

RICHTLINIE 2000/45/EG DER KOMMISSION**vom 6. Juli 2000****zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die Bestimmung von Vitamin A, Vitamin E und Tryptophan in Futtermitteln****(Text von Bedeutung für den EWR)**

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 70/373/EWG des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln ⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Akte über den Beitritt Österreichs, Finnlands und Schwedens ⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Gemäß der Richtlinie 70/373/EWG werden die amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Feststellung, ob die aufgrund der Rechts- und Verwaltungsvorschriften festgelegten Anforderungen an Beschaffenheit und Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind, nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und Analysemethoden durchgeführt.
- (2) Gemäß der Richtlinie 70/524/EWG des Rates vom 23. November 1970 über Zusatzstoffe in der Tierernährung ⁽³⁾, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 2439/1999 der Kommission ⁽⁴⁾, muß der Gehalt an Vitamin A und Vitamin E bei der Etikettierung angegeben werden, wenn diese Stoffe Vormischungen oder Futtermitteln zugesetzt werden.
- (3) Gemäß der Richtlinie 79/373/EWG des Rates vom 2. April 1979 über den Verkehr mit Mischfuttermitteln ⁽⁵⁾, zuletzt geändert durch die Richtlinie 2000/16/EG ⁽⁶⁾, und der Richtlinie 93/74/EWG des Rates vom 13. September 1993 über Futtermittel für besondere Ernährungszwecke ⁽⁷⁾, zuletzt geändert durch die Richtlinie 96/25/EG ⁽⁸⁾, müssen Aminosäuren auf dem Etikett von Futtermitteln angegeben werden.
- (4) Es sind gemeinschaftliche Analysemethoden für die Kontrolle dieser Stoffe festzulegen.
- (5) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermittelausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln und Vormischungen auf ihren Gehalt an Vitamin A, Vitamin E und Tryptophan nach den im Anhang beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten setzen bis spätestens 31. August 2000 die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften in Kraft, um dieser Richtlinie nachzukommen. Sie setzen die Kommission davon unverzüglich in Kenntnis.

Sie wenden die Maßnahmen ab 1. September 2000 an.

Wenn die Mitgliedstaaten diese Vorschriften erlassen, nehmen sie in den Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf diese Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten dieser Bezugnahme.

Artikel 3

Diese Richtlinie tritt am 20. Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Artikel 4

Diese Richtlinie ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 6. Juli 2000

Für die Kommission

David BYRNE

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. L 170 vom 3.8.1970, S. 2.⁽²⁾ ABl. C 241 vom 29.8.1994, S. 1.⁽³⁾ ABl. L 270 vom 14.12.1970, S. 1.⁽⁴⁾ ABl. L 297 vom 18.11.1999, S. 8.⁽⁵⁾ ABl. L 86 vom 6.4.1979, S. 30.⁽⁶⁾ ABl. L 105 vom 3.5.2000, S. 36.⁽⁷⁾ ABl. L 237 vom 22.9.1993, S. 23.⁽⁸⁾ ABl. L 125 vom 23.5.1996, S. 35.

ANHANG

TEIL A

BESTIMMUNG VON VITAMIN A

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode dient zur Bestimmung von Vitamin A (Retinol) in Futtermitteln und Vormischungen. Unter Vitamin A wird der nach dieser Methode ermittelte Gehalt an all-*trans*-Vitamin-A-Alkohol und seinen *cis*-Isomeren verstanden. Der Gehalt wird in Internationalen Einheiten (IE) je kg angegeben. Eine IE entspricht der Aktivität von 0,300 µg all-*trans*-Vitamin-A-Alkohol oder 0,344 µg all-*trans*-Vitamin-A-Acetat oder 0,550 µg all-*trans*-Vitamin-A-Palmitat.

Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 2 000 IE Vitamin A/kg.

2. **Prinzip**

Die Probe wird mit ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung hydrolysiert, und das Vitamin A wird mit Petrolether extrahiert. Das Lösungsmittel wird eingedampft, der Rückstand wird in Methanol gelöst und, falls notwendig, auf die erforderliche Konzentration verdünnt. Der Vitamin-A-Gehalt wird mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC) unter Verwendung eines UV- oder Fluoreszenzdetektors bestimmt. Die Arbeitsbedingungen werden so gewählt, daß keine Auftrennung zwischen all-*trans*-Vitamin-A-Alkohol und seinen *cis*-Isomeren erfolgt.

3. **Reagenzien**

- 3.1. Ethanol, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Petrolether, Siedepunktintervall 40 bis 60 °C
- 3.3. Methanol
- 3.4. Kaliumhydroxid-Lösung, $\beta = 50 \text{ g/100 ml}$
- 3.5. Natriumascorbat-Lösung, $\beta = 10 \text{ g/100 ml}$ (siehe Bemerkungen 7.7)
- 3.6. Natriumsulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
- 3.6.1. Natriumsulfid-Lösung, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ in Glycerin, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (bei $x = 9$) (siehe Bemerkungen unter 7.8)
- 3.7. Phenolphthalein-Lösung, $\beta = 2 \text{ g/100 ml}$ in Ethanol (3.1)
- 3.8. 2-Propanol
- 3.9. Mobile Phase für HPLC: Mischung von Methanol (3.3) und Wasser, z. B. 980 + 20 (v + v). Das Mischungsverhältnis muß der jeweils verwendeten Säule angepaßt werden.
- 3.10. Stickstoff, sauerstofffrei
- 3.11. All-*trans*-Vitamin-A-Acetat, reinst, mit zertifizierter Aktivität, z. B. $2,80 \times 10^6 \text{ IE/g}$
- 3.11.1. Stammlösung von all-*trans*-Vitamin-A-Acetat: 50 mg Vitamin-A-Acetat (3.11) auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Meßkolben einwiegen. In 2-Propanol (3.8) lösen und bis zur Marke mit demselben Lösungsmittel auffüllen. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 1 400 IE Vitamin A je ml. Der genaue Gehalt ist nach Nummer 5.6.3.1 zu bestimmen.
- 3.12. All-*trans*-Vitamin-A-Palmitat, reinst, mit zertifizierter Aktivität, z. B. $1,80 \times 10^6 \text{ IE/g}$
- 3.12.1. Stammlösung von all-*trans*-Vitamin-A-Palmitat: 80 mg Vitamin-A-Palmitat (3.12) auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Meßkolben einwiegen. In 2-Propanol (3.8) lösen und bis zur Marke mit demselben Lösungsmittel auffüllen. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 1 400 IE Vitamin A je ml. Der genaue Gehalt ist nach Nummer 5.6.3.2 zu bestimmen.
- 3.13. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (siehe Bemerkungen unter 7.5)

4. **Geräte**

- 4.1. Vakuum-Rotationsverdampfer
- 4.2. Braunglasgeräte

- 4.2.1. Stehkolben oder Erlenmeyerkolben, 500 ml, mit Schliffhülse
- 4.2.2. Meßkolben mit Schliffstopfen, enghalsig, 10, 25, 100 und 500 ml
- 4.2.3. Scheidetrichter, konische Form, 1 000 ml, mit Schliffstopfen
- 4.2.4. Spitzkolben, 250 ml, mit Schliffhülsen
- 4.3. Allihn-Rückflußkühler, Mantellänge 300 mm, Kernschliff mit Adapter für Gaseinleitung
- 4.4. Phasentrennungsfaltenfilter, Durchmesser 185 mm (z. B. Schleicher & Schuell 597 Hy ¹/₂)
- 4.5. HPLC-Einrichtung mit Injektionssystem
- 4.5.1. Flüssigkeitschromatographiesäule, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 oder 10 µm Korngröße oder gleichwertiges Material (Leistungskriterium: nur ein Peak für alle Retinol-Isomeren unter diesen HPLC-Bedingungen)
- 4.5.2. UV- oder Fluoreszenzdetektor mit variabler Wellenlängeneinstellung
- 4.6. Spektralphotometer mit Quarz-Küvetten von 10 mm Schichtdicke
- 4.7. Wasserbad mit Magnetrührer
- 4.8. Extraktionsapparat (Abbildung 1) bestehend aus:
 - 4.8.1. 1-Liter-Standzylinder mit Schliff und Schliffstopfen
 - 4.8.2. Schliffeinsatz mit Seitenarm und einem in der Höhe verschiebbaren Rohr in der Mitte. Das verschiebbare Rohr sollte ein U-förmiges unteres Ende und eine Düse am entgegengesetzten Ende haben, so daß die obere Flüssigkeitsphase aus dem Zylinder in den Scheidetrichter überführt werden kann.

5. Durchführung

Anmerkung: Vitamin A ist empfindlich gegenüber Licht (UV Strahlung und Oxidationsmitteln. Es muß deshalb unter Ausschluß von Licht (Verwendung von Braunglasgeräten oder mit Aluminiumfolie abgedeckte Glasgeräte) und Sauerstoff (Stickstoffspülung) gearbeitet werden. Während der Extraktion sollte das Luftpolster über der Flüssigkeit durch Stickstoff ersetzt werden (zur Vermeidung von Überdruck Stopfen rechtzeitig lüften).

5.1. Vorbereitung der Probe

Die Probe unter Vermeidung von Erwärmung so fein vermahlen, daß sie ein Sieb mit 1 mm Maschenweite passieren kann. Die Zerkleinerung darf erst unmittelbar vor dem Einwiegen und Verseifen erfolgen, da sonst Vitamin-A-Verluste auftreten können.

5.2. Verseifung

Je nach Vitamin-A-Gehalt 2 bis 25 g der Probe auf 0,01 g genau in einen 500-ml-Steh- oder Erlenmeyerkolben (4.2.1) einwiegen. Nacheinander unter Umschütteln 130 ml Ethanol (3.1), etwa 100 mg BHT (3.13), 2 ml Natriumascorbat-Lösung (3.5) und 2 ml Natriumsulfid-Lösung (3.6) zusetzen. Den Kolben mit einem Rückflußkühler (4.3) verbinden und in ein Wasserbad mit Magnetrührer (4.7) geben. Bis zum Sieden erhitzen und 5 Min. am Rückflußkühler kochen. Anschließend werden 25 ml Kaliumhydroxid-Lösung (3.4) durch den Rückflußkühler (4.3) zugegeben, und es wird 25 Min. weiter gekocht unter ständigem Rühren und schwachem Stickstoffstrom. Den Kühler mit etwa 20 ml Wasser ausspülen und den Kolbeninhalt auf Zimmertemperatur abkühlen.

5.3. Extraktion

Die Verseifungslösung wird mit 250 ml Wasser quantitativ in einen 1 000-ml-Scheidetrichter (4.2.3) oder in den Extraktionsapparat (4.8) überführt. Der Verseifungskolben wird mit 25 ml Ethanol (3.1) und anschließend mit 100 ml Petrolether (3.2) nachgewaschen, und die Flüssigkeiten werden ebenfalls in den Scheidetrichter oder den Extraktionsapparat überführt. Das Wasser/Ethanol-Verhältnis in den vereinigten Lösungen sollte etwa 2:1 betragen. 2 Min. gründlich schütteln und dann 2 Min. stehenlassen.

5.3.1. Extraktion mit Hilfe eines Scheidetrichters (4.2.3)

Nach Phasentrennung (siehe Bemerkung unter 7.3) wird die Petroletherphase in einen anderen Scheidetrichter (4.2.3) überführt. Diese Extraktion noch zweimal mit je 100 ml Petrolether (3.2) und zweimal mit je 50 ml Petrolether (3.2) wiederholen.

Die vereinigten Extrakte werden im Scheidetrichter durch zweimaliges Schwenken (Vermeidung von Emulsionsbildung) mit Portionen von jeweils 100 ml Wasser und durch mehrmaliges Schütteln mit weiteren Portionen von 100 ml Wasser so oft gewaschen, bis das Waschwasser bei Zugabe von Phenolphthalein-Lösung (3.7) farblos bleibt (viermaliges Waschen ist normalerweise ausreichend). Zur Entfernung eventuell suspendierten Wassers wird der gewaschene Extrakt durch ein trockenes PhasentrennungsfILTER (4.4) in einen 500-ml-Meßkolben (4.2.2) filtriert. Scheidetrichter und Filter mit 50 ml Petrolether (3.2) nachwaschen, mit Petrolether bis zur Marke (3.2) auffüllen und gut umschütteln.

5.3.2. Extraktion mit Hilfe eines Extraktionsapparats (4.8)

Nach Phasentrennung (siehe Bemerkung unter 7.3) wird der Stopfen des Standzylinders (4.8.1) am Schlickeinsatz (4.8.2) wieder aufgesetzt, und das verschiebbare Rohr wird so eingestellt, daß sich das U-förmige untere Ende gerade über dem Niveau der Grenzfläche befindet. Durch Druckausübung von einer am Seitenarm angebrachten Stickstoffleitung wird die obere Petroletherphase in einen 1 000-ml-Scheidetrichter (4.2.3) überführt. 100 ml Petrolether (3.2) in den Standzylinder geben, mit Stopfen verschließen und gründlich schütteln. Nach der Phasentrennung die obere Phase wie zuvor in den Scheidetrichter überführen. Diese Extraktion noch zweimal mit je 100 ml Petrolether (3.2) und zweimal mit je 50 ml Petrolether (3.2) wiederholen und die Petroletherphasen in den Scheidetrichter überführen.

Die vereinigten Petroletherextrakte wie unter Nummer 5.3.1 erläutert waschen und wie dort beschrieben weiter verfahren.

5.4. Vorbereitung der Probenlösung für die HPLC

Ein aliquoter Teil der Petrolether-Lösung (von 5.3.1 oder 5.3.2) wird in einen 250-ml-Spitzkolben (4.2.4) pipettiert. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck und bei einer Badtemperatur von höchstens 40 °C am Rotationsverdampfer (4.1) fast bis zur Trockne eingedampft. Darauf wird unter Stickstoff (3.10) Druckausgleich geschaffen und der Kolben vom Rotationsverdampfer abgenommen. Das restliche Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom (3.10) abgeblasen, und der Rückstand wird sofort in einer definierten Menge (10-100 ml) Methanol (3.3) aufgenommen (die Konzentration von Vitamin A sollte 5 IE/ml bis 30 IE/ml betragen).

5.5. Bestimmung durch HPLC

Die Abtrennung von Vitamin A erfolgt mit Hilfe einer Umkehrphasen- C_{18} -Säule (4.5.1), und die Konzentration wird mit Hilfe eines UV-Detektors (325 nm) oder eines Fluoreszenzdetektors (Anregung: 325 nm/Emission: 475 nm) (4.5.2) gemessen.

Hierzu wird ein aliquoter Teil (z. B. 20 µl) der nach 5.4 erhaltenen methanolischen Lösung auf die Trennsäule gegeben und mit der mobilen Phase (3.9) eluiert. Die mittlere Peakhöhe (-fläche) von mehreren Einspritzungen derselben Probenlösung wird ermittelt. In der gleichen Weise werden die mittleren Peakhöhen (-flächen) von mehreren Einspritzungen der Kalibrierlösungen (5.6.2) bestimmt.

HPLC-Parameter

Die folgenden Angaben sind Richtwerte; andere Parameter können verwendet werden, sofern sie zu vergleichbaren Ergebnissen führen:

Flüssigkeitschromatographiesäule (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C_{18} , 5 oder 10 µm Korngröße oder gleichwertiges Material
Mobile Phase (3.9):	Mischung von Methanol (3.3) und Wasser z. B. 980 + 20 (v + v)
Durchflußrate:	1-2 ml/Min.
Detektor (4.5.2):	UV-Detektor (325 nm) oder Fluoreszenzdetektor (Anregung: 325 nm/Emission: 475 nm)

5.6. Kalibrierung

5.6.1. Herstellen der Arbeits-Standardlösungen

20 ml der Vitamin-A-Acetat-Stammlösung (3.11.1) oder 20 ml der Vitamin-A-Palmitat-Stammlösung (3.12.1) in einen 500-ml-Steh- oder Erlenmeyerkolben (4.2.1) pipettieren und wie unter Nummer 5.2 beschrieben, aber ohne Zugabe von BHT, hydrolysieren. Anschließend mit Petrolether (3.2) gemäß Nummer 5.3 extrahieren und mit Petrolether (3.2) auf 500 ml auffüllen. 100 ml dieses Extrakts werden am Rotationsverdampfer (siehe 5.4) fast bis zur Trockne eingedampft, das verbleibende Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom (3.10) abgeblasen, und der Rückstand wird in 10,0 ml Methanol (3.3) aufgenommen. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 560 IE Vitamin A je ml. Der genaue Gehalt ist nach Nummer 5.6.3.3 zu bestimmen. Die Arbeits-Standardlösung muß vor Gebrauch frisch bereitet werden.

2,0 ml dieser Arbeits-Standardlösung werden in einen 20-ml-Meßkolben pipettiert, es wird bis zur Marke mit Methanol (3.3) aufgefüllt und gemischt. Der Sollgehalt dieser verdünnten Arbeits-Standardlösung beträgt 56 IE Vitamin A je ml.

5.6.2. Herstellen der Kalibrierlösungen und Erstellung der Kalibrierkurve

1,0 ml, 2,0 ml, 5,0 ml und 10,0 ml der verdünnten Arbeits-Standardlösung werden in eine Reihe von 20-ml-Meßkolben pipettiert; bis zur Marke mit Methanol (3.3) auffüllen und mischen. Der Sollgehalt dieser Lösungen beträgt 2,8 IE, 5,6 IE, 14,0 IE und 28,0 IE Vitamin A je ml.

20 µl von jeder Kalibrierlösung werden mehrmals eingespritzt, und die mittleren Peakhöhen (-flächen) werden gemessen. Die erhaltenen Peakhöhen (-flächen) dienen zur Erstellung der Kalibrierkurve unter Berücksichtigung der Ergebnisse der UV-Kontrolle (5.6.3.3).

5.6.3. UV-Kontrolle der Standardlösungen

5.6.3.1. Vitamin-A-Acetat-Stammlösung

2,0 ml der Vitamin-A-Acetat-Stammlösung (3.11.1) werden in einen 50-ml-Meßkolben (4.2.2) pipettiert, es wird bis zur Marke mit 2-Propanol (3.8) aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 56 IE Vitamin A je ml. 3,0 ml dieser verdünnten Vitamin-A-Acetat-Lösung werden in einen 25-ml-Meßkolben pipettiert, es wird bis zur Marke mit 2-Propanol (3.8) aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 6,72 IE Vitamin A je ml. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen 2-Propanol (3.8) im Spektralphotometer (4.6) zwischen 300 nm und 400 nm gemessen. Das Extinktionsmaximum muß zwischen 325 nm und 327 nm liegen.

Berechnung des Vitamin-A-Gehalts:

$$\text{IE Vitamin A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$\left(E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \right)$ für Vitamin-A-Acetat = 1 530 bei 326 nm in 2-Propanol)

5.6.3.2. Vitamin-A-Palmitat-Stammlösung

2,0 ml der Vitamin-A-Palmitat-Stammlösung (3.12.1) werden in einen 50-ml-Meßkolben (4.2.2) pipettiert, es wird bis zur Marke mit 2-Propanol (3.8) aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 56 IE Vitamin A je ml. 3,0 ml dieser verdünnten Vitamin-A-Palmitat-Lösung werden in einen 25-ml-Meßkolben pipettiert, es wird bis zur Marke mit 2-Propanol (3.8) aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 6,72 IE Vitamin A je ml. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen 2-Propanol (3.8) im Spektralphotometer (4.6) zwischen 300 nm und 400 nm gemessen. Das Extinktionsmaximum muß zwischen 325 nm und 327 nm liegen.

Berechnung des Vitamin-A-Gehalts:

$$\text{IE Vitamin A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$\left(E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \right)$ für Vitamin-A-Palmitat = 957 bei 326 nm in 2-Propanol)

5.6.3.3. Vitamin-A-Arbeits-Standardlösung

3,0 ml der gemäß 5.6.1 hergestellten, unverdünnten Vitamin-A-Arbeits-Standardlösung werden in einen 50-ml-Meßkolben (4.2.2) pipettiert, es wird bis zur Marke mit 2-Propanol (3.8) aufgefüllt. 5,0 ml dieser Lösung werden in einen 25-ml-Meßkolben pipettiert, es wird bis zur Marke mit 2-Propanol (3.8) aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 6,72 IE Vitamin A je ml. Das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen 2-Propanol (3.8) im Spektralphotometer (4.6) zwischen 300 nm und 400 nm gemessen. Das Extinktionsmaximum muß zwischen 325 nm und 327 nm liegen.

Berechnung des Vitamin-A-Gehalts:

$$\text{IE Vitamin A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

$\left(E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \right)$ für Vitamin-A-Alkohol = 1 821 bei 325 nm in 2-Propanol)

6. Berechnung der Ergebnisse

Aus der mittleren Höhe (Fläche) der Vitamin-A-Peaks der Probenlösung wird anhand der Kalibrierkurve (5.6.2) die Konzentration der Probenlösung in IE/ml bestimmt.

Der Vitamin-A-Gehalt w in IE/kg der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2 \cdot 1\,000}{V_1 \cdot m} \text{ [IE/kg]}$$

Dabei ist:

β = Vitamin-A-Konzentration der Probenlösung (5.4) in IE/ml

V_1 = Volumen der Probenlösung (5.4) in ml

V_2 = Volumen des bei 5.4 verwendeten aliquoten Teils in ml

m = Probeneinwaage in g

7. Bemerkungen

- 7.1. Bei Proben mit niedrigen Vitamin-A-Gehalten kann es zweckmäßig sein, die Petroletherextrakte von zwei Verseifungsansätzen (Einwaage 25 g) zu einer Probenlösung für die HPLC-Bestimmung zu vereinigen.
- 7.2. Die Einwaage für die Analyse sollte höchstens 2 g Fett enthalten.
- 7.3. Bei schlechter Phasentrennung können etwa 10 ml Ethanol (3.1) zur Zerstörung der Emulsion zugegeben werden.
- 7.4. Bei Lebertran oder anderen reinen Fetten wird empfohlen, die Verseifungsdauer auf 45 bis 60 Min. zu erhöhen.
- 7.5. Statt BHT kann Hydrochinon verwendet werden.
- 7.6. Bei Verwendung einer Normalphasensäule ist die Trennung der Retinolisomeren möglich.
- 7.7. Statt Natriumascorbat-Lösung können etwa 150 mg Ascorbinsäure verwendet werden.
- 7.8. Statt Natriumsulfid-Lösung können etwa 50 mg EDTA verwendet werden.

8. Wiederholbarkeit

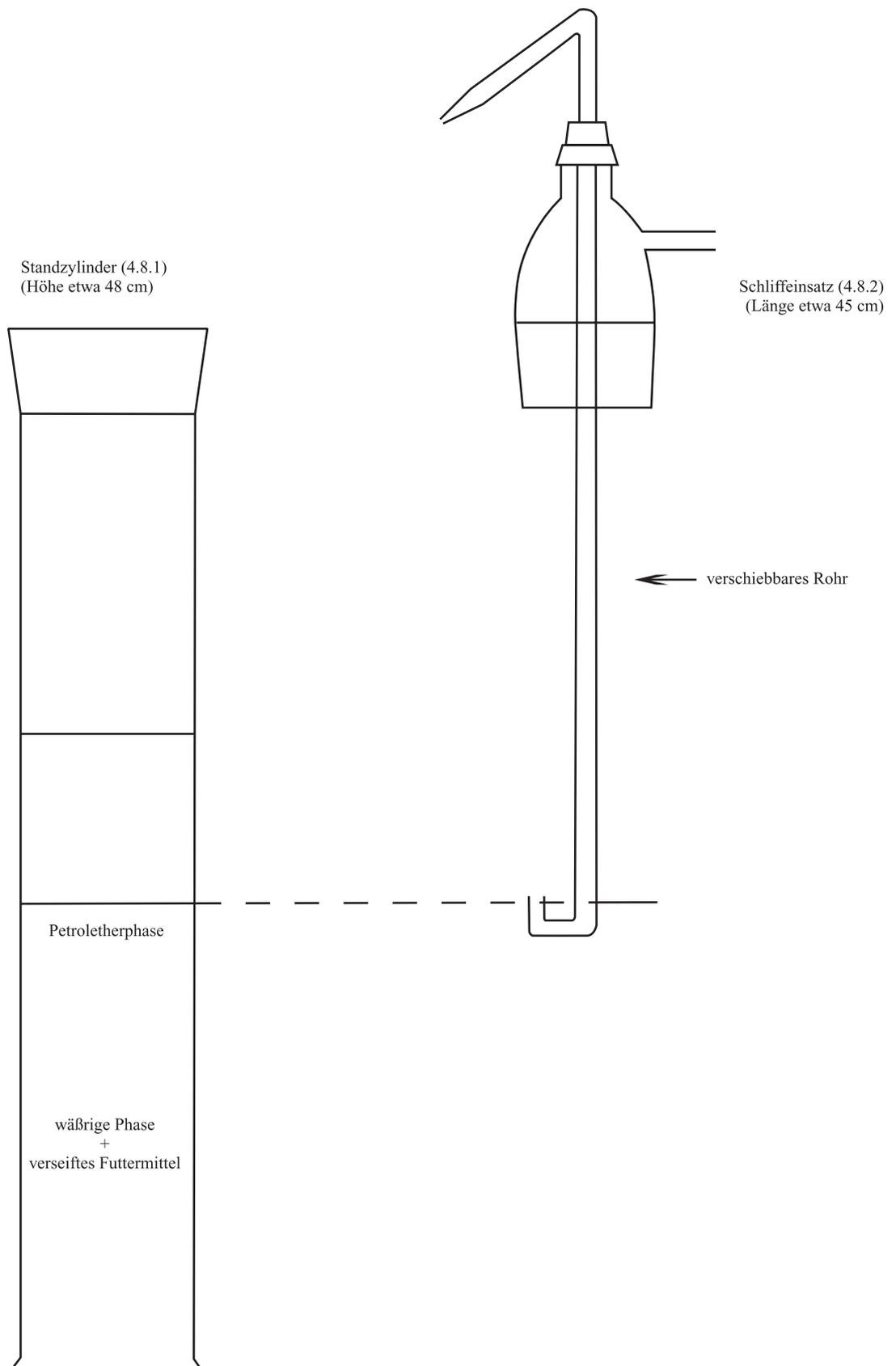
Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen bei ein und derselben Probe darf 15 % des höheren Resultats nicht überschreiten.

9. Ergebnisse eines Ringversuchs ⁽¹⁾

	Vormischung	Vormischung	Mineralfutter	Eiweißkonzentrat	Ferkelaufzuchtfutter
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Mittelwert [IE/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s_r [IE/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IE/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV_r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R [IE/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IE/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: Zahl der Labors
n: Zahl der Einzelwerte
 s_r : Wiederholstandardabweichung
 s_R : Vergleichstandardabweichung
r: Wiederholbarkeit
R: Vergleichbarkeit
 CV_r : Wiederholvariationskoeffizient
 CV_R : Vergleichsvariationskoeffizient

⁽¹⁾ Durchgeführt von der Fachgruppe Futtermittel des Verbands Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Abbildung 1: Extraktionsapparat (4.8)

TEIL B

BESTIMMUNG VON VITAMIN E

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode dient zur Bestimmung von Vitamin E in Futtermitteln und Vormischungen. Der Vitamin-E-Gehalt wird in mg DL- α -Tocopherol-Acetat je kg angegeben. 1 mg DL- α -Tocopherol-Acetat entspricht 0,91 mg DL- α -Tocopherol (Vitamin E).

Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 2 mg Vitamin E/kg.

2. **Prinzip**

Die Probe wird mit ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung hydrolysiert, und das Vitamin E wird mit Petrolether extrahiert. Das Lösungsmittel wird eingedampft, der Rückstand wird in Methanol gelöst und, falls notwendig, auf die erforderliche Konzentration verdünnt. Der Vitamin-E-Gehalt wird durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC) unter Verwendung eines UV- oder Fluoreszenzdetektors bestimmt.

3. **Reagenzien**

- 3.1. Ethanol, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Petrolether, Siedeintervall 40 bis 60 °C
- 3.3. Methanol
- 3.4. Kaliumhydroxid-Lösung, $\beta = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Natriumascorbat-Lösung, $\beta = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (siehe Bemerkungen unter 7.7)
- 3.6. Natriumsulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
- 3.6.1. Natriumsulfid-Lösung, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ in Glycerin, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (bei $x = 9$) (siehe Bemerkungen unter 7.8)
- 3.7. Phenolphthalein-Lösung, $\beta = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ in Ethanol (3.1)
- 3.8. Mobile Phase für HPLC: Mischung von Methanol (3.3) und Wasser, z. B. 980 + 20 (v + v). Das Mischungsverhältnis muß der jeweils verwendeten Säule angepaßt werden.
- 3.9. Stickstoff, sauerstofffrei
- 3.10. DL- α -Tocopherol-Acetat, reinst, mit zertifizierter Aktivität
- 3.10.1. DL- α -Tocopherol-Acetat-Stammlösung: 100 mg DL- α -Tocopherol-Acetat (3.10) auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Meßkolben einwiegen. In Ethanol (3.1) lösen und bis zur Marke mit demselben Lösungsmittel auffüllen. 1 ml dieser Lösung enthält 1 mg DL- α -Tocopherol-Acetat. (UV-Kontrolle siehe 5.6.1.3; Stabilisierung siehe Bemerkungen unter 7.4).
- 3.11. DL- α -Tocopherol, reinst, mit zertifizierter Aktivität
- 3.11.1. 100 mg DL- α -Tocopherol (3.10) auf 0,1 mg genau in einen 100-ml Meßkolben einwiegen. In Ethanol (3.1) lösen und bis zur Marke mit demselben Lösungsmittel auffüllen. 1 ml dieser Lösung enthält 1 mg DL- α -Tocopherol. (UV-Kontrolle siehe 5.6.2.3; Stabilisierung siehe Bemerkungen unter 7.4).
- 3.12. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (siehe Bemerkungen unter 7.5)

4. **Geräte**

- 4.1. Vakuum-Rotationsverdampfer
- 4.2. Braunglasgeräte
- 4.2.1. Stehkolben oder Erlenmeyerkolben, 500 ml, mit Schliffhülse

- 4.2.2. Meßkolben mit Schliffstopfen, enghalsig, 10, 25, 100 und 500 ml
- 4.2.3. Scheidetrichter, konische Form, 1 000 ml, mit Schliffstopfen
- 4.2.4. Spitzkolben, 250 ml, mit Schliffhülsen
- 4.3. Allihn-Rückflußkühler, Mantellänge 300 mm, Kernschliff mit Adapter für Gaseinleitung
- 4.4. Phasentrennungsfaltenfilter, Durchmesser 185 mm (z. B. Schleicher & Schuell 597 Hy $1/2$)
- 4.5. HPLC-Einrichtung mit Injektionssystem
- 4.5.1. Flüssigkeitschromatographiesäule, 250 mm × 4 mm, C₁₈, Korngröße 5 oder 10 µm oder gleichwertiges Material
- 4.5.2. UV- oder Fluoreszenzdetektor mit variabler Wellenlängeneinstellung
- 4.6. Spektralphotometer mit Quarz-Küvetten von 10 mm Schichtdicke
- 4.7. Wasserbad mit Magnetrührer
- 4.8. Extraktionsapparat (Abbildung 1) bestehend aus:
 - 4.8.1. 1-Liter-Standzylinder mit Schliff und Schliffstopfen
 - 4.8.2. Schliffeinsatz mit Seitenarm und einem in der Höhe verschiebbaren Rohr in der Mitte. Das verschiebbare Rohr sollte ein U-förmiges unteres Ende und eine Düse am entgegengesetzten Ende haben, so daß die obere Flüssigkeitsphase aus dem Zylinder in den Scheidetrichter überführt werden kann.

5. Durchführung

Anmerkung: Vitamin E ist empfindlich gegenüber Licht (UV-Strahlung und Oxidationsmitteln. Es muß deshalb unter Ausschluß von Licht (Verwendung von Braunglasgeräten oder mit Aluminiumfolie abgedeckte Glasgeräte) und Sauerstoff (Stickstoffspülung) gearbeitet werden. Während der Extraktion sollte das Luftpolster über der Flüssigkeit durch Stickstoff ersetzt werden (zur Vermeidung von Überdruck Stopfen rechtzeitig lüften).

5.1. Vorbereitung der Probe

Die Probe unter Vermeidung von Erwärmung so fein vermahlen, daß sie ein Sieb mit 1 mm Maschenweite passieren kann. Die Zerkleinerung darf erst unmittelbar vor dem Einwiegen und Verseifen erfolgen, da sonst Vitamin-E-Verluste auftreten können.

5.2. Verseifung

Je nach Vitamin-E-Gehalt 2 bis 25 g der Probe auf 0,01 g genau in einen 500-ml-Steh- oder Erlenmeyerkolben (4.2.1) einwiegen. Nacheinander unter Umschütteln 130 ml Ethanol (3.1), etwa 100 mg BHT (3.12), 2 ml Natriumascorbat-Lösung (3.5) und 2 ml Natriumsulfid-Lösung (3.6) zusetzen. Den Kolben mit dem Rückflußkühler (4.3) verbinden und in ein Wasserbad mit Magnetrührer (4.7) geben. Bis zum Sieden erhitzen und 5 Min. am Rückflußkühler kochen. Anschließend werden 25 ml Kaliumhydroxid-Lösung (3.4) durch den Rückflußkühler (4.3) zugegeben, und es wird 25 Min. weiter gekocht unter ständigem Rühren und schwachem Stickstoffstrom. Den Kühler mit etwa 20 ml Wasser ausspülen und den Kolbeninhalt auf Zimmertemperatur abkühlen.

5.3. Extraktion

Die Verseifungslösung wird mit 250 ml Wasser quantitativ in einen 1 000-ml-Scheidetrichter (4.2.3) oder in den Extraktionsapparat (4.8) überführt. Der Verseifungskolben wird mit 25 ml Ethanol (3.1) und anschließend mit 100 ml Petrolether (3.2) nachgewaschen, und die Flüssigkeiten werden ebenfalls in den Scheidetrichter oder den Extraktionsapparat überführt. Das Wasser/Ethanol-Verhältnis in den vereinigten Lösungen sollte etwa 2:1 betragen. 2 Min. gründlich schütteln und dann 2 Min. stehenlassen.

5.3.1. Extraktion mit Hilfe eines Scheidetrichters (4.2.3)

Nach Phasentrennung (siehe Bemerkung unter 7.3) wird die Petroletherphase in einen anderen Scheidetrichter (4.2.3) überführt. Diese Extraktion noch zweimal mit je 100 ml Petrolether (3.2) und zweimal mit je 50 ml Petrolether (3.2) wiederholen.

Die vereinigten Extrakte werden im Scheidetrichter durch zweimaliges Schwenken (Vermeidung von Emulsionsbildung) mit Portionen von jeweils 100 ml Wasser und durch mehrmaliges Schütteln mit weiteren Portionen von 100 ml Wasser so oft gewaschen, bis das Waschwasser bei Zugabe von Phenolphthalein-Lösung (3.7) farblos bleibt (viermaliges Waschen ist normalerweise ausreichend). Zur Entfernung eventuell suspendierten Wassers wird der gewaschene Extrakt durch ein trockenes PhasentrennungsfILTER (4.4) in einen 500-ml-Meßkolben (4.2.2) filtriert. Scheidetrichter und Filter mit 50 ml Petrolether (3.2) nachwaschen, mit Petrolether (3.2) bis zur Marke auffüllen und gut umschütteln.

5.3.2. Extraktion mit Hilfe eines Extraktionsapparats (4.8)

Nach Phasentrennung (siehe Bemerkung unter 7.3) wird der Stopfen des Standzylinders (4.8.1) am Schliffeinsatz (4.8.2) wieder aufgesetzt und das verschiebbare Rohr wird so eingestellt, daß sich das U-förmige untere Ende gerade über dem Niveau der Grenzfläche befindet. Durch Druckausübung von einer am Seitenarm angebrachten Stickstoffleitung wird die obere Petroletherphase in einen 1 000-ml-Scheidetrichter (4.2.3) überführt. 100 ml Petrolether (3.2) in den Standzylinder geben, mit Stopfen verschließen und gründlich schütteln. Nach der Phasentrennung die obere Phase wie zuvor in den Scheidetrichter überführen. Diese Extraktion noch zweimal mit je 100 ml Petrolether (3.2) und zweimal mit je 50 ml Petrolether (3.2) wiederholen und die Petroletherphasen in den Scheidetrichter überführen.

Die vereinigten Petroletherextrakte wie unter Nummer 5.3.1 erläutert waschen und wie dort beschrieben weiter verfahren.

5.4. Vorbereitung der Probenlösung für die HPLC

Ein aliquoter Teil der Petrolether-Lösung (von 5.3.1 oder 5.3.2) wird in einen 250-ml-Spitzkolben (4.2.4) pipettiert. Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck und bei einer Badtemperatur von höchstens 40 °C am Rotationsverdampfer (4.1) fast bis zur Trockne eingedampft. Darauf wird unter Stickstoff (3.9) Druckausgleich geschaffen und der Kolben vom Rotationsverdampfer abgenommen. Das restliche Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom (3.9) abgeblasen, und der Rückstand wird sofort in einer definierten Menge (10-100 ml) Methanol (3.3) aufgenommen (die Konzentration von DL- α -Tocopherol sollte 5 μ g/ml bis 30 μ g/ml betragen).

5.5. Bestimmung durch HPLC

Die Abtrennung von Vitamin E erfolgt mit Hilfe einer Umkehrphasen-C₁₈-Säule (4.5.1), und die Konzentration wird mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (Anregung: 295 nm, Emission: 330 nm) oder eines UV-Detektors (292 nm) (4.5.2) gemessen.

Hierzu wird ein aliquoter Teil (z. B. 20 μ l) der nach 5.4 erhaltenen methanolischen Lösung auf die Trennsäule gegeben und mit der mobilen Phase (3.8) eluiert. Die mittleren Peakhöhen (-flächen) von mehreren Einspritzungen derselben Probenlösung werden ermittelt. In der gleichen Weise werden die mittleren Peakhöhen (-flächen) von mehreren Einspritzungen der Kalibrierlösungen (5.6.2) bestimmt.

HPLC-Parameter

Die folgenden Angaben sind Richtwerte; andere Parameter können verwendet werden, sofern sie zu vergleichbaren Ergebnissen führen:

Flüssigkeitschromatographiesäule (4.5.1):	250 mm \times 4 mm, C ₁₈ , 5 oder 10 μ m Korngröße oder gleichwertiges Material
Mobile Phase (3.8):	Mischung von Methanol (3.3) und Wasser z. B. 980 + 20 (v + v)
Durchflußrate:	1-2 ml/Min.
Detektor (4.5.2):	Fluoreszenzdetektor (Anregung: 295 nm Emission: 330 nm) oder UV-Detektor (292 nm)

5.6. Eichung (DL- α -Tocopherol-Acetat oder DL- α -Tocopherol)

5.6.1. DL- α -Tocopherol-Acetat-Standard

5.6.1.1. Herstellen der Arbeits-Standardlösung

25 ml der DL- α -Tocopherol-Acetat-Stammlösung (3.10.1) in einen 500-ml-Steh- oder Erlenmeyerkolben (4.2.1) pipettieren und wie unter Nummer 5.2 beschrieben hydrolysieren. Anschließend mit Petrolether (3.2) gemäß Nummer 5.3 extrahieren und mit Petrolether auf 500 ml auffüllen. 25 ml dieses Extrakts werden am Rotationsverdampfer (siehe 5.4) fast bis zur Trockne eingedampft, das verbleibende Lösungsmittel wird mit einem Stickstoffstrom (3.9) abgeblasen, und der Rückstand wird in 25,0 ml Methanol (3.3) aufgenommen. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 45,5 μ g DL- α -Tocopherol je ml; das entspricht 50 μ g DL- α -Tocopherol-Acetat je ml. Die Arbeits-Standardlösung muß vor Gebrauch frisch zubereitet werden.

5.6.1.2. Herstellen der Kalibrierlösungen und Erstellung der Kalibrierkurve

1,0 ml, 2,0 ml, 4,0 ml und 10,0 ml der Arbeits-Standardlösung werden in eine Reihe von 20-ml-Meßkolben pipettiert; bis zur Marke mit Methanol (3.3) auffüllen und mischen. Der Sollgehalt dieser Lösungen beträgt 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml, 10,0 µg/ml und 25,0 µg/ml DL- α -Tocopherol-Acetat, d. h. 2,28 µg/ml, 4,55 µg/ml, 9,10 µg/ml und 22,8 µg/ml DL- α -Tocopherol.

20 µl von jeder Kalibrierlösung werden mehrmals eingespritzt, und die mittleren Peakhöhen (-flächen) werden gemessen. Unter Verwendung der mittleren Peakhöhen (-flächen) wird eine Kalibrierkurve erstellt.

5.6.1.3. UV-Kontrolle der DL- α -Tocopherol-Acetat-Stammlösung (3.10.1)

5,0 ml der DL- α -Tocopherol-Acetat-Stammlösung (3.10.1) werden mit Ethanol auf 25,0 ml aufgefüllt, das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen Ethanol (3.1) im Spektralphotometer (4.6) zwischen 250 nm und 320 nm gemessen.

Das Extinktionsmaximum soll bei 284 nm liegen.

$$\left(E \frac{1\%}{1\text{ cm}}\right) = 43,6 \text{ bei } 284 \text{ nm in Ethanol}$$

Bei der vorliegenden Verdünnung sollte eine Extinktion von 0,84 bis 0,88 erzielt werden.

5.6.2. DL- α -Tocopherol-Standard

5.6.2.1. Herstellen der Arbeits-Standardlösung

2,0 ml der DL- α -Tocopherol-Stammlösung (3.11.1) werden in einen 50-ml-Meßkolben pipettiert, in Methanol (3.3) gelöst und bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt. Der Sollgehalt dieser Lösung beträgt 40 µg DL- α -Tocopherol je ml; das entspricht 44,0 µg DL- α -Tocopherol-Acetat je ml. Die Arbeits-Standardlösung muß vor Gebrauch frisch zubereitet werden.

5.6.2.2. Herstellen der Kalibrierlösungen und Erstellung der Kalibrierkurve

1,0 ml, 2,0 ml, 4,0 ml und 10,0 ml der Arbeits-Standardlösung werden in eine Reihe von 20-ml-Meßkolben pipettiert; bis zur Marke mit Methanol (3.3) auffüllen und mischen. Der Sollgehalt dieser Lösungen beträgt 2,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 8,0 µg/ml und 20,0 µg/ml DL- α -Tocopherol, d. h. 2,20 µg/ml, 4,40 µg/ml, 8,79 µg/ml und 22,0 µg/ml DL- α -Tocopherol-Acetat.

20 µl von jeder Kalibrierlösung werden mehrmals eingespritzt, und die mittleren Peakhöhen (-flächen) werden gemessen. Unter Verwendung der mittleren Peakhöhen (-flächen) wird eine Kalibrierkurve erstellt.

5.6.2.3. UV-Kontrolle der DL- α -Tocopherol-Stammlösung (3.11.1)

2,0 ml der DL- α -Tocopherol-Stammlösung (3.11.1) werden mit Ethanol auf 25,0 ml aufgefüllt, das UV-Spektrum dieser Lösung wird gegen Ethanol (3.1) im Spektralphotometer (4.6) zwischen 250 nm und 320 nm gemessen. Das Extinktionsmaximum soll bei 292 nm liegen.

$$\left(E \frac{1\%}{1\text{ cm}}\right) = 75,8 \text{ bei } 292 \text{ nm in Ethanol}$$

Bei der vorliegenden Verdünnung sollte eine Extinktion von 0,6 erzielt werden.

6. Berechnung der Ergebnisse

Aus der mittleren Höhe (Fläche) der Vitamin-E-Peaks der Probenlösung wird anhand der Kalibrierkurve (5.6.1.2 oder 5.6.2.2) die Konzentration der Probenlösung in µg/ml (berechnet als α -Tocopherol-Acetat) bestimmt.

Der Vitamin-E-Gehalt w in mg/kg der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2}{V_1 \cdot m} \text{ [mg/kg]}$$

Dabei ist:

β = Vitamin-E-Konzentration der Probenlösung (5.4) in $\mu\text{g/ml}$

V_1 = Volumen der Probenlösung (5.4) in ml

V_2 = Volumen des bei 5.4 verwendeten aliquoten Teils in ml

m = Probeneinwaage in g

7. Bemerkungen

- 7.1. Bei Proben mit niedrigen Vitamin-E-Gehalten kann es zweckmäßig sein, die Petroletherextrakte von zwei Verseifungsansätzen (Einwaage 25 g) zu einer Probenlösung für die HPLC-Bestimmung zu vereinigen.
- 7.2. Die Einwaage für die Analyse sollte höchstens 2 g Fett enthalten.
- 7.3. Bei schlechter Phasentrennung können etwa 10 ml Ethanol (3.1) zur Zerstörung der Emulsion zugegeben werden.
- 7.4. Nach der spektralphotometrischen Vermessung der DL- α -Tocopherol-Acetat- oder DL- α -Tocopherol-Lösung nach 5.6.1.3 bzw. 5.6.2.3 empfiehlt es sich, der Lösung (3.10.1 bzw. 3.10.2) etwa 10 mg BHT (3.12) zuzusetzen und die Lösung im Kühlschrank aufzubewahren (Haltbarkeitsdauer höchstens vier Wochen).
- 7.5. Statt BHT kann Hydrochinon verwendet werden.
- 7.6. Bei Verwendung einer Normalphasensäule ist die Trennung von α -, β -, χ - und δ -Tocopherol möglich.
- 7.7. Statt Natriumascorbat-Lösung können etwa 150 mg Ascorbinsäure verwendet werden.
- 7.8. Statt Natriumsulfid-Lösung können etwa 50 mg EDTA verwendet werden.

8. Wiederholbarkeit

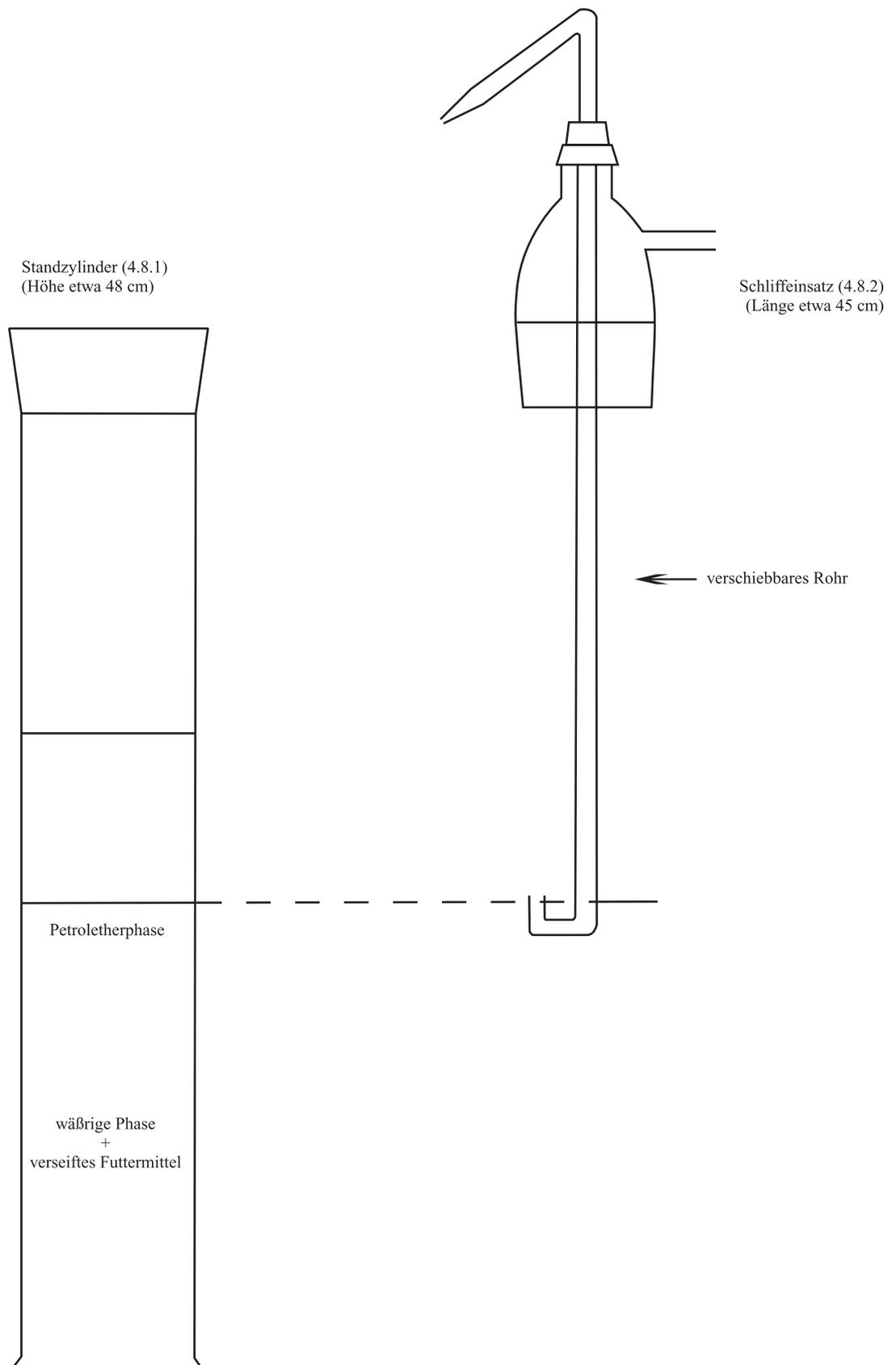
Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen bei ein und derselben Probe darf 15 % des höheren Resultats nicht überschreiten.

9. Ergebnisse eines Ringversuchs ⁽¹⁾

	Vormischung	Vormischung	Mineralfutter	Eiweißkonzentrat	Ferkelaufzuchtfutter
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Mittelwert [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s_r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV_r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s_R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: Zahl der Labors
n: Zahl der Einzelwerte
 s_r : Wiederholdstandardabweichung
 s_R : Vergleichstandardabweichung
r: Wiederholbarkeit
R: Vergleichbarkeit
 CV_r : Wiederholvariationskoeffizient
 CV_R : Vergleichsvariationskoeffizient

⁽¹⁾ Durchgeführt von der Fachgruppe Futtermittel des Verbands Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Abbildung 1: Extraktionsapparat (4.8)

TEIL C

BESTIMMUNG VON TRYPTOPHAN

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode dient zur Bestimmung des Gesamtgehalts an Tryptophan und des Gehalts an freiem Tryptophan in Futtermitteln. Sie dient nicht zur Unterscheidung zwischen D- und L-Formen.

2. **Prinzip**

Zur Bestimmung des Gesamtgehalts an Tryptophan wird die Probe unter alkalischen Bedingungen mit gesättigter Bariumhydroxid-Lösung hydrolysiert und 20 Std. auf 110 °C erhitzt. Nach der Hydrolyse wird ein interner Standard zugegeben.

Zur Bestimmung des Gehalts an freiem Tryptophan wird die Probe unter leicht sauren Bedingungen in Gegenwart eines internen Standards extrahiert.

Tryptophan und interner Standard im Hydrolysat bzw. im Extrakt werden durch HPLC mit Fluoreszenzdetektor bestimmt.

3. **Reagenzien**

- 3.1. Es ist bidestilliertes Wasser oder Wasser gleichwertiger Qualität zu verwenden (Leitfähigkeit < 10 µS/cm).
- 3.2. Standardsubstanz: Tryptophan (Reinheit/Gehalt ≥ 99 %), im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet
- 3.3. Interner Standard: α-Methyl-Tryptophan (Reinheit/Gehalt ≥ 99 %), im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet
- 3.4. Bariumhydroxid-Octahydrat (das Ba(OH)₂ · 8 H₂O darf nicht übermäßig der Luft ausgesetzt werden, um die Bildung von BaCO₃ zu vermeiden, das die Bestimmung stören könnte (siehe Bemerkung unter 9.3).
- 3.5. Natriumhydroxid
- 3.6. Orthophosphorsäure, w = 85 %
- 3.7. Salzsäure, ρ₂₀, 1,19 g/ml
- 3.8. Methanol, HPLC-Qualität
- 3.9. Petrolether, Siedepunktintervall 40 bis 60 °C
- 3.10. Natriumhydroxid-Lösung, c = 1 mol/l:
40,0 g NaOH (3.5) in Wasser lösen und mit Wasser (3.1) auf 1 Liter auffüllen.
- 3.11. Salzsäure, c = 6 mol/l:
492 ml HCl (3.7) mit Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- 3.12. Salzsäure, c = 1 mol/l:
82 ml HCl (3.7) mit Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- 3.13. Salzsäure, c = 0,1 mol/l:
8,2 ml HCl (3.7) mit Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- 3.14. Orthophosphorsäure, c = 0,5 mol/l:
34 ml Orthophosphorsäure (3.6) mit Wasser (3.1) auf 1 Liter auffüllen.

- 3.15. Konzentrierte Tryptophan-Lösung (3.2), $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:
0,2553 g Tryptophan (3.2) in einem 500-ml-Meßkolben in Salzsäure (3.13) lösen und mit Salzsäure bis zur Marke auffüllen. Bei -18°C höchstens vier Wochen aufbewahren.
- 3.16. Konzentrierte interne Standardlösung, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:
0,2728 g α -Methyl-Tryptophan (3.3) in einem 500-ml-Meßkolben in Salzsäure (3.13) lösen und mit Salzsäure (3.13) bis zur Marke auffüllen. Bei -18°C höchstens vier Wochen aufbewahren.
- 3.17. Eichstandardlösung von Tryptophan und internem Standard:
2,00 ml konzentrierte Tryptophan-Lösung (3.15) und 2,00 ml konzentrierte interne Standardlösung (α -Methyl-Tryptophan) (3.16) mit Wasser (3.1) und Methanol (3.8) auf etwa dasselbe Volumen und etwa dieselbe Methanolkonzentration (10-30 %) wie das fertige Hydrolysat verdünnen.
Diese Lösung muß vor Gebrauch frisch hergestellt werden.
Bei der Zubereitung vor direktem Sonnenlicht schützen.
- 3.18. Essigsäure
- 3.19. 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol
- 3.20. Ethanolamin > 98 %
- 3.21. Lösung von 1 g 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol (3.19) in 100 ml Methanol (3.8)
- 3.22. Mobile Phase für HPLC: 3,00 g Essigsäure (3.18) + 900 ml Wasser (3.1) + 50,0 ml Lösung (3.21) von 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol (3.19) in Methanol (3.8) (1 g/100 ml). Der pH-Wert wird mit Ethanolamin (3.20) auf 5,00 eingestellt. Mit Wasser (3.1) auf 1 000 ml auffüllen.

4. Geräte

- 4.1. HPLC-Einrichtung mit Fluoreszenzdetektor
- 4.2. Flüssigkeitschromatographiesäule, 125 mm \times 4 mm, C_{18} , Korngröße 3 μm , oder gleichwertiges Material
- 4.3. pH-Meter
- 4.4. Polypropylen-Kolben, 125 ml, Weithals mit Schraubkappe
- 4.5. Membranfilter, 0,45 μm
- 4.6. Autoklav, 110 (± 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 ($\pm 0,1$) bar
- 4.7. Mechanisches Schüttelgerät oder Magnetrührer
- 4.8. Vortex-Schüttelgerät

5. Durchführung

5.1. Vorbereitung der Proben

Die Probe wird so fein vermahlen, daß sie ein Sieb mit 0,5 mm Maschenweite passieren kann. Proben mit hohem Feuchtigkeitsgehalt müssen vor dem Vermahlen entweder bei einer Temperatur von höchstens 50°C luftgetrocknet oder gefriergetrocknet werden. Proben mit hohem Fettgehalt sollten vor dem Vermahlen mit Petrolether (3.9) extrahiert werden.

5.2. Bestimmung von freiem Tryptophan (Extrakt)

Eine geeignete Menge (1-5 g) der vorbereiteten Probe (5.1) auf 1 mg genau in einen Erlenmeyerkolben einwiegen. 100,0 ml Salzsäure, $c = 0,1 \text{ mol/l}$, (3.13) und 5,00 ml konzentrierte interne Standardlösung (3.16) zugeben. 60 Min. mit einem mechanischen Schüttelgerät oder einem Magnetrührer (4.7) schütteln bzw. rühren. Absetzen lassen und 10,0 ml des Überstands in ein Becherglas pipettieren. 5 ml Orthophosphorsäure, $c = 0,5 \text{ mol/l}$, (3.14) zugeben. Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid-Lösung, $c = 1,0 \text{ mol/l}$, (3.10) auf 3,0 eingestellt. Ausreichend Methanol (3.8) für eine Methanolkonzentration von 10 bis 30 % im Endvolumen zugeben. In einen Meßkolben mit ausreichendem Volumen überführen und mit Wasser auf das für die Chromatographie notwendige Volumen verdünnen (etwa dasselbe Volumen wie die Kalibrierstandardlösung (3.17)).

Einige ml der Lösung werden durch ein 0,45-µm-Membranfilter (4.5) filtriert, bevor ein Aliquot auf die HPLC-Säule gegeben wird. Die Chromatographie gemäß Nummer 5.4 durchführen.

Standardlösung und Extrakte sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen. Falls es nicht möglich ist, die Extrakte am selben Tag zu analysieren, können sie bei 5 °C maximal drei Tage aufbewahrt werden.

5.3. Bestimmung des Gesamttryptophans (Hydrolysat)

0,1 bis 1 g der vorbereiteten Probe (5.1) werden auf 0,2 mg genau in den Polypropylenkolben (4.4) eingewogen. Der eingewogene Teil der Probe sollte einen Stickstoffgehalt von etwa 10 mg haben. 8,4 g Bariumhydroxid-Octahydrat (3.4) und 10 ml Wasser zugeben. Mit Hilfe eines Vortex-Schüttelgeräts (4.8) oder Magnetrührgeräts (4.7) mischen. Den teflonbeschichteten Magneten in der Mischung lassen. Die Gefäßwände mit 4 ml Wasser abspülen. Schraubkappe aufsetzen und Kolben locker verschließen. In einem Autoklaven (4.6) 30-60 Minuten mit kochendem Wasser erhitzen. Den Autoklaven schließen und 20 Stunden bei 110 (± 2) °C autoklavieren.

Vor dem Öffnen des Autoklaven ist die Temperatur auf knapp unter 100 °C zu senken. Um Kristallisation des Ba(OH)₂ · 8 HO₂ zu vermeiden, sind der warmen Mischung 30 ml Wasser mit Zimmertemperatur zuzugeben. Leicht schütteln oder rühren. 2,00 ml konzentrierte interne Standardlösung (α-Methyl-Tryptophan) (3.16) zugeben. Die Gefäße im Wasser-/Eisbad 15 Min. kühlen.

Anschließend 5 ml Orthophosphorsäure, c = 0,5 mol/l, (3.14) zugeben. Das Gefäß im Kühlbad belassen und unter Rühren mit HCl, c = 6 mol/l, (3.11) neutralisieren; der pH-Wert wird mit HCl, c = 1 mol/l, (3.12) auf 3,0 eingestellt. Ausreichend Methanol für eine Methanolkonzentration von 10 bis 30 % im Endvolumen zugeben. In einen Meßkolben mit ausreichendem Volumen überführen und mit Wasser auf das für die Chromatographie notwendige Volumen verdünnen (z. B. 100 ml). Die Zugabe von Methanol sollte keine Präzipitation verursachen.

Einige ml der Lösung werden durch ein 0,45-µm-Membranfilter (4.5) filtriert, bevor ein Aliquot auf die HPLC-Säule gegeben wird. Die Chromatographie gemäß Nummer 5.4 durchführen.

Standardlösung und Hydrolysate sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen. Falls es nicht möglich ist, die Hydrolysate am selben Tag zu analysieren, können sie bei 5 °C maximal drei Tage aufbewahrt werden.

5.4. HPLC-Bestimmung

Die folgenden Angaben für eine isokratische Trennung sind Richtwerte; andere Parameter können verwendet werden, sofern sie zu vergleichbaren Ergebnissen führen (siehe Bemerkungen 9.1 und 9.2):

Flüssigkeitschromatographiesäule (4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , 3 µm Korngröße oder gleichwertiges Material
Säulentemperatur:	Zimmertemperatur
Mobile Phase (3.22):	3,00 g Essigsäure (3.18) + 900 ml Wasser (3.1) + 50,0 ml Lösung (3.21) von 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol (3.19) in Methanol (3.8) (1 g/100 ml). Mit Ethanolamin (3.20) auf einen pH-Wert von 5,00 einstellen. Mit Wasser (3.1) auf 1 000 ml auffüllen
Durchflußrate:	1 ml/Min.
Gesamtlaufzeit:	etwa 34 Min.
Detektionswellenlänge:	Anregung: 280 nm/Emission: 356 nm
Injektionsvolumen:	20 µl

6. Berechnung der Ergebnisse

$$\frac{A \times B \times C \times D \times E \times MW}{F \times G \times H \times 10\,000 \times W} = \text{g Tryptophan je 100 g Probe}$$

- A = Peakfläche von internem Standard; Kalibrierstandardlösung (3.17)
 B = Peakfläche von Tryptophan, Extrakt (5.2) oder Hydrolysat (5.3)
 C = Volumen der konzentrierten Tryptophanlösung (3.15), das der Kalibrierlösung (3.17) zugegeben wurde, in ml (2 ml)
 D = Konzentration der konzentrierten Tryptophanlösung (3.15), die der Kalibrierlösung (3.17) zugegeben wurde, in $\mu\text{mol/ml}$ (= 2,50)
 E = Volumen der konzentrierten internen Standardlösung (3.16), das bei der Extraktion (5.2) (= 5,00 ml) bzw. bei der Hydrolyse (5.3) (2,00 ml) zugegeben wurde, in ml
 F = Peakfläche von internem Standard, Extrakt (5.2) oder Hydrolysat (5.3)
 G = Peakfläche von Tryptophan, Kalibrierstandardlösung (3.17)
 H = Volumen der konzentrierten internen Standardlösung (3.16), das der Kalibrierstandardlösung (3.17) zugegeben wurde, in ml (2,00 ml)
 W = Probengewicht in g (korrigiert auf Originalgewicht, falls getrocknet und/oder entfettet)
 MW = Molekulargewicht von Tryptophan (= 204,23)

7. Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen bei ein und derselben Probe darf 10 % des höheren Resultats nicht überschreiten.

8. Ergebnisse eines Ringversuchs

Es wurde ein EG-Ringversuch (4. Vergleichstest) durchgeführt, bei dem drei Proben von bis zu 12 Labors analysiert wurden, um die Hydrolysemethode zu zertifizieren. Jede Probe wurde mehrfach (fünfmal) analysiert. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt:

	Probe 1 Schweinefutter	Probe 2 Schweinefutter mit Zusatz von L-Tryptophan	Probe 3 Futterkonzentrat für Schweine
L	12	12	12
n	50	55	50
Mittelwert [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
s_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

- L: Zahl der Labors, die Ergebnisse eingereicht haben
 n: Zahl der Einzelergebnisse ohne Ausreißer (Ausreißertest von Cochran, Dixon)
 s_r : Wiederholdstandardabweichung
 s_R : Vergleichstandardabweichung
 r: Wiederholbarkeit
 R: Vergleichbarkeit
 CV_r : Wiederholvariationskoeffizient
 CV_R : Vergleichsvariationskoeffizient

Es wurde ein weiterer EG-Ringversuch (3. Vergleichstest) durchgeführt, bei dem zwei Proben von bis zu 13 Labors analysiert wurden, um die Methode zur Extraktion von freiem Tryptophan zu zertifizieren. Jede Probe wurde mehrfach (fünfmal) analysiert. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt:

	Probe 4 Mischung aus Weizen und Soja	Probe 5 Mischung aus Weizen und Soja (= Probe 4) mit Tryptophan-Zusatz (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Mittelwert [g/kg]	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
s_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L: Zahl der Labors, die Ergebnisse eingereicht haben
n: Zahl der Einzelergebnisse ohne Ausreißer (Ausreißertest von Cochran, Dixon)
 s_r : Wiederholstandardabweichung
 s_R : Vergleichstandardabweichung
r: Wiederholbarkeit
R: Vergleichbarkeit
 CV_r : Wiederholvariationskoeffizient
 CV_R : Vergleichsvariationskoeffizient

Es wurde ein weiterer EG-Vergleichstest durchgeführt, bei dem vier Proben von bis zu sieben Labors analysiert wurden, um die Tryptophan-Hydrolyse zu zertifizieren. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt. Jede Probe wurde mehrfach (fünfmal) analysiert.

	Probe 1 Schweinemischfutter (CRM 117)	Probe 2 Fischmehl mit geringem Fettgehalt (CRM 118)	Probe 3 Sojamehl (CRM 119)	Probe 4 Magermilchpulver (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Mittelwert [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
s_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L: Zahl der Labors, die Ergebnisse eingereicht haben
n: Zahl der Einzelergebnisse ohne Ausreißer (Ausreißertest von Cochran, Dixon)
 s_r : Wiederholstandardabweichung
 s_R : Vergleichstandardabweichung
r: Wiederholbarkeit
R: Vergleichbarkeit
 CV_r : Wiederholvariationskoeffizient
 CV_R : Vergleichsvariationskoeffizient

9. Bemerkungen

- 9.1. Unter besonderen Chromatographiebedingungen kann eine bessere Trennung von Tryptophan und α -Methyl-Tryptophan erreicht werden.

Isokratische Elution gefolgt von Gradientensäulenreinigung:

Flüssigkeitschromatographiesäule: 125 mm \times 4 mm, C₁₈, 5 μ m Korngröße oder gleichwertiges Material

Säulentemperatur: 32 °C

Mobile Phase: A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/Methanol, 95 + 5 (V + V).
B : Methanol

Gradientenprogramm:	0 Min.	100 % A	0 % B
	15 Min.	100 % A	0 % B
	17 Min.	60 % A	40 % B
	19 Min.	60 % A	40 % B
	21 Min.	100 % A	0 % B
	33 Min.	100 % A	0 % B

Durchflußrate: 1,2 ml/Min.

Gesamtlaufzeit: etwa 33 Min.

- 9.2. Die Durchführung der Chromatographie variiert je nach Art der HPLC und der verwendeten Säulenpackung. Das System muß so gewählt werden, daß eine Grundlinientrennung zwischen Tryptophan und dem internen Standard möglich ist. Die Abbauprodukte müssen deutlich von Tryptophan und internem Standard getrennt werden. Es sollten Hydrolysate ohne internen Standard analysiert werden, um die Grundlinie unter dem internen Standard auf Verunreinigungen zu analysieren. Die Laufzeit muß lang genug sein, daß alle Abbauprodukte eluiert werden, andernfalls können späte Elutionspeaks anschließende Chromatographiedurchgänge beeinträchtigen.

Im Betriebsbereich sollte das Chromatographiesystem eine lineare Reaktion ergeben. Die lineare Reaktion sollte bei einer konstanten (der normalen) Konzentration des internen Standards und unterschiedlichen Tryptophan-konzentrationen gemessen werden. Die Größe des Tryptophan- und des internen Standardpeaks müssen sich innerhalb des linearen Bereichs des HPLC/Fluoreszenzsystems befinden. Sollten der Tryptophan- und/oder der interne Standardpeak zu klein oder zu hoch sein, ist die Analyse mit einer anderen Probengröße und/oder einem anderen Endvolumen zu wiederholen.

- 9.3. Bariumhydroxid

Älteres Bariumhydroxid ist schwerer löslich. Dies kann dazu führen, daß die Lösung für die HPLC-Bestimmung nicht klar ist und zu niedrigen Tryptophan-Werten führen kann.