

DIN EN ISO 14183

ICS 65.120

**Futtermittel –
Bestimmung der Gehalte an Monensin, Narasin und Salinomycin –
Flüssigkeitschromatographisches Verfahren mittels
Nachsäulenderivatisierung (ISO 14183:2005);
Deutsche Fassung EN ISO 14183:2008**

Animal feeding stuffs –
Determination of monensin, narasin and salinomycin contents –
Liquid chromatographic method using post-column derivatization (ISO 14183:2005);
German version EN ISO 14183:2008

Aliments des animaux –
Détermination des teneurs en monensine, narasine et salinomycine –
Méthode par chromatographie liquide utilisant la dérivatisation post-colonne
(ISO 14183:2005);
Version allemande EN ISO 14183:2008

Gesamtumfang 27 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 14183:2008) enthält unverändert die Internationale Norm ISO 14183:2005, die vom Unterkomitee SC 10 „Animal feeding stuffs“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) erarbeitet wurde.

Die Mitarbeit des DIN beim Europäischen Komitee für Normung (CEN) wird für den Bereich des CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) über das nationale Spiegelgremium, den Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EG-Richtlinien.

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

ISO 6497 siehe DIN EN ISO 6497

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 6497, *Futtermittel — Probenahme*

Deutsche Fassung

Futtermittel —
Bestimmung der Gehalte an Monensin, Narasin und Salinomycin —
Flüssigkeitschromatographisches Verfahren mittels Nachsäulenderivatisierung
(ISO 14183:2005)

Animal feeding stuffs —
Determination of monensin, narasin and
salinomycin contents —
Liquid chromatographic method using post-column
derivatization
(ISO 14183:2005)

Aliments des animaux —
Détermination des teneurs en monensine,
narasine et salinomycine —
Méthode par chromatographie liquide utilisant la
dérivatisation post-colonne
(ISO 14183:2005)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 25. Oktober 2008 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 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, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B- 1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien	4
5 Geräte	8
6 Probenahme	9
7 Vorbereitung der Untersuchungsproben	9
8 Durchführung	9
8.1 Vorbereitung einer Probe für die Qualitätskontrolle	9
8.2 Extraktion	9
8.3 HPLC-Analyse	10
8.4 Bestimmung	12
9 Bestätigung der HPLC	12
9.1 Allgemeines	12
9.2 Nachsäulenderivatisierung mit DMAB	13
9.3 Extraktion mit Hexan	13
10 Berechnung der Ergebnisse	13
10.1 Allgemeines	13
10.2 Monensin	13
10.3 Salinomycin	14
10.4 Narasin	15
10.5 Auswertung der Bestätigungsdaten	17
11 Präzision	18
11.1 Ringversuch	18
11.2 Wiederholpräzision	18
11.3 Vergleichpräzision	18
11.4 Bestimmungsgrenze	19
12 Untersuchungsbericht	19
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	20
A.1 Durchführung	20
A.2 Statistische Auswertung der Ergebnisse	21
A.3 Beispiel-Chromatogramm	24
Literaturhinweise	25

Vorwort

Der Text von ISO 14183:2005 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 14183:2008 durch das Technische Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ übernommen, 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 Mai 2009, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2009 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 EG-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, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 14183:2005 wurde vom CEN als EN ISO 14183:2008 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) zur Bestimmung der Monensin-, Narasin- und Salinomycin-Gehalte in Futtermitteln, Futtermittel-Zusatzstoffen (trocken und flüssig) und mineralischen Futtermittel-Vormischungen fest. Das Verfahren ist nicht anwendbar auf Gemische, die chemische Zusatzstoffe (pharmazeutische Produkte) enthalten. Lasalocid und Semduramicin können nach diesem Verfahren nicht bestimmt werden.

Die Bestimmungsgrenze liegt für Monensin etwa bei 1 mg/kg, für Salinomycin etwa bei 2 mg/kg und für Narasin etwa bei 2 mg/kg. Eine niedrigere Bestimmungsgrenze kann angewendet werden, ist dann aber vom Anwender zu validieren.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente 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 Änderungen).

ISO 6498:1998, *Animal feeding stuffs — Preparation of test samples*

3 Kurzbeschreibung

Die Ionophore Monensin, Narasin und Salinomycin werden in einer Lösung Methanol : Wasser (90 + 10) unter mechanischem Schütteln über eine Dauer von 1 h extrahiert, dann werden die Extrakte filtriert. Die Ionophore werden durch HPLC mit Umkehrphase unter Anwendung einer Nachsäulenderivatisierung mit Vanillin bestimmt und bei 520 nm detektiert. Bei Proben, in denen die genannten Ionophore in Spuren enthalten sein könnten und bei mit Arzneistoffen versetzten Proben (Medizinalproben), die nicht erwartete Ionophore enthalten, ist der Nachweis unter Anwendung einer Extraktion mit Hexan oder einer Nachsäulenderivatisierung mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB) durchzuführen.

4 Reagenzien

Zur Analyse sind, wenn nicht anders festgelegt, nur Reagenzien in anerkannter analytischer Reinheit anzuwenden.

4.1 Wasser, Qualität für die HPLC oder eine entsprechende Qualität (z. B. Reinstwasser).

4.2 Methanol, (CH_3OH), für die HPLC.

4.3 Schwefelsäure (H_2SO_4), 97 % bis 98 %.

4.4 Konzentrierte Essigsäure, ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), 97 % bis 98 %.

4.5 Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), Reinheit mindestens 99 %.

4.6 Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd), Reinheit mindestens 99 %.

4.7 Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB), Reinheit mindestens 99 %.

4.8 Hexan [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$], in Glas destilliert.

4.9 Lösemittel für die Extraktion, Methanol : Wasser (90 + 10).

1 800 ml Methanol (4.2) und 200 ml Wasser (4.1) sind in einem 2-l-Messkolben zu vereinigen. Die Lösung ist gut zu mischen.

4.10 Mobile Phasen

4.10.1 Für die Nachsäulenreaktion

20 ml Schwefelsäure (4.3) sind langsam und unter vorsichtigem Rühren zu 950 ml Methanol (4.2) zuzufügen. Die Lösung ist abkühlen zu lassen, dann sind unter Rühren 30 g Vanillin (4.6) hinzuzufügen. Diese Lösung ist vor Licht zu schützen. Sie ist täglich frisch anzusetzen.

4.10.2 Eluent für die HPLC

Es ist eine Lösung Methanol (4.2) : Wasser (4.1) : konzentrierte Essigsäure (4.4) (940 + 60 + 1) zu verwenden. Die Lösung ist unter Anwendung von Unterdruck durch die in 5.7 beschriebene Filtriereinrichtung zu filtrieren.

4.11 Neutralisiertes Methanol

Zu 4 l Methanol (4.2) ist 1,0 g Natriumhydrogencarbonat (4.5) hinzuzufügen. Die Lösung ist gut zu mischen und erforderlichenfalls durch ein 11 µm-Filterpapier (z. B. Whatman Nr 1)¹⁾ zu filtrieren. Siehe Anmerkung zu 4.13.

4.12 Referenz-Standards

Für jede Charge der Referenz-Standards ist die Angabe der Zusammensetzung oder Wirksamkeit (Verdünnung, Potenz) erforderlich.

4.12.1 Monesin-Natrium²⁾

4.12.2 Narasin²⁾

4.12.3 Natrium-Salinomycin³⁾

WARNHINWEIS — Das Inhalieren und alle anderen Arten der Einwirkung von giftigen Standard-Substanzen und ihren Lösungen ist zu vermeiden. Bei der Handhabung von Lösemitteln und Lösungen ist unter einem Abzug zu arbeiten. Es sind Schutzbrille und Schutzkleidung zu tragen.

4.13 Ionophor-Standard-Stammlösungen, etwa 0,50 mg/ml.

Exakt 25 mg von jeder Standardsubstanz (4.12.1 bis 4.12.3) sind auf 0,1 mg in je einen 50-ml-Messkolben einzuwägen. Das Lösen erfolgt in neutralisiertem Methanol (4.11), dann ist bis zur Marke aufzufüllen. Die Lösung ist jeden Monat frisch anzusetzen. Die Aufbewahrung erfolgt im Kühlschrank.

Alle Standardlösungen müssen vor Licht geschützt oder in nur gering lichtdurchlässigen Flaschen aufbewahrt werden.

ANMERKUNG Für Salinomycin wurde die Anforderung, neutralisiertes Methanol anzuwenden, nicht verifiziert. Diese Anforderung gilt nicht, wenn nur Monensin zu analysieren ist, für die Analyse von Narasin trifft sie jedoch zu.

-
- 1) Das genannte Filterpapier ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produkts durch ISO.
 - 2) Zu beziehen von: Lilly Research Laboratories, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, USA.
 - 3) Zu beziehen von: Alpharma Inc., Animal Health Division, 1 Duggar Drive, Willow Island, WV, USA 26134-97111 und Höchst Roussel Vet, D-65926 Frankfurt am Main, Gebäude H 790, Deutschland.

4.13.1 Monensin-Standard-Stammlösung

Die Herstellung erfolgt nach der Beschreibung in 4.13. Die Konzentration der Standard-Stammlösung wird basierend auf dem Hauptbestandteil, Monensin A, berechnet. Der Nebenbestandteil, Monensin B, der unmittelbar vor Monensin A [4] eluiert wird, ist in den Untersuchungsproben auf der Basis von Monensin A zu bestimmen. Dazu ist die auf dem Profil-Datenblatt des Referenzstandards angegebene Zusammensetzung anzuwenden:

$$\rho_M = \frac{0,5S_M}{100} \quad (1)$$

Dabei ist

- 0,5 die Konzentration der Standard-Stammlösung (4.13), in Milligramm je Milliliter, angegeben auf drei Dezimalstellen;
- ρ_M die Konzentration des gegebenen Bestandteils Monensin A in der Standard-Stammlösung, in Milligramm je Milliliter;
- S_M der Prozent-Anteil des gegebenen Bestandteils Monensin A im Referenz-Standard, entsprechend den Angaben im Profil-Datenblatt.

BEISPIEL Die Charge RS0234 des Referenz-Standards enthält unter Bezug auf die „Ist“-Werte 93,71 % Monensin A.

4.13.2 Salinomycin-Standard-Stammlösung

Die Herstellung erfolgt nach der Beschreibung in 4.13. Die Konzentration ist unter Anwendung des Wertes für die Konzentration des Referenz-Standards zu berechnen, die vom Lieferanten angegeben wird [2]:

$$\rho_S = \frac{0,5w}{1000} \quad (2)$$

Dabei ist

- ρ_S die Konzentration des Salinomycins in der Standard-Stammlösung, in Milligramm je Milliliter;
- w die Konzentration des vom Lieferanten angegebenen Salinomycin-Standards, in Mikrogramm je Milligramm.

BEISPIEL Für die Charge WS-19B beträgt die Standardkonzentration 986 µg/mg.

4.13.3 Narasin-Standard-Stammlösung

Die Herstellung erfolgt nach der Beschreibung in 4.13. Die Konzentration der Standard-Stammlösung wird basierend auf dem Hauptbestandteil, Narasin A, berechnet. Die Nebenbestandteile (Narasin D und Narasin I), die nach Narasin A eluiert werden [5], sind in den Untersuchungsproben auf der Basis von Narasin A zu bestimmen. Dazu ist die auf dem Datenblatt für das Profil des Referenz-Standards angegebene Zusammensetzung für den jeweiligen Bestandteil anzuwenden:

$$\rho_N = \frac{0,5S_N}{100} \quad (3)$$

Dabei ist

- ρ_N die Konzentration des angegebenen Bestandteils Narasin A in der Standard-Stammlösung, in Milligramm je Milliliter;
- S_N der Prozentanteil des gegebenen Bestandteils Narasin A im Referenz-Standard, entsprechend den Angaben im Profil-Datenblatt.

BEISPIEL Für die Charge RS0302 des Referenzstandards ergibt sich unter Bezug auf die „Ist“-Werte der folgende Prozentanteil:
Narasin A = 85,4 %
Narasin D = 1,9 %
Narasin I = 0,7 %

4.14 Zwischen-Mischstandardlösung, etwa 20 µg/ml Monensin, 40 µg/ml Salinomycin bzw. 40 µg/ml Narasin.

10,0 ml Monensin-, 20,0 ml Salinomycin- und 20,0 ml Narasin-Standard-Stammlösung (4.13) werden jeweils in einen 250-ml-Messkolben pipettiert. Mit dem Extraktionslösemittel (4.9) ist jede Lösung bis zur Marke zu verdünnen. Dann ist gut zu mischen. Jede dieser Lösungen ist jeden Monat frisch anzusetzen.

4.15 Mischstandardlösungen für die HPLC

Fünf Mischstandardlösungen für die HPLC sind herzustellen, indem ein aliquoter Anteil der Zwischen-Mischstandardlösung (4.14) in je einen wenig lichtdurchlässigen 100-ml-Messkolben pipettiert und nach Tabelle 1 mit dem Extraktionslösemittel (4.9) bis zur Marke verdünnt wird. Jede dieser Lösungen ist gut zu mischen. Jeden Monat sind sie frisch anzusetzen.

Tabelle 1

Identifizierung der Mischstandardlösung für die HPLC	Menge der Zwischen-Standardlösung (4.14) ml	Ungefähre Konzentration der HPLC-Standardlösung µg/ml		
		Monensin	Salinomycin	Narasin
A	1	0,2	0,4	0,4
B	5	1	2	2
C	10	2	4	4
D	25	5	10	10
E	50	10	20	20

4.16 Einzelne Standardlösungen für die HPLC

4.16.1 Monensin, etwa 5 µg/ml.

Exakt 1,0 ml der Monensin-Standard-Stammlösung (4.13.1) ist in einen wenig lichtdurchlässigen 100-ml-Messkolben zu pipettieren. Die Lösung ist bis zur Marke mit der Extraktionslösung (4.9) zu verdünnen. Die Lösung ist gut zu mischen. Sie ist jeden Monat frisch anzusetzen. Die Aufbewahrung erfolgt im Kühlschrank.

4.16.2 Salinomycin, etwa 10 µg/ml.

Exakt 2,0 ml der Salinomycin-Standard-Stammlösung (4.13.2) sind in einen wenig lichtdurchlässigen 100-ml-Messkolben zu pipettieren. Die Lösung ist bis zur Marke mit der Extraktionslösung (4.9) zu verdünnen. Die Lösung ist gut zu mischen. Sie ist jeden Monat frisch anzusetzen. Die Aufbewahrung erfolgt im Kühlschrank.

4.16.3 Narasin, etwa 10 µg/ml.

Exakt 2,0 ml der Salinomycin-Standard-Stammlösung (4.13.3) sind in einen wenig lichtdurchlässigen 100-ml-Messkolben zu pipettieren. Die Lösung ist bis zur Marke mit der Extraktionslösung (4.9) zu verdünnen. Die Lösung ist gut zu mischen. Sie ist jeden Monat frisch anzusetzen. Die Aufbewahrung erfolgt im Kühlschrank.