

DIN EN 17550



ICS 65.120

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Carotinoiden in Mischfuttermitteln und Vormischungen
für Tiere mittels Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie
mit UV-Detektion (RP-HPLC-UV);
Deutsche Fassung EN 17550:2021**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of carotenoids in animal compound feed and premixtures by high performance
liquid chromatography –
UV detection (HPLC-UV);
German version EN 17550:2021

Aliments des animaux –
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Détermination de la teneur en caroténoïdes des aliments composés et des prémélanges pour
animaux par chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection UV
(CLHP-UV);
Version allemande EN 17550:2021

Gesamtumfang 50 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17550:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel – Probenahme- 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 Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 13528 siehe DIN ISO 13528

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 13528, *Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche*

Deutsche Fassung

**Futtermittel —
Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung von Carotinoiden in Mischfuttermitteln und
Vormischungen für Tiere mittels Umkehrphasen-
Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit UV-Detektion
(RP-HPLC-UV)**

Animal feeding stuffs:
Methods of sampling and analysis —
Determination of carotenoids in animal compound feed
and premixtures by high performance liquid
chromatography — UV detection (HPLC-UV)

Aliments des animaux —
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse —
Détermination de la teneur en caroténoïdes des
aliments composés et des prémélanges pour animaux
par chromatographie liquide à haute performance
couplée à une détection UV (CLHP-UV)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 20. 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.....	5
5 Reagenzien und Materialien.....	6
6 Prüfeinrichtung	9
7 Probenahme.....	11
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....	11
8.1 Allgemeines.....	11
8.2 Laborprobe.....	11
8.3 Untersuchungsprobe.....	11
8.4 Prüfmenge	11
9 Durchführung	12
9.1 Allgemeines.....	12
9.2 Enzymatische Freisetzung.....	12
9.3 Extraktion	12
9.3.1 Extraktion mittels PLE.....	12
9.3.2 Konventionelle Flüssig-Fest-Extraktion (LSE, en: liquid solid extraction).....	13
9.4 Zentrifugation	14
9.5 HPLC-Analyse.....	14
9.5.1 Analysebedingungen.....	14
9.5.2 HPLC-Bestimmung.....	14
9.5.3 Kriterien für die Annahme des Analyseergebnisses.....	16
10 Berechnung.....	17
11 Präzision	18
11.1 Ringversuch	18
11.2 Wiederholpräzision.....	18
11.3 Vergleichpräzision.....	18
12 Untersuchungsbericht.....	18
Anhang A (informativ) Ergänzende Geräte- und analytische Informationen	19
A.1 Werte der Absorptionskoeffizienten.....	19
A.2 Beispiele für Muster chromatographischer Profile von isomerisierten Carotinoiden	20
A.3 Ergebnisse des Ringversuchs	31
Literaturhinweise	47

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17550:2021) 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 Juni 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 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 Mandates erarbeitet, das 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

Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren soll ein Hilfsmittel für die effektive Kontrolle der Carotinoide in Futtermitteln durch die zuständigen Behörden im Rahmen der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 darstellen. Durch Nutzung der Eigenschaften der isosbestischen Wellenlänge zur Quantifizierung ermöglicht das Verfahren, die Summe aller Isomere für jedes Carotinoid, das in Geflügel- und Fischfutter zugelassen ist, unter Routinebedingungen im Labor zu bestimmen. Dieser Ansatz kann bei einigen Matrices zu einer höheren analytischen Variation der quantitativen Ergebnisse führen; die Analyse sollte daher mit einem alternativen Verfahren wiederholt werden, wenn die resultierende Variation signifikant von den in Abschnitt A.3 dieses Dokuments aufgeführten Daten abweicht. Diese alternativen Verfahren dürfen solche sein, die für die Messung einzelner Carotinoide, die unter der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 zugelassen und vom Referenzlaboratorium für Futtermittel-Zusatzstoffe der Europäischen Union erhältlich sind, optimiert wurden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Analysenverfahren legt ein Verfahren der Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit UV-Detektion (RP-HPLC-UV) fest für die gleichzeitige Bestimmung von vier zugelassenen Carotinoiden in Fisch-Mischfuttermittel und Fischfutter-Vormischung, und zwar Astaxanthin (AXN), Canthaxanthin (CXN), Adonirubin (ADR) und Astaxanthindimethyldisuccinat (AXN-DMDS), und von sechs zugelassenen Carotinoiden in Geflügelfutter und Geflügelfutter-Vormischung, und zwar Canthaxanthin (CXN), Capsanthin (CSN), Beta-Apo-8'-Carotinsäureethylester (BACARE), Citranaxanthin (CIXN), Lutein (LUT) und Zeaxanthin (ZEA) im Massenanteilbereich von etwa 2 mg/kg bis etwa 4 500 mg/kg (je nach Carotinoid). Beta-Carotin (BCAR), in Mischfuttermittel und Vormischungen für alle Tierspezies zugelassen, wurde ebenfalls in den Anwendungsbereich aufgenommen. Das Analysenverfahren ist für den Zweck der Quantifizierung der angegebenen Carotinoide und die Bestätigung der Kennzeichnung geeignet. Das Verfahren ist auf Futtermittel anzuwenden, die unter Verwendung von natürlichen und synthetischen Futtermittel-Zusatzstoffen hergestellt werden.

Xanthophyllester, wie die von Lutein, Zeaxanthin und Capsanthin, die in Futtermitteln vorhanden sein könnten, sind keine zugelassenen Futtermittel-Zusatzstoffe und gehören daher nicht zum Anwendungsbereich dieses Dokuments.

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

3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

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>

4 Kurzbeschreibung

Die Carotinoide werden zuerst durch eine enzymatische Reaktion bei 50 °C freigesetzt. Die Proben werden mit Aceton mithilfe eines Flüssigextraktionsgeräts unter Druck oder durch Flüssig-Fest-Extraktion extrahiert. Die Extrakte werden anschließend zentrifugiert und mittels Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit UV- oder Diodenarray-Detektion analysiert. Für die Bestimmung der Zielanalyten wird eine gemeinsame isosbestische Wellenlänge von 410 nm gewählt, um sicherzustellen, dass die verschiedenen Isomere jedes der Carotinoide ähnliche Absorptionskoeffizienten haben. Die Quantifizierung erfolgt durch externe Kalibrierung.

ANMERKUNG Die Höchstgehalte der Carotinoide werden, wie durch die europäischen Verordnungen für die Zulassung von Futtermittel-Zusatzstoffen [3] [4] festgelegt, als die Summe der all-*trans*- und *cis*-Isomere ausgedrückt. Daher ist es aus juristischer Sicht wichtig, die Flächen der entsprechenden Isomere im HPLC-Chromatogramm vor der Quantifizierung der einzelnen Carotinoide aufzusummieren.

5 Reagenzien und Materialien

WARNUNG 1 — Carotinoide sind lichtempfindlich. Bei den analytischen Arbeiten ist für geeigneten Schutz vor Tageslicht zu sorgen, und die Standardlösungen sind vor Lichteinwirkung geschützt in Braunglasflaschen, Braunglasgefäßen oder mit Aluminiumfolie umhüllt aufzubewahren.

WARNUNG 2 — Einatmen und Kontakt mit den toxischen Standardmaterialien und deren Lösungen sind zu vermeiden. Bei der Handhabung der Lösemittel und Lösungen ist unter einem Laborabzug zu arbeiten. Dabei sind Schutzbrille und Schutzkleidung zu tragen.

WARNUNG 3 — Beim Umgang mit Hydromatrix™ ist immer eine Sicherheitsmaske zu tragen.

Sofern nicht anders festgelegt, werden ausschließlich Reagenzien von anerkannter Analysequalität verwendet.

5.1 Protease mit der Fähigkeit, Carotinoide aus ihrer eingekapselten Form freizusetzen.

ANMERKUNG Geeignete Proteasen sind im Handel erhältlich¹.

5.2 Gereinigtes Wasser, z. B. mit einer Milli-Q-Anlage oder einer ähnlichen Anlage gereinigt².

5.3 Butylhydroxytoluol BHT.

5.4 Hochreine, für Flüssigextraktion unter Druck (PLE, en: Pressurized Liquid Extraction) geeignete Kieselgur, z. B. Hydromatrix™, als loses Stützmaterial².

5.5 Aceton, HPLC-Qualität.

5.6 Aceton, spektroskopische Qualität³.

5.7 Acetonitril, HPLC-Qualität.

5.8 Methyl-*tert*-butylether tBME, HPLC-Qualität.

5.9 Tetrahydrofuran (THF), mit 250 mg/l bis 350 mg/l Butylhydroxytoluol (BHT) stabilisiert, HPLC-Qualität.

5.10 *n*-Hexan, spektroskopische Qualität³.

5.11 Ethanol, spektroskopische Qualität³.

5.12 Cyclohexan, spektroskopische Qualität³.

1 Bei der Validierung wurden Alcalase® und Multifect PR 6L erfolgreich eingesetzt.

2 Milli-Q, Hydromatrix™, Alcalase® und Multifect PR 6L sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, sofern sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

3 Die genaue spektroskopische Qualität hängt von dem Carotinoid ab, für das die UV-Standardisierung der Standardlösung durchgeführt wird (5.15.2).

5.13 Mobile Phase für HPLC

5.13.1 Phase A: Gemisch aus Acetonitril + Methyl-*tert*-butylether + Wasser von 70 + 20 + 10; $V_1 + V_2 + V_3$, stabilisiert mit 1 000 mg/l BHT.

Mit einem Messzylinder (6.17) werden 700 ml Acetonitril (5.7) in eine 1 000-ml-Flasche überführt. 200 ml Methyl-*tert*-butylether (5.8) werden abgemessen (6.17) und hinzugefügt; anschließend werden 100 ml Wasser (5.2) hinzugegeben. 1,0 g BHT (5.3) wird hinzugegeben. In einem Ultraschallbad (6.11) wird die Lösung 10 min gemischt und entgast. Diese mobile Phase ist 28 Tage stabil.

ANMERKUNG Die Retentionszeit der Carotinoide wird durch geringe Unterschiede in der Zusammensetzung der mobilen Phase A stark beeinflusst. Die Verwendung einer HPLC-Qualitätskontrollprobe (9.1) ist von entscheidender Bedeutung für die korrekte Zuordnung der erhaltenen Signale. Darüber hinaus könnte die Anwesenheit von Nichtziel-Carotinoiden die Signale der Zielanalyten stören, wenn die Zusammensetzung der mobilen Phase A von der in 5.13.1 festgelegten abweicht.

5.13.2 Phase B: Gemisch aus Acetonitril + Methyl-*tert*-butylether von (70 + 30; $V_1 + V_2$), stabilisiert mit 1 000 mg/l BHT.

Mit einem Messzylinder (6.17) werden 700 ml Acetonitril (5.7) in eine 1 000-ml-Flasche überführt. 300 ml Methyl-*tert*-butylether (5.8) werden abgemessen (6.17) und hinzugegeben. 1,0 g BHT (5.3) wird hinzugegeben. In einem Ultraschallbad (6.11) wird die Lösung 10 min gemischt und entgast. Diese mobile Phase ist 28 Tage stabil.

5.14 Referenzstandards

Garantierte Reinheit, die für jede Charge der Referenzstandards erforderlich ist:

5.14.1 Astaxanthin (AXN), CAS-Nr. 472-61-7, Reinheit ≥ 970 g/kg.

5.14.2 Canthaxanthin (CXN), CAS-Nr. 514-78-3, Reinheit ≥ 970 g/kg.

5.14.3 Adonirubin (ADR), CAS-Nr. 4418-72-8, Reinheit ≥ 970 g/kg.

5.14.4 Astaxanthindimethyldisuccinat (AXN-DMDS), CAS-Nr. 578006-46-9, Reinheit ≥ 950 g/kg.

5.14.5 Capsanthin (CSN), CAS-Nr. 465-42-9, Reinheit ≥ 950 g/kg.

5.14.6 Beta-Apo-8'-Carotinsäureethylester (BACARE), CAS-Nr. 1109-11-1, Reinheit ≥ 950 g/kg.

5.14.7 Lutein (LUT), CAS-Nr. 127-40-2, Reinheit ≥ 950 g/kg.

5.14.8 Citranaxanthin (CIXN), CAS-Nr. 3604-90-8, Reinheit ≥ 950 g/kg.

5.14.9 Zeaxanthin (ZEA), CAS-Nr. 144-68-3, Reinheit ≥ 950 g/kg.

5.14.10 Beta-Carotin (BCAR), CAS-Nr. 7235-40-7, Reinheit ≥ 950 g/kg.

5.15 Standardlösungen

Alle Standardlösungen werden vor Tageslicht geschützt.

5.15.1 Carotinoid-Standard-Stammlösung, etwa 200 µg/ml.

Die Lösung wird immer frisch hergestellt und sofort für die Messung verwendet.

ANMERKUNG Mögliche Carotinoide sind Astaxanthin (AXN), Canthaxanthin (CXN), Adonirubin (ADR), Astaxanthin-dimethyldisuccinat (AXN-DMDS), Capsanthin (CSN), Beta-Apo-8'-Carotinsäureethylester (BACARE), Citranaxanthin (CIXN), Lutein (LUT), Zeaxanthin (ZEA) und Beta-Carotin (BCAR).

Es wird genau 1,0 mg des Carotinoid-Standards (5.14) (dabei wird die eingewogene Menge des Standards aufgezeichnet) in einen 5,0-ml-Messkolben eingewogen (oder es wird der gesamte Inhalt des Behälters, der die Standardsubstanz (5.14) enthält, quantitativ überführt).

Die Substanz wird in THF/BHT (5.9) gelöst und es wird mit demselben Lösemittel bis zur Markierung aufgefüllt. Die Lösung wird auf einem Vortex-Mischer (6.27) und in einem Ultraschallbad (6.11) gut gemischt. Der genaue Massenanteil muss mit dem Spektralphotometer (6.2), wie detailliert in 5.15.2 beschrieben, standardisiert werden. Falls erforderlich, wird ein Anteil von 1 ml für das Isomerisierungsverfahren (5.15.4) als Reserve zurückgestellt. Ein weiteres Aliquot wird für die Identifizierung des Analyten, wie in 9.5.3.2 beschrieben, als Reserve zurückgestellt und im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

5.15.2 UV-Standardisierung der Standardlösungen

100 µl der gewählten Carotinoid-Standard-Stammlösung (5.15.1) werden mit der Pipette in einen 10-ml-Messkolben (6.8) gegeben und mit dem geeigneten Lösemittel bis zur Markierung aufgefüllt (Anhang A). Der Nennwert der erhaltenen Lösung beträgt etwa 2 µg/ml. Mit dem Spektralphotometer (6.2) wird das Spektrum dieser Lösung im Wellenlängenbereich von 300 nm bis 550 nm aufgenommen und beim Maximum wird die Absorption dieser Lösung gegen das reine Lösemittel gemessen. Das Maximum ist lösemittelspezifisch und ist als Näherungswert in Anhang A angegeben.

Der genaue Gehalt des gewählten Carotinoids ergibt sich nach Gleichung (1).

$$\text{Carotinoid } \mu\text{g/ml} = E_{\lambda_{\text{max}}} \times 10\,000 / E^{1\%}_{1\text{ cm}} \quad (1)$$

BEISPIEL Für alle *E*-Werte von AXN ist das in der Tabelle in Anhang A vorgeschlagene Lösemittel *n*-Hexan. Für dieses Lösemittel ist die Wellenlänge, bei der gemessen wird, ungefähr 470 nm und der Wert für $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (oder $A^{1\%}_{1\text{ cm}}$) beträgt 2 100.

Mit einer geeigneten Pipette werden 100 µl der Astaxanthin-Standard-Stammlösung (5.15.1) in einen 10-ml-Messkolben gegeben und mit *n*-Hexan bis zur Markierung aufgefüllt. Der Nennwert der erhaltenen Standard-Messlösung beträgt etwa 2 µg/ml. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen reines *n*-Hexan im Spektralphotometer (6.2), das auf die Wellenlänge des Absorptionsmaximums (etwa 470 nm) eingestellt ist, gemessen.

ANMERKUNG Das Lösemittel der gemessenen Lösung ist keine Reinsubstanz, da immer ein kleiner Rest von THF/BHT (5.9) vorhanden ist. Sein Effekt wird jedoch als vernachlässigbar angesehen, und es wird derselbe tabellarische Extinktionskoeffizient verwendet, da der Beitrag von THF/BHT (5.9) sehr gering ist (1 %).

Der Gehalt an AXN wird nach Gleichung (2) berechnet.

$$\text{AXN } \mu\text{g/ml} = E_{\text{max}} \times 10\,000 / 2\,100 \quad (2)$$

Eine Lösung derselben Konzentration, d. h. 100 µl der Astaxanthin-Standard-Stammlösung (5.15.1), die in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und mit Aceton (5.5) bis zur Markierung aufgefüllt wird, muss gleichzeitig in das HPLC-System (siehe 5.15.3) injiziert werden.

5.15.3 HPLC-Standard-Kalibrierkurve

Mit einer geeigneten Pipette werden 100 µl der Carotinoid-Standard-Stammlösung (5.15.1) in einen 10-ml-Messkolben gegeben und mit Aceton (5.5) bis zur Markierung aufgefüllt.

5.15.4 Isomerisierung

5.15.4.1 Allgemeines

Es wird empfohlen, diesen Schritt durchzuführen, wenn Unklarheit hinsichtlich des Vorhandenseins möglicher Isomere besteht.

5.15.4.2 Isomerisierung der Standardlösungen

Die nach 5.15.1 hergestellten Standards könnten einer Isomerisierung unterzogen werden, um ein Profil der all-*trans*- und der *cis*-Isomere jedes Carotinoids, die in der Phase des Gleichgewichts vorhanden sind, zu erhalten.

In ein Flüssigchromatographie-(LC-)Fläschchen wird 1 ml Standard gefüllt. Das Fläschchen wird dicht verschlossen und es wird kontrolliert, dass das Fläschchen gut verschlossen ist und sich die Verschlusskappe nicht dreht. Das Fläschchen wird ungefähr 2 h auf ungefähr 80 °C erhitzt, um das Gleichgewicht zwischen den Isomeren zu erreichen. Für diesen Zweck kann ein Blockheizgerät für Fläschchen (6.30) verwendet werden.

Es wird eine Verdünnung des isomerisierten Standards (z. B. 1 → 200) injiziert.

Der isomerisierte Standard ist bei Raumtemperatur mehrere Monate stabil.

5.16 Positive HPLC-Qualitätskontrollprobe (QCS, en: quality control sample)

Es werden ungefähr 0,8 mg AXN (5.14.1), 0,4 mg CXN (5.14.2) und 0,5 g BHT (5.3) in einen Rundbodenkolben (6.9) eingewogen. Es werden 200 ml einer Lösung aus Aceton (5.5) und Wasser (5.2) (75 + 25)-Gemisch ($V_1 + V_2$) hinzugegeben. Der Kolben wird mit einem Rückflusskühler (6.10) verbunden und in einen Heizmantel platziert oder in ein Heizbad (6.28) mit Magnetrührwerk (6.29) eingetaucht. Es wird bis zum Sieden erhitzt und etwa 1,5 h bis 2 h refluxiert.

ANMERKUNG Alternativ kann das Gemisch in einem druckresistenten Röhrchen auf 80 °C erhitzt werden.

Bei dieser Reaktion kommt es zur Bildung eines stabilen Isomerenverhältnisses. Diese Lösung wird in einen 500-ml-Messkolben (6.8) überführt und das Volumen wird mit Aceton (5.5) bis zur Markierung aufgefüllt. Die Lösung wird gut gemischt und sofort danach in HPLC-Fläschchen überführt. Das Befüllen sollte schnell erfolgen und jedes befüllte Fläschchen sollte sofort verschlossen werden, um eine Verdampfung zu vermeiden. Die Fläschchen werden bei Raumtemperatur und vor Lichteinwirkung geschützt aufbewahrt. Diese Lösung ist, sofern vor Sauerstoffeinwirkung geschützt, für mehrere Monate stabil.

6 Prüfeinrichtung

Übliche Laborgeräte und insbesondere Folgendes.

6.1 HPLC-System, bestehend aus dem Folgenden.

6.1.1 Pumpe, pulsationsfrei, mit der eine Volumenfließrate von 0,1 ml/min bis 2,0 ml/min aufrechterhalten werden kann.

6.1.2 Injektionssystem, manuell oder Autosampler.

Wenn ein Autosampler verwendet wird, wird ein gekühlter Autosampler empfohlen, auch wenn dieser bei der Validierung des Verfahrens nicht verwendet wurde.

6.1.3 UV/VIS-Detektor, mit variabler Wellenlänge, geeignet für zuverlässige Messungen bei 410 nm, oder ein UV/VIS-Photodiodenarray-Detektor (DAD).

6.1.4 Computerdatensystem.

6.1.5 Analytische Säule, Supelco® Suplex pKb-100 5 µm, 250 mm × 4,6 mm oder vergleichbar⁴.

6.1.6 Schutzsäule, 5 µm, 2 cm × 4 mm SUPELCOSIL™ Suplex™ pKb-100 Supelguard™ Cartridge oder vergleichbar⁴.

6.2 Spektralphotometer, mit 1-mm-Öffnungen.

6.3 Mahlgerät.

6.4 Sieb, mit 1 mm Maschenweite.

6.5 Waagen, eine analytische Waage mit einer Kapazität von 10 g oder größer mit einer Ablesbarkeit von 0,1 mg, sowie eine Waage mit einer Kapazität von 100 g oder größer mit einer Ablesbarkeit von 0,01 g.

6.6 Polypropylenbehälter, 100 ml mit Deckel.

6.7 Kolbenhubpipetten mit variablem Luftvolumen, geeignet für Pipettiervolumina von 50 µl bis 100 µl.

6.8 Glas-Messkolben, 5 ml, 10 ml, 150 ml, 500 ml und 1 000 ml.

6.9 Rundbodenkolben, 500 ml.

6.10 Allihn-Rückflusskühler.

6.11 Ultraschallbad, mit Temperaturregler.

6.12 Flachspatel.

6.13 System für Lösemittlextraktion unter erhöhtem Druck (PLE), ASE 300 Dionex®, Büchi SpeedExtractor E-914 oder vergleichbar⁴.

6.14 PLE-Zellen, für die verwendete Extraktionseinheit geeignet, 66 ml oder größer.

6.15 Zellulosefilter, für PLE-Zellen.

6.16 PLE-Fläschchen, für die verwendete Extraktionseinheit, mindestens 240 ml.

6.17 Messzylinder, 250 ml und 1 000 ml.

6.18 Mikrozentrifugenröhrchen mit Sicherheitsverschluss, 1,8 ml, Eppendorf®-Röhrchen oder vergleichbar⁴.

6.19 Mikrozentrifuge.

6.20 HPLC-Braunglasfläschchen, 1,5 ml.

⁴ Supelco® Suplex pKb-100, SUPELCOSIL™ Suplex™ pKb-100 Supelguard™ Cartridge, ASE 300 Dionex®, Büchi SpeedExtractor E-914, Eppendorf®-Röhrchen, Techne Dri-Block-Heizgeräte und Ultra-Turrax®-Mischer sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, sofern sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

- 6.21 Bördelzange für HPLC-Glasfläschchen.
- 6.22 Zentrifuge.
- 6.23 Zentrifugenröhrchen, 50 ml oder 100 ml.
- 6.24 Ultra-Turrax®-Mischer⁴.
- 6.25 PLE-Trichter, für PLE-Zellen.
- 6.26 Pulvertrichter.
- 6.27 Vortex-Mischer.
- 6.28 Heizmantel oder Heizbad.
- 6.29 Magnetrührwerk.
- 6.30 Blockheizgerät für Fläschchen, Techne Dri-Block-Heizgerät oder vergleichbar⁴.

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 Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 6497 [1] angegeben.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

8.1 Allgemeines

Die Untersuchungsprobe wird nach EN ISO 6498 vorbereitet.

8.2 Laborprobe

Die Laborprobe (üblicherweise 50 g) wird so gemahlen, dass sie vollständig durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm (6.4) hindurchpasst oder bis eine feine Paste erhalten wird. Sie wird gründlich durchmischt.

8.3 Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe besteht aus einem repräsentativen und homogenisierten Aliquot der gemahlenen Laborprobe (8.2) von mindestens 10 g.

8.4 Prüfmenge

Es werden 5,0 g der gründlich gemischten Untersuchungsprobe (8.3) auf 0,1 g in einen 100-ml-Polypropylenbehälter (6.6) für das Extraktionsverfahren nach 9.3.1 oder in ein 50-ml- oder 100-ml-Zentrifugenröhrchen (6.23) für das Extraktionsverfahren nach 9.3.2 eingewogen. Die Masse in g wird aufgezeichnet. Die Probe wird dem Analysenverfahren (Abschnitt 9) unterzogen.

9 Durchführung

9.1 Allgemeines

Das vollständige Verfahren (9.2 bis 9.4) sollte auf zwei Prüfmengen (8.4) derselben Untersuchungsprobe angewendet werden, um zwei unabhängige und parallele Bestimmungen durchzuführen.

Die Verwendung von Qualitätskontrollproben (QCS) wird empfohlen.

Die QCS (5.16) muss an jedem Untersuchungstag vor und nach der vollständigen Probenabfolge injiziert werden, um die Eignung des HPLC/DAD-Systems zu bewerten.

Die QCS (5.16) enthält zwei Carotinoide:

- 1) CXN, ein stabiles und besser lösliches Carotinoid, sowie
- 2) AXN, ein weniger stabiles und weniger lösliches Carotinoid.

Je nach den zu bestimmenden Analyten darf ein relevantes Carotinoid zu diesem Gemisch hinzugefügt werden.

Das Gemisch wird solange isomerisiert, bis ein konstantes Verhältnis der Isomere erreicht ist. Diese Lösung ist, sofern vor Sauerstoffeinwirkung geschützt, für mehrere Monate stabil.

9.2 Enzymatische Freisetzung

Zur Prüfmenge (8.4) werden 0,2 g BHT (5.3), 100 µl des Enzyms (5.1) und 15 ml gereinigtes Wasser (5.2) hinzugegeben. Das Gefäß wird dicht verschlossen und kräftig geschüttelt, um sicherzustellen, dass das Futtermittel vollständig von Wasser durchdrungen wird. Der Ansatz wird für 15 min bis 20 min in ein Ultraschallbad (6.11), das auf eine Temperatur von 50 °C eingestellt ist, gegeben. Es ist alle 5 min zu schütteln.

9.3 Extraktion

9.3.1 Extraktion mittels PLE

Nach Schritt 9.2 wird der Deckel vom Behälter mit der Prüfmenge abgenommen; dabei ist darauf zu achten, dass kein Tropfen der Probenflüssigkeit verloren geht. Es werden ungefähr 13 g hochreine Kieselgur, die für das PLE-Verfahren (5.4) geeignet ist, hinzugegeben, der Behälter wieder dicht verschlossen und kräftig von Hand geschüttelt, bis die nasse Futtermittelprobe vollständig an die Kieselgurkügelchen adsorbiert erscheint und sich gut von der Wandung des Polypropylenbehälters ablöst.

ANMERKUNG Der Vorgang kann durch Klopfen des Behälters auf den Tisch unterstützt werden.

Die Behälter werden vorsichtig geöffnet, wobei die am Deckel haftenden Probenpartikel mit einem Flachspatel (6.12) in den Behälter überführt werden. Es wird gut mit dem Spatel (6.12) gemischt, wobei sicherzustellen ist, dass keine Klümpchen der Probenpartikel mehr vorhanden sind. Auf den Boden der PLE-Zelle (6.14) werden zwei Zellulosefilter (6.15) eingebracht. Das gesamte Material wird mithilfe eines Trichters (6.25) in die PLE-Zelle (6.14) überführt. Falls erforderlich, wird mit Kieselgur (5.4) aufgefüllt. Die Zelle wird verschlossen und die Extraktion wird unter Anwendung der in Tabelle 1 angegebenen Parameter durchgeführt.

Tabelle 1 — Extraktionsparameter

Extraktionslösemittel	Aceton (5.5)
Druck (bar)	103,4
Druck (psi)	1 500
Temperatur (°C)	58
Aufheizzeit (min)	0
Heizzeit (min)	0
Statische Extraktionszeit (min)	7
Spülvolumen (%)	120
Spülzeit (s)	60
Statische Zyklen	3

Jede Futtermittlextraktion dauert ungefähr 30 min. Mit dem Gerät können bis zu 12 Proben automatisiert, z. B. über Nacht, verarbeitet werden.

Anschließend wird das Röhrchen mit dem Rohextrakt entnommen. Es wird gut gemischt und das Gesamtvolumen des Extrakts (V_{ext}) (10) wird mithilfe eines Messzylinders (6.17) aufgezeichnet.

9.3.2 Konventionelle Flüssig-Fest-Extraktion (LSE, en: liquid solid extraction)

Es werden 50 ml Aceton (5.5) zur Prüfmenge hinzugefügt und es wird 1 min geschüttelt. Es wird 5 min bei etwa 1 800 *g* bis 1 900 *g* (entspricht ungefähr 3 100 min⁻¹) zentrifugiert (6.22). Der Überstand (erster Extrakt) wird aufgefangen und in einen 150-ml-Messkolben (6.8) überführt.

Es werden 50 ml Aceton (5.5) zum festen Niederschlag der ersten Extraktion hinzugefügt. Falls erforderlich, wird der Ultra-Turrax®-Mischer (6.24) verwendet, um eine Auflösung zu erreichen, und dann wird 1 min geschüttelt. Es wird für 5 min bei etwa 1 800 *g* bis 1 900 *g* (entspricht ungefähr 3 100 min⁻¹) zentrifugiert (6.22). Der Überstand (zweiter Extrakt) wird aufgefangen und mit dem ersten Extrakt im 150-ml-Messkolben vereinigt.

Es werden 40 ml Aceton (5.5) zum Niederschlag der zweiten Extraktion hinzugefügt und es wird 1 min geschüttelt. Es wird 5 min bei etwa 1 800 *g* bis 1 900 *g* (entspricht ungefähr 3 100 min⁻¹) zentrifugiert (6.22). Der Überstand (dritter Extrakt) wird aufgefangen und mit den beiden zuvor erhaltenen Extrakten im 150-ml-Messkolben vereinigt. Das Extraktionsvolumen (V_{ext}) (10) wird mit Aceton aufgefüllt und es wird kräftig geschüttelt.

Wenn es nicht möglich ist, 100-ml-Zentrifugenröhrchen zu finden oder zu verwenden, dürfen die gebräuchlicheren 50-ml-Zentrifugenröhrchen verwendet werden. In diesem Fall müssen allerdings die drei Extraktionsschritte mit 50 ml Aceton durch vier Extraktionsschritte mit jeweils 35 ml bis 37 ml Aceton (5.5) ersetzt werden.

Gleichmaßen gilt, wenn ein 150-ml-Messkolben (6.8) nicht verfügbar ist, wird das Endvolumen V_{ext} (10) mithilfe eines Messzylinders (6.17) aufgezeichnet.

Ein 1,8-ml-Aliquot des Rohextrakts wird in ein Mikrozentrifugenröhrchen mit Sicherheitsverschluss (6.18) überführt.