

DIN EN 17270

ICS 65.120

Einsprüche bis 2018-09-20

Entwurf**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Theobromin in Einzelfuttermitteln, vor allem aus Kakao
gewonnen sowie in Mischfuttermitteln mittels Flüssigchromatographie;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17270:2018**

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 and English version prEN 17270:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-07-20 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-
Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de,
sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im
Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-
Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL),
10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 53 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17270:2018) 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).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Bestimmung von Theobromin in Einzelfuttermitteln, vor allem aus Kakao gewonnen sowie in Mischfuttermitteln 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

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	6
6 Geräte	8
7 Durchführung	9
7.1 Probenvorbereitung	9
7.2 Extraktion	9
8 Chromatografische Analyse	10
9 Berechnung der Ergebnisse	10
10 Präzision	11
11 Untersuchungsbericht	11
Anhang A (informativ) Beispiel für HPLC-UV-Bedingungen	12
A.1 HPLC-UV-Analyse	12
A.1.1 LC-System	12
A.1.2 UV-Bedingungen	12
A.1.3 Chargenzusammensetzung	12
A.1.4 Identifizierung der Peaks	12
A.2 Reagenzien	12
A.3 Geräte	13
A.3.1 HPLC mit UV-Detektor	13
A.4 HPLC-Bedingungen	13
A.5 Beispielchromatogramm	14
Anhang B (informativ) Beispiel für LC-MS/MS-Bedingungen	15
B.1 Allgemeines	15
B.2 LC-MS/MS-Analyse	15
B.2.1 LC-System	15
B.2.2 MS-Bedingungen	15
B.2.3 Chargenzusammensetzung	15
B.2.4 Identifizierung der Peaks	15
B.3 Reagenzien	16
B.4 Geräte	16
B.4.1 LC-MS/MS:	16
B.5 HPLC-Bedingungen	17
B.6 MS-Bedingungen	17
B.7 Beispielchromatogramme	18
Anhang C (informativ) Während der Einzellabor-Validierung erhaltene Verfahrensleistungsdaten	22

Anhang D (informativ) Während des Ringversuchs erhaltene Verfahrensleistungsdaten	23
Literaturhinweise.....	25

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17270:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

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

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

Das Verfahren in diesem Dokument gilt für die Bestimmung von Theobromin in Mischfutter mittels Flüssigchromatographie mit UV-Detektion im Prüfbereich von 27 mg/kg bis 307 mg/kg. Dieses Verfahren wurde unter Verwendung von Ergänzungsmischfuttermittel für erwachsene Hunde und Ergänzungsmischfuttermittel für Pferde validiert. Der tatsächliche Arbeitsbereich kann größer sein als der geprüfte Bereich. Es werden auch alternative Chromatographiebedingungen unter Verwendung von Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) für den validierten Bereich von 49 mg/kg bis 307 mg/kg bereitgestellt. Dieses Verfahren hat sich ebenfalls als gebrauchstauglich für die Bestimmung von Theobromin in Blockschokolade mittels HPLC-UV oder LC-MS/MS erwiesen.

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: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: 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

5.2 Eisessig, 99,5 % w/v

5.3 Essigsäure, 1 M

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 aufgefüllt. Vor der Verwendung wird der Messkolbeninhalt nochmals sorgfältig durch Umdrehen gemischt.

5.4 Wasser nach Klasse LC-MS 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 Ammoniumacetat

5.6 2,5 M Ammoniumacetatpuffer, pH 5,5

192,7 g ± 0,1 g Ammoniumacetat (5.5) 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 eingestellt, zunächst mit Eisessig (5.2) und dann mit 1 M 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 aufgefüllt. Vor der Verwendung wird sorgfältig durch Umdrehen gemischt. Diese Lösung ist, bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis zu 1 Monat haltbar.

5.7 Hexan

5.8 Zinkacetat-Dihydrat

5.9 Kaliumferrocyanid-Trihydrat

5.10 Carrez-Reagenz I

219 g ± 1 g Zinkacetat-Dihydrat (5.8) 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 aufgefüllt. Vor der Verwendung wird gut gemischt. Diese Lösung ist, bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis zu 3 Monate haltbar.

5.11 Carrez-Reagenz II.

106 g ± 1 g Kaliumferrocyanid-Trihydrat (5.9) 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 aufgefüllt. Vor der Verwendung wird gut gemischt. Diese Lösung ist, bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis zu 3 Monate haltbar.

5.12 Theobromin, ≥ 98,5 %

5.13 Theobromin-Stammlösung, 125 µg/ml

62,5 mg ± 1 mg Theobromin (5.12) 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 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.

5.14 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin, ≥ 98 %

5.15 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin-Stammlösung, 1 mg/ml

100 mg ± 1 mg 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin (5.14) werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und etwa 80 ml Wasser(5.4) hinzugefügt. Die Lösung wird gut geschüttelt und das Volumen mit Wasser aufgefüllt. Vor der Verwendung wird gut gemischt. Diese Lösung ist, bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt, bis zu 1 Monat haltbar.

5.16 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin-Lösung, 100 µg/ml

1 ml 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin-Stammlösung, 1 mg/ml (5.15) werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und das Volumen mit Wasser (5.4) aufgefüllt. Vor der Verwendung wird gut gemischt. Diese Lösung ist, bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt, bis zu 1 Monat haltbar.

5.17 Kalibrierstandards

Mittels Pipette werden eine 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin-Lösung, 100 µg/ml (5.16) und verschiedene Volumina Theobromin-Stammlösung, 125 µg/ml (5.13), in 6 10-ml-Messkolben hinzugefügt, so dass 6 Kalibrierstandards über den gesamten Kalibrierbereich erhalten werden. Die Lösungen sollten mit Wasser auf das Volumen verdünnt werden. Diese Lösungen sind, bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis zu 1 Woche haltbar.

Tabelle 1 gibt Beispiele für Volumina, die verwendet werden müssen, um Kalibrierstandards bei 0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml und 15 µg/ml Theobromin zu erhalten. Wenn das Extraktionsverfahren eingehalten wird, sind die Kalibrierstandards äquivalent mit 0 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg und 600 mg/kg in der Probe. Die exakte Konzentration des Kalibrierstandards sollte anhand des Gewichtes des Theobromins berechnet werden, das für die Zubereitung der Standard-Stammlösung (5.13) verwendet wurde.

Tabelle 1 — Vorgeschlagene Kalibrierstandards

Kalibrierstandard (nominale Konzentration µg/ml)	0	0,5	1	5	10	15
Volumen (µl) aus 125 µg/ml Theobromin	0	40	80	400	800	1 200
Volumen (µl) aus 100 µg/ml 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin	200	200	200	200	200	200

5.18 Qualitätskontrollmaterial

Es wird empfohlen, dass in jeder Charge ein geeignetes Qualitätskontrollmaterial analysiert wird, beispielsweise NIST SRM 2384 Blockschokolade, zertifizierter Wert für Theobromin (11 600 ± 1 100) mg/kg. Für NIST SRM 2384 sollte ein Probengewicht von 1,0 g ± 0,1 g verwendet werden, 2 ml des Internen Standards (5.15) 1 mg/ml 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin sollten hinzugefügt und der Extrakt sollte vor der Analyse mittels HPLC-UV oder LC-MS/MS verdünnt werden, beispielsweise mit einem Faktor 10.

6 Geräte

Standard-Laborglasgeräte und -ausrüstung, einschließlich folgender Ausrüstung:

6.1 Mühle, Einfachmühle oder Mehrfachmühlen, die Prüfmateriale auf Partikelgrößen von < 500 µm zerkleinern können.

6.2 Sieb, 500 µm

6.3 Mischer, der die zerkleinerten Prüfmateriale ausreichend homogenisieren kann

6.4 Konisches Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (PP) mit Schraubdeckel, 50 ml oder ähnliches Röhrchen

- 6.5 Waage**, mit einer Massenauflösung von 0,001 g oder besser
- 6.6 Zentrifuge**, die eine relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 3 000 *g* erzeugen kann
- 6.7 Glasfläschchen** zur Verwendung im Autosampler (üblicherweise mit einem Fassungsvermögen von etwa 1,5 ml) sowie Schraubdeckel oder Ähnliches
- 6.8 Nylon-Spritzenfilter**, kleines internes Volumen, Porengröße: 0,45 µm
- 6.9 Universal-Filterpapier**
- 6.10 Vortex-Mischer**.
- 6.11 Wasserbad**, dazu geeignet, 40 °C ± 5 °C zu halten.
- 6.12 Ultraschallbad**

7 Durchführung

7.1 Probenvorbereitung

Es ist wichtig, dass das Labor eine wirklich repräsentative Probe des Produktes erhält, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde. Laborproben sollten gegebenenfalls in Übereinstimmung mit Europäischen Rechtsvorschriften hergestellt werden [1]. Die Laborprobe sollte mit einer Mühle (6.1) fein gemahlen und sorgfältig mit einem Mischer (6.3) oder einem anderen Prozess, bei dem eine angemessene Homogenisierung nachgewiesen wurde, vermischt werden, bevor eine Prüfmenge zur Analyse entnommen wird.

Es ist wichtig, dass die Prüfmenge von einer Teilprobe entnommen wird, die ausreichend homogen ist und eine Partikelgröße von ≤ 500 µm hat. Es sollte während dieses Prozesses darauf geachtet werden, dass es nicht zu einer Überhitzung der Probe kommt.

7.2 Extraktion

2,5 g ± 0,1 g der homogenisierten Probe werden in ein Polypropylen-Röhrchen mit Schraubverschluss (6.4) eingewogen. Es werden 6 ml Hexan (5.7) hinzugefügt, und die Probe wird sorgfältig mit einem Vortex-Mischer (6.10) vermischt und dann 5 min bei 2 700 *g* zentrifugiert (6.6). Die oberste Hexanschicht wird verworfen.

Die Hexanextraktion wird weitere 2 Male mit jeweils 3 ml Hexan wiederholt.

Die Probe wird mit einem Stickstoffstrom getrocknet, um die letzten Spuren von Hexan zu beseitigen, dann werden 0,2 ml des Internen Standards (5.15) 1 mg/ml 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin hinzugefügt.

25 ml 2,5 M Ammoniumacetat, pH 5,5 (5.6) werden hinzugefügt, kräftig geschüttelt und dann für (15 ± 2) min in ein auf 40 °C ± 1 °C eingestelltes Wasserbad (6.11) gestellt. Die Probe wird sorgfältig mit einem Vortex-Mischer vermischt, wobei sichergestellt wird, dass keine Feststoffe am Boden des Röhrchens kleben bleiben, und dann für (20 ± 2) min in ein Ultraschallbad (6.12) gestellt.

Die Probe wird unter Verwendung von Wasser zur Reinigung des Polypropylen-Röhrchens in einen 100-ml-Messkolben überführt und extrahiert.

Es werden 5 ml Carrez I (5.10) hinzugefügt und es wird gründlich von Hand gemischt. Es werden 5 ml Carrez II (5.11) hinzugefügt und es wird gründlich von Hand gemischt.

Das Volumen wird mit Wasser aufgefüllt und gründlich gemischt, dann durch ein Universal-Filterpapier (6.9) gefiltert. Ein Aliquot des Filtrats wird durch einen 0,45 µm Spritzenfilter (6.8) durchlaufen gelassen.

8 Chromatografische Analyse

Die Probenextrakte werden mittels HPLC-UV analysiert, ein Beispiel für geeignete Bedingungen ist in Anhang A aufgeführt. Wenn der Analyst keinen Zugang zu einer HPLC-UV hat, können die Extrakte auch mittels LC-MS/MS analysiert werden, siehe Anhang B für Beispielbedingungen. Analysensäule, Zusammensetzung der mobilen Phase, Gradienteneinstellungen und Injektionsvolumen sollten so kombiniert werden, dass eine annehmbare Trennung auf den geforderten Niveaus erreicht werden kann.

9 Berechnung der Ergebnisse

Die Konzentration von Theobromin in der Probe wird mit Hilfe des Verhältnisses der Bereichsresponse für Theobromin zu der Bereichsresponse für 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin berechnet. Das Verhältnis der Peakflächen zu der Konzentration von Theobromin in dem entsprechenden Kalibrierstandard wird grafisch dargestellt und die Steigung und der Achsenabschnitt werden bestimmt.

Die Konzentration von Theobromin in der injizierten Lösung kann mittels der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$C_e = \frac{\left(\frac{A_1}{A_2}\right) - a}{b} \times \frac{c}{d} \quad (1)$$

Dabei ist

- C_e die Konzentration von Theobromin im Extrakt, in µg/ml;
- A_1 die Response des Probenbereichs für Theobromin;
- A_2 die Response des Probenbereichs für 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin;
- a der Achsenabschnitt der Kalibrierkurve;
- b die Steigung der Kalibrierkurve;
- c die Konzentration von 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin im ursprünglichen 100-ml-Probenextrakt (siehe Anmerkung 1), in µg/ml;
- d die Konzentration von 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin im Kalibrierstandard (siehe Anmerkung 2), in µg/ml.

ANMERKUNG 1 $c = 2$, wenn der Probe 0,2 ml 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin hinzugefügt werden. $c = 20$, wenn der Probe 2 ml 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin hinzugefügt werden.

ANMERKUNG 2 $d = 2$, wenn die Kalibrierstandards wie in 5.17 beschrieben hergestellt werden.

Liegt die Konzentration von Theobromin in dem Extrakt außerhalb des Kalibrierbereichs, sollte die Probe neu extrahiert werden und anstatt 0,2 ml 7-(β-Hydroxyethyl-)Theophyllin sollten 2 ml hinzugefügt werden. Das Extrakt sollte vor der Analyse mittels HPLC-UV oder LC-MS/MS beispielsweise mit einem Faktor 10 verdünnt werden.

Die Konzentration von Theobromin in der Probe kann mittels der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$C_s = C_e \times \frac{V}{m} \quad (2)$$

Dabei ist

C_s die Konzentration von Theobromin in der Probe, in mg/kg;

C_e die Konzentration von Theobromin im Extrakt, in µg/ml;

V das Extraktionsvolumen, in ml;

m das Probengewicht, in g.

10 Präzision

Es wurde eine Einzellabor-Validierung unter Verwendung eines Ergänzungsmischfutters für ausgewachsene Hunde, eines Ergänzungsmischfutters für Pferde und eines aus Kakao gewonnenen Materials (NIST SRM 2384, Blockschokolade) durchgeführt. Diese Analyse wurde mittels LC-MS/MS durchgeführt. Einzelheiten sind in Anhang C angeführt.

Leistungskriterien, die aus einem Ringversuch des Verfahrens unter Verwendung eines Ergänzungsmischfutters für ausgewachsene Hunde, eines Ergänzungsmischfutters für Pferde und eines aus Kakao gewonnenen Materials (NIST SRM 2384, Blockschokolade) sowie eines Futtermittels, das aus Kakao gewonnenes Material enthält, stammen, sind in Anhang D angeführt.

11 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) notwendige Informationen zur Identifizierung der Probe;
- b) Verweisung auf diese Europäische Norm;
- c) Datum des Probeneinganges;
- d) Prüfergebnisse mit den Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- e) Messverfahren.

Anhang A (informativ)

Beispiel für HPLC-UV-Bedingungen

A.1 HPLC-UV-Analyse

A.1.1 LC-System

Analysensäule, mobile Phase und Injektionsvolumen sollten so kombiniert werden, dass eine annehmbare Trennung der zu betrachtenden Analyte erreicht werden kann. In A.4 findet sich ein Beispiel für Bedingungen, die sich als geeignet erwiesen haben.

A.1.2 UV-Bedingungen

In A.4 findet sich ein Beispiel für Bedingungen, die sich als geeignet erwiesen haben.

A.1.3 Chargenzusammensetzung

Ein Reagenzienblindwert sollte zu Beginn jedes Durchlaufs injiziert werden, um zu bestätigen, dass keine Kontamination in dem System besteht. Auch nach den Kalibrierstandards sollte ein Blindwert injiziert werden, um sicherzustellen, dass es keine Verschleppung gibt.

Die Kalibrierstandards sollten zumindest zu Beginn und am Ende des Durchlaufs injiziert werden. Außerdem ist es besser, die Kalibrierstandards während des gesamten Durchlaufs zu injizieren, um auf Drifts zu prüfen.

A.1.4 Identifizierung der Peaks

Die Identifizierung des Theobrominpeaks sollte durch Vergleich der Retentionszeit eines in dem Probenextrakt nachgewiesenen Peaks mit der Retentionszeit des Theobrominpeaks in den Kalibrierstandards erfolgen.

A.2 Reagenzien

A.2.1 Orthophosphorsäure

A.2.2 Kaliumdihydrogenphosphat

A.2.3 0,012 5 M Kaliumdihydrogenphosphat, pH 3,5

1,7 g $\pm$ 0,05 g Kaliumdihydrogenphosphat (A.2.2) werden in etwa 800 ml Reinstwasser (5.4) in einem 1-l-Becher aufgelöst. Der pH-Wert wird mit Orthophosphorsäure (A.2.1) auf pH 3,5 $\pm$ 0,05 eingestellt.

Die Lösung wird in einen 1-l-Messkolben überführt, das Volumen wird mit Wasser aufgefüllt und durch Umdrehen gut vermischt. Diese Lösung sollte wöchentlich frisch hergestellt und vor der Verwendung sorgfältig durch Umdrehen vermischt werden.

A.2.4 Acetonitril

A.2.5 90 % 0,012 5 M Kaliumdihydrogenphosphat, pH 3,5, 10 % Acetonitril

900 ml 0,012 5 M Kaliumdihydrogenphosphat, pH 3,5 (A.2.3) werden zu 100 ml Acetonitril (A.2.4) hinzugegeben und durch Umdrehen gut vermischt.

A.3 Geräte

A.3.1 HPLC mit UV-Detektor

A.3.1.1 Lösemittelübertragungssystem, das eine Flussrate liefern kann, die für die verwendete analytische Säule geeignet ist

A.3.1.2 Degaser, optional, zum Entgasen während der mobilen LC-Phasen

A.3.1.3 Autosampler, der ein angemessenes Volumen mit ausreichender Genauigkeit injizieren kann

A.3.1.4 Säulenofen, der die Säule auf einer geeigneten Temperatur halten kann, beispielsweise 30 °C

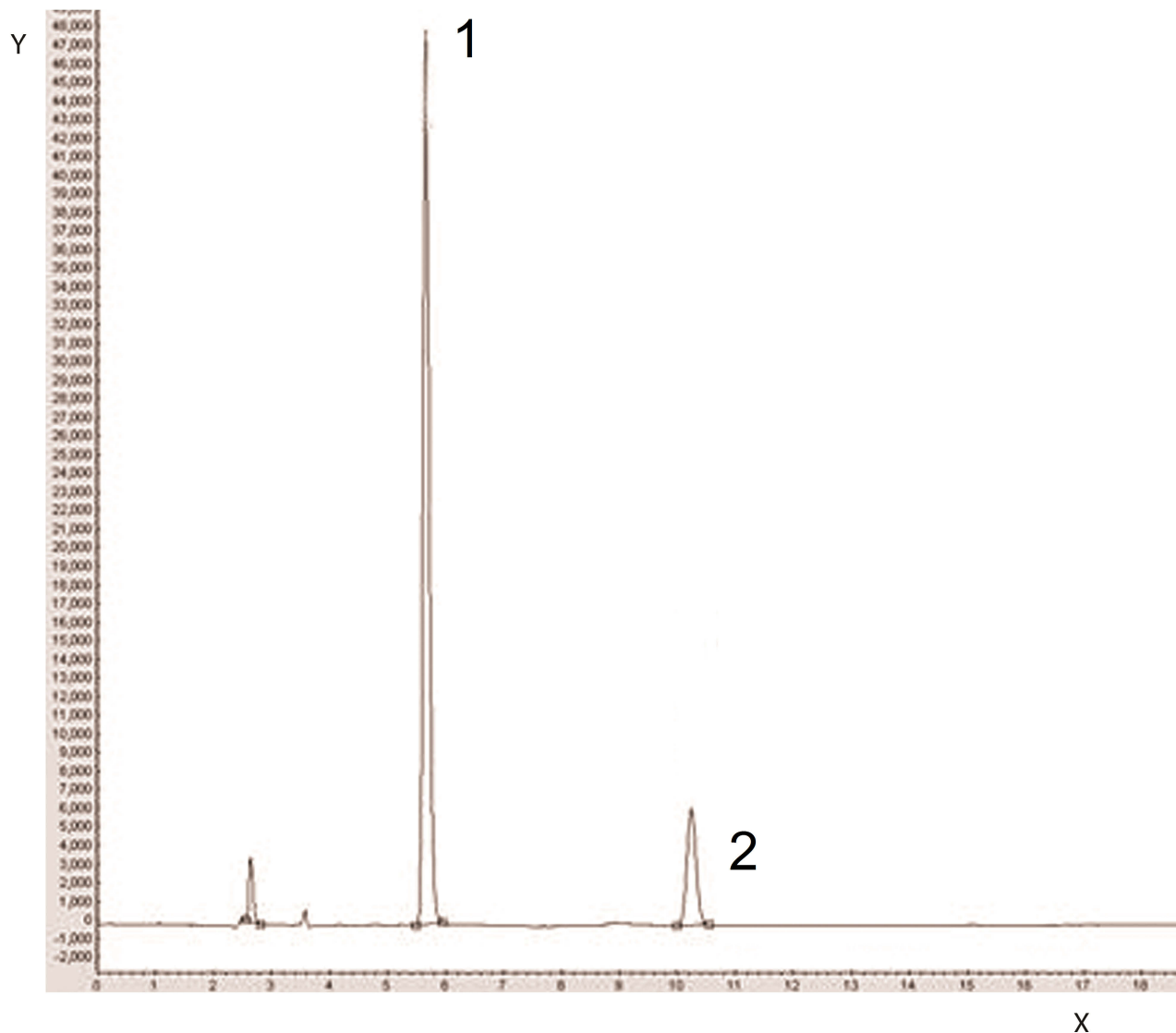
A.3.1.5 Analytische Säule, die die zu betrachtenden Analyte trennen kann

A.3.1.6 UV-Detektor, der bei 278 nm messen kann

A.4 HPLC-Bedingungen

Säule	Luna C18 (2), 250 mm × 4,60 mm, 5 Mikrometer (Phenomenex)
Temperatur Säulenofen	30 °C
Injektionsvolumen	20 µl
Volumenstrom	1,0 ml/min
Mobile Phase	90 % 0,012 5 M Kaliumdihydrogenphosphat, pH 3,5, 10 % Acetonitril
Wellenlänge	278 nm

A.5 Beispielchromatogramm



Legende

x-Achse Retentionszeit (min)

y-Achse Response (μV)

1 Theobromin — 5,5 min

2 7-(β -Hydroxyethyl-)Theophyllin — 9,9 min

Bild A.1 — Chromatogramm für Theobromin und 7-(β -Hydroxyethyl-)Theophyllin