

DIN EN 17550



ICS 65.120

Einsprüche bis 2020-10-21

Entwurf

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Carotinoiden in Mischfuttermitteln und Vormischungen
für Tiere mittels Reverse Hochdruckphase-Flüssigchromatographie-UV
Detektion (RP-HPLC-UV);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17550:2020**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of carotenoids in animal compound feed and premixtures by high performance
liquid chromatography –
UV detection (HPLC-UV);
German and English version prEN 17550:2020

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-08-21 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 97 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17550:2020) 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 Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 13528 siehe DIN ISO 13528

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

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 13528, *Statistische Verfahren für Eignungsprüfungen durch Ringversuche*

<i>Titel de:</i>	Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Bestimmung von Carotinoiden in Mischfuttermitteln und Vormischungen für Tiere mittels Reverse Hochdruckphase-Flüssigchromatographie-UV Detektion (RP-HPLC-UV)
<i>Titel en:</i>	Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis — Determination of carotenoids in animal compound feed and premixtures by high performance liquid chromatography - UV detection (HPLC-UV)
<i>Titel fr:</i>	

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Kurzbeschreibung	4
5 Reagenzien und Materialien	5
6 Prüfeinrichtung	9
7 Probenahme	10
8 Herstellung der Untersuchungsprobe	10
8.1 Allgemeines	10
8.2 Laborprobe	11
8.3 Untersuchungsprobe	11
8.4 Prüfmenge	11
9 Durchführung	11
9.1 Allgemeines	11
9.2 Enzymatische Freisetzung	11
9.3 Extraktion	12
9.3.1 Extraktion mittels PLE	12
9.3.2 Konventionelle Flüssig-Fest-Extraktion (SLE)	12
9.4 Zentrifugation	13
9.5 HPLC-Analyse	13
9.5.1 Analysebedingungen	13
9.5.2 HPLC-Bestimmung	13
9.5.3 Kriterien für die Annahme des Analyseergebnisses	15
10 Berechnung	16
11 Prüfbericht	17
11.1 Ringversuch	17
11.2 Wiederholpräzision	17
11.3 Vergleichpräzision	17
12 Prüfbericht	18
Anhang A (informativ) Ergänzende Geräte- und analytische Informationen	19
A.1 Werte der Absorptionskoeffizienten	19
A.2 Beispiele für Muster chromatographischer Profile von isomerisierten Carotinoiden	21
A.3 Ergebnisse des Ringversuchs	32
A.3.1 Durchführung	32
A.3.2 Materialien	33
A.3.3 Statistische Analyse der Ergebnisse	35
A.3.4 Ergebnisse	35
A.3.5 Interpretation und Schlussfolgerungen	43
A.3.6 Genauigkeit und Richtigkeit	44
Literaturhinweise	46

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17550:2020) 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 Mandats erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

1 Anwendungsbereich

Dieses Analysenverfahren legt ein Verfahren der reversen Hochdruckphase-Flüssigchromatographie mit UV-Detektion (RP-HPLC-UV) fest für die gleichzeitige Bestimmung von vier zugelassenen Carotinoiden in Fisch-Mischfuttermittel, und zwar Astaxanthin (AXN), Canthaxanthin (CXN), Adonirubin (ADR) und Astaxanthindimethyldisuccinat (AXN-DMDS), und von sechs zugelassenen Carotinoiden in Geflügelfutter, und zwar Canthaxanthin (CXN), Capsanthin (CSN), Beta-Apo-8'-Carotinsäureethylester (BACARE), Citranaxanthin (CIXN), Lutein (LUT) und Zeaxanthin (ZEA) im Massenanteilbereich von etwa 2 mg/kg bis etwa 4 500 mg/kg (je nach Carotinoid). Beta-Carotin (BCAR), in Mischfuttermittel für alle Tierspezies zugelassen, wurde ebenfalls in den Anwendungsbereich aufgenommen. Das Analysenverfahren ist für den Zweck der Quantifizierung der angegebenen Carotinoide und die Bestätigung der Kennzeichnung geeignet. Das Verfahren gilt für natürliche und synthetische Futtermittel-Zusatzstoffe.

Xanthophyllester, wie die von Lutein, Zeaxanthin und Capsanthin, die in Futtermitteln vorhanden sein könnten, sind keine zugelassenen Futtermittel-Zusatzstoffe und gehören daher nicht zum Anwendungsbereich dieses Verfahrens.

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

3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

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

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

4 Kurzbeschreibung

Die Carotinoide werden zuerst durch eine enzymatische Reaktion bei 50 °C freigesetzt. Die Proben werden mit Aceton mithilfe eines Flüssigextraktionsgeräts unter Druck oder durch Flüssig-Fest-Extraktion extrahiert. Die Extrakte werden anschließend zentrifugiert und mittels reverser Hochdruckphase-Flüssigchromatographie mit UV- oder Diodenarray-Detektion analysiert. Für die Bestimmung der Zielanalyten wird eine gemeinsame isosbestische Wellenlänge von 410 nm gewählt, um sicherzustellen, dass die verschiedenen Isomere jedes der Carotinoide ähnliche Absorptionskoeffizienten haben. Die Quantifizierung erfolgt durch externe Kalibrierung.

ANMERKUNG Die maximalen Gehalte der Carotinoide werden, wie durch die europäischen Verordnungen für die Zulassung von Futtermittel-Zusatzstoffen ([1], [2]) festgelegt, als die Summe der all-trans- und cis-Isomere ausgedrückt. Daher müssen die Flächen der entsprechenden Isomere im HPLC-Chromatogramm vor der Quantifizierung der einzelnen Carotinoide aufsummiert werden.

5 Reagenzien und Materialien

WARNUNG 1 — Carotinoide sind lichtempfindlich. Bei den analytischen Arbeiten ist für geeigneten Schutz vor Lichteinwirkung zu sorgen, und die Standardlösungen sind vor Lichteinwirkung geschützt in Braunglasflaschen, Braunglasgefäßen oder mit Aluminiumfolie umhüllt aufzubewahren.

WARNUNG 2 — Einatmen und Kontakt mit den toxischen Standardmaterialien und deren Lösungen sind zu vermeiden. Bei der Handhabung der Lösemittel und Lösungen ist unter einem Laborabzug zu arbeiten. Dabei sind Schutzbrille und Schutzkleidung zu tragen.

WARNUNG 3 — Beim Umgang mit Hydromatrix™ ist immer eine Sicherheitsmaske zu tragen.

Sofern nicht anders festgelegt, werden ausschließlich Reagenzien von anerkannter Analysequalität verwendet.

5.1 Protease mit der Fähigkeit, Carotinoide aus ihrer eingekapselten Form freizusetzen.

ANMERKUNG Geeignete Proteasen sind im Handel erhältlich.¹

5.2 Gereinigtes Wasser, z. B. mit einer Milli-Q-Anlage oder einer ähnlichen Anlage gereinigt².

5.3 Butylhydroxytoluol (BHT).

5.4 Hochreine, für Flüssigextraktion unter Druck (PLE) geeignete Kieselgur, z. B. Hydromatrix™, als loses Stützmaterial².

5.5 Aceton, HPLC-Reinheitsgrad.

5.6 Aceton, für Spektroskopie geeignet³.

5.7 Acetonitril, HPLC-Reinheitsgrad.

5.8 Methyl-tert-butylether (tBME), HPLC-Reinheitsgrad.

5.9 Tetrahydrofuran, mit 250 ppm bis 350 ppm BHT stabilisiert, HPLC-Reinheitsgrad.

5.10 n-Hexan, für Spektroskopie geeignet³.

5.11 Ethanol, für Spektroskopie geeignet³.

5.12 Cyclohexan, für Spektroskopie geeignet³.

5.13 Mobile Phase für HPLC.

5.13.1 Phase A: Gemisch Acetonitril : Methyl-tert-butylether : Wasser von 70 : 20 : 10 (v:v:v), stabilisiert mit 1 000 ppm BHT.

1 Bei der Validierung wurden Alcalase® und Multifect PR 6L erfolgreich eingesetzt.

2 Milli-Q, Hydromatrix™, Alcalase® und Multifect PR 6L sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angaben dienen nur der Information der Anwender dieses Dokuments und stellen keine Anerkennung dieser Produkte durch CEN dar.

3 Der genaue Reinheitsgrad zur Eignung für die Spektroskopie hängt von dem Carotinoid ab, für das die UV-Standardisierung der Standardlösung durchgeführt wird (5.15.2).

Mit einem Messzylinder (6.17) werden 700 ml Acetonitril (5.7) in eine 1 000-ml-Flasche überführt. 200 ml Methyl-tert-butylether (5.8) werden abgemessen (6.17) und hinzugefügt; anschließend werden 100 ml Wasser (5.2) hinzugegeben. 1,0 g BHT (5.3) wird hinzugegeben. In einem Ultraschallbad (6.11) wird die Lösung für 10 min gemischt und entgast. Diese mobile Phase ist 28 Tage stabil.

ANMERKUNG Die Retentionszeit der Carotinoide wird durch geringe Unterschiede in der Zusammensetzung der mobilen Phase A stark beeinflusst. Die Verwendung einer HPLC-Qualitätskontrollprobe (9.1) ist von entscheidender Bedeutung für die korrekte Zuordnung der erhaltenen Signale. Darüber hinaus könnte die Anwesenheit von Nichtziel-Carotinoiden die Signale der Zielanalyten stören, wenn die Zusammensetzung der mobilen Phase A von der in 5.13.1 festgelegten abweicht.

5.13.2 Phase B: Gemisch Acetonitril : Methyl-tert-butylether von 70 : 30 (v:v).

Mit einem Messzylinder (6.17) werden 700 ml Acetonitril (5.7) in eine 1 000-ml-Flasche überführt. 300 ml Methyl-tert-butylether (5.8) werden abgemessen (6.17) und hinzugegeben. 1,0 g BHT (5.3) wird hinzugegeben. In einem Ultraschallbad (6.11) wird die Lösung für 10 min gemischt und entgast. Diese mobile Phase ist 28 Tage stabil.

5.14 Referenzstandards.

Garantierte Reinheit, die für jede Charge der Referenzstandards erforderlich ist:

5.14.1 Astaxanthin (AXN), Reinheit ≥ 97 %.

5.14.2 Canthaxanthin (CXN), Reinheit ≥ 97 %.

5.14.3 Adonirubin (ADR), Reinheit ≥ 97 %.

5.14.4 Astaxanthindimethyldisuccinat (AXN-DMDS), Reinheit ≥ 95 %.

5.14.5 Capsanthin (CSN), Reinheit ≥ 95 %.

5.14.6 Beta-Apo-8'-Carotinsäureethylester (BACARE), Reinheit ≥ 95 %.

5.14.7 Lutein (LUT), Reinheit ≥ 95 %.

5.14.8 Citranaxanthin (CIXN), Reinheit ≥ 95 %.

5.14.9 Zeaxanthin (ZEA), Reinheit ≥ 95 %.

5.14.10 Beta-Carotin (BCAR), Reinheit ≥ 95 %.

5.15 Standardlösungen.

Alle Standardlösungen sind vor Lichteinwirkung zu schützen.

5.15.1 Carotinoid-Standard-Stammlösungen, etwa 200 µg/ml.

Die Lösungen sind immer frisch herzustellen und sofort für die Messung zu verwenden.

ANMERKUNG Mögliche zu untersuchende Carotinoide sind Astaxanthin (AXN), Canthaxanthin (CXN), Adonirubin (ADR), Astaxanthindimethyldisuccinat (AXN-DMDS), Capsanthin (CSN), Beta-Apo-8'-Carotinsäureethylester (BACARE), Citranaxanthin (CIXN), Lutein (LUT), Zeaxanthin (ZEA) und Beta-Carotin (BCAR).

5.15.1.1 Lagerbehälter bei Lagerung von mehr als 1,0 mg.

Wenn der Lagerbehälter mehr als 1,0 mg des gewählten Carotinoids enthält (siehe 5.14.1 oder 5.14.2 oder 5.14.3 oder 5.14.4 oder 5.14.5 oder 5.14.6 oder 5.14.7 oder 5.14.8 oder 5.14.9 oder 5.14.10, je nach gewähltem Carotinoid), ist eine 0,2-mg/ml-Standardlösung z. B. durch Einwaage von 1,0 mg dieses Carotinoids in einen 5-ml-Messkolben herzustellen (dabei ist die eingewogene Menge des Standards aufzuzeichnen).

Die Substanz wird in THF/BHT (5.9) gelöst und es wird mit demselben Lösemittel bis zur Markierung aufgefüllt. Die Lösung wird auf einem Vortex-Mischer (6.27) und in einem Ultraschallbad (6.11) gut gemischt. Der genaue Massenanteil muss mit einem Spektralphotometer (6.2), wie detailliert in 5.15.2 beschrieben, standardisiert werden. Falls erforderlich, wird ein Anteil von 1 ml für das Isomerisierungsverfahren (5.15.4) als Reserve zurückgestellt. Ein weiteres Aliquot ist für die Identifizierung des Analyten, wie in 9.5.3.2 beschrieben, als Reserve zurückzustellen und im Tiefkühlschrank aufzubewahren.

5.15.1.2 Lagerbehälter bei Lagerung von weniger als 1,0 mg.

Wenn für den Lagerbehälter einen Nenninhalt von 1,0 mg oder weniger des gewählten Carotinoids (siehe 5.14.1 oder 5.14.2 oder 5.14.3 oder 5.14.4 oder 5.14.5 oder 5.14.6 oder 5.14.7 oder 5.14.8 oder 5.14.9 oder 5.14.10, je nach gewähltem Carotinoid) festgelegt ist, wird der gesamte Inhalt quantitativ in einen 5-ml-Messkolben überführt. Die Substanz wird in THF/BHT (5.9) gelöst und es wird mit demselben Lösemittel bis zur Markierung aufgefüllt. Die Lösung wird auf einem Vortex-Mischer (6.27) und in einem Ultraschallbad (6.11) gut gemischt. Der genaue Massenanteil muss mit dem Spektralphotometer (6.2), wie detailliert in 5.15.2 beschrieben, standardisiert werden. Falls erforderlich, wird ein Anteil von 1 ml für das Isomerisierungsverfahren (5.15.4) als Reserve zurückgestellt. Ein weiteres Aliquot ist für die Identifizierung des Analyten, wie in 9.5.3.2 beschrieben, als Reserve zurückzustellen und im Tiefkühlschrank aufzubewahren.

5.15.2 UV-Standardisierung der Standardlösungen.

100 µl der gewählten Carotinoid-Standard-Stammlösung (5.15.1) werden mit der Pipette in einen 10-ml-Messkolben (6.8) gegeben und mit dem geeigneten Lösemittel bis zur Markierung aufgefüllt. Der Nennwert der erhaltenen Lösung beträgt etwa 2 µg/ml. Mit dem Spektralphotometer (6.2) wird das Spektrum dieser Lösung im Wellenlängenbereich von 300 nm bis 550 nm aufgenommen und beim Maximum dieses Scans wird außerdem die Absorption dieser Lösung gegen das reine Lösemittel gemessen. Das Maximum ist lösemittelspezifisch und ist als Näherungswert in Anhang A angegeben.

Der genaue Gehalt des gewählten Carotinoids ergibt sich nach Gleichung (1).

$$\text{Carotinoid } \mu\text{g/ml} = E_{\lambda\text{max}} \times 10\,000 / E^{1\%}_{1\text{cm}} \quad (1)$$

BEISPIEL Für alle E-Werte von AXN ist das in der Tabelle in Anhang A vorgeschlagene Lösemittel *n*-Hexan. Für dieses Lösemittel ist die Wellenlänge, bei der gemessen wird, ungefähr 470 nm und der Wert für $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ (oder $A^{1\%}_{1\text{cm}}$) beträgt 2 100.

Mit einer geeigneten Pipette werden 100 µl der Astaxanthin-Standard-Stammlösung (5.15.1) in einen 10-ml-Messkolben gegeben und mit *n*-Hexan bis zur Markierung aufgefüllt. Der Nennwert der erhaltenen Standard-Messlösung beträgt etwa 2 µg/ml. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen reines *n*-Hexan im Spektralphotometer (6.2), das auf die Wellenlänge des Absorptionsmaximums (etwa 470 nm) eingestellt ist, gemessen.

ANMERKUNG Das Lösemittel der gemessenen Lösung ist keine Reinsubstanz, da immer ein kleiner Rest von THF/BHT (5.8) vorhanden ist. Sein Effekt wird jedoch als vernachlässigbar angesehen, und daher wird derselbe tabellarische Extinktionskoeffizient angewendet, vorausgesetzt dass der Beitrag von THF/BHT (5.9) sehr gering ist (1 %).

Der Gehalt an AXN wird nach Gleichung (2) berechnet.

$$\text{AXN } \mu\text{g/ml} = E_{\text{max}} \times 10\,000 / 2\,100 \quad (2)$$

Eine Lösung derselben Konzentration, d. h. 100 µl der Astaxanthin-Standard-Stammlösung (5.15.1) in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und mit Aceton (5.5) bis zur Markierung aufgefüllt, muss zur gleichen Zeit in das HPLC-System (siehe 5.15.3.1) injiziert werden.

5.15.3 HPLC-Standard-Kalibrierkurve.

5.15.3.1 Carotinoid-Standard-Kalibrierkurve.

Mit einer geeigneten Pipette werden 100 µl der Carotinoid-Standard-Stammlösung (5.15.1) in einen 10-ml-Messkolben gegeben und mit Aceton (5.5) bis zur Markierung aufgefüllt.

5.15.4 Isomerisierung.

5.15.4.1 Allgemeines.

Es wird empfohlen, diesen Schritt durchzuführen, wenn Unklarheit hinsichtlich des Vorhandenseins möglicher Isomere besteht.

5.15.4.2 Isomerisierung der Standardlösungen.

Die nach 5.15.1.1 oder 5.15.1.2 hergestellten Standards könnten einer Isomerisierung unterzogen werden, um ein Profil der all-trans- und der cis-Isomere jedes Carotinoids, die in der Phase des Gleichgewichts vorhanden sind, zu erhalten.

In ein Flüssigchromatographie-(LC-)Fläschchen wird 1 ml Standard gefüllt. Das Fläschchen wird dicht verschlossen und es wird kontrolliert, dass das Septum gut und dicht schließt und die Verschlusskappe nicht drehbar ist. Das Fläschchen wird 2 h auf ungefähr 80 °C erhitzt, um das Gleichgewicht zwischen den Isomeren zu erreichen. Für diesen Zweck kann ein Blockheizgerät für LC-Fläschchen (6.30) verwendet werden.

Es wird eine verdünnte Lösung (z. B. 1 : 200) des isomerisierten Standards injiziert.

Der isomerisierte Standard ist bei Raumtemperatur mehrere Monate stabil.

5.16 Positive HPLC-Qualitätskontrollprobe (QCS).

Es werden ungefähr 0,8 mg AXN (5.14.1), 0,4 mg CXN (5.14.2) und 0,5 g BHT (5.3) in einen Rundbodenkolben (6.9) eingewogen. 200 ml eines 75 : 25-Gemischs (v:v) aus Aceton (5.5) und Wasser (5.2) werden hinzugegeben. Der Kolben wird mit einem Rückflusskühler (6.10) verbunden und in einen Heizmantel platziert oder in ein Heizbad (6.28) mit Magnetrührwerk (6.29) eingetaucht. Es wird bis zum Sieden erhitzt und für etwa 1,5 h bis 2 h refluxiert.

ANMERKUNG Alternativ kann das Gemisch in einem druckresistenten Röhrchen auf 80 °C erhitzt werden.

Bei dieser Reaktion kommt es zur Bildung eines stabilen Isomerenverhältnisses. Diese Lösung wird in einen 500-ml-Messkolben (6.8) überführt und das Volumen wird mit Aceton (5.5) aufgefüllt. Die Lösung wird gut gemischt und sofort danach in HPLC-Fläschchen überführt. Das Befüllen sollte schnell erfolgen und jedes befüllte Fläschchen sollte sofort verschlossen werden, um eine Verdampfung zu vermeiden. Die Fläschchen werden bei Raumtemperatur und vor Lichteinwirkung geschützt aufbewahrt.

6 Prüfeinrichtung

Übliche Laborgeräte und insbesondere Folgendes:

6.1 HPLC-System, bestehend aus dem Folgenden

6.1.1 Pumpe, pulsationsfrei, mit der eine Volumenfließrate von 0,1 ml/min bis 2,0 ml/min aufrechterhalten werden kann.

6.1.2 Injektionssystem, manuell oder Autosampler.

Bei Verwendung eines Autosamplers wird empfohlen, einen mit Kühlung zu verwenden, auch wenn ein solches Gerät nicht bei der Validierung des Verfahrens verwendet wurde.

6.1.3 UV/VIS-Detektor, mit variabler Wellenlänge, geeignet für zuverlässige Messungen bei 410 nm, oder ein UV/VIS-Photodiodenarray-Detektor (DAD).

6.1.4 Computerdatensystem.

6.1.5 Analytische Säule, Supelco® Suplex pKb-100 5 µm, 250 mm × 4,6 mm oder vergleichbar⁴.

6.1.6 Schutzsäule, 5 µm, 2 cm × 4 mm SUPELCOSIL™ Suplex™ pKb-100 Supelguard™ Cartridge oder vergleichbar⁴.

6.2 Spektralphotometer, mit einer Apertur von 1 mm.

6.3 Mahlgerät.

6.4 Sieb, mit 1 mm Maschenweite.

6.5 Waagen, darunter eine analytische Waage mit einer Kapazität von 10 g oder größer mit 0,1 mg Ablesbarkeit, sowie eine Waage mit einer Kapazität von 100 g oder größer mit 0,01 g Ablesbarkeit.

6.6 Polypropylenbehälter, 100 ml, mit Deckel.

6.7 Kolbenhubpipetten mit variablem Luftvolumen, geeignet für Pipettiervolumina von 50 µl bis 100 µl.

6.8 Glas-Messkolben, 5 ml, 10 ml, 150 ml, 500 ml und 1 000 ml.

6.9 Rundbodenkolben, 500 ml.

6.10 Allihn-Rückflusskühler.

6.11 Ultraschallbad, mit Temperaturregler.

6.12 Flachspatel.

⁴ Supelco® Suplex pKb-100, SUPELCOSIL™ Suplex™ pKb-100 Supelguard™ Cartridge, ASE 300 Dionex®, Büchi SpeedExtractor E-914, Eppendorf® Röhrchen und Techne Dri-Block Heizgeräte sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angaben dienen nur der Information der Anwender dieses Dokuments und stellen keine Anerkennung dieser Produkte durch CEN dar.

6.13 System für Lösemittlextraktion unter erhöhtem Druck (PLE), ASE 300 Dionex®, Büchi SpeedExtractor E-914 oder vergleichbar⁴.

6.14 PLE-Zellen, für das verwendete Extraktionssystem geeignet, 66 ml oder größer.

6.15 Zellulosefilter, für PLE-Zellen.

6.16 PLE-Fläschchen, für das verwendete Extraktionssystem geeignet, mit einem Mindestvolumen von 240 ml.

6.17 Messzylinder, 250 ml und 1 000 ml.

6.18 Mikrozentrifugenröhrchen mit Sicherheitsverschluss, 1,8 ml, Eppendorf® Röhrchen oder vergleichbar⁴.

6.19 Mikrozentrifuge.

6.20 HPLC-Glasfläschchen, 1,5 ml.

6.21 Bördelzange für HPLC-Glasfläschchen.

6.22 Zentrifuge.

6.23 Zentrifugenröhrchen, 50 ml oder 100 ml.

6.24 Ultraturrax Mixwerkzeug.

6.25 PLE-Trichter, für PLE-Zellen.

6.26 Pulvertrichter.

6.27 Vortex-Mischer.

6.28 Heizmantel oder Heizbad.

6.29 Magnetrührwerk.

6.30 Fläschchen-Blockheizgerät, Techne Dri-Block Heizgerät oder vergleichbar⁴.

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Labor eine wirklich repräsentative Probe des Produktes empfängt, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 6497 [3] angegeben.

8 Herstellung der Untersuchungsprobe

8.1 Allgemeines

Die Untersuchungsprobe wird nach EN ISO 6498 vorbereitet.

8.2 Laborprobe

Die Laborprobe (üblicherweise 50 g) wird so gemahlen, dass sie vollständig durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm (6.4) hindurchpasst oder bis eine feine Paste erhalten wird. Sie wird gründlich durchmischt.

8.3 Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe besteht aus einem repräsentativen und homogenisierten Aliquot der gemahlenen Laborprobe (8.2) von mindestens 10 g.

8.4 Prüfmenge

Es werden 5,0 g der gründlich gemischten Untersuchungsprobe (8.3) auf 0,1 g in einen 100-ml-Polypropylenbehälter (6.6) für das Extraktionsverfahren nach 9.3.1 oder in ein 50-ml- oder 100-ml-Zentrifugenröhrchen (6.23) für das Extraktionsverfahren nach 9.3.2 eingewogen. Die Masse in g wird notiert. Die Probe wird dem Analysenverfahren (Abschnitt 9) unterzogen.

9 Durchführung

9.1 Allgemeines

Das vollständige Verfahren (9.2, 9.3 und 9.4) sollte auf zwei Prüfmengen (8.4) derselben Untersuchungsprobe angewendet werden, um zwei unabhängige und parallele Bestimmungen durchzuführen.

Die Verwendung von Qualitätskontrollproben (QCS) wird empfohlen.

Die QCS (5.16) muss an jedem Untersuchungstag vor und nach der vollständigen Probenabfolge injiziert werden, um die Eignung des HPLC-/DAD-Systems zu bewerten.

Die QCS (5.16) enthält zwei Carotinoide:

- 1) CXN, ein stabiles und besser lösliches Carotinoid, sowie
- 2) AXN, ein weniger stabiles und weniger lösliches Carotinoid.

ANMERKUNG Je nach den zu bestimmenden Analyten kann ein relevantes Carotinoid zu diesem Gemisch hinzugefügt werden.

Das Gemisch wird solange isomerisiert, bis ein konstantes Verhältnis der Isomeren erreicht ist. Diese Lösung ist, sofern vor Sauerstoffeinwirkung geschützt, für mehrere Monate stabil.

9.2 Enzymatische Freisetzung

Zur Prüfmenge (8.4) werden 0,2 g BHT (5.3), 100 µl des Enzyms (5.1) und 15 ml gereinigtes Wasser (5.2) hinzugegeben. Das Gefäß wird dicht verschlossen und kräftig geschüttelt, um sicherzustellen, dass das Futtermittel vollständig von Wasser durchdrungen wird. Der Ansatz wird für 15 min bis 20 min in ein Ultraschallbad (6.11), das auf eine Temperatur von 50 °C eingestellt ist, gegeben und nach jeweils 5 min geschüttelt.

9.3 Extraktion

9.3.1 Extraktion mittels PLE

Nach Schritt 9.2 wird der Deckel vom Behälter mit der Prüfmenge abgenommen; dabei ist darauf zu achten, dass kein Tropfen der Probenflüssigkeit verloren geht. Es werden ungefähr 13 g hochreine Kieselgur, die für das PLE-Verfahren (5.4) geeignet ist, hinzugegeben, der Behälter wieder dicht verschlossen und kräftig von Hand geschüttelt, bis die nasse Futtermittelprobe vollständig an die Kieselgurkügelchen adsorbiert erscheint und sich gut von der Wandung des Polypropylenbehälters ablöst.

ANMERKUNG Der Vorgang kann durch Klopfen des Behälters auf den Tisch unter Umständen unterstützt werden.

Die Behälter werden vorsichtig geöffnet, wobei die gegebenenfalls am Deckel haftenden Probenpartikel mit einem Flachspatel (6.12) in den Behälter überführt werden. Es wird gut mit dem Spatel (6.12) gemischt, wobei sicherzustellen ist, dass keine Klümpchen der Probenpartikel mehr vorhanden sind. Auf den Boden der PLE-Zelle (6.14) werden zwei Zellulosefilter (6.15) eingebracht. Das gesamte Material wird mithilfe eines Trichters (6.25) in die PLE-Zelle (6.14) überführt. Falls erforderlich, wird mit Kieselgur (5.4) aufgefüllt. Die Zelle wird verschlossen und die Extraktion wird unter Anwendung der in Tabelle 1 angegebenen Parameter durchgeführt.

Tabelle 1 — Extraktionsparameter

Extraktionslösemittel	Aceton (5.5)
Druck (bar)	103,4
Druck (psi)	1 500
Temperatur (°C)	58
Aufheizzeit (min)	0
Heizzeit (min)	0
Statische Extraktionszeit (min)	7
Spülvolumen (%)	120
Spülzeit (s)	60
Statische Zyklen	3

Jede Futtermittelextraktion dauert ungefähr 30 min. Mit dem Gerät können bis zu 12 Proben automatisiert, z. B. über Nacht, verarbeitet werden.

Anschließend wird das Röhrchen mit dem Rohextrakt entnommen. Nach gutem Mischen wird das Gesamtvolumen des Extrakts (V_{ext}) mithilfe eines Messzylinders (6.17) bestimmt und dokumentiert.

9.3.2 Konventionelle Flüssig-Fest-Extraktion (SLE)

Nach Zugabe von 50 ml Aceton (5.5) wird 1 min geschüttelt. Es wird für 5 min bei 1 800 g bis 1 900 g zentrifugiert (6.22). Der Überstand (erster Extrakt) wird entnommen und in einen 150-ml-Messkolben (6.8) überführt.

Zum festen Niederschlag nach der ersten Extraktion werden 50 ml Aceton (5.5) gegeben. Falls erforderlich, wird das Ultra-Turrax Mixwerkzeug (6.24) verwendet, um eine Auflösung zu erreichen; dann wird für 1 min geschüttelt. Es wird für 5 min bei 1 800 g bis 1 900 g zentrifugiert (6.22). Der Überstand (zweiter Extrakt) wird entnommen und mit dem ersten Extrakt im 150-ml-Messkolben vereinigt.

Nach Zugabe von 40 ml Aceton (5.5) zum Niederschlag nach der zweiten Extraktion wird für 1 min geschüttelt. Es wird für 5 min bei 1 800 *g* bis 1 900 *g* zentrifugiert (6.22). Der Überstand (dritter Extrakt) wird entnommen und mit den beiden zuvor erhaltenen Extrakten im 150-ml-Messkolben vereinigt. Das Extraktionsvolumen (V_{ext}) wird mit Aceton aufgefüllt und es wird kräftig geschüttelt.

Wenn die Verwendung von 100-ml-Zentrifugenröhrchen nicht möglich ist, dürfen die gebräuchlicheren 50-ml-Zentrifugenröhrchen verwendet werden. In diesem Fall müssen allerdings die drei Extraktionsschritte mit 50 ml Aceton durch *vier* Extraktionsschritte mit jeweils 35 ml bis 37 ml Aceton (5.5) ersetzt werden.

Gleichmaßen gilt, wenn ein 150-ml-Messkolben (6.8) nicht verfügbar ist, wird das Endvolumen V_{ext} (10) mit einem Messzylinder (6.17) bestimmt und dokumentiert.

Ein 1,8-ml-Aliquot des Rohextrakts wird in ein Mikrozentrifugenröhrchen mit Sicherheitsverschluss (6.18) überführt.

9.4 Zentrifugation

Die Zentrifuge (6.19) wird für 1 min bei hoher Geschwindigkeit (z. B. 13 000 *g*) betrieben.

ANMERKUNG Alternativ wird der Extrakt durch ein 0,45- μm -Membranfilter (das für Aceton geeignet ist) filtriert.

Der Überstand wird in ein HPLC-Braunglasfläschchen (6.20) überführt; anschließend wird die HPLC-Analyse (9.5) durchgeführt.

9.5 HPLC-Analyse

9.5.1 Analysebedingungen

Die folgenden Bedingungen dienen als Richtwerte. Andere Bedingungen dürfen verwendet werden, sofern sie zu gleichwertigen Ergebnissen führen.

9.5.1.1 HPLC-Säule, wie in 6.1.5.

9.5.1.2 Schutzsäule, wie in 6.1.6.

9.5.1.3 Mobile Phase, wie in 5.13, Fließrate: 0,5 ml/min.

9.5.1.4 Injektionsvolumen, 5 μl .

9.5.1.5 Säulentemperatur, 20 °C.

9.5.1.6 Detektionswellenlänge, isosbestische Wellenlänge 410 nm [4].

9.5.2 HPLC-Bestimmung

9.5.2.1 Carotinoid-Elution

Die Elution der Carotinoide wird im Gradientenmodus durchgeführt. Der dabei anzuwendende Gradient ist in Tabelle 2 angegeben.

9.5.2.2 Externe Kalibrierkurven

Jede Kalibrierlösung (5.15.3) wird sofort nach der Herstellung in das HPLC-System (6.1) injiziert und parallel dazu für die spektralphotometrischen Standardisierung (5.15.2) eingesetzt. Die Peakfläche, *A*, wird notiert.

Die Konzentration dieser Lösung, c , zur Peakfläche in Bezug gesetzt, entspricht dem exakten Gehalt (in $\mu\text{g/ml}$), der mit dem Spektralphotometer bestimmt wird.

Die Regressionsgerade der Kalibrierkurve wird anhand der folgenden beiden Punkte gezeichnet:

- Kalibrierpunkt 1: Konzentration 0 $\mu\text{g/ml}$; Fläche 0 (willkürliche Einheit, AU [en: Arbitrary Unit]);
- Kalibrierpunkt 2: Konzentration c = genauer Gehalt, mit Spektralphotometer bestimmt, in $\mu\text{g/ml}$; bestimmte Fläche A , in AU.

Die Gleichung der Regressionsgeraden der Kalibrierung wird nach Gleichung (3) berechnet.

$$a = \frac{A}{c} \quad (3)$$

Dabei ist

- a der mit den Standardlösungen erhaltene Steigungskoeffizient der Kalibrierkurve;
- A die Peakfläche;
- c die Konzentration der Lösung, in $\mu\text{g/ml}$.

Tabelle 2 — Elutionsgradient

Zeit min	% der mobilen Phase A	% der mobilen Phase B
0	100	0
10	100	0
14	40	60
30	40	60
30,1	100	0
45	100	0

Unter diesen Bedingungen sollten die Retentionszeiten für die verschiedenen Carotinoide ungefähr den Werten in Tabelle 3 entsprechen.

Tabelle 3 — Ungefähre Retentionszeiten bei den in 9.5.1 festgelegten Einstellungen

Carotinoid	Retentionszeit min
AXN-DMDS, Astaxanthindimethyldisuccinat	8,0
AXN, Astaxanthin	13,5
ADR, Adonirubin	14,5
CXN, Canthaxanthin	15,8
CSN, Capsanthin	18,6

Carotinoid	Retentionszeit min
CIXN, Citranaxanthin	20,9
BACARE, Beta-Apo-8'-Carotinsäureethylester	21,4
LUT, Lutein	24,5
ZEA, Zeaxanthin	25,8
BCAR, Beta-Carotin	32,0

9.5.2.3 Qualitätskontrollprobe

Unmittelbar nach der Herstellung (5.16) wird ein Fläschchen, das die Qualitätskontrollprobe (QCS) (5.16) enthält, für die Injektion eingesetzt und damit die Eignung des gesamten HPLC-Systems bestätigt. Die Peakflächen der beiden in der Probe enthaltenen Carotinoide und ihre zugehörigen Retentionszeiten werden aufgezeichnet. Diese Werte bilden die REFERENZ ($Fläche_{Referenz\ i}$ und $Rt_{Referenz\ i}$; dabei hat i den Wert 1 oder 2 (2 entspricht der Gesamtzahl der Carotinoide in der QCS-Lösung)).

Vor der Analyse einer unbekannten Probe wird eine Probe aus dem QCS-Fläschchen injiziert, die für die beiden Analyten in der QCS erhaltenen Flächen und Retentionszeiten werden aufgezeichnet und mit den Referenzwerten (Fläche und Retentionszeit) verglichen. Am Ende der Probenabfolge wird ein neues QCS-Fläschchen für die Injektion eingesetzt, um zu bestätigen, dass die Eignung des HPLC-Systems nach wie vor annehmbar ist.

9.5.2.4 Probenextrakte

Jeder Probenextrakt, der in Schritt (9.3.1) oder (9.3.2) erhalten wird, wird injiziert. Die Peakflächen für die Signale der Carotinoide werden aufgezeichnet.

9.5.3 Kriterien für die Annahme des Analyseergebnisses

9.5.3.1 Annahme eines HPLC-Laufs

Vor und nach Durchführung einer Analyse muss immer eine QCS injiziert werden. Für die Annahme der Versuche müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- Die Flächen der AXN- und CXN-Peaks der QCS müssen zu den entsprechenden Flächen der Referenzprobe (9.5.2.3) gleich sein ($\pm 8\%$).
- Die Retentionszeiten der AXN- und CXN-Peaks der QCS müssen zu den entsprechenden Retentionszeiten der Referenzprobe (9.5.2.3) gleich sein ($\pm 8\%$).

Werden die Kriterien nicht erfüllt, ist eine neue Kalibrierung erforderlich.

ANMERKUNG Wenn das System stabile Werte liefert, kann es problemlos mindestens 3 Monate betrieben werden, ohne eine neue Kalibrierung vornehmen zu müssen.

- Die Retentionszeiten der AXN- und CXN-Peaks des Probenextrakts (9.5.2.4) müssen zu den entsprechenden Retentionszeiten der QCS (9.5.2.3) gleich sein ($\pm 5\%$).
- Die Retentionszeiten der AXN- und CXN-Peaks des ersten Probenextraktes (9.5.2.4) in der Probenabfolge müssen zu den entsprechenden Retentionszeiten des letzten Probenextraktes (9.5.2.4) gleich sein ($\pm 2\%$).

Bei sehr langen Probenabfolgen sollte eine QCS-Probe als neue Referenz zum Vergleich der Retentionszeiten eingefügt werden. Der nächste injizierte Probenextrakt würde somit auch zur neuen Referenz für den Vergleich der Retentionszeiten werden. Das Kriterium ist gültig, solange keine Veränderung vorgenommen wird, wenn z. B. dieselbe Charge der mobilen Phase für die gesamte Probenabfolge verwendet wird.

Die Proben sollten die Identifizierungskriterien (9.5.3.2) erfüllen.

9.5.3.2 Identifizierungskriterien

Für einen zu untersuchenden Analyten können unter Umständen verschiedene Isomere existieren (siehe Anhang A).

Es wird eine geeignete Verdünnung des im Tiefkühlschrank aufbewahrten Standards, wie in 5.15.1.1 und 5.15.1.2 beschrieben, injiziert. Die in der Probe vorhandenen Analyten können entweder einzeln oder als Gemisch injiziert werden.

Die Identität der Analyten (einschließlich aller Isomere, siehe Anhang A) wird bestätigt, wenn die folgenden beiden Kriterien erfüllt werden.

- 1) Die Retentionszeiten der Probenpeaks müssen zu den Retentionszeiten der Peaks der Standards gleich sein ($\pm 8 \%$).
- 2) Die jeweils am Scheitelpunkt des Peaks aufgezeichneten Differenzspektren der Proben- und Standard-Peaks dürfen sich bei visueller Prüfung hinsichtlich der Spektrenanteile, die eine relative Absorption von mindestens 10 % (zwischen 10 % und 100 % in einem normalisierten Spektrum) aufweisen, nicht unterscheiden. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn
 - a) innerhalb einer Spanne, die durch die Auflösung des Detektionssystems (4 nm) festgelegt ist, dieselben Maxima vorhanden sind und
 - b) bei den Wellenlängen dieser bestimmten Maxima die relative Abweichung zwischen den beiden Spektren (Probe zu Standard), verglichen mit der Absorption des als Standard verwendeten Analyten, nicht größer ist als 25 %.

Zusätzlich kann, wenn die dazu notwendige Software und Fachkenntnisse verfügbar sind, auch das folgende Kriterium angewendet werden.

- 3) Die Reinheit des Probenpeaks wird auf der Grundlage der Übereinstimmung der Differenzspektren beurteilt, die am Scheitelpunkt sowie an Wendepunkten des aufsteigenden und des absteigenden Kurvenasts aufgezeichnet werden. Für die Anteile der Spektren, die eine relative Absorption von mindestens 10 % (zwischen 10 % und 100 % in einem normalisierten Spektrum) aufweisen, muss für alle Spektren die relative Absorption bei jeder Wellenlänge gleich (innerhalb von 25 %) sein.

10 Berechnung

Der Gehalt des Ziel-Carotinoids in den unbekannten Proben wird durch Vergleichen der Peakfläche des injizierten Probenextraktes mit der Peakfläche der Standards, die zur Erstellung der externen Kalibrierkurve (9.5.2.2) verwendet wurden, berechnet.

Zur Berechnung des Gehalts an Ziel-Carotinoid in der Probe in Milligramm je Kilogramm (mg/kg) (C_{TC}) dient Gleichung (4).

$$C_{TC} = \frac{A_{TC}}{a} \times \frac{V_{ext}}{m} \quad (4)$$

Dabei ist

- C_{TC} der anfängliche Massenanteil des Ziel-Carotinoids in der Futtermittelprobe, in mg/kg;
- A_{TC} die Summe der Flächen der HPLC-Peaks für die verschiedenen Isomere des Ziel-Carotinoids (AU);
- a der mit den Standardlösungen erhaltene Steigungskoeffizient der Kalibrierkurve (siehe Gleichung (3));
- V_{ext} das Gesamtvolumen des Extraktes, in ml;
- BEISPIEL Dieses Volumen beträgt 150 ml, wenn ein 150-ml-Messkolben verwendet wird.
- m die Masse der Prüfmenge, in g.

11 Prüfbericht

11.1 Ringversuch

Einzelheiten des vom JRC in Geel (Belgien) organisierten Ringversuchs zur Untersuchung der Präzision des Verfahrens sind in A.3 angegeben.

11.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei voneinander unabhängigen, parallel bestimmten einzelnen Untersuchungsergebnissen, die unter Anwendung desselben Verfahrens an identischem Untersuchungsmaterial im selben Laboratorium durch denselben Bearbeiter mit derselben Geräteausrüstung in kurzen Zeitabständen erhalten wurde und als Prozentsatz des bestimmten Mittelwerts ausgedrückt wird, wird in nicht mehr als in 5 % der Fälle die Wiederholgrenze (r) überschreiten, die aus Gleichung (5) hergeleitet wird.

$$r = 2 \times \sqrt{2} \times RSD_r = 2,8 \times RSD_r \quad (5)$$

Dabei ist

- r die Wiederholgrenze;
- RSD_r die Standardabweichung der Wiederholpräzision.

11.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei voneinander unabhängigen, parallel bestimmten einzelnen Untersuchungsergebnissen, die unter Anwendung desselben Verfahrens an identischem Untersuchungsmaterial an verschiedenen Tagen von verschiedenen Bearbeitern mit verschiedener Geräteausrüstung erhalten wurde und als Prozentsatz des bestimmten Mittelwerts ausgedrückt wird, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Vergleichgrenze (R) überschreiten, die aus Gleichung (6) hergeleitet wird.

$$r = 2 \times \sqrt{2} \times RSD_R = 2,8 \times RSD_R \quad (6)$$

Dabei ist

- R die Vergleichgrenze;
- RSD_R die Standardabweichung der Vergleichpräzision.

12 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

- a) sämtliche zur vollständigen Identifizierung der Probe notwendigen Angaben;
- b) das angewendete Probenahmeverfahren, sofern bekannt;
- c) sämtliche zur vollständigen Identifizierung der Kalibriersubstanzen notwendigen Angaben;
- d) das angewendete Prüfverfahren mit Verweisung auf dieses Protokoll;
- e) alle in diesem Protokoll nicht festgelegten oder als optional angesehenen Betriebsbedingungen, einschließlich Einzelheiten zu allen Zwischenfällen, die das (die) Prüfergebnis(se) beeinflusst haben könnten;
- f) die erhaltenen Prüfergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- g) die mit dem/den Prüfergebnis(en) in Verbindung stehende Unsicherheit;
- h) das Prüfdatum;
- i) wenn die Wiederholpräzision überprüft wurde, das vorliegende Endergebnis;
- j) wenn die Richtigkeit überprüft wurde, das vorliegende Endergebnis.

Anhang A (informativ)

Ergänzende Geräte- und analytische Informationen

A.1 Werte der Absorptionskoeffizienten

Für Carotinoide in Lösung gilt das Lambert-Beersche Gesetz, wonach ihre Absorption proportional zu ihrer Konzentration ist.

Werte der Absorptionskoeffizienten $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (oder $A^{1\%}_{1\text{ cm}}$), die jeweils für ein bestimmtes Lösemittel angegeben werden, sind in der Literatur veröffentlicht (z. B. in [5], in den USP- und JECFA-Monographien [6], [7], [8]).

Aus Zweckmäßigkeitsgründen werden die Werte der Absorptionskoeffizienten, die während der laborinternen Validierung verwendet wurden, zusammen mit dem jeweiligen Lösemittel sowie den Werten für λ_{max} und den Koeffizienten der Kalibrierkurve, der üblicherweise erhalten wird, in Tabelle A.1 zusammenfassend angegeben. Andere Werte, die entweder aus veröffentlichten Artikeln entnommen oder experimentell bestimmt wurden, können unter Umständen ebenfalls geeignet sein, um die genaue Konzentration zu bestimmen.

Tabelle A.1 — Werte der Absorptionskoeffizienten

Analyt	Verwendetes Lösemittel	$A^{1\%}_{1\text{cm}}$ oder $E^{1\%}_{1\text{cm}}$	λ_{max}^a nm
AXN	<i>n</i> -Hexan ^b	2 100	470
AXN DMDS	<i>n</i> -Hexan ^c	1 519	470
CXN	Cyclohexan ^d	2 200	466
ADR	Cyclohexan ^e	2 150	476
CIXN	Cyclohexan ^f	2 680	473
CSN	Aceton ^g	2 157	470
LUT	Ethanol ^h	2 550	445
ZEA	Ethanol ⁱ	2 480	450
BACARE	Cyclohexan ^j	2 550	449
BCAR	Cyclohexan ^f	2 500	455

^a Es handelt sich um Näherungswerte.

^b Aus Britton et al. [5], Nr. 404 bis 406.

^c Abgeleitet aus dem Wert $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ für Astaxanthin unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Molekulargewichte.

^d Aus der JECFA-Monographie, 51. JECFA [6].

^e Abgeleitet aus dem Wert $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ für Astaxanthin und Canthaxanthin.

^f Aus der JECFA-Monographie, 31. JECFA [7].

^g Alternativ zur Verwendung von Benzol ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$ 2 072; λ_{max} etwa 483 nm).

^h US Pharmacopeia, 2009 USPC Official 8/1/09 – 11/30/09 Dietary Supplements: Lutein.

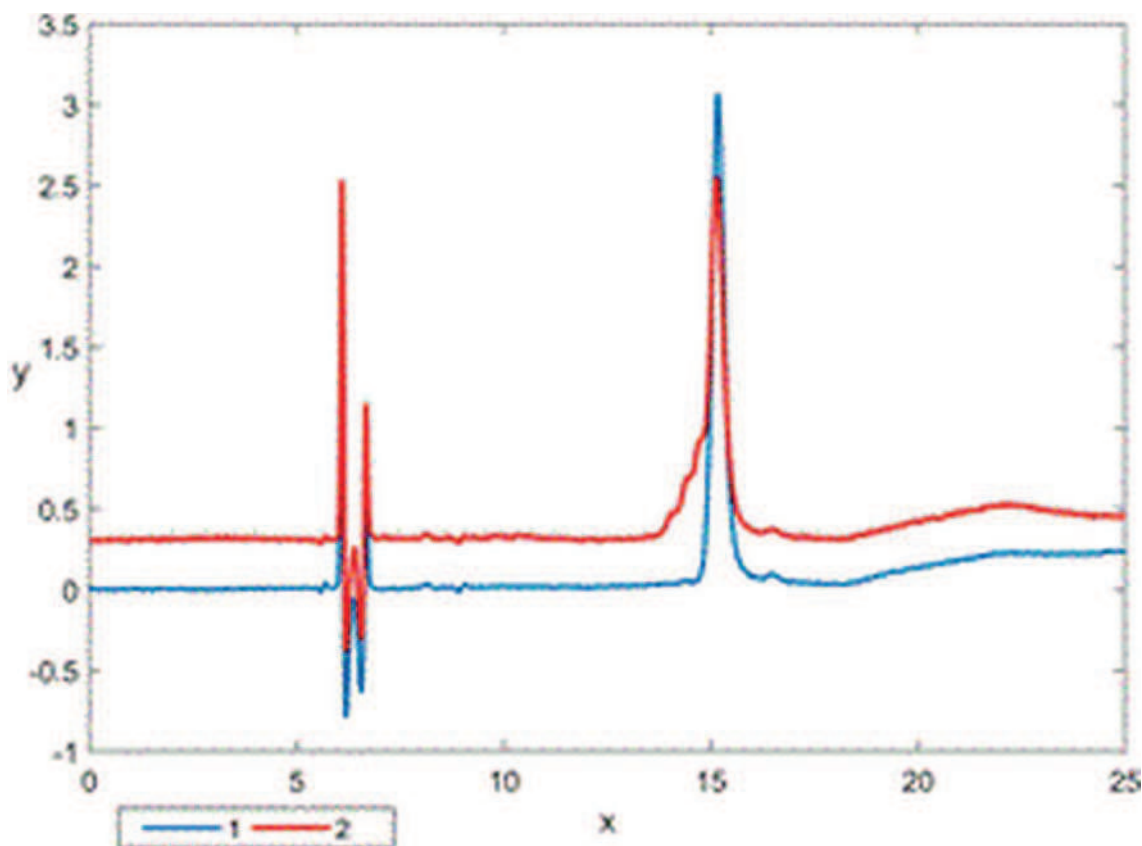
ⁱ Aus Britton et al. [5], Nr. 119.

^j Aus der JECFA-Monographie, 74. JECFA [8].

A.2 Beispiele für Muster chromatographischer Profile von isomerisierten Carotinoiden

In Bild A.1 bis Bild A.10 sind Beispiele von Profilen gezeigt, die beim Auftreten von Isomerisierung erhalten werden.

In Bild A.11 und Bild A.12 sind die Profile der isomerisierten Carotinoide kombiniert.



Legende

X Retentionszeit, in min

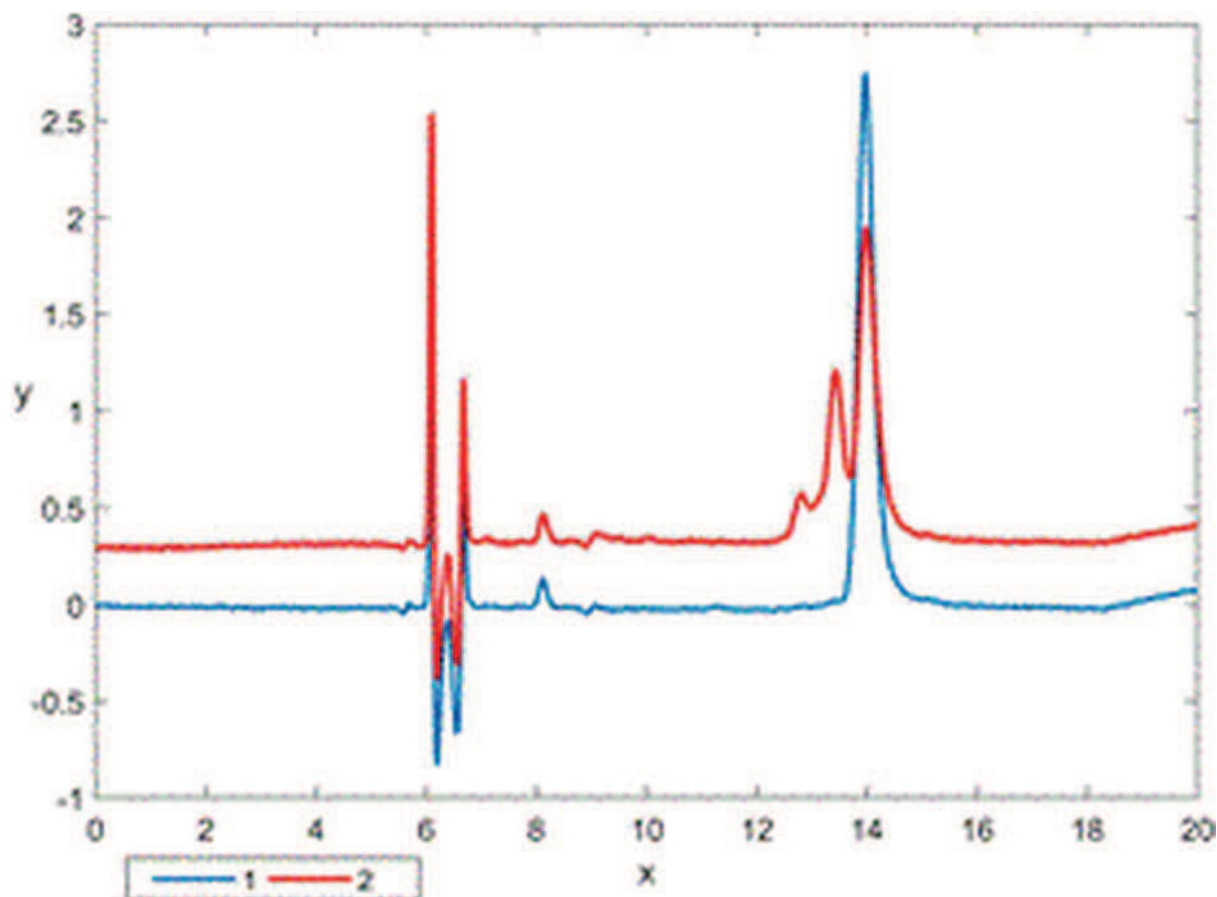
Y Ansprechen (Response), in AU

1 vor Isomerisierung

2 nach Isomerisierung derselben Lösung des untersuchten Carotinoids

ANMERKUNG Bei Schwarz-Weiß-Kopien dieses Dokuments: Die Linie, die zu Beginn unter der anderen Linie verläuft, gehört zu Nummer 1 und ist blau; die darüber verlaufende gehört zu Nummer 2 und ist rot. Im Peak bei etwa 15 min übersteigt Linie 1 die Linie 2.

Bild A.1 — Chromatographisches Profil reiner Standardlösungen von ADR, einschließlich Identifizierung der Peaks



Legende

X Retentionszeit, in min

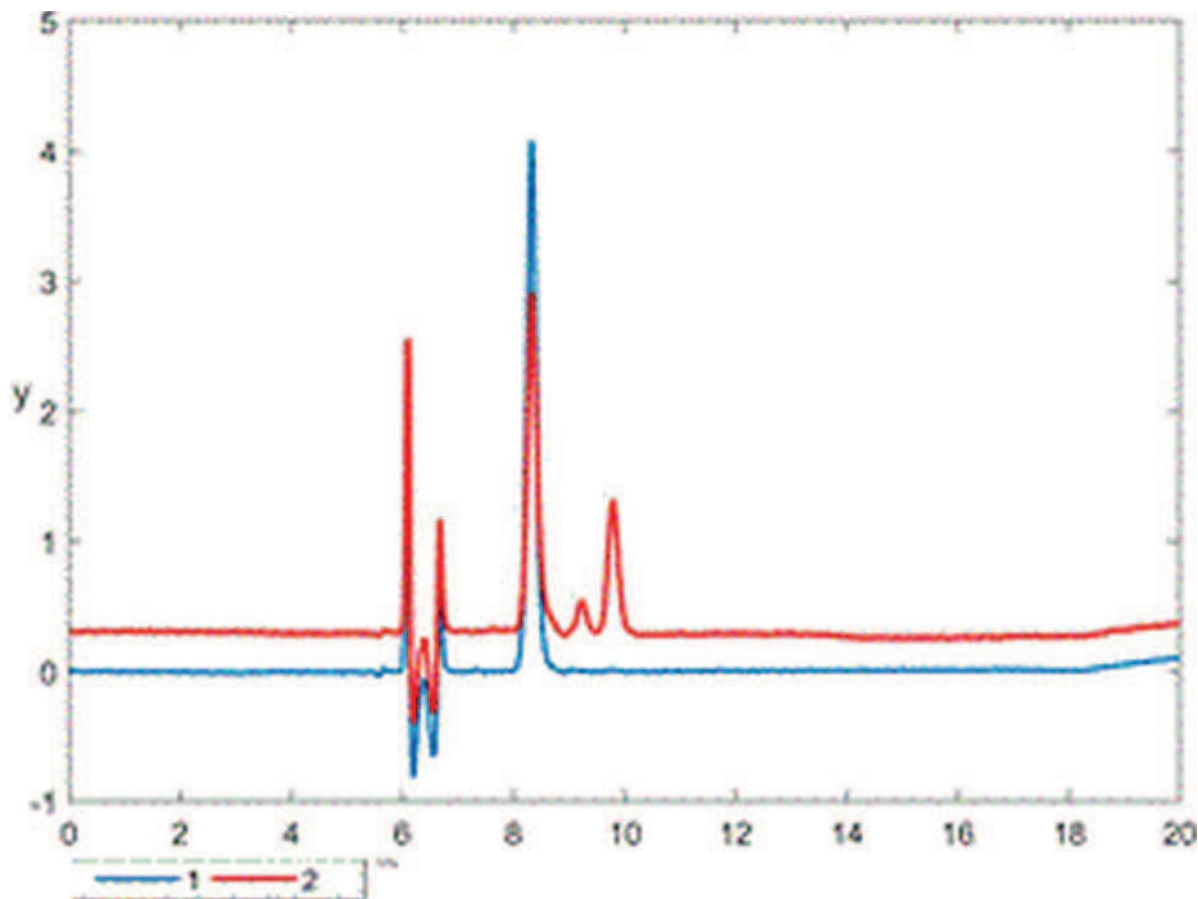
Y Ansprechen (Response), in AU

1 vor Isomerisierung

2 nach Isomerisierung derselben Lösung des untersuchten Carotinoids

ANMERKUNG Bei Schwarz-Weiß-Kopien dieses Dokuments: Die Linie, die zu Beginn unter der anderen Linie verläuft, gehört zu Nummer 1 und ist blau; die darüber verlaufende gehört zu Nummer 2 und ist rot. Im Peak bei etwa 14 min übersteigt Linie 1 die Linie 2.

Bild A.2 — Chromatographisches Profil reiner Standardlösungen von AXN, einschließlich Identifizierung der Peaks



Legende

X Retentionszeit, in min

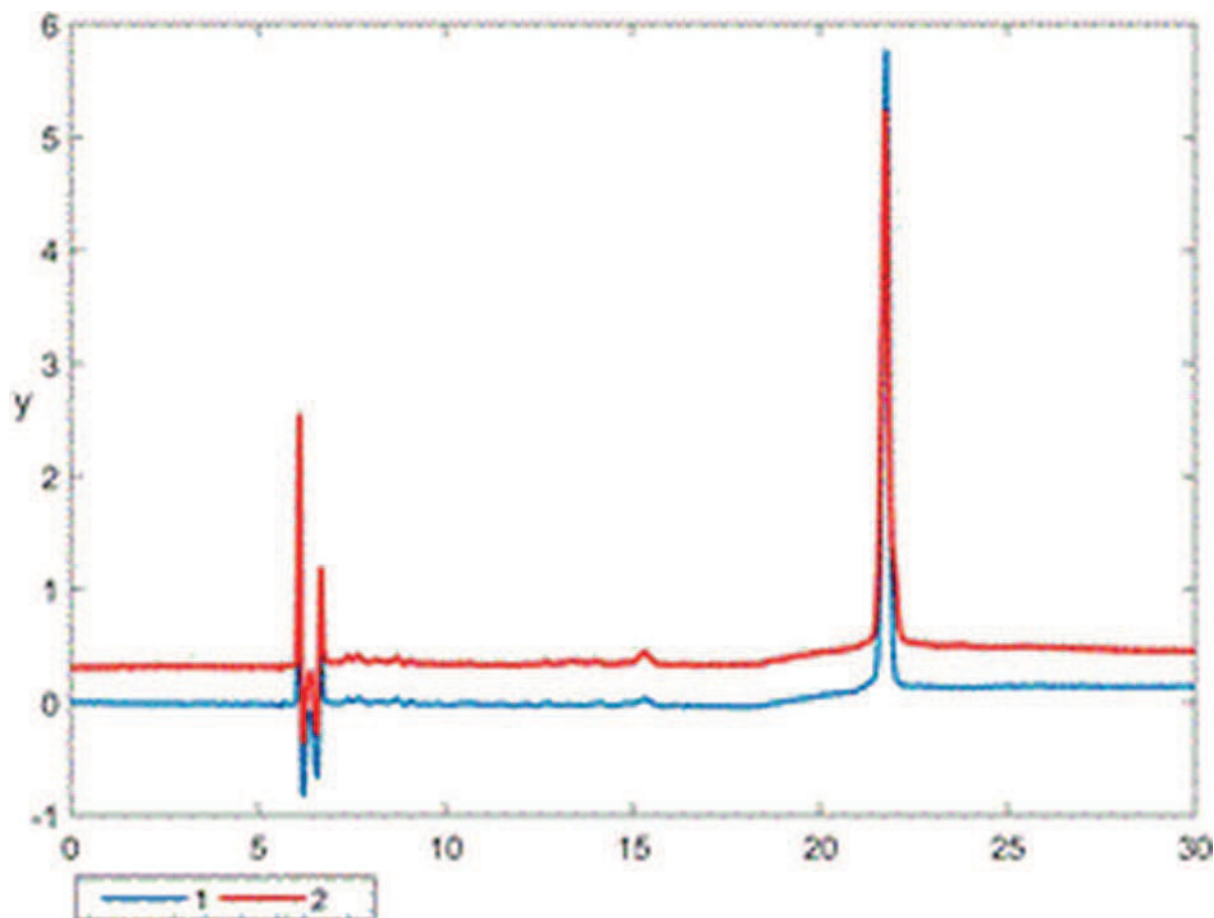
Y Ansprechen (Response), in AU

1 vor Isomerisierung

2 nach Isomerisierung derselben Lösung des untersuchten Carotinoids

ANMERKUNG Bei Schwarz-Weiß-Kopien dieses Dokuments: Die Linie, die zu Beginn unter der anderen Linie verläuft, gehört zu Nummer 1 und ist blau; die darüber verlaufende gehört zu Nummer 2 und ist rot. Im Peak bei etwa 8 min übersteigt Linie 1 die Linie 2.

Bild A.3 — Chromatographisches Profil reiner Standardlösungen von AXN-DMDS, einschließlich Identifizierung der Peaks



Legende

X Retentionszeit, in min

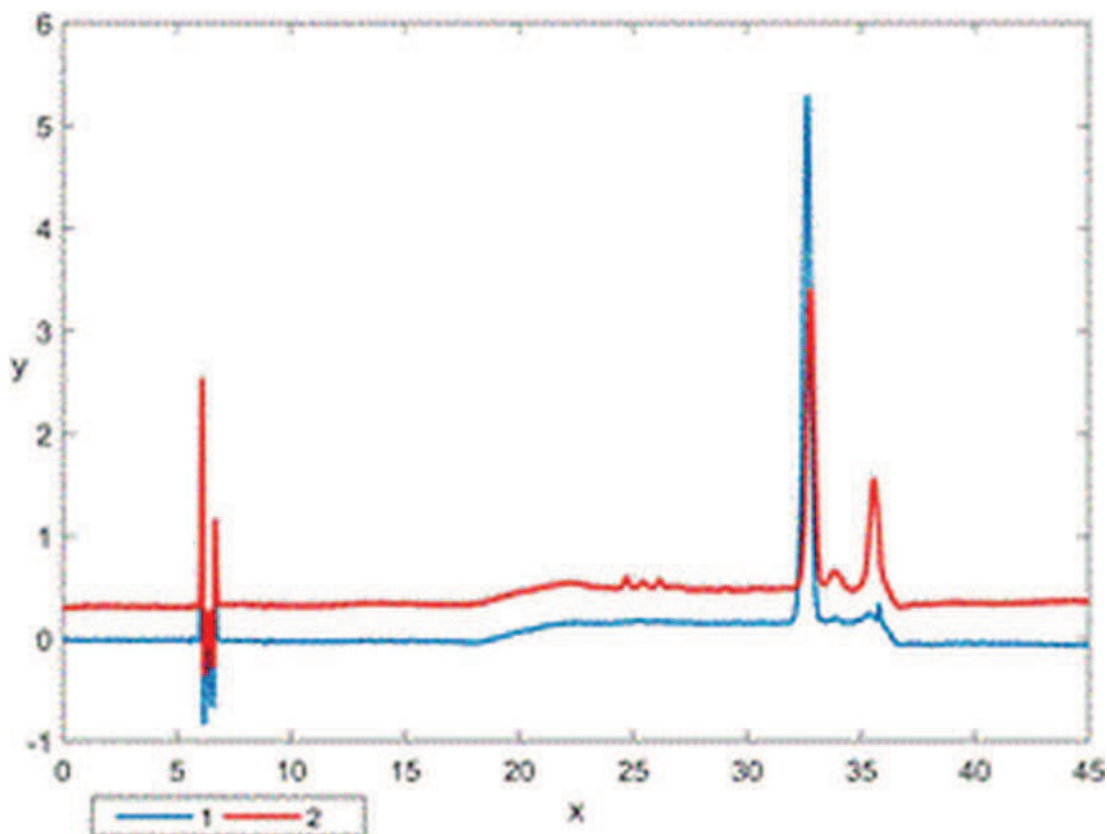
Y Ansprechen (Response), in AU

1 vor Isomerisierung

2 nach Isomerisierung derselben Lösung des untersuchten Carotinoids

ANMERKUNG Bei Schwarz-Weiß-Kopien dieses Dokuments: Die Linie, die zu Beginn unter der anderen Linie verläuft, gehört zu Nummer 1 und ist blau; die darüber verlaufende gehört zu Nummer 2 und ist rot. Im Peak bei etwa 22 min übersteigt Linie 1 die Linie 2.

Bild A.4 — Chromatographisches Profil reiner Standardlösungen von BACARE, einschließlich Identifizierung der Peaks



Legende

X Retentionszeit, in min

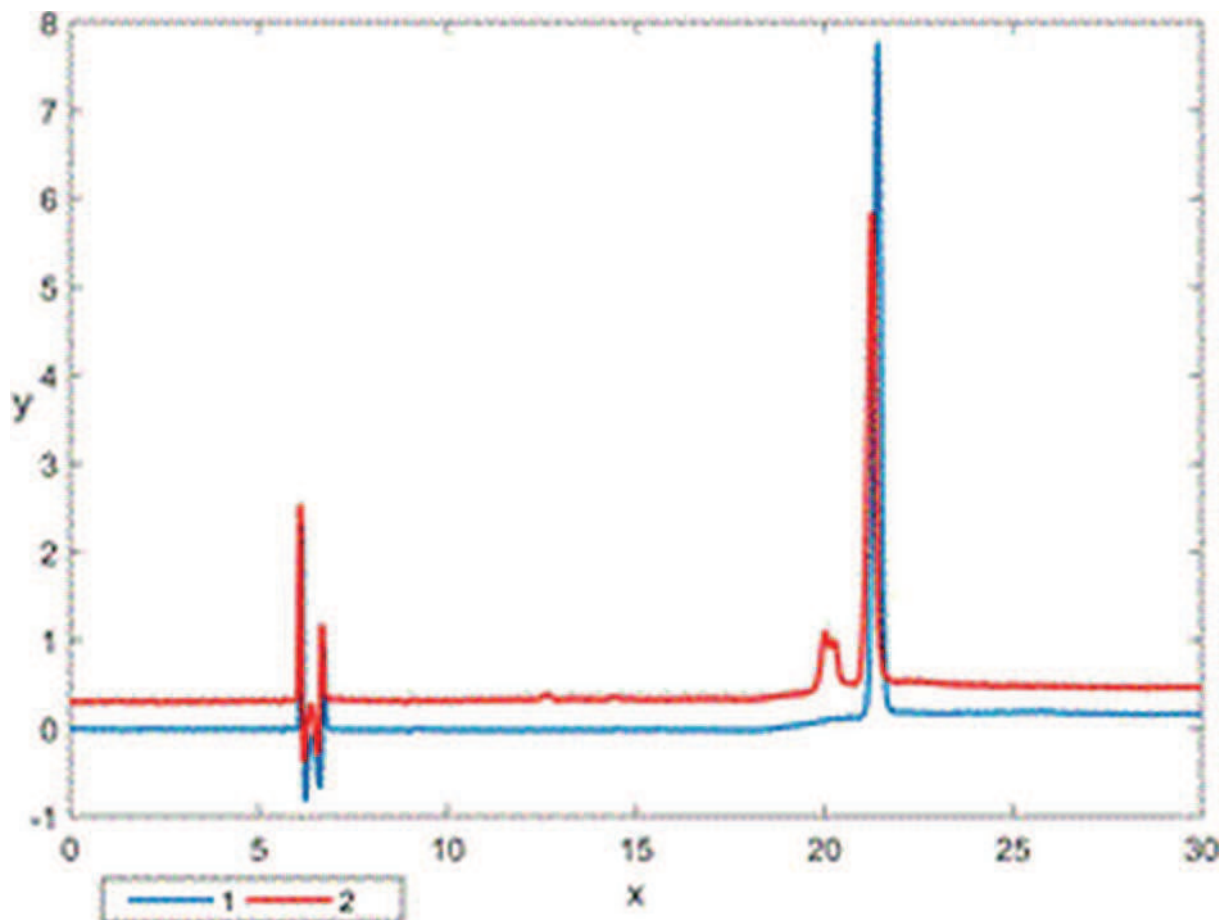
Y Ansprechen (Response), in AU

1 vor Isomerisierung

2 nach Isomerisierung derselben Lösung des untersuchten Carotinoids

ANMERKUNG Bei Schwarz-Weiß-Kopien dieses Dokuments: Die Linie, die zu Beginn unter der anderen Linie verläuft, gehört zu Nummer 1 und ist blau; die darüber verlaufende gehört zu Nummer 2 und ist rot. Im Peak bei etwa 33 min übersteigt Linie 1 die Linie 2.

Bild A.5 — Chromatographisches Profil reiner Standardlösungen von BCAR, einschließlich Identifizierung der Peaks



Legende

X Retentionszeit, in min

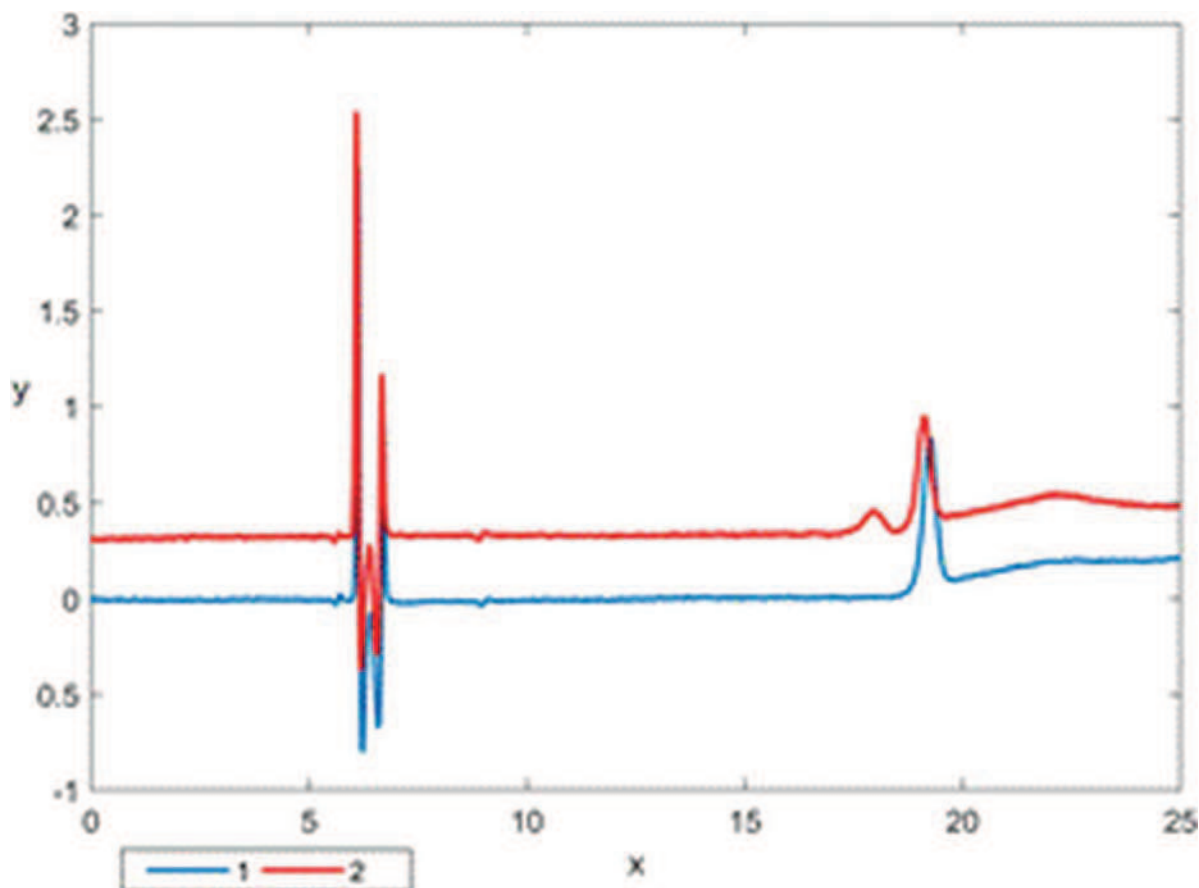
Y Ansprechen (Response), in AU

1 vor Isomerisierung

2 nach Isomerisierung derselben Lösung des untersuchten Carotinoids

ANMERKUNG Bei Schwarz-Weiß-Kopien dieses Dokuments: Die Linie, die zu Beginn unter der anderen Linie verläuft, gehört zu Nummer 1 und ist blau; die darüber verlaufende gehört zu Nummer 2 und ist rot. Im Peak bei etwa 22 min übersteigt Linie 1 die Linie 2.

Bild A.6 — Chromatographisches Profil reiner Standardlösungen von CIXN, einschließlich Identifizierung der Peaks



Legende

X Retentionszeit, in min

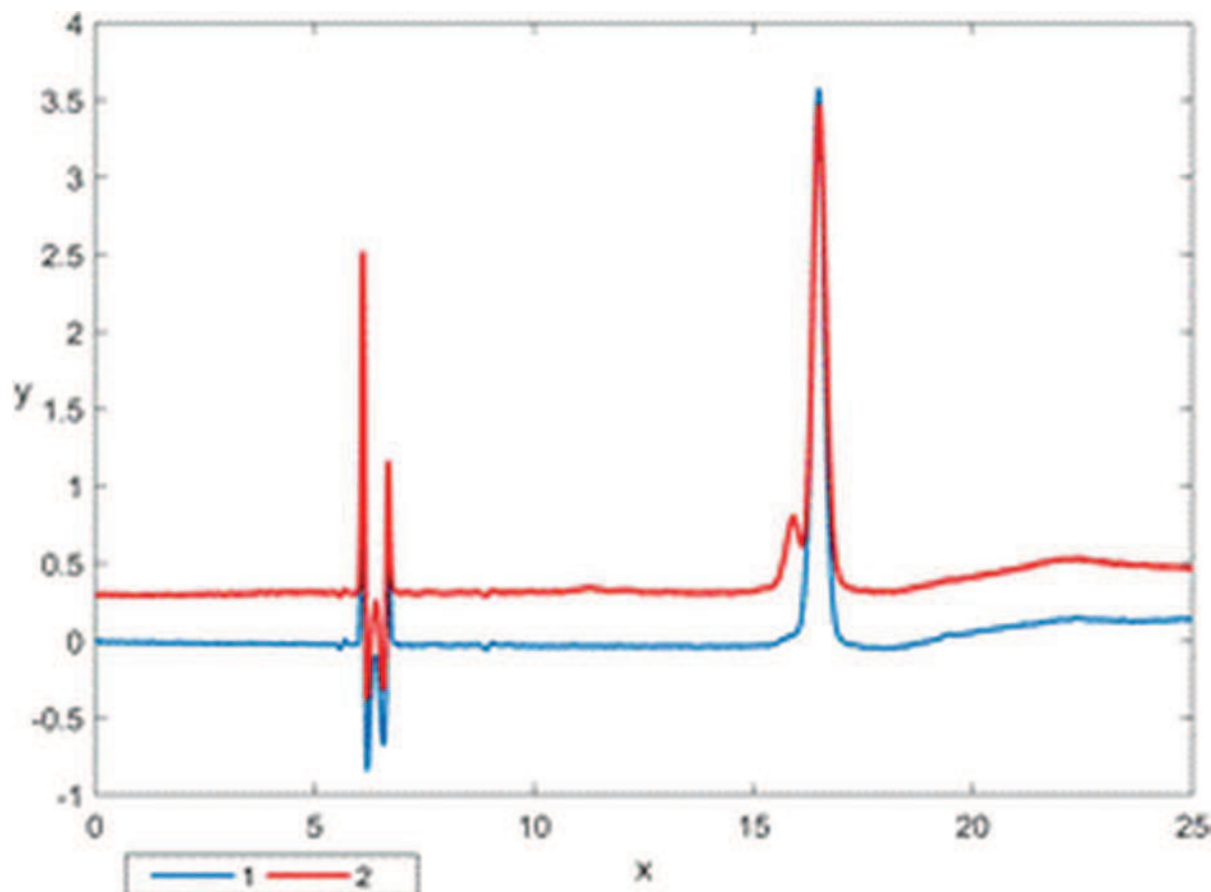
Y Ansprechen (Response), in AU

1 vor Isomerisierung

2 nach Isomerisierung derselben Lösung des untersuchten Carotinoids

ANMERKUNG Bei Schwarz-Weiß-Kopien dieses Dokuments: Die Linie, die zu Beginn unter der anderen Linie verläuft, gehört zu Nummer 1 und ist blau; die darüber verlaufende gehört zu Nummer 2 und ist rot.

Bild A.7 — Chromatographisches Profil reiner Standardlösungen von CSN, einschließlich Identifizierung der Peaks



Legende

X Retentionszeit, in min

Y Ansprechen (Response), in AU

1 vor Isomerisierung

2 nach Isomerisierung derselben Lösung des untersuchten Carotinoids

ANMERKUNG Bei Schwarz-Weiß-Kopien dieses Dokuments: Die Linie, die zu Beginn unter der anderen Linie verläuft, gehört zu Nummer 1 und ist blau; die darüber verlaufende gehört zu Nummer 2 und ist rot. Im Peak bei etwa 17 min übersteigt Linie 1 die Linie 2.

Bild A.8 — Chromatographisches Profil reiner Standardlösungen von CXN, einschließlich Identifizierung der Peaks