

DIN EN 17294

ICS 65.120

Einsprüche bis 2018-10-03

Entwurf

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung organischer Säuren mittels Ionenchromatographie mit
Leitfähigkeitsdetektion (IC-CD);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17294:2018**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of organic acids by Ion Chromatography with Conductivity Detection (IC-CD);
German and English version prEN 17294:2018

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Dosage des acides organiques par chromatographie d'exclusion ionique avec détection de
conductivité (IC-CD);
Version allemande et anglaise prEN 17294:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-08-03 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 72 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17294:2018) 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).

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.

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-2 siehe DIN ISO 5725-2

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

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

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Dosage des acides organiques par chromatographie d'exclusion ionique avec détection de conductivité (IC-CD)

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

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	7
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien	8
5.1 Allgemeines	8
5.2 Wasser	8
5.3 Ameisensäure-, Milchsäure-, Propionsäure-, Citronensäure-, Essigsäure-, Apfelsäure- Standardlösung, $c = 1\,000\text{ [mg/l]}$	8
5.4 Alternative Zubereitung der Stammlösung auf Basis von Einzel-Standardsubstanzen	8
5.5 Gemischte Standardlösung, (etwa) 100 [mg/l]	9
5.6 Mobile Phase der Ionenchromatographie (IC)	9
6 Geräte	9
6.1 Allgemeines	9
6.2 Labormahlwerk	9
6.3 Analysenwaage	9
6.4 Magnetrührer	9
6.5 Ultraschallbad	10
6.6 Pipetten (elektronisch oder manuell)	10
6.7 Zentrifuge, etwa $5\,000 \times g$	10
6.8 Faltenfilter, Porengröße $4\text{ }\mu\text{m}$ – $7\text{ }\mu\text{m}$, (aschefreies Papierfilter)	10
6.9 Membranfilter, für die HPLC-Anwendung (Hochleistungs-Flüssigchromatographie, en: high performance liquid chromatography, HPLC)	10
6.10 Umkehrphasen-Festphasenextrakt (en: reversed phase solid phase extract, RP-SPE)	10
6.11 Ionenchromatograph (Pumpe, Probengeber) mit unterdrückter Leitfähigkeitsdetektion	10
6.12 Qualitätsanforderungen an die Trennsäule	10
7 Probenahme	13
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	13
9 Durchführung	14
9.1 Extraktion	14
9.1.1 Extraktion von Ameisensäure, Milchsäure, Propionsäure, Citronensäure, Essigsäure und Apfelsäure	14
9.1.2 Extraktion von Fumarsäure	14
9.1.3 Extraktion von beschichteten Säuren	14
9.2 Kalibrierung	15
9.3 Messung der Kalibrierstandards und der Probenlösungen	16
9.4 Bestätigung der Identität	16
10 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	16
11 Präzision	17
11.1 Ringversuch	17

11.2	Wiederholpräzision.....	17
11.3	Vergleichpräzision	17
12	Untersuchungsbericht	21
Anhang A (informativ) Beispiele für Messgeräte und geeignete Eluenten		22
A.1	Allgemeines	22
A.2	Beispiele für mobile Phasen und für Lösungen, die als Regenerierungsmittel für Suppressionseinrichtungen verwendet werden.....	23
A.2.1	Reagenzien.....	23
A.2.2	Lösungen.....	23
A.2.3	Beispiele für Chromatogramme.....	24
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten		26
B.1	Ergebnisse der Validierungsstudie.....	26
B.2	Statistische Parameter für organische Säuren	27
Anhang C (informativ) Ablaufplan		35
Literaturhinweise.....		36

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17294:2018) 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 Mandates erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben.

Einleitung

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

1 Anwendungsbereich

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

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

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

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

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

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

Tabelle 1 — Bestimmungsgrenzen (LOQ)

Organische Säure	LOQ [mg/kg]
Ameisensäure	200
Milchsäure	200
Propionsäure	200
Citronensäure	200
Fumarsäure	200
Essigsäure	200
Apfelsäure	200

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

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

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

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

Futtermittelzusatzstoffe

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

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

3.2

Futtermittel

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

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

4 Kurzbeschreibung

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

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

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

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

5 Reagenzien

5.1 Allgemeines

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

5.2 Wasser

Qualität 1 nach EN ISO 3696:1995.

5.3 Ameisensäure-, Milchsäure-, Propionsäure-, Citronensäure-, Essigsäure-, Apfelsäure-Standardlösung, $c = 1\,000$ [mg/l]

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

5.4 Alternative Zubereitung der Stammlösung auf Basis von Einzel-Standardsubstanzen

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

5.4.1 Citronensäure, Reinheit mindestens 99 %.

5.4.2 Apfelsäure, Reinheit mindestens 99 %.

5.4.3 Ameisensäure, Reinheit mindestens 98 %.

5.4.4 Milchsäure, Reinheit mindestens 85 %.

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

5.4.5 Essigsäure, Reinheit mindestens 99 %.

5.4.6 Fumarsäure, Reinheit mindestens 99 %.

5.4.7 Propionsäure, Reinheit mindestens 99 %.

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

250 mg Säure (5.4.1 bis 5.4.7) werden jeweils in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Diese wird mit etwa 80 ml Wasser (5.2) gelöst, gemischt und bis zur Marke mit Wasser (5.2) aufgefüllt.

Bei Fumarsäure werden 250 mg (5.4.6) in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Es werden 80 ml Wasser hinzugefügt (5.2) und sie wird 10 min in einem Ultraschallbad bei 60 °C gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Die maximale Lagerdauer beträgt 6 Monate bei 4 °C.

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

Die genaue Konzentration der Stammlösung wird mittels des vom Lieferanten angegebenen Reinheitsgrades des Referenzstandards ermittelt:

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

Dabei ist

- C_s die experimentelle Konzentration der organischen Säure in der Standard-Stammlösung, in mg/ml;
- P die vom Lieferanten angegebene Reinheit des organischen Säurestandards, in Prozent geteilt durch 100, z. B. 0,98;
- m die eingewogene Masse der organischen Säure, in mg;
- V das Volumen des Messkolbens, in ml.

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

Es werden 4,0 ml jeder Einzel-Standard-Stammlösung (5.4.8) sorgfältig in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt (5.2). Die exakte Konzentration jeder organischen Säure muss entsprechend der tatsächlichen Konzentration der Einzel-Standard-Stammlösungen berechnet werden.

Im Falle gebrauchsfertiger Lösungen (5.3) werden jeweils 10,0 ml in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt (5.2).

Die maximale Lagerdauer beträgt 2 Monate bei 4 °C.

5.6 Mobile Phase der Ionenchromatographie (IC)

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

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

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

6 Geräte

6.1 Allgemeines

Übliche Laborgeräte, insbesondere Folgendes.

6.2 Labormahlwerk

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

6.3 Analysenwaage

In der Lage, bis zu einer Fehlergrenze von 0,1 mg zu wiegen.

6.4 Magnetrührer

Mit Polytetrafluorethylen (PTFE) beschichteter Rührstab.

6.5 Ultraschallbad

6.6 Pipetten (elektronisch oder manuell)

Im Bereich von 100 µl bis 5 000 µl.

6.7 Zentrifuge, etwa 5 000 × g

6.8 Faltenfilter, Porengröße 4 µm–7 µm, (aschefreies Papierfilter)

0,45-µm-Filter (gebrauchsfertige Filtereinheit mit einer hydrophilen Membran mit geringer Proteinbindung aus regenerierter Cellulose).

6.9 Membranfilter, für die HPLC-Anwendung (Hochleistungs-Flüssigchromatographie, en: high performance liquid chromatography, HPLC)

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

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

6.11 Ionenchromatograph (Pumpe, Probengeber) mit unterdrückter Leitfähigkeitsdetektion

6.11.1 IC-Säule, mit festgelegter Trennleistung (6.11)

6.11.2 Vorsäule

6.12 Qualitätsanforderungen an die Trennsäule

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

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

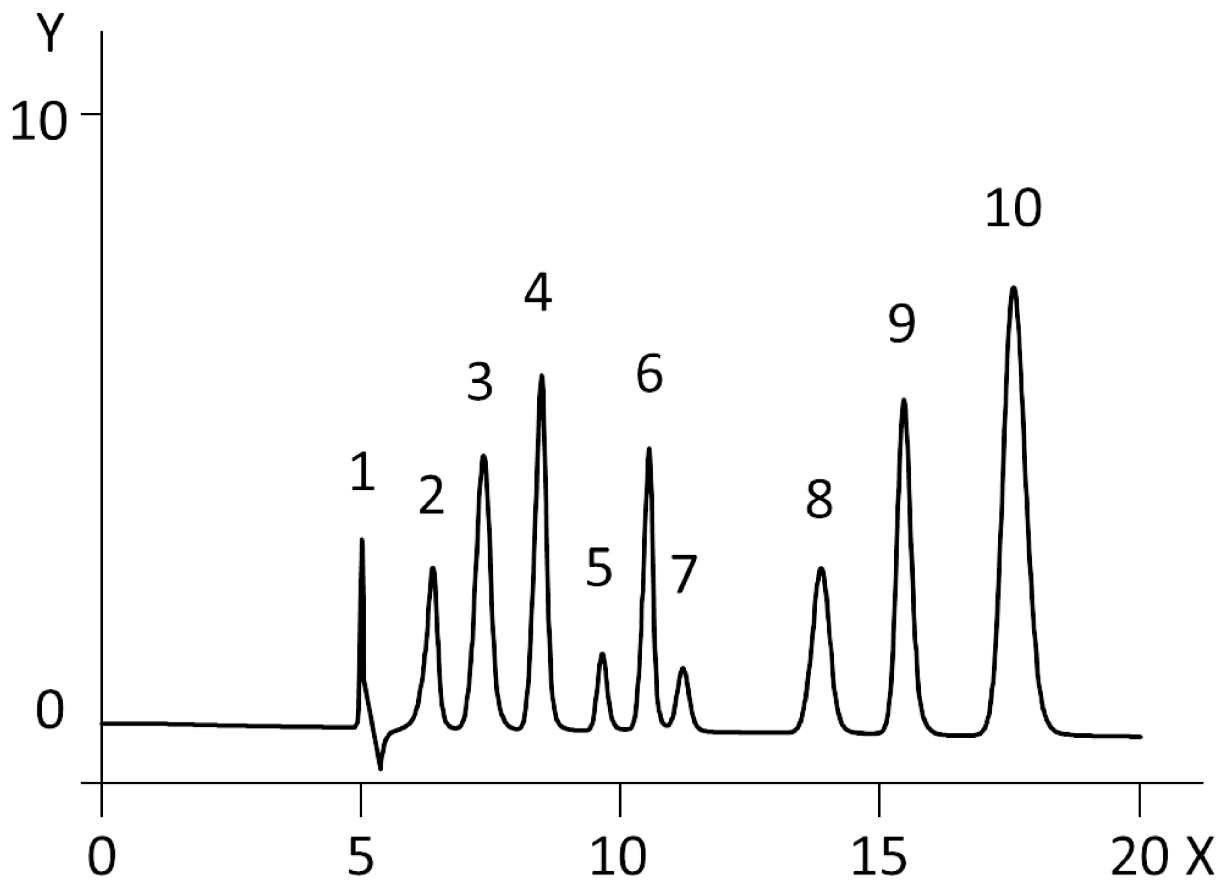
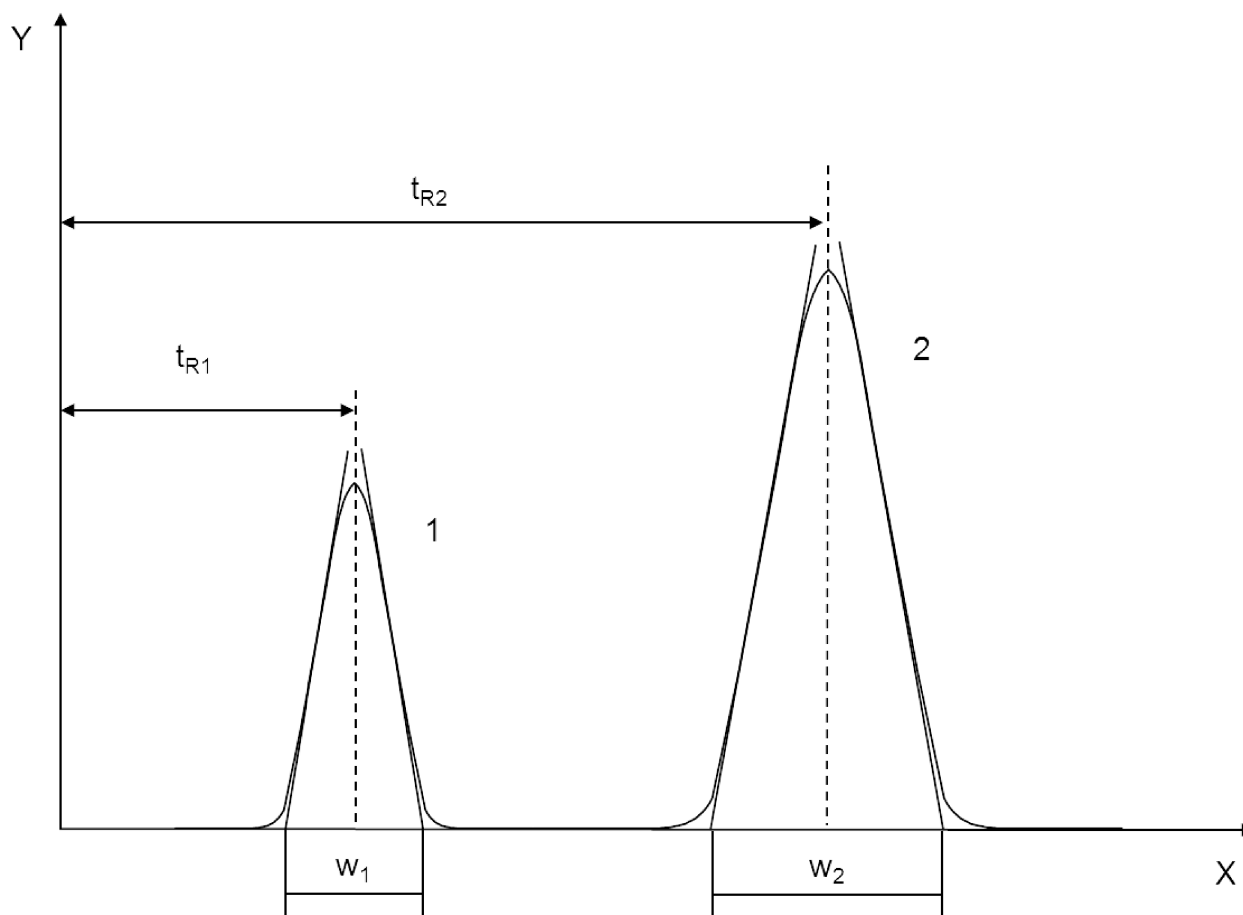


Bild 1 — Beispiel Chromatogramm organischer Säuren mit ausreichender Peak-Auflösung



Legende

X = Retentionszeit t_R (s)

1 = Peak 1

Y = Signal

2 = Peak 2

W = Peak-Breite (s)

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

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

Die Peakauflösung R wird nach Gleichung (2) berechnet.

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

Dabei ist

$R_{2,1}$ die Peakauflösung;

t_{R1} die Retentionszeit des ersten Peaks, in s;

t_{R2} die Retentionszeit des zweiten Peaks, in s;

w_1 die Peakbreite des ersten Peaks auf der Zeitachse, in s;

w_2 die Peakbreite des zweiten Peaks auf der Zeitachse, in s.

ANMERKUNG Meist kann die Chromatographie-Software *R* selbständig berechnen.

Wenn *R* manuell berechnet werden muss, wird nach dem beschriebenen Verfahren vorgegangen: Die Breite an der Basis eines Peaks ist das Segment des Schnittpunkts der Peakbasis mit den Tangenten, die zu den Umkehrpunkten auf beiden Seiten des Peaks gezogen wurden. Alternativ kann die Breite der Peaks auf halber Peak-Höhe nach Gleichung (3) gemessen werden.

$$R_{2,1} = \frac{1,8 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h2} + w_{h1}} \quad (3)$$

Dabei ist

$R_{2,1}$ die Peakauflösung;

t_{R1} die Retentionszeit des ersten Peaks, in s;

t_{R2} die Retentionszeit des zweiten Peaks, in s;

w_{h1} die Peakbreite des ersten Peaks auf der Zeitachse auf halber Peak-Höhe, in s;

w_{h2} die Peakbreite des zweiten Peaks auf der Zeitachse auf halber Peak-Höhe, in s.

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Labor eine Probe erhält, die wirklich repräsentativ ist, und während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Die Probenahme ist nicht Teil des in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 6497 [3] angegeben.

Die Probe wird so gelagert, dass eine Zerstörung und Änderung in ihrer Zusammensetzung verhindert werden.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird nach EN ISO 6498 vorbereitet.

Das Vermahlen (Teilchengröße ≤ 1 mm) muss unter Bedingungen erfolgen, unter denen die Substanz nicht merklich erwärmt wird.

Das gesamte vermahlene Produkt wird in einen Kolben aus z. B. Polypropylen gegeben, der verschlossen und so gelagert werden kann, dass jede Änderung in der Zusammensetzung verhindert wird.

Vor jedem Wägevorgang für die Analyse, muss die gesamte Untersuchungsprobe aus Gründen der Homogenität gründlich durchmischt werden.

9 Durchführung

9.1 Extraktion

9.1.1 Extraktion von Ameisensäure, Milchsäure, Propionsäure, Citronensäure, Essigsäure und Apfelsäure

5,00 g $\pm$ 10 mg der vorbereiteten Probe werden sorgfältig in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Es werden 100,0 ml Wasser hinzugegeben (5.2) und es wird 60 min mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) gemischt.

ANMERKUNG Proben können auch für 30 min in einem Ultraschallbad bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) extrahiert werden.

Es wird gewartet, bis sich die Teilchen abgesetzt haben. Es wird durch ein Faltenfilter (6.7) filtriert, wobei die ersten 3 ml des Filtrats verworfen werden und der Rest aufgefangen wird. Alternativ wird der Probenextrakt für 3 min zentrifugiert (etwa 5 000 $\times g$).

Die filtrierte/zentrifugierte Lösung wird mit Wasser (5.2) bis zu einer Endkonzentration entsprechend dem Arbeitsbereich der Kalibrierung (10 $\mu\text{g/ml}$ bis 100 $\mu\text{g/ml}$) verdünnt. Siehe das nachfolgend aufgeführte Beispiel für eine Verdünnung. Für unterschiedliche Konzentrationsniveaus von organischen Säuren kann mehr als eine Verdünnung vorgenommen werden.

Vor der IC-Analyse wird durch ein 0,45- μm -Membranfilter filtriert (6.8).

9.1.2 Extraktion von Fumarsäure

5,00 g $\pm$ 10 mg der vorbereiteten Probe werden sorgfältig in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Es werden 100,0 ml Wasser hinzugegeben (5.2), der Kolben wird verschlossen, und die gesamte Lösung wird bis auf 60 °C erwärmt und für 60 min mit einem Magnetrührer gemischt.

ANMERKUNG Proben können auch für 30 min in einem Ultraschallbad bei 60 °C extrahiert werden.

Der Kolben sollte verschlossen werden, um die Verdunstung von Extraktionslösung zu vermeiden.

Es wird auf Raumtemperatur abgekühlt und gewartet, bis sich die Teilchen gesetzt haben. Es wird durch ein Faltenfilter (6.7) filtriert, wobei die ersten 3 ml des Filtrats verworfen werden und der Rest aufgefangen wird. Alternativ wird der Probenextrakt für 3 min zentrifugiert (etwa 5 000 $\times g$).

Die filtrierte/zentrifugierte Lösung wird mit Wasser (5.2) bis zu einer Endkonzentration entsprechend dem Arbeitsbereich der Kalibrierung (10 $\mu\text{g/ml}$ bis 100 $\mu\text{g/ml}$) verdünnt. Siehe das nachfolgend aufgeführte Beispiel für eine Verdünnung.

Vor der IC-Analyse wird durch ein 0,45- μm -Membranfilter filtriert (6.8).

9.1.3 Extraktion von beschichteten Säuren

Es werden 5,00 g $\pm$ 10 mg der vorbereiteten Probe sorgfältig in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Es werden 100,0 ml Wasser hinzugegeben (5.2), der Kolben wird verschlossen, und es wird für 30 min in einem Ultraschallbad bei 60 °C extrahiert.

Der Kolben muss verschlossen werden, um die Verdunstung von Extraktionslösung zu vermeiden.

Es wird auf Raumtemperatur abgekühlt und gewartet, bis sich die Teilchen gesetzt haben. Es wird durch ein Faltenfilter (6.7) filtriert, wobei die ersten 3 ml des Filtrats verworfen werden und der Rest aufgefangen wird. Alternativ wird der Probenextrakt für 3 min zentrifugiert (etwa 5 000 $\times g$).

Die filtrierte/zentrifugierte Lösung wird mit Wasser (5.2) bis zu einer Endkonzentration entsprechend dem Arbeitsbereich der Kalibrierung (10 µg/ml bis 100 µg/ml) verdünnt. Siehe das nachfolgend aufgeführte Beispiel für eine Verdünnung.

Vor der IC-Analyse wird durch ein 0,45-µm-Membranfilter filtriert (6.8).

Zum Schutz der IC-Säule kann die Probenlösung durch ein RP-SPE (6.9) gereinigt werden. Es wird nach der Beschreibung des Lieferanten vorgegangen. Die Blindlösung und die Rückgewinnung organischer Säuren müssen überprüft werden.

BEISPIEL Beispiel für eine Verdünnung:

Erwartete Konzentration der Probe: 0,8 % (8 000 µg/g) Ameisensäure.

Gewünschte Endkonzentration: 80 µg/ml.

Probenmasse von 5 g gelöst in 100 ml.

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{5 \text{ g} \times 8\,000 \text{ µg/g}}{100 \text{ ml} \times 80 \text{ µg/ml}} = 5$$

Daher muss die Probenextraktionslösung im Verhältnis 1:5 verdünnt werden, um dem Kalibrierbereich zu entsprechen.

9.2 Kalibrierung

Die folgenden Kalibrierlösungen werden empfohlen:

Die maximale Lagerdauer beträgt 2 Monate bei 4 °C.

Die Kalibrierstandards werden mit Wasser (5.2) nach Tabelle 3 hergestellt. Die exakte Konzentration jeder organischen Säure muss entsprechend der Konzentration der gemischten Standardlösung (5.5) berechnet werden.

Tabelle 2 — Vorbereitung von Kalibrierstandards

Kalibrierstandard	ml Standard- lösung (5.5) in 20 ml	Konzentration ^a organischer Säuren jeweils in der Kalibrierlösung in µg/ml (Arbeitsbereich)
1	2	10
2	5	25
3	10	50
4	15	75
5	20	100

Stufe 1: 2,0 ml der gemischten Standardlösung (5.5) werden in einen 20-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt (5.2).
Stufe 2: 5,0 ml der gemischten Standardlösung (5.5) werden in einen 20-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt (5.2).
Stufe 3: 10,0 ml der gemischten Standardlösung (5.5) werden in einen 20-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt (5.2).
Stufe 4: 15,0 ml der gemischten Standardlösung (5.5) werden in einen 20-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt (5.2).
Stufe 5: 20,0 ml der gemischten Standardlösung (5.5) werden in einen 20-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt (5.2).

^a Die tatsächliche Konzentration muss berechnet werden.

9.3 Messung der Kalibrierstandards und der Probenlösungen

Es hat sich gezeigt, dass die Bedingungen in Anhang A eine angemessene Trennung ergeben haben. Aufgrund der unterschiedlichen Laborausrüstung für die Ionenchromatographie dienen die beschriebenen Spezifikationen nur als Anleitung. Andere Parameter sollten anwendbar sein, wenn sie zu vergleichbaren Ergebnissen führen.

Ein aliquoter Teil der nach 9.2 vorbereiteten Kalibrierstandards 1 bis 5 wird stichprobenweise dreimal in das IC-System (6.11) injiziert, um die Standardkalibrierkurve zu berechnen.

Ein aliquoter Teil der nach 9.1 vorbereiteten Probenextraktionslösung wird injiziert. Wenn die Konzentration des Analyten den Kalibrierbereich überschreitet, wird die Probe nach 9.1 verdünnt, oder es wird eine gesonderte Kalibrierfunktion für einen höheren Arbeitsbereich festgelegt und erneut analysiert.

9.4 Bestätigung der Identität

Die Identität des/der Ziel-Analyten kann durch Co-Chromatographie bestätigt werden.

Es wird ein aufgestockter Probenextrakt vorbereitet, indem eine entsprechende Menge Kalibrierlösung der in Frage stehenden organischen Säure zum Probenextrakt hinzugegeben wird. Die Menge der hinzugegebenen organischen Säure muss etwa der abgeschätzten Menge der entsprechenden organischen Säure entsprechen, die im Probenextrakt nachgewiesen wurde. Der aufgestockte Probenextrakt wird injiziert. Wenn das nachgewiesene Signal im erhaltenen Chromatogramm in (9.3) mit dem Nachweis der organischen Säure verknüpft wurde, sollte sich nur diese Signalintensität erhöhen. Der zugehörige Anstieg der Peakhöhe sollte proportional zum Aufstockungsniveau der organischen Säure sein, und die zugehörige Peakbreite auf halber Höhe sollte um nicht mehr als ± 10 % der ursprünglichen Breite ansteigen.

10 Berechnung und Angabe der Ergebnisse

Im Allgemeinen werden die Kalibrierkurve und die Konzentration der Prüflösung vom Messsystem selbst berechnet. Die Quantifizierung erfolgt auf der Grundlage der Peakflächen, die nach 9.2 durch die Kalibrier-Regressionsgerade (Kalibrierkurve) nach dem Verfahren externer Standards ermittelt wurden. $y = bx + a$

Die Konzentration organischer Säuren in der Probe, angegeben in mg/kg, wird nach Gleichung (4) ermittelt.

$$C_A = \frac{C_{\text{Chr}} \times V_E \times D}{m} \quad (4)$$

Dabei ist

C_A die Konzentration der organischen Säure in der Probe, in mg/kg, bei Angabe von 3 signifikanten Stellen;

C_{Chr} die Konzentration der organischen Säure in der Messlösung, in $\mu\text{g/ml}$;

V_E das Extraktionsvolumen, in ml;

D der Verdünnungsfaktor nach 9.1 (Extraktionsvolumen * Verdünnung);

m die Masse der Probe, in g.

Es sollte insbesondere das kritische Peakpaar bezüglich der Peakauflösung R berücksichtigt werden. Wenn das Verhältnis der Konzentration der Milchsäure zu der von Essigsäure den Faktor 20 überschreitet, ist die Bestimmung der Essigsäure nicht sichergestellt.

Wenn die Säure in Form des entsprechenden Salzes anzugeben ist, sollte Gleichung (5) angewendet werden.

$$C_S = C_A \times \frac{MW_S}{MW_A} \quad (5)$$

$$C_S[\text{mg/kg}] = C_A * \frac{MW_S}{MW_A} [4]$$

Dabei ist

C_S die Konzentration des Salzes der organischen Säure in der Probe, in mg/kg, bei 3 µg/ml;

C_A die Konzentration der organischen Säure in der Probe, in mg/kg;

MW_S die Molekulargewicht des Salzes der organischen Säure;

MW_A die Molekulargewicht der organischen Säure.

11 Präzision

11.1 Ringversuch

Einzelheiten einer Ringversuchsstudie zur Präzision des Verfahrens sind in Tabelle 3 bis Tabelle 9 aufgeführt.

Möglicherweise sind die aus dieser Ringversuchsstudie abgeleiteten Werte für Leistungseigenschaften nicht für andere als die angegebenen Konzentrationsbereiche und/oder Matrices anwendbar.

11.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei voneinander unabhängigen Untersuchungsergebnissen oder das Verhältnis des höheren zum niedrigeren der beiden Untersuchungsergebnisse auf der Normalskala, die/das unter Anwendung desselben Verfahrens an identischem Untersuchungsmaterial im selben Laboratorium durch denselben Bearbeiter mit demselben Gerät innerhalb des kürzesten realisierbaren Zeitabstandes ermittelt wurde, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Wiederholgrenze r überschreiten.

11.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei Einzelprüfergebnissen oder das Verhältnis des höheren zum niedrigeren der beiden Untersuchungsergebnisse auf der Normalskala, die/das unter Anwendung desselben Verfahrens an identischem Untersuchungsmaterial in verschiedenen Laboratorien durch verschiedene Bearbeiter mit verschiedenen Geräten ermittelt wurde, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Vergleichgrenze R überschreiten.

Tabelle 3 — Präzisionsdaten — Ameisensäure

Matrix	Mittelwert (mg/kg)	r^a (mg/kg)	R^b (mg/kg)
Wasser ^c	999	17,1	164
Vormischung	269 745	26 964	71 470
Vormischung	39 935	5 157	9 479
Einzelfuttermittel (Sojamehl)	26 309	2 630	4 269
Ergänzungsfuttermittel (Wiederkäuer)	7 166	187	2 059
Ergänzungsfuttermittel (Geflügel)	16 488	2 429	9 773
Alleinfuttermittel (Kaninchen)	9 194	451	1 522
Alleinfuttermittel (Geflügel)	5 751	163	726
Alleinfuttermittel (Schweine)	5 669	533	1 007
^a Wiederholgrenze. ^b Vergleichsgrenze. ^c mg/l.			

Tabelle 4 — Präzisionsdaten — Milchsäure

Matrix	Mittelwert (mg/kg)	r^a (mg/kg)	R^b (mg/kg)
Wasser ^c	993	19,6	130
Vormischung	55 908	6 473	19 953
Vormischung	28 055	2 761	8 876
Einzelfuttermittel (Sojamehl)	19 078	1 634	2 625
Ergänzungsfuttermittel (Wiederkäuer)	34 537	1 208	10 815
Ergänzungsfuttermittel (Geflügel)	90 601	11 665	27 682
Alleinfuttermittel (Kaninchen)	8 110	421	1 958
Alleinfuttermittel (Geflügel)	2 667	106	610
Alleinfuttermittel (Schweine)	13 485	496	2 834
^a Wiederholgrenze. ^b Vergleichsgrenze. ^c In mg/l.			

Tabelle 5 — Präzisionsdaten — Propionsäure

Matrix	Mittelwert (mg/kg)	r^a (mg/kg)	R^b (mg/kg)
Wasser^c	995	36,7	117
Vormischung	33 115	2 390	14 313
Vormischung	208 263	7 532	35 277
Einzelfuttermittel (Sojamehl)	12 205	1 171	1 821
Ergänzungsfuttermittel (Wiederkäuer)	6 044	410	1 513
Ergänzungsfuttermittel (Geflügel)	4 715	343	1 052
Alleinfuttermittel (Kaninchen)	2 683	162	497
Alleinfuttermittel (Geflügel)	4 971	184	687
Alleinfuttermittel (Schweine)	2 793	201	696
^a Wiederholgrenze. ^b Vergleichsgrenze. ^c In mg/l.			

Tabelle 6 — Präzisionsdaten — Citronensäure

Matrix	Mittelwert (mg/kg)	r^a (mg/kg)	R^b (mg/kg)
Wasser^c	205	10,7	36,9
Vormischung	110 276	33 782	49 260
Vormischung	29 889	2 569	6 327
Einzelfuttermittel (Sojamehl)	33 155	3 046	16 043
Ergänzungsfuttermittel (Wiederkäuer)	6 756	281	975
Ergänzungsfuttermittel (Geflügel)	14 294	2 111	3 517
Alleinfuttermittel (Kaninchen)	8 931	610	1 808
Alleinfuttermittel (Geflügel)	8 397	311	1 435
Alleinfuttermittel (Schweine)	17 711	2 748	5 069
^a Wiederholgrenze. ^b Vergleichsgrenze. ^c In mg/l.			

Tabelle 7 — Präzisionsdaten — Fumarsäure

Matrix	Mittelwert (mg/kg)	r^a (mg/kg)	R^b (mg/kg)
Wasser ^c	191	1,62	18,9
Vormischung	96 098	7 813	9 485
Vormischung	43 823	3 585	7 263
Einzelfuttermittel (Sojamehl)	4 446	484	659
Ergänzungsfuttermittel (Wiederkäuer)	6 228	540	5 215
Ergänzungsfuttermittel (Geflügel)	12 758	1 078	3 621
Alleinfuttermittel (Kaninchen)	952	117	577
Alleinfuttermittel (Geflügel)	7 479	339	1 654
Alleinfuttermittel (Schweine)	2 650	277	550
^a Wiederholgrenze. ^b Vergleichsgrenze. ^c In mg/l.			

Tabelle 8 — Präzisionsdaten — Essigsäure

Matrix	Mittelwert (mg/kg)	r^a (mg/kg)	R^b (mg/kg)
Wasser ^c	316	14,2	48,4
Vormischung	33 726	6 950	12 040
Vormischung	120 575	6 485	20 054
Einzelfuttermittel (Sojamehl)	914	10,3	762
Ergänzungsfuttermittel (Wiederkäuer)	869	130	1 016
Ergänzungsfuttermittel (Geflügel)	4 904	806	2 477
Alleinfuttermittel (Kaninchen)	1 322	29,8	661
Alleinfuttermittel (Geflügel)	829	60,2	162
Alleinfuttermittel (Schweine)	1 476	88,2	88,2
^a Wiederholgrenze. ^b Vergleichsgrenze. ^c In mg/l.			