und während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde. Die Probenahme ist nicht Teil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren findet sich in EN ISO 6497 [2].

Die Probe ist so zu lagern, dass Verderb und Veränderungen in ihrer Zusammensetzung verhindert werden.

² Chromafil PET ist ein Beispiel eines geeigneten handelsüblichen Produkts. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN.

8 Probenvorbereitung

Die Proben werden am Tag der Analyse, so wie im Leitfaden zur Probenvorbereitung in EN ISO 6498 empfohlen, gemahlen.

Eine repräsentative Portion der trockenen Laborprobe wird so gemahlen, dass sie durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm passt. Ein Erwärmen der Probe ist zu vermeiden.

Das Mahlen von Proben mit einer geeigneten Teilchengrößenverteilung (z. B. bei Vormischungen und Konzentraten), ist unter Umständen nicht notwendig, solange die Homogenität gewährleistet wird.

Halbfeuchtes Heimtierfutter (Dosenfutter für Heimtiere) kann durch Hacken homogenisiert werden.

Proben können auch am Tag vor der Analyse gemahlen werden. In diesem Fall muss durch die Lagerbedingungen jegliche Schädigung verhindert werden; z. B. durch Einfrieren der gemahlenen Probe und Auftauen im Kühlschrank in der Nacht vor der Analyse.

9 Durchführung

9.1 Allgemeines

Aufgrund der Empfindlichkeit der Vitamine A, E und D gegenüber UV-Strahlung und Luft werden alle Arbeitsgänge unter Ausschluss von natürlichem und stark fluoreszierendem Licht und so schnell durchgeführt, wie es mit einer exakten Arbeitsweise vereinbar ist. Wenn möglich, sind Braunglasgeräte (6.3) zu verwenden (siehe Bemerkung 11.3).

9.2 Herstellung und Standardisierung der Standardlösungen

9.2.1 Vitamin A (Retinol)

9.2.1.1 Allgemeines

Zur Herstellung der Vitamin-A- (Retinol-) Standardlösungen wird all-trans-Retinylacetat (5.17.1) oder all-trans-Retinylpalmitat (5.17.2) verwendet.

ANMERKUNG Die Standardsubstanz von Retinol selbst ist weniger stabil als Retinylpalmitat oder Retinylacetat. Zur Herstellung einer Vitamin-A-Standardlösung werden daher üblicherweise diese Ester verwendet. Die Verwendung der Retinol-Standardsubstanz ist jedoch auch möglich.

9.2.1.2 Standard-Stammlösung von Vitamin A (Retinol)

Eine Menge von Vitamin A (Retinylacetat) (5.17.1) oder Vitamin A (Retinylpalmitat) (5.17.2), die ungefähr 100 000 IE Vitamin A (Retinol) enthält, wird auf 0,1 mg in einen 250-ml-Steh- oder Erlenmeyerkolben (6.3.1) eingewogen und es wird mit einer Verseifung nach 9.4.2.1 oder 9.4.2.2 und einer Extraktion nach 9.5 fortgefahren.

Das Eluat der SPE-Säule (6.5) wird in einem 100-ml-Messkolben (6.3.3) aufgefangen und dieser wird bis zur Markierung mit Cyclohexan (5.12) aufgefüllt.

Die nominale Konzentration der Standard-Stammlösung von Vitamin A (Retinol) in Cyclohexan beträgt ungefähr 75 IE je ml.

Der exakte Gehalt muss anhand der nach 9.2.1.4 bestimmten exakten Konzentration der Standard-Arbeitslösung von Vitamin A (Retinol) (9.2.1.3) berechnet werden.

Die Standard-Stammlösung von Vitamin A (Retinol) bleibt im Dunklen bei 4 °C 6 Monate stabil und kann in diesem Zeitraum zur Herstellung einer Standard-Arbeitslösung nach 9.2.1.2 verwendet werden.

9.2.1.3 Standard-Arbeitslösung von Retinol

10,0 ml der Standard-Stammlösung von Vitamin A (Retinol) (9.2.1.2) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert und bis zur Markierung mit Cyclohexan (5.12) aufgefüllt.

Die nominale Konzentration der Standard-Arbeitslösung beträgt 7,5 IE Vitamin A (Retinol) je ml.

Die exakte Konzentration von Vitamin A (Retinol) in der Standard-Arbeitslösung muss nach 9.2.1.4 bestimmt werden.

Die Standard-Arbeitslösung von Vitamin A (Retinol) bleibt im Dunklen bei 4 °C mindestens 2 Monate stabil, jedoch muss die tatsächliche Konzentration vor der Verwendung überprüft werden.

9.2.1.4 Standardisierung der Standard-Arbeitslösung von Vitamin A (Retinol) (9.2.1.3)

Die exakte Konzentration von Vitamin A (Retinol) in der Standard-Arbeitslösung (9.2.1.3) wird mittels spektrometrischer Messung bestimmt. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen Cyclohexan (5.12) im Spektralphotometer (6.12) beim Absorptionsmaximum zwischen 325 nm und 327 nm gemessen.

Die Konzentration von Vitamin A (Retinol) kann mit Gleichung (1) berechnet werden.

$$C_A = \frac{33\,333 \times A_{\text{wSTD}}}{A_{325}} = \frac{33\,333 \times A_{\text{wSTD}}}{1\,735} = 19,212 \times A_{\text{wSTD}} \quad (1)$$

Dabei ist

C_A die Konzentration von Vitamin A (Retinol), in IE/ml;

33 333 die Konzentration von Vitamin A (Retinol), die 10 000 µg/ml entspricht, in IE/ml;

A_{wSTD} die Absorption der Standard-Arbeitslösung (9.2.1.3);

A_{325} der Absorptionskoeffizient von Vitamin A (Retinol) in Cyclohexan bei 325 nm.

ANMERKUNG Der Absorptionskoeffizient von Vitamin A (Retinol) in Cyclohexan $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ bei 325 nm beträgt 1 735, d. h. 33 333 IE/ml ergeben eine Absorption von 1 735, also ergeben 7,5 IE/ml eine Absorption von 0,3904.

9.2.2 Vitamin E (α-Tocopherol)

9.2.2.1 Allgemeines

Zur Herstellung der Standardlösungen von Vitamin E (α-Tocopherol) wird DL-α-Tocopherol (5.18.1) verwendet.

ANMERKUNG Es ist auch möglich, DL-α-Tocopherolacetat als Standard zu verwenden, siehe Anhang B. Die Herstellung mit DL-α-Tocopherol ist vorzuziehen, da in diesem Fall keine Verseifung durchgeführt werden muss.

9.2.2.2 Standard-Stammlösung von Vitamin E (α-Tocopherol)

50 mg Vitamin E (DL-α-Tocopherol) (5.18.1) werden auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben (6.3.3) eingewogen. Die Substanz wird in Ethanol (5.11) gelöst und es wird mit demselben Lösemittel bis zur Markierung aufgefüllt.