



Institut luxembourgeois de la normalisation
de l'accréditation, de la sécurité et qualité
des produits et services

ILNAS-EN 17547:2021

Futtermittel - Probenahme- und Untersuchungsverfahren - Bestimmung des Gehalts an Vitamin A, E und D - Verfahren mittels Reinigung

Animal feeding stuffs: Methods of
sampling and analysis - Determination of
vitamin A, E and D content - Method
using solid phase extraction (SPE) clean-

Aliments des animaux - Méthodes
d'échantillonnage et d'analyse -
Détermination de la teneur en vitamines
A, E et D - Méthode utilisant la



Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm EN 17547:2021 wurde als luxemburgische Norm ILNAS-EN 17547:2021 übernommen.

Alle interessierten Personen, welche Mitglied einer luxemburgischen Organisation sind, können sich kostenlos an der Entwicklung von luxemburgischen (ILNAS), europäischen (CEN, CENELEC) und internationalen (ISO, IEC) Normen beteiligen:

- Inhalt der Normen beeinflussen und mitgestalten
- Künftige Entwicklungen vorhersehen
- An Sitzungen der technischen Komitees teilnehmen

<https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html>

DIESES WERK IST URHEBERRECHTLICH GESCHÜTZT

Kein Teil dieser Veröffentlichung darf ohne schriftliche Einwilligung weder vervielfältigt noch in sonstiger Weise genutzt werden - sei es elektronisch, mechanisch, durch Fotokopien oder auf andere Art!

Deutsche Fassung

**Futtermittel - Probenahme- und Untersuchungsverfahren -
Bestimmung des Gehalts an Vitamin A, E und D - Verfahren
mittels Reinigung durch Festphasenextraktion und
Hochleistungs-Flüssigchromatographie**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis
- Determination of vitamin A, E and D content - Method
using solid phase extraction (SPE) clean-up and high-
performance liquid chromatography (HPLC)

Aliments des animaux - Méthodes d'échantillonnage et
d'analyse - Détermination de la teneur en vitamines A, E
et D - Méthode utilisant la purification par extraction en
phase solide (SPE) et la chromatographie liquide à
haute performance (CLHP)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 27. September 2021 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien und Materialien	8
6 Prüfeinrichtung	9
7 Probenahme	10
8 Probenvorbereitung	11
9 Durchführung	11
10 Angabe der Ergebnisse	23
11 Bemerkungen	27
12 Präzision	27
13 Prüfbericht	29
Anhang A (informativ) Beispiele für Kombinationen von Einwaagemenge, Aliquotierung und Verdünnung zum Erhalt von Konzentrationen im Bereich der Kalibrierkurve	30
Anhang B (informativ) Herstellung der Standard-Stammlösung von Vitamin E (α -Tocopherol) aus α -Tocopherolacetat	33
B.1 Allgemeines	33
B.2 Reagenzien	33
B.3 Herstellung der Standard-Stammlösung	33
B.4 Standardisierung der Standard-Stammlösung von Vitamin E (α -Tocopherol) in Cyclohexan	33
B.5 Kalibrierlösungen und Erstellung einer Kalibrierkurve für Vitamin A (Retinol) und E (α -Tocopherol)	34
Anhang C (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	35
Literaturhinweise	41

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17547:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel – Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2022 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN CENELEC Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

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 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.

Die Bestimmungsgrenzen wurden nicht im Rahmen der Validierungsstudie bestimmt. 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. Niedrigere Grenzen sind möglich, sofern sie 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)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

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

3.1

Vitamin-A-Gehalt

Retinol

Gehalt an all-trans- und cis-Isomeren von Retinol, der in Übereinstimmung mit diesem Dokument 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-Retinylacetat oder 0,546 µg all-trans-Retinylpalmitat oder 0,359 µg all-trans-Retinylpropionat.

3.2

Vitamin-E-Gehalt

α -Tocopherol

Gehalt an α -Tocopherol, der in Übereinstimmung mit diesem Dokument bestimmt wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt an Vitamin E (α -Tocopherol) kann 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 einzelnen 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 einzelnen 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

Cholecalciferol

Gehalt an Cholecalciferol, der in Übereinstimmung mit diesem Dokument bestimmt wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Gehalt an Vitamin D₃ wird in Internationalen Einheiten je Kilogramm (IE/kg) angegeben. Die Aktivität von 1 IE entspricht 0,025 μ g 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. Für den Fall, dass Vitamin D₃ (Cholecalciferol) bestimmt werden soll, 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.

Der *n*-Hexan-Extrakt für die Bestimmung von Vitamin D₃ wird mittels semipräparativer Normalphasen-HPLC auf Kieselgel gereinigt. Der 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.