

DIN EN 17298

ICS 65.120

Einsprüche bis 2018-10-03

Entwurf

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Benzoesäure und Sorbinsäure mittels
Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC-UV);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17298:2018**

Animal feeding stuffs –

Methods of sampling and analysis –

Determination of benzoic and sorbic acid by high pressure liquid chromatography (HPLC-UV);
German and English version prEN 17298:2018**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 38 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17298:2018) 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.

Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Bestimmung von Benzoessäure und Sorbinsäure mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Animal feeding stuffs — Methods of sampling and analysis — Determination of benzoic and sorbic acid by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

ICS:

Deskriptoren

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

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	6
6 Geräte	8
7 Probenahme	8
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	8
9 Durchführung	9
9.1 Extraktion	9
9.2 Kalibrierung	9
9.3 Messung der Kalibrierstandards und der Probenlösungen	10
9.4 Bestätigung der Identität	11
10 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	11
11 Präzision	12
11.1 Ringversuch	12
11.2 Wiederholpräzision	12
11.3 Vergleichpräzision	12
12 Untersuchungsbericht	13
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten — Ergebnisse der Validierungsstudie	14
Anhang B (informativ) Ablaufplan	17
Literaturhinweise	18

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17298:2018) 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 von Benzoesäure und Sorbinsäure in Futtermitteln mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Ultraviolett-Detektion (HPLC-UV, en: high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection) fest.

Das Verfahren ist für die Verwendung zur Bestimmung von Benzoesäure und Sorbinsäure als Wirkstoffe in Futtermittelzusatzstoffen, Vormischungen, Mischfuttermitteln und für Benzoesäure in Wasser vorgesehen. Dieses Verfahren ermittelt die extrahierbare Gesamtkonzentration dieser 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 5 mg/l und 100 mg/l eingehalten wird.

Das Verfahren wurde im Rahmen einer Ringversuchsstudie bei Konzentrationen von 0,02 % bis 9,0 % erfolgreich geprüft.

Auf der Grundlage des zugehörigen Arbeitsbereichs, der Probenmasse und des Extraktionsvolumens können Bestimmungsgrenzen (LOQ) (en: limits of quantification) wie auf der Grundlage einer Wellenlänge von 230 nm berechnet (Tabelle 1) erreichbar sein.

Tabelle 1 — Bestimmungsgrenzen (LOQ) bei 230 nm

Organische Säure	LOQ (mg/kg)
Benzoesäure	200
Sorbinsäure	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)*

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 und 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 einem Gemisch aus Natriumacetatpuffer und Methanol extrahiert. Der Extrakt wird filtriert oder zentrifugiert und erforderlichenfalls verdünnt. Die aus der Probe extrahierte Menge organischer Säuren wird mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) bestimmt, indem eine RP-18-Säule in Verbindung mit Diodenarray-Detektion (DAD, en: diode array detection) oder Ultraviolett-Detektion (UV) angewendet wird. Die Quantifizierung erfolgt durch eine externe Kalibrierung.

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 Wasser, Qualität 2 nach EN ISO 3696:1995.

5.2 Benzoesäure, p. a., Reinheit mindestens 99 %.

5.3 Sorbinsäure, p. a., Reinheit mindestens 99 %.

5.4 Essigsäure, p. a., $\omega = 100$ %.

5.5 Methanol, Gradientenqualität, $\omega \geq 99,8$ %.

5.6 Natriumacetat-Trihydrat, p. a.

5.7 Natriumacetatlösung, $c = 1$ mol/l.

13,6 g Natriumacetat-Trihydrat (5.6) werden mit etwa 80 ml Wasser (5.1) in einem 100-ml-Messkolben aufgelöst, gemischt und bis zur Marke mit Wasser (5.1) aufgefüllt.

Die maximale Lagerdauer beträgt 3 Monate bei Raumtemperatur.

5.8 Essigsäurelösung, $c = 1$ mol/l.

6,00 g Essigsäure (5.4) werden mit etwa 80 ml Wasser (5.1) in einem 100-ml-Messkolben aufgelöst, gemischt und bis zur Marke mit Wasser (5.1) aufgefüllt.

Die maximale Lagerdauer beträgt 3 Monate bei Raumtemperatur.

5.9 Acetatpuffer, $c = 0,1$ mol/l.

Mithilfe einer Pipette werden 50,0 ml Natriumacetatlösung (5.7) und 50,0 ml Essigsäurelösung (5.8) in einen 1 000-ml-Messkolben gegeben, und es werden etwa 700 ml Wasser (5.1) hinzugegeben. Der pH-Wert wird mit Essigsäurelösung (5.8) auf 4,6 eingestellt. Es wird bis zur Marke mit Wasser (5.1) aufgefüllt.

Die maximale Lagerdauer beträgt 6 Monate bei Raumtemperatur.

ANMERKUNG Hinsichtlich der genannten Bedingungen ist ein pH-Wert von 4,6 der beste Bereich für eine optimale HPLC-Trennung.

5.10 Mobile Phase der HPLC

Acetatpuffer (5.9) und Methanol (5.5) werden im Verhältnis von 75 : 25 (Volumenanteil) in einem Messzylinder gemischt. Für die HPLC-Anwendung wird filtriert.

Die maximale Lagerdauer beträgt 6 Monate bei Raumtemperatur.

5.11 Extraktionslösung

Acetatpuffer (5.9) und Methanol (5.5) werden im Verhältnis von 60 : 40 (Volumenanteil) in einem Messzylinder gemischt.

Die maximale Lagerdauer beträgt 6 Monate bei Raumtemperatur.

5.12 Standard-Stammlösung, etwa 500 mg/l.

125 mg Benzoesäure (5.2) und 125 mg Sorbinsäure (5.3) werden in denselben 250-ml-Messkolben eingewogen. Der Inhalt wird mit etwa 150 ml Extraktionslösung (5.11) aufgelöst, 5 min in einem Ultraschallbad aufgelöst und es wird bis zur Marke mit Extraktionslösung (5.11) aufgefüllt.

Die maximale Lagerdauer beträgt 2 Monate bei 4 °C.

ANMERKUNG 1 Die Lagerfähigkeit der Stammlösung ist aufgrund von Veresterungsreaktionen begrenzt.

ANMERKUNG 2 Sofern verfügbar können Einzelsäuren-Standardlösungen mit angemessenen und geforderten Spezifikationen verwendet werden.

BEISPIEL Beispiel für eine Verdünnung:

Die tatsächliche Konzentration der Stammlösung wird mittels des vom Lieferanten angegebenen Reinheitsgrades des Referenzstandards nach Gleichung (1) 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, geteilt durch 100, in %;

ANMERKUNG Beispielsweise 0,98.

m die eingewogene Masse der organischen Säure, in mg;

V das Volumen des Messkolbens, in ml.

6 Geräte

Übliche Laboreinrichtung und insbesondere Folgendes:

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

6.2 Analysenwaage, die geeignet ist, mit einer Fehlergrenze von 0,1 mg zu wägen.

6.3 Ultraschallbad.

6.4 pH-Messgerät, das auf mindestens eine Dezimalstelle abgelesen werden kann.

6.5 Pipetten (elektronisch oder manuell) im Bereich von 100 µl bis 5 000 µl.

6.6 Zentrifuge, etwa $5\,000 \times g$.

6.7 Membranfilter, für die HPLC-Anwendung.

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

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

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

6.9 HPLC-System (Pumpe, Probengeber, Säulenofen) mit DAD-/UV-Detektor.

6.10 HPLC-Säule, RP-18-Säule, z. B. Nucleosil 120 C18, 5 µm, 250 mm × 4,0 mm.

6.11 Vorsäule (optional).

Die Verwendung einer Vorsäule wird zum Schutz der analytischen HPLC-Säule empfohlen.

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 Europäischen Norm festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 6497 [3] angegeben.

Die Probe wird so gelagert, dass eine Zerstörung und Änderung 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 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

5,00 g ± 10 mg der vorbereiteten Probe werden sorgfältig in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Es werden 100 ml Extraktionslösung (5.11) hinzugegeben, es wird gut gemischt und die Probe wird für 30 min in einem Ultraschallbad (6.3) aufgelöst.

ANMERKUNG 1 Wegen der Verdunstung von Extraktionslösung wird eine Temperatur über 50 °C vermieden.

ANMERKUNG 2 Bei hochkonzentrierten homogenen Proben (Vormischungen) kann die Probenmasse wegen der begrenzten Löslichkeit von Sorbinsäure verringert werden.

Es wird gewartet, bis sich die Teilchen abgesetzt haben. Es wird durch ein Faltenfilter (6.8) 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 × g).

Die filtrierte/zentrifugierte Lösung wird mit Extraktionslösung (5.11) bis zu einer Endkonzentration entsprechend dem Arbeitsbereich der Kalibrierung (5 µg/ml bis 100 µg/ml) verdünnt – siehe das nachfolgend aufgeführte Beispiel für eine Verdünnung.

Vor der HPLC-Analyse wird durch ein 0,45-µm-Membranfilter (6.7) filtriert, wobei die ersten Tropfen des Filtrats verworfen werden und der Rest aufgefangen wird.

BEISPIEL Beispiel für eine Verdünnung:

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

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 Extraktionslösung (5.11) nach Tabelle 2 hergestellt.

Tabelle 2 — Herstellung von Kalibrierstandards

Kalibrierstandard	ml Standardlösung (5.12) in 100 ml	Konzentration ^a der Benzoesäure oder Sorbinsäure jeweils in der Kalibrierlösung in µg/ml (Arbeitsbereich)
1	1	5 ^a
2	4	20 ^a
3	10	50 ^a
4	15	75 ^a
5	20	100 ^a
Stufe 1: 1,0 ml Standard-Stammlösung (5.12) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Extraktionslösung aufgefüllt (5.11). Stufe 2: 4,0 ml Standard-Stammlösung (5.12) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Extraktionslösung aufgefüllt (5.11). Stufe 3: 10,0 ml Standard-Stammlösung (5.12) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Extraktionslösung aufgefüllt (5.11). Stufe 4: 15,0 ml Standard-Stammlösung (5.12) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Extraktionslösung aufgefüllt (5.11). Stufe 5: 20,0 ml Standard-Stammlösung (5.12) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert, und es wird bis zur Marke mit Extraktionslösung aufgefüllt (5.11).		
^a Die tatsächliche Konzentration muss berechnet werden.		

9.3 Messung der Kalibrierstandards und der Probenlösungen

Es hat sich gezeigt, dass die folgenden Bedingungen eine angemessene Trennung ergeben haben. Aufgrund der unterschiedlichen Laborausrüstungen für die Flüssigchromatographie dienen die beschriebenen Spezifikationen nur als Anleitung. Andere Parameter sollten anwendbar sein, wenn sie zu vergleichbaren Ergebnissen führen:

Säule	Nucleosil 120 C18, 5 µm, 250 mm × 4,0 mm
Vorsäule	Umkehrphasen- (RP)-Vorsäulenkartusche, z. B. Nucleosil 300-5 C8
Mobile Phase der HPLC	Acetatpuffer/Methanol (75 : 25) (5.10)
Temperatur	40 °C
Durchflussrate	0,7 ml/min
Injektionsvolumen	5 µl
Detektion	DAD/UV
Wellenlänge	230 nm

ANMERKUNG Alternativ kann Sorbinsäure zusätzlich bei 254 nm detektiert werden, da dies die ideale Wellenlänge für diese Substanz ist.