

DIN EN 14526



ICS 67.120.30

**Lebensmittel –
Bestimmung von Saxitoxin und DC-Saxitoxin in Muscheln –
HPLC-Verfahren mit Vorsäulenderivatisierung mit Peroxid- oder
Periodatoxidation;
Deutsche Fassung EN 14526:2004**

Foodstuffs –

Determination of saxitoxin and dc-saxitoxin in mussels –
HPLC method using pre-column derivatization with peroxide or periodate oxidation;
German version EN 14526:2004

Produits alimentaires –

Détermination de la teneur en saxitoxine et en dc-saxitoxine dans les moules –
Méthode par CLHP avec dérivation pré-colonne et par oxydation au peroxide ou au
periodate;
Version allemande EN 14526:2004

Gesamtumfang 17 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm ist vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN) erarbeitet worden.

Die Mitarbeit des DIN wird über den Arbeitsausschuss „Biotoxine“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Für die im Abschnitt 2 zitierte Norm wird im Folgenden auf die entsprechende Deutsche Norm hingewiesen:

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen; Identisch mit ISO 3696:1987.*

Deutsche Fassung

**Lebensmittel
Bestimmung von Saxitoxin und DC-Saxitoxin in Muscheln
HPLC-Verfahren mit Vorsäulenderivatisierung mit Peroxid- oder
Periodatoxidation**

Foodstuffs —
Determination of saxitoxin and dc-saxitoxin in mussels —
HPLC method using pre-column derivatization with
peroxide or periodate oxidation

Produits alimentaires —
Détermination de la teneur en saxitoxine et en dc-
saxitoxine dans les moules —
Méthode par CLHP avec dérivation pré-colonne et par
oxydation au peroxide ou au periodate

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 21. Mai 2004 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 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, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort.....	3
Einleitung	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Chemikalien	5
5 Geräte	8
6 Durchführung	9
7 HPLC-Bestimmung	11
8 Kalibriergerade	12
9 Identifizierung	12
10 Berechnung	12
11 Präzisionsdaten	13
12 Untersuchungsbericht	13
Anhang A (informativ) Leistungsdaten.....	14
Literaturhinweise.....	15

Vorwort

Dieses Dokument (EN 14526:2004) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Februar 2005, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Februar 2005 zurückgezogen werden.

WARNUNG — Bei der Anwendung dieser Europäischen Norm ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Diese Norm erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung festzulegen, welche einschränkenden Vorschriften gelten.

Einleitung

Dieses Dokument basiert auf dem Verfahren nach Lawrence und Ménard [1]. In der Originalvorschrift wird die Probe an einer C₁₈-Festphase extrahiert und dann an einer anderen Festphase mit einem schwachen Kationenaustauscher gereinigt. Bei Verwendung des Kationenaustauschers werden drei verschiedene Gruppen an Muscheltoxinen durch Elution mit Eluenten verschiedener Ionenstärke und Polarität getrennt. Die verschiedenen Toxingruppen werden dann mit Periodat oder Peroxid derivatisiert, um ein möglichst günstiges Auftreten der Derivatpeaks im Chromatogramm zu ermöglichen. Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren gilt insbesondere für Saxitoxin und Decarbamoyl (DC)-Saxitoxin, sodass nur die C₁₈-Reinigung angewendet wird.

Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren ermöglicht die Wahl zwischen einer Extraktion mit Essigsäure (HAc) oder mit Salzsäure (HCl). Die Wahl durch den Analytiker hängt von der Zielstellung der Untersuchung ab.

Die Salzsäureextraktion bei Siedetemperaturen führt zur teilweisen Hydrolyse der paralytic-shellfish-poisoning-Toxine (PSP toxine), was zur Umwandlung mancher PSP-Toxine (C-1, C-2, GTX-5) in ihre toxischeren Analoge führt (GTX-2, GTX-3, Saxitoxin). Dieser Vorgang erfolgt auch mehr oder weniger im menschlichen Magen. Daher kann diese Art der Extraktion als vernünftige Annäherung angesehen werden, die potenzielle Toxizität abzuschätzen.

Die Essigsäureextraktion bei niedrigeren Temperaturen ist eine mildere Extraktion, bei der das Toxinprofil in der Probe praktisch intakt bleibt. Diese Extraktion kann angewendet werden, wenn es wichtiger erscheint, das tatsächliche Toxinprofil abzuschätzen. Die Essigsäureextraktion wurde bei der Herstellung von zertifizierten Referenzmaterialien für PSP-Toxine angewandt [2] und [3].

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren für die quantitative Bestimmung von Saxitoxin (STX) und Decarbamoyl-Saxitoxin (DCSTX) in Miesmuscheln fest. Es darf auch auf andere Muscheln angewendet werden, z. B. Jakobsmuscheln. Die Bestimmungsgrenze dieses Verfahrens (Signal/Rauschverhältnis = 10) ist 0,006 mg/kg für Saxitoxin und 0,02 mg/kg für DC-Saxitoxin in Muschelfleisch. Dieses Verfahren wurde im Ringversuch für Saxitoxingehalte von 0,4 mg/kg und 0,5 mg/kg und für DC-Saxitoxingehalte von 0,4 mg/kg und 1,6 mg/kg geprüft.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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, *Wasser für analytische Zwecke—Anforderungen und Prüfungen (ISO 3696:1987)*

3 Kurzbeschreibung

Die PSP-Toxine (en: paralytic shellfish poisoning, de: paralytische Schalentiervergiftung) werden aus Muschelhomogenat mit Essigsäure (HAc) oder Salzsäure (HCl) extrahiert. Nach Zentrifugieren wird der Überstand durch Festphasenextraktion (en: solid phase Extraktion, SPE) über eine C₁₈-Reinigungskartusche gereinigt. Ein Teil des Extrakts wird mit Wasserstoffperoxid derivatisiert.

WARNUNG — PSP-Toxine sind starke Neurotoxine. Handschuhe und Schutzbrille müssen ständig getragen werden und alle Arbeitsschritte der Standard- und Probenherstellung müssen unter dem Abzug durchgeführt werden.

Die Derivatisierung von STX und DCSTX führt zu verschiedenen Oxidationsprodukten, die durch Umkehrphasen-HPLC getrennt und mit Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden. Tabelle 1 zeigt die Reaktionsprodukte für STX und DCSTX nach der Derivatisierung mit Wasserstoffperoxid.

Tabelle 1 — Reaktionsprodukte nach der Derivatisierung mit Wasserstoffperoxid

Toxin	Elutions-reihenfolge	Intensität	Peakbezeichnung des Reaktionsproduktes
STX	erstes Signal	+	DCSTX Oxidationsprodukt (1)
	zweites Signal	+	DCSTX Oxidationsprodukt (2)
	drittes Signal	++	STX Oxidationsprodukt
DCSTX	erstes Signal	++	DCSTX Oxidationsprodukt (1)
	zweites Signal	+	DCSTX Oxidationsprodukt (2)

Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren eignet sich für die quantitative Bestimmung der PSP-Toxine STX und DCSTX. Jedoch sollte Folgendes beachtet werden:

Das gemeinsame Auftreten verschiedener PSP-Toxine in Muscheln könnte das Analysenergebnis beeinflussen, denn einige PSP-Toxine können (teilweise) zu denselben Reaktionsprodukten führen. Daher müssen die Chromatogramme sorgfältig interpretiert werden.