

DIN EN 17547

ICS 65.120

Einsprüche bis 2020-10-07

Entwurf

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung des Gehalts an Vitamin A, E und D – Verfahren mittels
Reinigung durch Festphasenextraktion und
Hochleistungs-Flüssigchromatographie;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17547:2020**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of vitamin A, E and D content –
Method using solid phase extraction clean-up and High Performance Liquid Chromatography;
German and English version prEN 17547:2020

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-08-07 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 oder Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 83 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17547:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel – Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale 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.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

<i>Titel de:</i>	Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Bestimmung des Gehalts an Vitamin A, E und D — Verfahren mittels Reinigung durch Festphasenextraktion und Hochleistungs-Flüssigchromatographie
<i>Titel en:</i>	Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis — Determination of vitamin A, E and D content — Method using solid phase extraction clean-up and High Performance Liquid Chromatography
<i>Titel fr:</i>	

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien und Materialien	9
6 Geräte	10
7 Probenahme	11
8 Probenvorbereitung	11
9 Durchführung	12
9.1 Allgemeines	12
9.2 Herstellung und Standardisierung der Standardlösungen	12
9.2.1 Vitamin A (Retinol)	12
9.2.2 Vitamin E (α -Tocopherol)	13
9.2.3 Vitamin D	14
9.3 Kalibrierung	16
9.3.1 Allgemeines	16
9.3.2 Kalibrierlösungen und Kalibrierkurve für Vitamin A (Retinol) und E (α -Tocopherol)	16
9.3.3 Kalibrierlösungen und Kalibrierkurve für Vitamin D ₂ und D ₃	17
9.4 Probenanalyse	18
9.4.1 Vorbereitung der Untersuchungsproben	18
9.4.2 Verseifung	19
9.5 Extraktion von Vitamin A (Retinol), Vitamin E (α -Tocopherol) und Vitamin D ₃ (Cholecalciferol) mittels SPE	19
9.6 Herstellung der Prüflösung für die HPLC-Trennung	20
9.6.1 Vitamin A (Retinol) und Vitamin E (α -Tocopherol)	20
9.6.2 Vitamin D ₃ (Cholecalciferol)	20
9.7 Semipräparative HPLC-Reinigung zur Bestimmung von Vitamin D ₃	20
9.7.1 Bestimmung des Retentionszeitfensters für die Vitamin-D ₂ /D ₃ -Fraktion	20
9.7.2 Bedingungen für die semipräparative HPLC-Reinigung	21
9.7.3 Sammeln der Vitamin-D-Fraktion	21
9.8 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	21
9.8.1 Bedingungen für die analytische HPLC	21
9.8.2 Bestimmung	22
10 Auswertung	22
10.1 Ergebnisberechnung für Vitamin A (Retinol)	22
10.2 Ergebnisberechnung für Vitamin E (α -Tocopherol)	23
10.3 Ergebnisberechnung für Vitamin D ₃ (Cholecalciferol)	24
10.4 Wiederfindungsrate für Vitamin D	25
11 Bemerkungen	26
12 Präzision	26

12.1	Ringversuch.....	26
12.2	Wiederholpräzision.....	27
12.3	Vergleichpräzision.....	27
13	Untersuchungsbericht.....	28
Anhang A (informativ) Beispiele für Kombinationen von Einwaagemenge, Aliquotierung und Verdünnung zum Erhalt von Konzentrationen im Bereich der Kalibrierkurve		29
Anhang B (informativ) Herstellung der Standard-Stammlösung von Vitamin E (α -Tocopherol) aus α -Tocopherolacetat		32
B.1	Allgemeines	32
B.2	Reagenzien.....	32
B.3	Herstellung der Standard-Stammlösung	32
B.4	Standardisierung der Standard-Stammlösung von Vitamin E (α -Tocopherol) in Cyclohexan	32
B.5	Kalibrierlösungen und Kalibrierkurve für Vitamin A (Retinol) und E (α -Tocopherol).....	33
Anhang C (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs		34
Literaturhinweise.....		40

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17547:2020) 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 Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

Einleitung

WARNUNG — Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren beinhaltet die Verwendung von Reagenzien, die eine Gefahr für die Gesundheit darstellen. Die Norm erhebt nicht den Anspruch, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, vor der Anwendung dieser Norm geeignete Maßnahmen für den Gesundheitsschutz und die Sicherheit des Personals zu ergreifen und sicherzustellen, dass behördliche und gesetzliche Anforderungen eingehalten werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts an Vitamin A (Retinol), Vitamin E (α -Tocopherol) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol) in Futtermitteln mittels Reinigung durch Festphasenextraktion (SPE; en: solid phase extraction) und Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC, en: high performance liquid chromatography) fest.

ANMERKUNG 1 Das Verfahren ermöglicht auch die Bestimmung von Vitamin D₂, jedoch unter Verwendung eines anderen internen Standards. Das Verfahren ist nur für Vitamin D₃ vollständig validiert.

Das Verfahren wurde in einem Ringversuch für Alleinfuttermittel für Hähnchen, Schweine und Puten, für Vormischungen für Hähnchen und für Ferkel, für Ergänzungsfuttermittel für Kühe sowie für mineralische Futtermittel innerhalb folgender Bereiche erfolgreich geprüft:

- Vitamin A: 4 365 IE/kg – 4 118 352 IE/kg;
- Vitamin E: 22 mg/kg – 13 800 mg/kg
- Vitamin D₃: 1 668 IE/kg – 1 638 150 IE/kg.

Üblicherweise sollten Bestimmungsgrenzen von 1 100 IE für Vitamin A/kg (mittels UV-Detektion), 4 mg für Vitamin E/kg (mittels UV-Detektion), 2 mg für Vitamin E/kg (mittels Fluoreszenzdetektion) und 2 000 IE für Vitamin D/kg (mittels UV-Detektion) erreicht werden.

ANMERKUNG 2 Die Bestimmungsgrenzen sind Mindestgrenzen, die nicht im Rahmen der Validierungsstudie bestimmt wurden. Niedrigere Bestimmungsgrenzen sind möglich, müssen jedoch vom Anwender validiert werden.

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:

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

3.1

Vitamin-A-Gehalt (Retinolgehalt)

Gehalt an all-trans-Retinol und dessen cis-Isomeren, der in Übereinstimmung mit dieser Norm bestimmt wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Vitamin-A-Gehalt (Retinolgehalt) wird in Internationalen Einheiten je Kilogramm (IE/kg) angegeben.

Anmerkung 2 zum Begriff: 1 IE Vitamin A (Retinol) entspricht 0,300 µg all-trans-Retinol oder 0,344 µg all-trans-Retinylnacetat oder 0,546 µg all-trans-Retinylnpalmitat oder 0,359 µg all-trans-Retinylnpropionat.

3.2

Vitamin-E-Gehalt (α-Tocopherolgehalt)

Gehalt an α-Tocopherol, der in Übereinstimmung mit dieser Norm bestimmt wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt an Vitamin E (α-Tocopherol) könnte auch als mg α-Tocopherolacetat je kg ausgedrückt werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: 1 mg Vitamin E (α-Tocopherolacetat) entspricht 0,91 mg Vitamin E (α-Tocopherol).

Anmerkung 3 zum Begriff: In den Proben können auch β-, γ-, δ-Tocopherol und α-, β-, γ-, δ-Tocotrienol vorhanden sein. Dieses Verfahren nutzt die Umkehrphasentrennung, welche die verschiedenen Formen von Tocopherol nicht voneinander trennt. Daher umfasst der als α-Tocopherol oder α-Tocopherolacetat ausgedrückte Vitamin-E-Gehalt alle Formen, ohne die Unterschiede der Vitaminaktivitäten und die entsprechenden Anteile der verschiedenen Formen zu berücksichtigen. Mit einer Normalphasensäule ist die Trennung von α-, β-, γ- und δ-Tocopherolen möglich (siehe Bemerkung 11.6).

3.3

Vitamin-D₃-Gehalt (Cholecalciferolgehalt)

Gehalt an Cholecalciferol, der in Übereinstimmung mit dieser Norm bestimmt wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt an Vitamin D₃ wird in Internationalen Einheiten je Kilogramm (IE/kg) angegeben. 1 IE entspricht einer Aktivität von 0,025 µg Vitamin D₃ (Cholecalciferol).

Anmerkung 2 zum Begriff: Für Futtermittel ist gemäß Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 [1] nur Vitamin D₃ als Futtermittel-Zusatzstoff zugelassen. Der Zusatz von Vitamin D₂ ist nicht erlaubt. Daher kann Vitamin D₂ als interner Standard verwendet werden.

Anmerkung 3 zum Begriff: Für eine genaue Berechnung der Ergebnisse ist es wichtig, dass die Probe kein anderes Vitamin D₂ außer dem als internen Standard hinzugefügten Vitamin D₂ enthält.

4 Kurzbeschreibung

Die Probe wird mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung verseift. Wenn Vitamin D₃ (Cholecalciferol) zu bestimmen ist, wird der interne Standard vor der Verseifung hinzugefügt. Die Vitamine werden mittels einer SPE-Säule und Elution mit Cyclohexan extrahiert und gereinigt. Das Cyclohexan wird durch Verdampfung entfernt und der Rückstand wird in Methanol (bei der Bestimmung von Vitamin A (Retinol) und Vitamin E (α-Tocopherol)) oder in *n*-Hexan (bei der Bestimmung von Vitamin D₃ (Cholecalciferol)) gelöst.

Die Konzentrationen von Vitamin A (Retinol) und Vitamin E (α-Tocopherol) im methanolischen Extrakt werden mittels Umkehrphasen-Flüssigchromatographie unter Verwendung einer externen Kalibrierung und unter HPLC-Bedingungen, die einen einzigen Peak für alle Retinol-Isomere sowie für alle Tocopherole ergeben, bestimmt.

Das *n*-Hexan-Extrakt für die Bestimmung von Vitamin D₃ wird mittels semipräparativer Normalphasen-HPLC auf Kieselgel gereinigt. Das gereinigte Extrakt wird mittels Umkehrphasen-HPLC unter Bedingungen, die eine Basislinientrennung zwischen Vitamin D₂ und Vitamin D₃ ergeben, getrennt. Die Quantifizierung des Vitamin D₃ erfolgt durch externe Standardkalibrierung unter Berücksichtigung der Wiederfindungsrate des internen Standards.

ANMERKUNG Bild 1 stellt die Bestimmung der Vitamine A, D und E in einem Flussdiagramm dar.

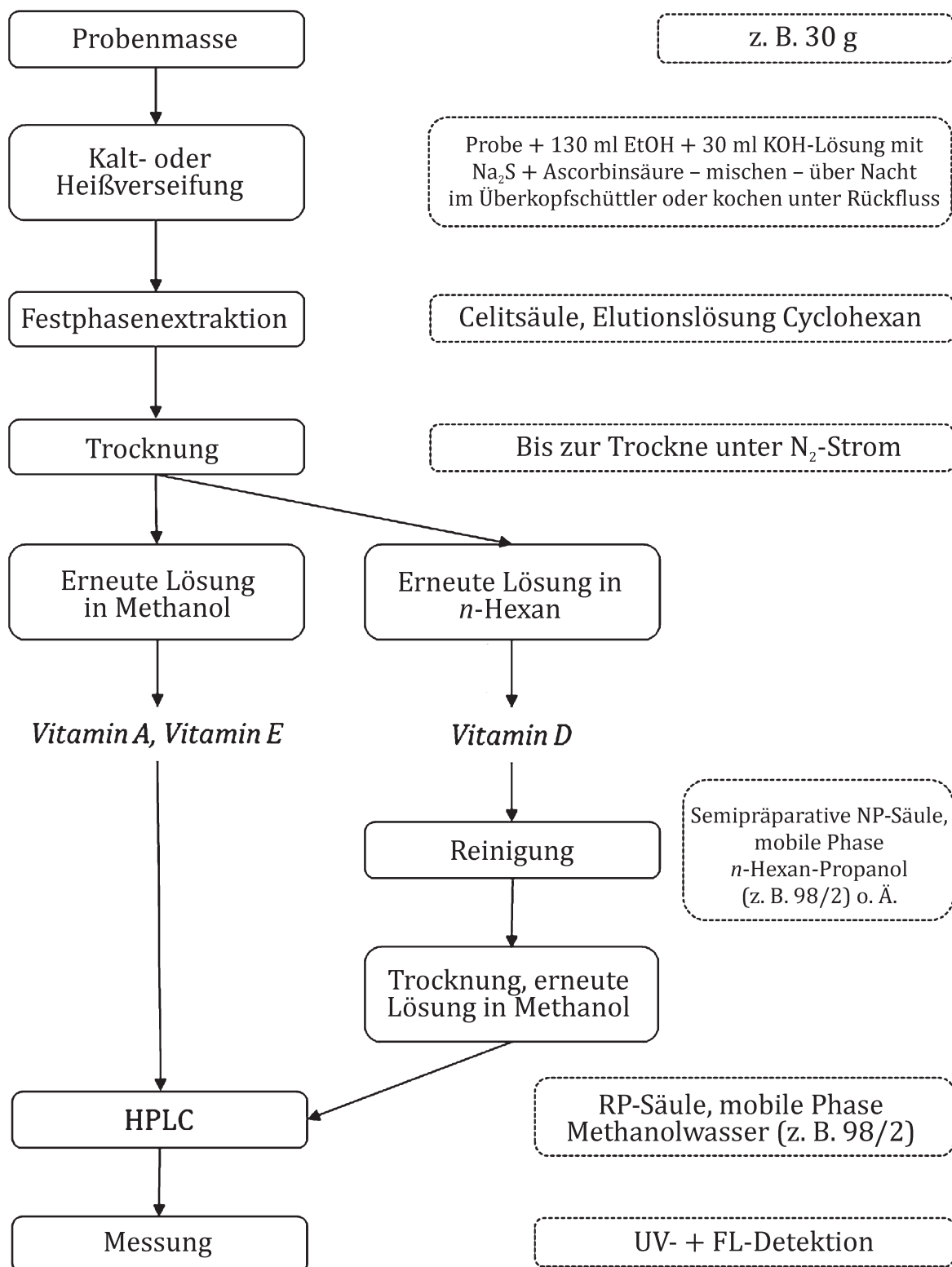


Bild 1 — Flussdiagramm für die Bestimmung der Vitamine A, D und E

5 Reagenzien und Materialien

Es werden ausschließlich Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit verwendet.

5.1 Wasser, mindestens Reinheitsgrad 3 nach EN ISO 3696:1995.

5.2 Kaliumhydroxid (KOH), $w \cong 85\%$.

5.3 Ethanol (C_2H_5OH), $w = 95\%$ (Volumenanteil), oder ein gleichwertiger industrieller Brennspritus (mit Methanol oder Hexan vergälltes Ethanol).

5.4 Ascorbinsäure ($C_6H_8O_6$).

5.5 Ascorbinsäure, Lösung, $\rho = 200\text{ g/l}$.

5.6 Natriumsulfid ($Na_2S \times 9 H_2O$).

5.7 Natriumsulfid, alkalische Lösung (siehe 11.1 Bemerkungen).

2 000 g Kaliumhydroxid (5.2) werden in 1 200 ml Wasser (5.1) gelöst. 224 g Natriumsulfid (5.6) werden in einem Ultraschallbad in 800 ml Wasser (5.1) gelöst. Beide Lösungen werden miteinander vermischt.

ANMERKUNG Das Lösen von KOH ist ein langsamer Vorgang. Es ist notwendig, die Lösung so lange zu mischen, bis sich so viel KOH wie möglich aufgelöst hat. Nachdem die Natriumsulfidlösung hinzugefügt wurde, löst sich der Rest des KOH.

5.8 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), (siehe 11.2 Bemerkungen).

5.9 Inertgas, z. B. Stickstoff.

5.10 Methanol (CH_3OH), HPLC-Qualität.

5.11 Ethanol (CH_3CH_2OH), HPLC-Qualität.

5.12 Cyclohexan (C_6H_{12}), HPLC-Qualität.

5.13 2-Propanol (C_3H_7OH), HPLC-Qualität.

5.14 n-Hexan (C_6H_{14}), HPLC-Qualität.

5.15 Mobile Phase für die semipräparative HPLC-Reinigung von Vitamin D₃.

Mischung von *n*-Hexan (5.14) und Propanol (5.13) im Verhältnis von bspw. 98 + 2 (Volumenanteil). Das Mischverhältnis muss an die verwendete HPLC-Säule angepasst werden. Gegebenenfalls wird durch einen Membranfilter gefiltert (6.8).

5.16 Mobile Phase für die analytische HPLC.

Methanol (5.10) und Wasser (5.1) werden im Verhältnis 980 + 20 (Volumenanteil) gemischt. Das genaue Mischverhältnis hängt von den Eigenschaften der verwendeten Säule ab. Die Verwendung von anders zusammengesetzten mobilen Phasen ist unter der Voraussetzung erlaubt, dass die Trennung von Vitaminen in Übereinstimmung mit dem Anwendungsbereich dieser Norm möglich ist. Gegebenenfalls wird durch einen Membranfilter gefiltert (6.8).

5.17 Vitamin-A-Standardsubstanzen.

5.17.1 All-trans-Retinylacetat ($C_{22}H_{32}O_2$), CAS = 127-47-9, MW = 328,49 g/mol, extra rein, mit zertifizierter Aktivität, z. B. $2,80 \times 10^6$ IE/g.

5.17.2 All-trans-Retinylpalmitat ($C_{36}H_{60}O_2$), CAS = 79-81-2, MW = 524,86 g/mol, extra rein, mit zertifizierter Aktivität, z. B. $1,80 \times 10^6$ IE/g.

5.18 Vitamin-E-Standardsubstanz.

5.18.1 DL- α -Tocopherol ($C_{29}H_{50}O_2$), CAS = 10191-41-0, MW = 430,72 g/mol, extra rein, mit zertifizierter Reinheit.

5.19 Vitamin-D-Standardsubstanzen.

5.19.1 Vitamin D₂ (Ergocalciferol; $C_{27}H_{44}O$), CAS = 50-14-6, MW = 384,62 g/mol, extra rein, mit zertifizierter Aktivität, z. B. 40×10^6 IE/g.

5.19.2 Vitamin D₃ (Cholecalciferol; $C_{27}H_{44}O$), CAS = 67-97-0; MW = 384,62 g/mol, extra rein, mit zertifizierter Aktivität, z. B. 40×10^6 IE/g.

5.20 Celit für die SPE-Säule.

Basismaterial grobkörnige Kieselgur (auch als Diatomeenerde, Hydromatrix oder Celit bekannt); Teilchengröße: max. 10 % < 100 μ m, max. 90 % < 500 μ m, max. 5 % > 800 μ m; große Porenweite, hohes Porenvolumen, konstant hohe Chargenqualität.

6 Geräte

Übliche Laborausrüstung und insbesondere die folgenden Geräte:

6.1 Siedendes Wasserbad mit Magnetrührer oder elektrisches Heizgerät mit Rührfunktion (für die Heißverseifung).

6.2 Überkopfschüttler mit Drehbewegung (für die Kaltverseifung).

6.3 Braunglasgeräte (siehe Bemerkung 11.3).

6.3.1 Steh- oder Erlenmeyerkolben, 250 ml und 500 ml, mit Schliffhülse.

6.3.2 Allihnkühler, Mantellänge 300 mm, mit Schliffverbindung, mit Adapter für Gaseinleitung.

6.3.3 Messkolben mit Schliffstopfen, enghalsig, 20 ml, 25 ml, 50 ml und 100 ml.

6.3.4 Spitzkolben mit Schliffstopfen, 100 ml.

6.4 Fläschchen, für Probenverdichter geeignet.

6.5 Säule für SPE, mit Celit gefüllt (z. B. Chromabond XTR, 70 ml Volumen), die die Wasserphase aus der Verseifungslösung (9.4.2) adsorbieren und die Vitamine A, E und D durch Elution mit organischen Lösemitteln vollständig freisetzen kann. Die Säule muss eine Kapazität von nicht weniger als 20 ml wässriger Lösung aufweisen und die Auslauföffnung muss mit einem Ventil verschlossen werden können.

6.6 Vakuumrotationsverdampfer, mit auf 40 °C eingestelltem Wasserbad.

6.7 Stickstoffprobenverdichter, auf 50 °C erhitzbar.

6.8 Membranfilter, methanolverträglich, 0,45 µm Porengröße; z. B. Chromafil PET - 45/15 MS, oder ein geeigneter Filter mit kleinerer Porengröße.

6.9 HPLC-System, semipräparativ, für die Reinigung von Vitamin D, bestehend aus:

6.9.1 HPLC-Pumpe, auf eine konstante Fließrate des Elutionsmittels von bspw. 2,5 ml/min eingestellt.

6.9.2 HPLC-Injektionsvorrichtung, Injektionsvolumen von 500 µl.

6.9.3 Semipräparative Normalphasen-HPLC-Säule mit Vorsäule (siehe 9.7.2).

6.9.4 Säulenofen, auf eine konstante Säulentemperatur eingestellt.

6.9.5 UV-Detektor

6.10 HPLC-System zur analytischen Trennung, bestehend aus:

6.10.1 HPLC-Pumpe, auf eine konstante Fließrate des Elutionsmittels von bspw. 1 ml/min eingestellt.

6.10.2 HPLC-Injektionsvorrichtungen, Injektionsvolumen von 20 µl und 100 µl.

6.10.3 HPLC-Umkehrphasensäule, mit Vorsäule (siehe 9.8.1).

6.10.4 Säulenofen, auf eine konstante Säulentemperatur eingestellt.

6.10.5 Detektoren zur UV- und Fluoreszenzdetektion.

6.10.6 Datenintegrator/Datenverarbeitungssystem.

6.11 UV- (oder UV-VIS-) Spektralphotometer, zur Messung der Absorption bei den in 9.2.1.3, 9.2.2.3 und 9.2.3.5 definierten Wellenlängen, mit Zellen von 10 mm Schichtdicke ausgestattet.

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 Teil des in dieser Europäischen Norm festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren findet sich in EN ISO 6497 [2].

Die Probe ist so zu lagern, dass Verderb und Veränderungen in ihrer Zusammensetzung verhindert werden.

8 Probenvorbereitung

Die Proben werden am Tag der Analyse, sowie im Leitfaden zur Probenvorbereitung in EN ISO 6498 empfohlen, gemahlen.

Eine Portion der gut durchmischten, trockenen Laborprobe wird so gemahlen, dass sie durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm passt. Ein Erwärmen der Probe ist zu vermeiden.

Wenn die Teilchengrößenverteilung hinreichend ist (z. B. bei Vormischungen und Konzentraten), wird/werden die Probe(n) nicht gemahlen.

Halbfeuchtes Heimtierfutter (Dosenfutter für Heimtiere) kann durch Hacken homogenisiert werden.

Proben können auch am Tag vor der Analyse gemahlen werden. In diesem Fall muss durch die Lagerbedingungen eine Schädigung verhindert werden; z. B. durch Einfrieren der gemahlenen Probe und Auftauen im Kühlschrank am Abend vor der Analyse.

9 Durchführung

9.1 Allgemeines

Aufgrund der UV- und Luftempfindlichkeit von Vitamin A, E und D werden alle Arbeitsgänge unter Ausschluss natürlichen und stark fluoreszierenden Lichts und so schnell, wie es mit einer exakten Arbeitsweise vereinbar ist, durchgeführt. Wenn möglich, sind Braunglasgeräte (6.3) zu verwenden (siehe Bemerkung 11.3).

9.2 Herstellung und Standardisierung der Standardlösungen

9.2.1 Vitamin A (Retinol)

9.2.1.1 Allgemeines

Zur Herstellung der Vitamin-A- (Retinol-) Standardlösung wird all-trans-Retinylacetat (5.17.1) oder all-trans-Retinylpalmitat (5.17.2) verwendet.

ANMERKUNG Die Standardsubstanz von Retinol selbst ist weniger stabil als Retinylpalmitat oder Retinylacetat. Zur Herstellung einer Vitamin-A-Standardlösung werden daher üblicherweise diese Ester verwendet. Die Verwendung der Retinol-Standardsubstanz ist jedoch auch möglich.

9.2.1.2 Standard-Stammlösung von Vitamin A (Retinol)

Eine Menge von Vitamin A (Retinylacetat) (5.17.1) oder Vitamin A (Retinylpalmitat) (5.17.2), die ungefähr 100 000 IE Vitamin A (Retinol) enthält, wird auf 0,1 mg in einen 250-ml-Steh- oder Erlenmeyerkolben (6.3.1) eingewogen und es wird eine Verseifung nach 9.4.2.1 oder 9.4.2.2 und eine Extraktion nach 9.5 durchgeführt.

Das Eluat wird aus der SPE-Säule (6.5) in einen 100-ml-Messkolben (6.3.3) gegeben und dieser wird bis zur Markierung mit Cyclohexan (5.12) aufgefüllt.

Die nominale Konzentration der Standard-Stammlösung von Vitamin A (Retinol) in Cyclohexan beträgt ungefähr 75 IE je ml.

Der exakte Gehalt muss ausgehend von der nach 9.2.1.3 bestimmten exakten Konzentration der Standard-Arbeitslösung von Vitamin A (Retinol) (9.2.1.2) berechnet werden.

Die Standard-Stammlösung von Vitamin A (Retinol) bleibt im Dunklen bei 4 °C 6 Monate lang stabil und kann in diesem Zeitraum zur Herstellung einer Standard-Arbeitslösung nach 9.2.1.2 verwendet werden.

9.2.1.3 Standard-Arbeitslösung von Retinol

10,0 ml der Standard-Stammlösung von Vitamin A (Retinol) (9.2.1.2) werden mit der Pipette in einen 100-ml-Messkolben gegeben und bis zur Markierung mit Cyclohexan (5.12) aufgefüllt.

Die nominale Konzentration der Standard-Arbeitslösung beträgt ungefähr 7,5 IE Vitamin A (Retinol) je ml.

Der exakte Gehalt an Vitamin A (Retinol) in der Standard-Arbeitslösung muss nach 9.2.1.3 bestimmt werden.

Die Standard-Arbeitslösung von Vitamin A (Retinol) bleibt im Dunklen bei 4 °C mindestens 2 Monate lang stabil, jedoch muss die tatsächliche Konzentration vor der Verwendung überprüft werden.

9.2.1.4 Standardisierung der Standard-Arbeitslösung von Vitamin A (Retinol) (9.2.1.2)

Der exakte Gehalt an Vitamin A (Retinol) in der Standard-Arbeitslösung (9.2.1.2) wird mittels spektrometrischer Messung bestimmt. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen Cyclohexan (5.12) im Spektralphotometer (6.11) beim Absorptionsmaximum zwischen 325 nm und 327 nm gemessen.

Der Gehalt an Vitamin A (Retinol) kann mit Gleichung (1) berechnet werden.

$$C_A = \frac{33\,333 \cdot A_{\text{wSTD}}}{A_{325}} = \frac{33\,333 \cdot A_{\text{wSTD}}}{1\,735} = 19,212 \cdot A_{\text{wSTD}} \quad (1)$$

Dabei ist

- C_A der Gehalt an Vitamin A (Retinol), in IE/ml;
- 33 333 die Konzentration von Retinol in einer 1%igen Lösung, in IE/ml;
- A_{wSTD} die Absorption der Standard-Arbeitslösung (9.2.1.3);
- A_{325} der Absorptionskoeffizient von Retinol in Cyclohexan bei 325 nm.

ANMERKUNG Der Absorptionskoeffizient von Vitamin A (Retinol) in Cyclohexan $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ bei 325 nm beträgt 1 735, d. h. 33 333 IE/ml ergeben eine Absorption von 1 734, also ergeben 7,5 IE/ml eine Absorption von 0,3904.

9.2.2 Vitamin E (α-Tocopherol)

9.2.2.1 Allgemeines

Zur Herstellung der Standardlösungen von Vitamin E (α-Tocopherol) wird DL-α-Tocopherol (5.18.1) verwendet.

ANMERKUNG Es ist auch möglich, DL-α-Tocopherolacetat als Standard zu verwenden, siehe Anhang B. Die Herstellung mit DL-α-Tocopherol ist vorzuziehen, da in diesem Fall keine Hydrolyse durchgeführt werden muss.

9.2.2.2 Standard-Stammlösung von Vitamin E (α-Tocopherol)

50 mg Vitamin E (DL-α-Tocopherol) (5.18.1) werden auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben (6.2.3) eingewogen. Die Substanz wird in Ethanol (5.11) gelöst und es wird mit demselben Lösemittel bis zur Markierung aufgefüllt.

Die nominale Konzentration dieser Lösung enthält 500 µg Vitamin E (α-Tocopherol) je ml.

Der exakte Gehalt an Vitamin E (α-Tocopherol) in der Standard-Stammlösung (9.2.2.2) muss ausgehend von der exakten Konzentration der Standard-Arbeitslösung von Vitamin E (α-Tocopherol) (9.2.2.3) berechnet werden.

Die Standard-Stammlösung von Vitamin E (α-Tocopherol) in Ethanol bleibt im Dunklen bei 4 °C mindestens sechs Monate lang stabil und kann in diesem Zeitraum zur Herstellung einer Standard-Arbeitslösung nach 9.2.2.3 verwendet werden.

9.2.2.3 Standard-Arbeitslösung von Vitamin E (α-Tocopherol) in Ethanol

10,0 ml der Standard-Stammlösung von Vitamin E (α-Tocopherol) (9.2.2.2) werden mit der Pipette in einen 100-ml-Messkolben gegeben und bis zur Markierung mit Ethanol (5.11) aufgefüllt.

Die nominale Konzentration der Standard-Arbeitslösung beträgt ungefähr 50 µg Vitamin E (α-Tocopherol) je ml.

Der exakte Gehalt an Vitamin E (α -Tocopherol) in der Standard-Arbeitslösung muss nach 9.2.2.4 bestimmt werden.

Die Standard-Arbeitslösung von Vitamin E (α -Tocopherol) bleibt im Dunklen bei 4 °C mindestens 2 Monate lang stabil, jedoch muss die tatsächliche Konzentration vor der Verwendung überprüft werden.

9.2.2.4 Standardisierung der Standard-Arbeitslösung von Vitamin E (α -Tocopherol) in Ethanol (9.2.2.3)

Der exakte Gehalt an Vitamin E (α -Tocopherol) in der Standard-Arbeitslösung (9.2.2.3) wird anhand der spektrometrischen Messung der Absorption der Standard-Arbeitslösung (9.2.2.3) in Ethanol (5.11) bestimmt. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen Ethanol (5.11) im Spektralphotometer (6.11) beim Absorptionsmaximum zwischen 250 nm und 320 nm gemessen. Das Absorptionsmaximum muss für Ethanol (5.11) bei 292 nm liegen.

Der Gehalt an Vitamin E (α -Tocopherol) in Ethanol (5.11) kann mit Gleichung (2) berechnet werden.

$$C_E = \frac{10\,000 \cdot A_{wSTD}}{A_{292}} = 131,9 \cdot A_{wSTD} \quad (2)$$

Dabei ist

- C_E der Vitamin-E-Gehalt in Ethanol (5.11), in $\mu\text{g/ml}$;
- 10 000 die Konzentration von Vitamin E (α -Tocopherol) in einer 1%igen Lösung, in $\mu\text{g/ml}$;
- A_{wSTD} die Absorption der Standard-Arbeitslösung (9.2.2.3);
- A_{292} der Absorptionskoeffizient von Vitamin E (α -Tocopherol) in Ethanol bei 292 nm.

ANMERKUNG Der Absorptionskoeffizient von Vitamin E (α -Tocopherol) in Ethanol (5.11) bei 292 nm $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ beträgt 75,8, d.h. 1 000 mg/100 ml ergeben eine Absorption von 75,8, also ergeben 50 $\mu\text{g/ml}$ eine Absorption von 0,379.

9.2.3 Vitamin D

9.2.3.1 Stammlösung des internen Standards von Vitamin D₂ (Ergocalciferol)

50 mg Vitamin D₂ (Ergocalciferol) (5.19.1) werden auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben (6.3.3) eingewogen, in Ethanol (5.11) gelöst und damit auf 100 ml aufgefüllt.

Die nominale Konzentration dieser Lösung beträgt 20 000 IE Vitamin D₂ (Ergocalciferol) je ml.

Der exakte Gehalt an Vitamin D₂ (Ergocalciferol) in der Stammlösung des internen Standards muss nach 9.2.3.5 bestimmt werden.

Die Stammlösung des internen Standards von Vitamin D₂ (Ergocalciferol) bleibt bei 4 °C mindestens einen Monat lang stabil und kann in diesem Zeitraum zur Herstellung der internen Standard-Arbeitslösung I nach 9.2.3.3 verwendet werden.

9.2.3.2 Standard-Stammlösung von Vitamin D₃ (Cholecalciferol)

50 mg Vitamin D₃ (Cholecalciferol) (5.19.2) werden auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben (6.3.3) eingewogen, in Ethanol (5.11) gelöst und damit auf 100 ml aufgefüllt.

Die nominale Konzentration dieser Lösung beträgt 20 000 IE Vitamin D₃ (Cholecalciferol) je ml.

Der exakte Gehalt an Vitamin D₃ (Cholecalciferol) in der Standardlösung muss nach 9.2.3.5 bestimmt werden.

Die Stammlösung von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) bleibt im Dunkeln bei 4 °C mindestens einen Monat lang stabil und kann in diesem Zeitraum zur Herstellung der Standard-Arbeitslösung I nach 9.2.3.3 verwendet werden.

9.2.3.3 Standard-Arbeitslösung I von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) und internem Standard D₂ (Ergocalciferol)

5,0 ml der Standard-Stammlösung von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) (9.2.3.2) und 5,0 ml der Stammlösung des internen Standards von Vitamin D₂ (Ergocalciferol) (9.2.3.1) werden mit der Pipette in denselben 100-ml-Messkolben (6.3.3) gegeben und mit Methanol (5.10) auf 100 ml aufgefüllt.

Die nominale Konzentration der Standard-Arbeitslösung I aller Vitamin-D-Formen (Vitamin D₃ (Cholecalciferol) und Vitamin D₂ (Ergocalciferol)) beträgt 1 000 IE je ml.

Diese Standard-Arbeitslösung muss vor der Verwendung frisch hergestellt werden.

9.2.3.4 Standard-Arbeitslösung II von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) und des internen Standards D₂ (Ergocalciferol)

1,0 ml der Standard-Arbeitslösung I (9.2.3.3) werden mit der Pipette in einen 100-ml-Messkolben (6.3.3) gegeben, mit Methanol (5.10) wird bis zur Markierung aufgefüllt und gemischt.

Die nominale Konzentration der Standard-Arbeitslösung II aller Vitamin-D-Formen (Vitamin D₃ (Cholecalciferol) und Vitamin D₂ (Ergocalciferol)) beträgt 10 IE je ml.

Die exakte Konzentration muss ausgehend von der exakten Konzentration der Stammlösung des internen Standards von Vitamin D₂ (Ergocalciferol) (9.2.3.1) oder der Standard-Stammlösung D₃ (Cholecalciferol) (9.2.3.2) berechnet werden.

Diese Standard-Arbeitslösung II muss vor der Verwendung frisch hergestellt werden.

9.2.3.5 Standardisierung der Stammlösung des internen Standards von Vitamin D₂ (Ergocalciferol) und der Standard-Stammlösung von Vitamin D₃ (Cholecalciferol)

Je 2 ml der Standard-Stammlösungen von Vitamin D₂ (Ergocalciferol) und D₃ (Cholecalciferol) (9.2.3.1 und 9.2.3.2) werden in getrennten Messkolben (6.3.3) mit Ethanol (5.11) auf 100 ml verdünnt und ihr UV-Spektrum von 220 nm bis 320 nm gegen Ethanol (5.11) wird auf dem Spektralphotometer (6.11) gemessen. Das Absorptionsmaximum sollte bei 263 nm – 265 nm liegen.

Der Gehalt an Vitamin D₂ (Ergocalciferol) in Ethanol (5.11) kann mit Gleichung (3) berechnet werden.

$$C_{D_2} = \frac{400\,000 \cdot A_{STD}}{A_{264}} = \frac{400\,000 \cdot A_{STD}}{460} = 869,6 \cdot A_{STD} \quad (3)$$

Dabei ist

C_{D_2}	der Gehalt an Vitamin D ₂ (Ergocalciferol) in Ethanol (5.11), in IE/ml;
400 000	die Konzentration von Vitamin D ₂ (Ergocalciferol) in einer 1%igen Lösung, in IE/ml;
A_{STD}	die Absorption der nach 9.2.3.5 verdünnten Standard-Stammlösung (9.2.3.1);
A_{264}	der Absorptionskoeffizient von Vitamin D ₂ (Ergocalciferol) in Ethanol bei 264 nm.

ANMERKUNG Der Absorptionskoeffizient von Vitamin D₂ (Ergocalciferol) in Ethanol (5.11) bei 264 nm $A_{1\,cm}^{1\%}$ beträgt 460, d. h. 1 000 mg/100 ml (= 400 000 IE/ml) ergeben eine Absorption von 460, also ergeben 400 IE/ml eine Absorption von 0,460.

Der Gehalt von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) in Ethanol (5.11) kann mit Gleichung (4) berechnet werden.

$$C_{D_3} = \frac{400\,000 \cdot A_{STD}}{A_{264}} = \frac{400\,000 \cdot A_{STD}}{485} = 824,7 \cdot A_{STD} \quad (4)$$

Dabei ist

C_{D_3}	der Gehalt an Vitamin D ₃ (Cholecalciferol) in Ethanol (5.11), in IE/ml;
400 000	die Konzentration von Vitamin D ₃ (Cholecalciferol) in einer 1%igen Lösung, in IE/ml;
A_{STD}	die Absorption der nach 9.2.3.5 verdünnten Standard-Stammlösung (9.2.3.1);
A_{264}	der Absorptionskoeffizient von Vitamin D ₃ (Cholecalciferol) in Ethanol bei 264 nm.

ANMERKUNG Der Absorptionskoeffizient von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) in Ethanol (5.11) bei 264 nm $A_{1\,cm}^{1\%}$ beträgt 485, d. h. 1 000 mg/100 ml (= 400 000 IE/ml) ergeben eine Absorption von 485, also ergeben 400 IE/ml eine Absorption von 0,485.

9.3 Kalibrierung

9.3.1 Allgemeines

Die Kalibrierlösungen und die Futtermittelproben werden vorzugsweise gleichzeitig hergestellt. Jedoch können die Kalibrierungen für Vitamin A (Retinol), Vitamin E (α-Tocopherol) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol) über einen längeren Zeitraum hinweg verwendet werden, solange sichergestellt ist, dass die Wiederholbedingungen im Labor stabil sind. Dies muss regelmäßig mittels angemessener Qualitätssicherungsmaßnahmen überprüft werden.

9.3.2 Kalibrierlösungen und Kalibrierkurve für Vitamin A (Retinol) und E (α-Tocopherol)

9.3.2.1 Ein definiertes Volumen der Standard-Stammlösung von Vitamin A (Retinol) (9.2.1.2) und der Standard-Arbeitslösung von Vitamin A (Retinol) (9.2.1.3) wird unter Vakuum mit einem Vakuumrotationsverdampfer (6.6) oder einem Probenverdichter (6.7) bei einer Temperatur von höchstens 40 °C bzw. 50 °C bis fast zur Trockne eingeengt. Wenn ein Vakuumverdampfer verwendet wird, wird zum Schluss der Atmosphärendruck durch Einleiten eines Inertgases (5.9) wiederhergestellt. Der Rückstand wird unverzüglich im gleichen Volumen Methanol (5.10) wie bei der Einengung gelöst.

9.3.2.2 Verschiedene Volumen der Standard-Stammlösung und der Standard-Arbeitslösung von Vitamin A (Retinol) (hergestellt nach 9.3.2.1) und Vitamin E (α-Tocopherol) (9.2.2.1 oder 9.2.2.2) werden jeweils in 20-ml-Messkolben (6.3.3) gegeben. Die Messkolben werden mit Methanol (5.10) bis zur Markierung aufgefüllt und gemischt. Tabelle 1 enthält Beispiele für Kalibrierlösungen für die Bestimmung von Vitamin A und E.

Die exakte Konzentration der Kalibrierlösungen sollte ausgehend von den Konzentrationen der Standard-Arbeitslösungen von Vitamin A (Retinol) (9.2.1.2) und Vitamin E (α-Tocopherol) (9.2.2.2) berechnet werden.

Tabelle 1 — Kalibrierlösungen für Vitamin A und E

Kalibrier- lösung	Volumen der Standard- Arbeitslösung von Vitamin A (Retinol) (hergestellt nach 9.2.1.3) ml	Nominale Konzentration von Vitamin A (Retinol) IE/ml	Volumen der Standard- Arbeitslösung von Vitamin E (α -Tocopherol) (9.2.2.3) ml	Nominale Konzentration von Vitamin E (α -Tocopherol) $\mu\text{g/ml}$
0	0,0	0,000	0,0	0,0
1	0,3	0,113	0,2	0,5
3	0,8	0,300	0,8	2,0
4	1,6	0,600	1,6	4,0
5	4,0	1,500	3,0	7,5
Kalibrier- lösung	Volumen der Standard- Stammlösung von Vitamin A (Retinol) in Methanol (9.2.1.2) ml	Nominale Konzentration von Vitamin A (Retinol) IE/ml	Volumen der Standard- Stammlösung von Vitamin E (α -Tocopherol) (9.2.2.2) ml	Nominale Konzentration von Vitamin E (α -Tocopherol) $\mu\text{g/ml}$
6	0,8	3,0	0,6	15,0
7	1,6	6,00	1,2	30,0
8	4,8	18,00	2,4	60,0

ANMERKUNG Die Kalibrierkurve ist für Vitamin A (Retinol) im Bereich 0,1 IE/ml – 30 IE/ml und für Vitamin E (α -Tocopherol) im Bereich 0,5 $\mu\text{g/ml}$ – 60 $\mu\text{g/ml}$ linear, es ist jedoch nicht notwendig, alle Konzentrationen auf einer einzigen Kalibrierkurve aufzutragen. Dies hängt von der zu erwartenden Konzentration der Prüflösung (9.6) ab.

Von jeder Kalibrierlösung werden mehrmals 20 μl injiziert und die mittleren Peakflächen (-höhen) bestimmt.

Als mathematisches Modell wird eine lineare Regression verwendet ($y = ax + b$), mit x = der exakte Gehalt des Vitamins in der Kalibrierlösung und y = die dazugehörige mittlere Peakhöhe oder -fläche.

9.3.3 Kalibrierlösungen und Kalibrierkurve für Vitamin D2 und D3

Verschiedene Volumen der Standard-Arbeitslösungen I (9.2.3.3) und Standard-Arbeitslösungen II (9.2.3.4) werden jeweils in 20-ml-Messkolben (6.3.3) gegeben. Die Messkolben werden mit Methanol (5.10) bis zur Markierung aufgefüllt und gemischt. Die exakte Konzentration der Kalibrierlösungen sollte ausgehend von den Konzentrationen der Standard-Stammlösungen von Vitamin D₃ und der Stammlösung des internen Standards von Vitamin D₂ (9.2.3.1 und 9.2.3.2) berechnet werden.

Tabelle 2 — Kalibrierlösungen für Vitamin D

Kalibrier- lösung	Volumen der Standard-Arbeitslösung II (9.2.3.4) ml	Nominale Konzentration von Vitamin D ₂ bzw. D ₃ (IE/ml) in der Kalibrierlösung
1	0	0
2	2,00	1,00
3	6,00	3,00
4	12,0	6,00
Kalibrier- lösung	Volumen der Standard-Arbeitslösung I (9.2.3.3) ml	Nominale Konzentration von Vitamin D ₂ bzw. D ₃ (IE/ml) in der Kalibrierlösung
5	0,2	10,0
6	0,4	20,0
7	1,0	50,0
8	1,5	75,0
9	2,0	100

Von jeder Kalibrierlösung werden mehrmals 100 µl injiziert und die mittleren Peakflächen (-höhen) bestimmt.

Als mathematisches Modell wird eine lineare Regression verwendet ($y = ax + b$), mit x = der exakte Gehalt des Vitamins in der Kalibrierlösung und y = die dazugehörige mittlere Peakhöhe oder -fläche.

9.4 Probenanalyse

9.4.1 Vorbereitung der Untersuchungsproben

Die gemahlene Probe (8) wird gründlich gemischt und je nach Gehalt an Vitamin A (Retinol) und/oder Vitamin E (α-Tocopherol) und/oder Vitamin D₃ werden 2 g bis 30 g der Probe auf 1 mg (siehe Bemerkung 11.4) in einen 500-ml-Steh- oder Erlenmeyerkolben (6.3.1) eingewogen.

Als interner Standard (ISTD) wird Vitamin D₂ verwendet.

Die Stammlösung des internen Standards Vitamin D₂ (9.2.3.1) wird so weit verdünnt, dass die Menge an internem Standard (IE) in 1 ml der verdünnten Probenlösung genauso hoch ist wie die zu erwartende Menge an Vitamin D₃ (IE) in der Untersuchungsprobe. 1,0 ml dieser verdünnten Vitamin-D₂-Lösung werden mit einer Pipette in den Kolben mit der Untersuchungsprobe gegeben.

Die hinzugefügten Einheiten ISTD werden bei der Berechnung der Wiederfindungsrate nach Gleichung (8) (10.3) als ISTD_{spiked} eingesetzt. Das Verseifungsgefäß wird verschlossen und es wird 10 min gewartet.

Wenn lediglich Vitamin A (Retinol) und/oder E (α-Tocopherol) zu bestimmen sind, ist die Zugabe eines internen Standards nicht notwendig. In diesem Fall wird anstelle der Lösung des internen Standards 1 ml Ethanol (5.11) hinzugegeben. Jedoch wird die Analyse von Vitamin A (Retinol) und/oder Vitamin E (α-Tocopherol) durch die Zugabe des internen Standards nicht beeinflusst.

Mit 9.4.2.1 oder 9.4.2.2 fortfahren.

ANMERKUNG Anhang A gibt Beispiele für mögliche Einwaagemengen in Kombination mit weiteren Aliquotierungen und Verdünnungen, je nach deklariertem Gehalt, mit denen eine Konzentration in der Prüflösung erreicht werden kann, die auf der Kalibrierkurve liegt.

9.4.2 Verseifung

9.4.2.1 Kaltverseifung

Zu der Probe im Steh- bzw. Erlenmeyerkolben werden ungefähr 1 g Ascorbinsäure (5.4) und 100 mg BHT (5.8) gegeben. Dann werden nach und nach unter Schwenken genau 130,0 ml Ethanol (5.3) und schließlich exakt 30,0 ml alkalische Natriumsulfidlösung (5.7) hinzugegeben und gut gemischt. Mit einem Stickstoffstrom wird die Luft aus dem Kolben entfernt, der Kolben wird verschlossen und mindestens 12 h (vorzugsweise über Nacht) bei Labortemperatur in einen Überkopfschüttler (6.2) gegeben.

9.4.2.2 Heißverseifung

Ungefähr 1 g Ascorbinsäure (5.4) und 100 mg BHT (5.8) werden zugegeben. Dann werden nach und nach unter Schwenken genau 130,0 ml Ethanol (5.3) und schließlich exakt 30,0 ml alkalische Natriumsulfidlösung (5.7) hinzugegeben und gut gemischt. Der Kolben wird mit einem Rückflusskühler (6.3.2) verbunden und in ein Wasserbad mit Magnetrührer (6.1) eingestellt. Das Wasserbad wird zum Sieden gebracht und unter Rühren und einem langsamen Strom Inertgas (5.9) verbleibt der Kolben 30 min unter Rückflussbedingungen im Wasserbad. Danach wird der Kühler vom Kolben abgenommen und die Verseifungslösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt, z. B. in einem Eisbad.

ANMERKUNG In Ausnahmefällen können bei manchen Produkten abweichende Verseifungsbedingungen (siehe Bemerkung 11.4) oder eine längere Verseifungszeit (siehe Bemerkung 11.5) erforderlich sein.

9.5 Extraktion von Vitamin A (Retinol), Vitamin E (α -Tocopherol) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol) mittels SPE

Es ist sicherzustellen, dass sich die Probenteilchen in der Verseifungslösung (hergestellt nach 9.4.2.1 oder 9.4.2.2) abgesetzt haben und der Überstand so klar wie möglich ist. 40,0 ml des Überstands werden in einen 50-ml-Messkolben (6.3.3) überführt. Mit Ascorbinsäurelösung (5.5) wird bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Ascorbinsäurelösung (5.5) muss kurz vor der Verwendung frisch hergestellt werden.

Die Lösung wird gründlich geschüttelt, sodass eine sichtbar homogene Emulsion entsteht. Dann werden unverzüglich jeweils 15,0 ml dieser Lösung in zwei SPE-Säulen (6.5) gegeben. Eine Säule dient zur Bestimmung von Vitamin A (Retinol) und/oder Vitamin E (α -Tocopherol), die andere Säule zur Bestimmung von Vitamin D₃ (Cholecalciferol).

ANMERKUNG 1 Die Emulsion zerfällt schnell wieder. Daher ist es wichtig, dass das Aliquot der gut geschüttelten Emulsion sofort nach dem Mischen in die Säule gegeben wird.

Die Lösung wird langsam mithilfe der Schwerkraft durch die Säule geleitet. Nachdem das Extrakt vollständig in die Säule eingeflossen ist, wird 15 min gewartet. Nach Ablauf dieser Zeit wird so lange Cyclohexan (5.12) in die Säule gegeben, bis das Cyclohexan beinahe die Auslauföffnung erreicht hat. Dann wird 5 min gewartet. Mehr Cyclohexan (5.12) wird in die Säule gegeben und das Eluat, das mithilfe der Schwerkraft die Säule durchquert, wird in einem 100-ml-Messkolben (6.3.3) aufgefangen. Die Fließrate sollte nicht schneller als 1 Tropfen/s sein. Das Eluieren wird beendet, kurz bevor das definierte Volumen (100 ml) erreicht ist. Mit Cyclohexan (5.12) wird bis zur Markierung aufgefüllt.

ANMERKUNG 2 Bei Proben mit einem niedrigen Gehalt an Vitamin D₃ kann es sein, dass die Konzentration im Eluat zu niedrig für eine weitergehende Analyse ist. Dieser Umstand kann behoben werden, indem zwei 70-ml-CHROMABOND-Säulen verwendet werden und die Eluate aus den beiden Säulen zusammengeführt werden.

9.6 Herstellung der Prüflösung für die HPLC-Trennung

9.6.1 Vitamin A (Retinol) und Vitamin E (α -Tocopherol)

Ein Aliquot des Cyclohexanextrakts (9.5) wird unter Vakuum mit einem Vakuumrotationsverdampfer (6.6) oder einem Probenverdichter (6.7) bei einer Temperatur von höchstens 40 °C bzw. 50 °C bis fast zur Trockne eingengt. Dieses Aliquot wird bei der Berechnung der Ergebnisse nach Gleichung (5) und Gleichung (6) als F_A eingesetzt. Wenn ein Vakuumverdampfer verwendet wird, wird zum Schluss der Atmosphärendruck durch Einleiten eines Inertgases (5.9) wiederhergestellt.

Zur Bestimmung von Vitamin A (Retinol) und Vitamin E (α -Tocopherol) wird der Rückstand unverzüglich in einem bekannten Volumen (1 ml – 100 ml) Methanol (5.10) gelöst. Dieses Volumen wird bei der Berechnung der Ergebnisse nach Gleichung (5) und Gleichung (6) (10.1, 10.2) als V_s eingesetzt.

ANMERKUNG 1 Falls der nach der Einengung verbleibende Rückstand unlöslich ist, wird die Analyse mit einer größeren Menge alkalischer Natriumsulfidlösung (5.7), so wie in Bemerkung 11.4 beschrieben, wiederholt.

Die im Probenextrakt zu erwartenden Konzentrationen von Vitamin A (Retinol) und Vitamin E (α -Tocopherol) müssen im validierten Kalibrierbereich liegen. Gegebenenfalls wird das Probenextrakt so stark mit Methanol (5.10) verdünnt, dass die Konzentration in diesen Bereich fällt. Diese Verdünnung wird bei der Berechnung der Ergebnisse nach Gleichung (5) und Gleichung (6) (10.1, 10.2) als F_D berücksichtigt. Das Extrakt wird durch einen Membranfilter (6.8) gefiltert und es wird mit der HPLC-Bestimmung nach 9.8 fortgefahren.

ANMERKUNG 2 Falls eine Verzögerung unvermeidbar sein sollte, wird die Prüflösung in Inertgas (5.9) im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4 °C $\pm$ 1 °C für höchstens 24 h aufbewahrt. Vor der Verwendung wird sie im Dunkeln auf Raumtemperatur erwärmt.

9.6.2 Vitamin D₃ (Cholecalciferol)

Ein Aliquot des Cyclohexanextrakts (9.5) wird unter Vakuum mit einem Vakuumrotationsverdampfer (6.6) oder einem Probenverdichter (6.7) bei einer Temperatur von höchstens 40 °C bzw. 50 °C bis fast zur Trockne eingengt. Dieses Aliquot wird bei der Berechnung der Ergebnisse nach Gleichung (7) als F_A berücksichtigt. Wenn ein Vakuumverdampfer verwendet wird, wird zum Schluss der Atmosphärendruck durch Einleiten eines Inertgases (5.9) wiederhergestellt.

Zur Bestimmung von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) wird das verbleibende Lösemittel im Cyclohexanextrakt (9.5) mit einem Strom Inertgas (5.9) entfernt und der Rückstand wird unverzüglich in 1 ml *n*-Hexan (5.14) gelöst.

Dann wird mit der semipräparativen Reinigung nach 9.7 fortgefahren.

9.7 Semipräparative HPLC-Reinigung zur Bestimmung von Vitamin D₃

9.7.1 Bestimmung des Retentionszeitfensters für die Vitamin-D₂/D₃-Fraktion

Jeweils 0,25 ml der beiden Vitamin-D-Stammlösungen (9.2.3.1 und 9.2.3.2) werden mit einer Pipette in einen 100-ml-Spitzkolben (6.3.4) gegeben und bei reduziertem Druck entweder im Vakuumrotationsverdampfer (6.6) bei einer Temperatur von max. 40 °C oder im Stickstoffprobenverdichter (6.7) bei einer Temperatur von max. 50 °C bis fast zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 100 ml *n*-Hexan (5.14) gelöst. Diese Standardlösung weist von jedem Vitamin D eine Konzentration von 50 IE/ml auf. Mehrmals werden 500 μ l dieses Standards in die Säule des semipräparativen HPLC-Systems (6.9) injiziert und das Retentionszeitfenster wird von Beginn bis Ende des Vitamin-D-Peaks bestimmt. Das durchschnittliche Retentionszeitfenster wird berechnet und um ungefähr 10 % der Retentionszeit am Peakbeginn und am Peakende erweitert, sodass während der Aufnahmezeit kein Vitamin D verloren gehen darf.

9.7.2 Bedingungen für die semipräparative HPLC-Reinigung

Säule:	250 mm × 8 mm, Normalphase, z. B. MultoHigh 100 Si-5μ Normalphasensäule, 250 mm × 8 mm ID mit geeigneter Vorsäule.
Mobile Phase (5.15):	Mischung aus <i>n</i> -Hexan (5.14) und 2-Propanol (5.13), z. B. im Verhältnis 98 + 2 (Volumenanteil). Das Mischverhältnis muss an die verwendete Säule (6.9.3) angepasst werden.
Fließrate:	2,5 ml/min
UV-Detektor:	265 nm
Injektionsvolumen:	500 μl

ANMERKUNG 1 Unter Normalphasenbedingungen (9.7.2) werden Vitamin D₂ und D₃ nicht getrennt und beide sind in derselben semipräparativen Fraktion enthalten. Sofern eine zufriedenstellende Trennung der Vitamin-D-Fraktion von anderen Extraktstoffen erreicht wird, können auch andere Bedingungen verwendet werden. Es ist jedoch äußerst wichtig, dass die Bedingungen, die einen signifikanten Einfluss auf die Retentionszeit haben (Säulentemperatur, Fließrate usw.), konstant bleiben, damit sichergestellt ist, dass die gesammelte Fraktion das Vitamin D enthält.

ANMERKUNG 2 Andere Techniken zur Reinigung des Vitamin D sind möglich, z. B. Dünnschichtchromatographie (TLC) [3].

9.7.3 Sammeln der Vitamin-D-Fraktion

500 μl der nach 9.6.2 hergestellten Lösung werden in die Säule des semipräparativen HPLC-Systems (6.9) gegeben und mit der mobilen Phase für die semipräparative HPLC (5.15) eluiert. Die Fraktion wird innerhalb des für Vitamin D definierten Retentionszeitfensters (9.7.1) in einem 50-ml-Spitzkolben (6.3.4) gesammelt. Die Fließrate wird nach der Trennung der Vitamin-D-Fraktion um ungefähr 2 ml/min erhöht und die Säule wird ungefähr 10 min gespült, um nachkommende eluierende Substanzen zu entfernen. Dann wird wieder die ursprüngliche Fließrate eingestellt.

Die gesammelte Lösung der Vitamin-D-Fraktion wird bei reduziertem Druck entweder im Vakuumrotationsverdampfer (6.6) oder im Probenverdichter (6.7) bei einer Temperatur von max. 40 °C bzw. 50 °C auf 2 ml – 3 ml eingengt und das verbleibende Lösemittel wird mit einem Strom Inertgas (5.9) entfernt. Der Rückstand wird sofort in 1,0 ml Methanol (5.10) gelöst und gegebenenfalls einer kurzen Ultraschallbehandlung unterzogen. Die zu erwartende Konzentration des Vitamin D₃ muss im Bereich der Kalibrierkurve liegen. Gegebenenfalls wird das Probenextrakt so stark mit Methanol (5.10) verdünnt, dass die Konzentration in diesen Bereich fällt. Diese Verdünnung wird bei der Berechnung der Ergebnisse nach Gleichung (7) und Gleichung (8) als F_D berücksichtigt. Die Lösung wird durch einen Membranfilter (6.8) gefiltert und sie wird für die HPLC-Bestimmung nach 9.8 verwendet.

ANMERKUNG Falls eine Verzögerung unvermeidbar sein sollte, wird die Prüflösung in Inertgas (5.9) im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4 °C ± 1 °C für höchstens 24 h aufbewahrt. Vor der Verwendung wird sie im Dunkeln auf Raumtemperatur erwärmt.

9.8 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

9.8.1 Bedingungen für die analytische HPLC

Die folgenden Bedingungen dienen als Richtwerte. Unter der Voraussetzung dass gleichwertige Ergebnisse erzielt werden, d. h. dass eine zufriedenstellende Trennung der Vitamine A (Retinol), D₂ (Ergocalciferol), D₃ (Cholecalciferol) und E (α-Tocopherol) untereinander und von anderen Extraktstoffen erreicht wird, dürfen auch andere Bedingungen verwendet werden.

Säule: 250 mm × 4,6 mm, Umkehrphase, C18, z. B. Hypurity C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm (6.10.3) oder Eclipse XDB-C8, 150 × 4,6 mm, 5 µm (siehe Bemerkung 11.6) mit geeigneter Vorsäule.

Mobile Phase (5.16): Mischung aus Methanol (5.10) mit Wasser (5.1) im Verhältnis 980 + 20 (Volumenanteil). Das Mischverhältnis muss an die verwendete Säule (6.10.3) angepasst werden.

Fließrate: 0,5 ml/min.

Detektor: UV-Detektor mit variabel einstellbarer Wellenlänge zur Messung bei Wellenlänge 325 nm für Vitamin A (Retinol), 292 nm für Vitamin E (α-Tocopherol) und 265 nm für Vitamin D₂ (Ergocalciferol) und D₃ (Cholecalciferol), der mit einem Datenintegrator/Datenverarbeitungssystem ausgestattet ist.

Zur Bestimmung von Vitamin A (Retinol) und E (α-Tocopherol) kann alternativ ein Fluoreszenzdetektor (Bemerkung 11.7) verwendet werden:

— für Vitamin A (Retinol): Anregungswellenlänge 325 nm, Emissionswellenlänge 475 nm;

— für Vitamin E (α-Tocopherol): Anregungswellenlänge 295 nm, Emissionswellenlänge 330 nm.

ANMERKUNG Zur Bestimmung von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) ist alternativ MS/MS-Detektion möglich, jedoch wurde dieses Detektionsverfahren nicht validiert und muss daher vor der Anwendung im Labor validiert werden.

Injektionsvolumen: 20 µl (für Vitamin A (Retinol) und E (α-Tocopherol)); 100 µl (für Vitamin D₃ (Cholecalciferol)).

Retentionszeiten ungefähr 7 min für Vitamin A (Retinol), ungefähr 15 min für Vitamin D₂ (Ergocalciferol), ungefähr 16 min für Vitamin D₃ (Cholecalciferol) und ungefähr 18 min für Vitamin E (α-Tocopherol)

9.8.2 Bestimmung

Das erforderliche Volumen des Probenextrakts (20 µl bzw. 100 µl) wird in die analytische Säule injiziert und die Peakfläche (-höhe) der Vitamine wird gemessen. Aus mehreren Injektionen des gleichen Probenextrakts wird die mittlere Peakfläche (-höhe) berechnet. Die Vitaminkonzentration wird durch Vergleich mit den Kalibrierkurven (9.3.2 und 9.3.3) bestimmt.

Mit der Kalibriergerade werden die Konzentrationen von Vitamin A (Retinol) und/oder Vitamin E (α-Tocopherol) und/oder Vitamin D₂/D₃ (Ergocalciferol/Cholecalciferol) ausgehend von den durch Vergleich mit den Kalibrierkurven (9.3.2 und 9.3.3) im Probenextrakt bestimmten Peakhöhen (-flächen) berechnet. Der berechnete Wert *C* wird in Gleichung (5), Gleichung (6), Gleichung (7) und Gleichung (8) zur abschließenden Berechnung des Vitamingehalts in den Proben verwendet (10.1, 10.2 und 10.3).

10 Auswertung

10.1 Ergebnisberechnung für Vitamin A (Retinol)

Der numerische Wert des Vitamin-A- (Retinol-) Gehalts (*W_A*) in der Untersuchungsprobe wird mit Gleichung (5) berechnet.

$$W_A = \frac{C_A \cdot F_A \cdot V_s \cdot F_D}{m} \cdot \frac{161}{40} \cdot \frac{50}{15} \cdot 1\,000 = \frac{C_A \cdot F_A \cdot V_s \cdot F_D \cdot 13\,417}{m} \quad (5)$$

Dabei ist

W_A	der numerische Wert des Vitamin-A- (Retinol-) Gehalts in der Untersuchungsprobe, in IE/kg;
C_A	die Konzentration von Vitamin A (Retinol) in der Prüflösung (9.8.2), in IE/ml;
F_A	100 geteilt durch das Aliquotvolumen des Cyclohexanextrakts (9.5), das zur Einengung verwendet wurde;
V_s	das Volumen der Prüflösung (9.6.1), in ml;
F_D	der Verdünnungsfaktor der Prüflösung nach 9.6.1;
m	die Masse der Untersuchungsprobe, in g;
161	das Volumen der Verseifungslösung (nach 9.4.2.1 oder 9.4.2.2), in ml;
40	das Aliquot der Verseifungslösung (nach 9.5), in ml;
50	das Endvolumen des mit Ascorbinsäurelösung aufgefüllten Aliquots der Verseifungslösung (nach 9.5), in ml;
15	das Aliquot dieser Lösung, das in die SPE-Säule gegeben wird (nach 9.5), in ml;
1 000	der Umrechnungsfaktor für Masse von g zu kg.

ANMERKUNG Die Festwerte können zu einem Wert zusammengefasst werden:
 $(161/40) \times (50/15) \times 1\,000 = 13\,417$.

Die Umrechnungsfaktoren für Retinol sind

- zu Retinylacetat: 1,147;
- zu Retinylpalmitat: 1,820;
- zu Retinylpropionat: 1,195.

10.2 Ergebnisberechnung für Vitamin E (α -Tocopherol)

Der numerische Wert des Vitamin-E- (α -Tocopherol-) Gehalts in der Untersuchungsprobe wird mit Gleichung (6) berechnet.

$$W_E = \frac{C_E \cdot F_A \cdot V_s \cdot F_D}{m} \cdot \frac{161}{40} \cdot \frac{50}{15 \cdot 1\,000} \cdot 1\,000 = \frac{C_E \cdot F_A \cdot V_s \cdot F_D \cdot 13,417}{m} \quad (6)$$

Dabei ist

W_E	der numerische Wert des Vitamin-E- (α -Tocopherol-) Gehalts in der Untersuchungsprobe, in mg/kg;
C_E	die Konzentration von Vitamin E (α -Tocopherol) in der Prüflösung (9.8.2), in μ g/ml;
F_A	100 geteilt durch das Aliquotvolumen des Cyclohexanextrakts (9.5), das zur Einengung verwendet wurde;
V_s	das Volumen der Prüflösung (9.6.1), in ml;
F_D	der Verdünnungsfaktor der Prüflösung nach 9.6.1;
m	die Masse der Untersuchungsprobe, in g;
161	das Volumen der Verseifungslösung (nach 9.4.2.1 oder 9.4.2.2), in ml;