

DIN EN 14526

ICS 67.120.30

Ersatz für
DIN EN 14526:2004-11

**Lebensmittel –
Bestimmung von Toxinen der Saxitoxingruppe in Schalentieren –
HPLC-Verfahren mit Vorsäulenderivatisierung mit Peroxid- oder
Periodatoxidation;
Deutsche Fassung EN 14526:2017**

Foodstuffs –

Determination of saxitoxin-group toxins in shellfish –
HPLC method using pre-column derivatization with peroxide or periodate oxidation;
German version EN 14526:2017

Produits alimentaires –

Détermination de la teneur en toxines du groupe de la saxitoxine dans les coquillages –
Méthode par CLHP avec dérivation pré-colonne et par oxydation au peroxyde ou au periodate;
Version allemande EN 14526:2017

Gesamtumfang 71 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 14526:2017) ist vom Technischen Komitee TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) nach eingehenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 14 „Marine Biotoxine“ erarbeitet worden.

Das zuständige deutsche Arbeitsgremium ist der Arbeitskreis NA 057-01-03-01 AK „Algantoxine“ des DIN-Normenausschusses „Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte“ (NAL).

Änderungen

Gegenüber DIN EN 14526:2004-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Der Titel wurde geändert;
- b) die Anwendbarkeit wurde erweitert, da das Verfahren an mehreren Proben in Ringversuchen geprüft wurde;
- c) die Extraktionsvorschrift in 6.2 wurde überarbeitet;
- d) die chromatographischen Bedingungen in Abschnitt 7 wurden überarbeitet;
- e) Leitlinien für die Berechnung bei Vorhandensein mehrerer Toxine wurden eingefügt (Tabelle 7);
- f) das Verfahren wurde in neuen Ringversuchen getestet und die Präzisionsdaten in Anhang A wurden überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN 14526: 2004-11

Deutsche Fassung

Lebensmittel —
Bestimmung von Toxinen der Saxitoxingruppe in
Schalentieren —
HPLC-Verfahren mit Vorsäulenderivatisierung und
Peroxid- oder Periodatoxidation

Foodstuffs —

Determination of saxitoxin-group toxins in shellfish —
HPLC method using pre-column derivatization with
peroxide or periodate oxidation

Produits alimentaires —

Détermination de la teneur en toxines du groupe
de la saxitoxine dans les coquillages —
Méthode par CLHP avec dérivation pré-colonne et
par oxydation au peroxyde ou au periodate

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 7. November 2016 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 des CEN-CENELEC 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, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, 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: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	6
3 Kurzbeschreibung	6
4 Chemikalien	9
5 Geräte	13
6 Durchführung	14
7 HPLC-Bestimmung	19
8 Kalibriergerade	22
9 Identifizierung	22
10 Berechnung	22
11 Präzision	36
12 Untersuchungsbericht	36
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	37
Literaturhinweise	68

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 14526:2017) 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 Juli 2017, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juli 2017 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 ersetzt EN 14526:2004.

EN 14526:2017 enthält die folgenden signifikanten technischen Änderungen im Vergleich zur EN 14526:2004:

- die Anwendbarkeit wurde erweitert, da das Verfahren an mehreren Proben in Ringversuchen geprüft wurde;
- die Extraktionsvorschrift in 6.2 wurde überarbeitet;
- die chromatographischen Bedingungen in Abschnitt 7 wurden überarbeitet;
- Leitlinien für die Berechnung beim Vorhandensein mehrerer Toxine wurden eingefügt;
- das Verfahren wurde in mehreren Ringversuchen zusätzlich validiert und die Präzisionsdaten in Anhang A wurden überarbeitet.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, 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

PSP-Toxine (en: paralytic shellfish poisoning) sind Derivate des Saxitoxins. Diese Toxine wurden in zweischaligen Weichtieren, die sich durch Filtration des Meerwassers ernähren, an verschiedenen Orten der Welt nachgewiesen. Bei einer Vergiftung mit PSP-Toxinen zeigen sich charakteristische Symptome, die von leichtem Kribbeln oder einem Taubheitsgefühl um die Lippen bis hin zu tödlichen Atemlähmungen reichen. Dieses Dokument beschreibt ein Untersuchungsverfahren für die Quantifizierung dieser PSP-Toxine durch Extraktion aus dem Muschelgewebe nach mehreren Reinigungsschritten und einer Trennung mit Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion (FLD).

WARNUNG — Die Anwendung dieser Europäischen Norm kann die Anwendung gefährlicher Stoffe, Arbeitsgänge und Geräte mit sich bringen. Diese Norm erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, vor deren Anwendung geeignete Maßnahmen für die Sicherheit und den Gesundheitsschutz des Personals zu ergreifen und dafür Sorge zu tragen, dass behördliche und gesetzliche Anforderungen eingehalten werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren [1] für die quantitative Bestimmung von Saxitoxin (STX), Decarbamoyl-Saxitoxin (dcSTX), Neosaxitoxin (NEO), Decarbamoyl-Neosaxitoxin (dcNEO), Gonyautoxin 1 und 4 (GTX1,4; Summe der Isomere), Gonyautoxin 2 und 3 (GTX2,3; Summe der Isomere), Gonyautoxin 5 (GTX5, auch als B1 bezeichnet), Gonyautoxin 6 (GTX6, auch als B2 bezeichnet), Decarbamoyl-Gonyautoxin 2 und 3 (dcGTX2,3; Summe der Isomere), N-Sulfocarbamoyl-Gonyautoxin 1 und 2 (C1,2; Summe der Isomere) und (je nach Verfügbarkeit von zertifizierten Referenzmaterialien [CRM, en: certified reference material]) N-Sulfocarbamoyl-Gonyautoxin 3 und 4 (C3,4; Summe der Isomere) in (rohen) Miesmuscheln, Austern, Jakobsmuscheln und Venusmuscheln fest. Laborerfahrungen haben gezeigt, dass das Verfahren auch auf andere Schalentiere [2], [3] und gekochte Schalentiererzeugnisse anwendbar ist. Das beschriebene Verfahren wurde in einem Ringversuch [4], [5] validiert und auch in einer EURL-Leistungsprüfung verifiziert, die auf die Gesamtoxität der Proben ausgerichtet war [6]. Toxine, die nicht im ersten Ringversuch [4], [5] verfügbar waren, wie z. B. dcGTX2,3 und dcNEO, wurden in zwei weiteren Ringversuchen [7], [8] validiert. Die niedrigsten validierten Werte [4], [5], [8] sind in µg Toxin (freie Base)/kg Schalentiergewebe und auch in µmol/kg Schalentiergewebe angegeben und in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 — Niedrigste validierte Werte

Toxin		µg/kg	µmol/kg
Saxitoxin (STX) [5]		22 ^c	0,07 ^c
Gonyautoxin 2,3 (GTX2,3) [5]		114 ^b	0,29 ^b
Gonyautoxin 5 (GTX5, B1) [5]		27 ^c	0,07 ^c
dcSaxitoxin (dcSTX) [5]		8 ^c	0,03 ^c
Neosaxitoxin (NEO) [5]		33 ^c	0,10 ^c
Gonyautoxin 1,4 (GTX1,4) [5]		61,4 ^c	0,15 ^c
N-Sulfocarbamoyl-Gonyautoxin 1,2 (C1,2) [5]		93 ^c	0,20 ^c
N-Sulfocarbamoyl-Gonyautoxin 3,4 (C3,4) [5]		725 ^b	1,48 ^b
Gonyautoxin 6 (GTX6, B2)	direkt [4]	30	0,08
	indirekt [9]	834 ^b	2,11 ^b
dcGonyautoxin 2,3 (dcGTX2,3) [8]		271 ^a	0,77 ^a
dcNeosaxitoxin (dcNEO) [8]		594 ^b	2,18 ^b
^a niedrigster aufgestockter Wert, mittlere Wiederfindung: 58 % [8]			
^b niedrigste untersuchte Konzentration			
^c niedrigste untersuchte Konzentration mit einem HorRat-Wert < 2 [4], [5]			

GTX6 (B2) wurde im ersten Ringversuch nicht quantitativ bestimmt, jedoch wiesen mehrere Laboratorien dieses Toxin direkt nach der Reinigung mit Festphasenextraktion an einem Ionenaustauscher (SPE-COOH) nach. Diese Laboratorien gaben eine Massenkonzentration von 30 µg/kg oder höher in einigen Proben an. Aus diesem Grund ist das vorliegende Verfahren, abhängig von der Verfügbarkeit der Standardsubstanz, für die direkte Quantifizierung von GTX6 (B2) anwendbar. Derzeit ist es möglich, GTX6 nach einer Hydrolyse der Fraktion 2 der SPE-COOH-Reinigung als NEO zu bestimmen, wie in 6.4 beschrieben. Die indirekte Quantifizierung von GTX6 wurde in zwei zusätzlichen Ringversuchen [7], [8] validiert.

C3,4 wurde im ersten Ringversuch quantitativ bestimmt. Das vorliegende Verfahren ist, abhängig von der Verfügbarkeit der Standardsubstanz, für die direkte Quantifizierung von C3,4 anwendbar. Wenn keine

Standardsubstanz verfügbar ist, kann C3,4 nur als GTX1,4 quantifiziert werden, wenn die gleiche Hydrolysevorschrift wie für GTX6 (6.4) auf die Fraktion 1 der SPE-COOH-Reinigung angewendet wird, siehe [10].

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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 Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696)*

3 Kurzbeschreibung

WARNUNG — PSP-Toxine sind Neurotoxine, die oral oder durch Inhalation aufgenommen werden können. Daher müssen angemessene Schutzmaßnahmen ergriffen werden.

Die PSP-Toxine werden aus dem Homogenat von Schalentiergewebe durch Erhitzen mit Essigsäure extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand durch Festphasenextraktion (SPE, en: solid phase extraction) über eine C18-Reinigungskartusche gereinigt. Dieser wird nach der Periodat- oder Peroxidoxidation durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion (FLD) analysiert. Die meisten Toxine (STX, C1,2, GTX5 (B1), dcSTX, GTX2,3 und dcGTX2,3) können nach der SPE-C18-Reinigung quantifiziert werden.¹⁾

Die Oxidation von PSP-Toxinen führt zu verschiedenen Reaktionsprodukten, die durch Umkehrphasen-HPLC getrennt und mit Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden. Tabelle 2 zeigt die entstandenen Reaktionsprodukte für PSP-Toxine nach der Periodat- oder Peroxidoxidation. Zusätzlich sind die entsprechenden Chromatogramme in Bild 1 dargestellt.

Die Gonyautoxine GTX2 und GTX3 sowie GTX1 und GTX4, die Decarbamoyl-Gonyautoxine dcGTX2 und dcGTX3 und die N-Sulfocarbamoyl-Gonyautoxine C1 und C2 sowie C3 und C4 sind Strukturisomere und führen mit beiden Oxidationsverfahren zu den gleichen Reaktionsprodukten. Der Anteil der Strukturisomere wird als Summe der beiden Toxine bestimmt.

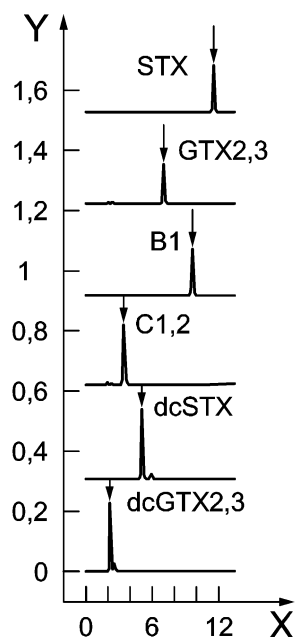
STX reagiert in beiden Oxidationsreaktionen (sowohl in der Peroxid- als auch in der Periodatoxidation) zu demselben einen Oxidationsprodukt. Dasselbe gilt für GTX2,3, GTX5 (B1) und C1,2. Im Unterschied dazu ergeben dcSTX und dcGTX2,3 bei beiden Reaktionen jeweils zwei verschiedene Oxidationsprodukte, siehe auch Tabelle 2. Das Toxin dcNEO reagiert nur bei der Periodatoxidation zu zwei Oxidationsprodukten. Jedes der Toxine NEO, GTX6 (B2), GTX1,4 und C3,4 ergibt drei Peaks nach der Periodatoxidation, jedoch wird nur der zweite Peak für die Quantifizierung herangezogen (die Peroxidoxidation kann für die Quantifizierung nicht verwendet werden).

Das gleichzeitige Auftreten von verschiedenen PSP-Toxinen in Schalentieren kann die Analysenergebnisse beeinflussen, denn einige PSP-Toxine können (teilweise) zu den gleichen Reaktionsprodukten führen (siehe Tabelle 2). Daher müssen die Chromatogramme nach der SPE-C18-Reinigung sorgfältig interpretiert werden.

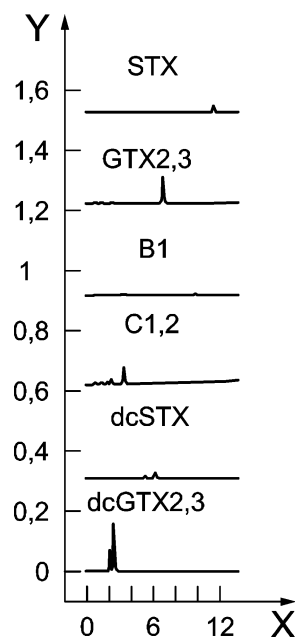
1) Dieses Verfahren beruht auf einer Vorgehensweise, die von Lawrence et al. [4] beschrieben und auch als AOAC Official Method 2005.06 veröffentlicht wurde [1].

Tabelle 2 — Reaktionsprodukte nach der Periodat- oder Peroxidoxidation

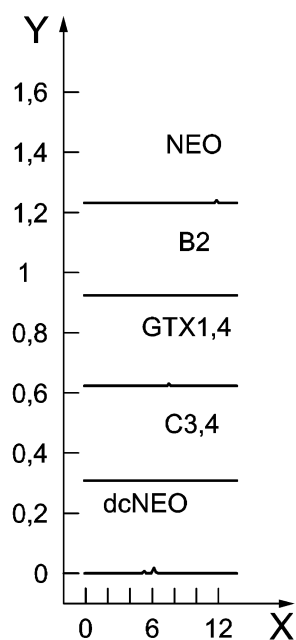
Toxin	Oxidationsprodukte und HPLC-Elutionsreihenfolge		Intensität		Oxidationsprodukt bei der gleichen Retentionszeit wie	
	Peroxid	Periodat	Peroxid	Periodat	Peroxid	Periodat
STX	ein	ein	++	+	NEO ^a {3} ^b	NEO {3}; GTX6 (B2) {3}
dcSTX	erstes {1}	erstes {1}	++	-		dcNEO {1}
	zweites {2}	zweites {2}	+	+	NEO ^a {2}	NEO {2}; GTX6 (B2) {2}; dcNEO {2}
NEO	kein	erstes {1}	—	+		GTX6 (B2) {1}
	zweites {2}	zweites {2}	-	++	dcSTX {2}	GTX6 (B2) {2}; dcSTX {2}, dcNEO {2}
	drittes {3}	drittes {3}	-	+	STX	STX; GTX6 (B2) {3}
C1,2	ein	ein	++	+		
C3,4	kein	erstes {1}	—	+		GTX1,4 {1}
	kein	zweites {2}	—	++		GTX1,4 {2}; dcGTX2,3 {2}
	kein	drittes {3}	—	+		GTX1,4 {3}; GTX2,3
GTX1,4	kein	erstes {1}	—	+		C3,4 {1}
	kein	zweites {2}	—	++		C3,4 {2}; dcGTX2,3 {2}
	drittes {3}	drittes {3}	-	++	GTX2,3	C3,4 {3}; GTX2,3
GTX2,3	ein	ein	++	++	GTX1,4 ^a {3}	C3,4 {3}; GTX1,4 {3}
GTX5 (B1)	ein	ein	++	-		
GTX6 (B2)	kein	erstes {1}	—	+		NEO {1}
	kein	zweites {2}	—	++		NEO {2}; dcSTX {2}; dcNEO {2}
	kein	drittes {3}	—	-		NEO {3}; STX
dcGTX2,3	erstes {1}	erstes {1}	++	+		
	zweites {2}	zweites {2}	+	++		C3,4 {2}; GTX1,4 {2}
dcNEO	erstes {1}	erstes {1}	-	++		dcSTX {1}
	zweites {2}	zweites {2}	-	+	dcSTX {2}	dcSTX {2}; NEO {2}; GTX6 (B2) {2}
Intensität:— nicht sichtbar - sehr gering + gering ++ hoch						
^a Eine hohe Konzentration des angegebenen Toxins kann die Quantifizierung durch Vortäuschen eines erhöhten Gehaltes beeinflussen. ^b Die Zahlen in den geschweiften Klammern beziehen sich auf die Elutionsreihenfolge.						



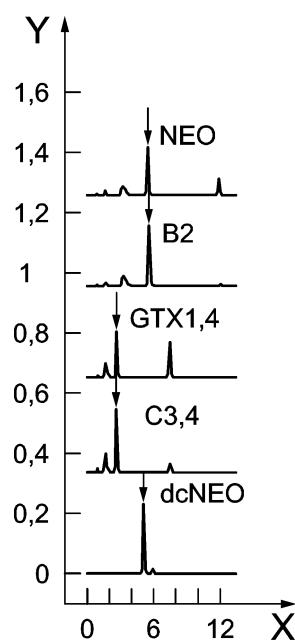
a) nicht-hydroxylierte Toxine: Peroxid



b) nicht-hydroxylierte Toxine: Periodat



c) N-hydroxylierte Toxine: Peroxid



d) N-hydroxylierte Toxine: Periodat

Legende

Y Nachweisresponse (V)

X Zeit (min)

Bild 1 — Reaktionsprodukte nach der Derivatisierung mit Peroxid und Periodat (die Peaks für die Quantifizierung sind mit Pfeilen gekennzeichnet)

Für die quantitative Bestimmung von N-hydroxylierten Toxinen ist eine Fraktionierung durch SPE-COOH-Reinigung notwendig (in Tabelle 3 dargestellt), da die Oxidationsprodukte bestimmter PSP-Toxine [NEO und GTX6 (B2), GTX1,4 und C3,4] identisch sind. Dieser Arbeitsschritt trennt die PSP-Toxine durch Elution mit mobilen Phasen unterschiedlicher Ionenstärke in drei eindeutige Gruppen, die als C-Toxin-Gruppe, GTX-Toxin-Gruppe und als Saxitoxin-Gruppe bezeichnet werden. Die C-Toxine eluieren unverzüglich mit Wasser, die GTX-Toxine (sowohl GTX1 bis GTX6 als auch dcGTX2 und dcGTX3) eluieren mit 0,05 mol/l NaCl-Lösung, während die Saxitoxin-Gruppe (STX, NEO, dcNEO und dcSTX) für die Elution eine 0,3 mol/l NaCl-Lösung erfordert. Diese Fraktionen können mit HPLC nach der Periodat- oder Peroxidoxidation analysiert werden.

Tabelle 3 — Toxin-Elutionsreihenfolge nach der SPE-COOH-Reinigung

Fraktion	Eluent	Eluiertes Toxin
1	Wasser	C1,2; C3,4
2	0,05 mol/l NaCl	dcGTX2,3; GTX2,3; GTX1,4; GTX5; GTX6 (B2)
3	0,3 mol/l NaCl	dcSTX; STX; NEO; dcNEO

4 Chemikalien

Soweit nicht anders festgelegt, müssen analysenreine (p.a.) Chemikalien und für HPLC-FLD geeignete Löse-mittel verwendet werden.

Das verwendete Wasser muss vor der Anwendung in Glasgefäßen destilliert oder entmineralisiert werden oder von entsprechender Reinheit nach EN ISO 3696 sein.

Wenn nicht bereits festgelegt, sollte die Stabilität der Lösungen durch das Labor geprüft werden.

4.1 Methanol, HPLC-Qualität.

4.2 Acetonitril, HPLC-Qualität.

4.3 Ammoniumformiatlösung, Stoffmengenkonzentration $c = 0,3 \text{ mol/l}$.

1,892 g Ammoniumformiat (kristallines Pulver) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.4 Eisessig

4.4.1 Essigsäurelösung 1, Massenkonzentration $\rho \approx 1 \%$.

1 ml Eisessig (4.4) wird mit Wasser auf 100 ml verdünnt.

4.4.2 Essigsäurelösung 2, $c \approx 0,1 \text{ mol/l}$.

572 µl Eisessig (4.4) werden mit Wasser auf 100 ml verdünnt.

4.4.3 Essigsäurelösung 3, $c \approx 0,1 \text{ mmol/l}$.

100 µl Essigsäurelösung 2 (4.4.2) werden mit Wasser auf 100 ml verdünnt.

4.5 Ammoniumacetat

4.5.1 Ammoniumacetatlösung 1, $c = 0,1$ mol/l.

0,77 g Ammoniumacetat (4.5) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.5.2 Ammoniumacetatlösung 2, $c = 0,01$ mol/l.

10 ml Ammoniumacetatlösung 1 (4.5.1) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.6 Natriumchlorid

4.6.1 Natriumchloridlösung 1, $c = 0,05$ mol/l.

0,29 g Natriumchlorid (4.6) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.6.2 Natriumchloridlösung 2, $c = 0,3$ mol/l.

1,75 g Natriumchlorid (4.6) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.7 Salzsäure, $c = 1$ mol/l.

4.8 Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung, $c = 0,3$ mol/l

4,26 g Dinatriumhydrogenphosphat werden in 100 ml Wasser gelöst oder 8,04 g Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.9 Natriumhydroxid

4.9.1 Natriumhydroxidlösung 1, $c = 1$ mol/l.

4 g Natriumhydroxid (4.9) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.9.2 Natriumhydroxidlösung 2, $c = 0,2$ mol/l.

10 ml Natriumhydroxidlösung 1 (4.9.1) werden mit Wasser auf mit 50 ml verdünnt.

4.10 Wasserstoffperoxidlösung, $w \approx 10$ %.

3 ml kommerziell erhältliche Wasserstoffperoxidlösung, Massenkonzentration $w = 30$ %, werden mit 6 ml Wasser verdünnt. Die Lösung wird täglich frisch hergestellt. Beide Lösungen werden im Dunkel bei etwa $+4$ °C aufbewahrt.

4.11 Periodsäure

4.11.1 Periodsäurelösung 1, $c = 0,1$ mol/l.

0,227 9 g Periodsäure (4.11) werden in 10 ml Wasser gelöst.

4.11.2 Periodsäurelösung 2, $c = 0,034$ mol/l.

3,4 ml Periodsäurelösung 1 (4.11.1) werden mit 6,6 ml Wasser verdünnt. Die Lösung wird in einem Kühlschrank im Dunkel bei etwa $+4$ °C aufbewahrt. Die Lösung wird täglich frisch hergestellt.

4.12 Periodat-Oxidationsreagenz

Ein Volumenteil Periodsäurelösung 2 (4.11.2) wird mit einem Volumenteil Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (4.8) und einem Volumenteil Ammoniumformiatlösung (4.3) gemischt. Durch tropfenweise Zugabe von Natriumhydroxidlösung 2 (4.9.2) wird der pH-Wert auf 8,2 eingestellt, der mit einem pH-Messgerät überprüft wird. Die Lösung wird an jedem Analysentag frisch hergestellt.

4.13 PSP-Toxin-Standardsubstanzen

4.13.1 PSP-Toxin-Stammlösungen

Einfachheitshalber können die Standardsubstanzen durch geeignete Verdünnung der Standardlösungen mit Wasser in drei Gemische zusammengefasst werden. Die Lösungen werden mit 0,1 mol/l Essigsäurelösung 2 (4.4.2) auf einen pH-Wert von etwa 4 eingestellt. Für die Untersuchung auf C1,2 werden die Lösungen auf einen pH-Wert von 5 eingestellt, da ansonsten eine Zersetzung beobachtet wurde. Tabelle 4 zeigt geeignete Konzentrationen für jedes PSP-Toxin in drei Stammlösungsgemischen. Die Lösungen werden im Dunkel bei etwa +4 °C aufbewahrt und die Massenkonzentrationen werden regelmäßig nach 2 Wochen überprüft oder die Lösungen werden im Dunkel bei etwa –18 °C oder darunter aufbewahrt und die Massenkonzentrationen werden regelmäßig nach 6 Monaten überprüft.

Tabelle 4 — Beispiele für geeignete Konzentrationen für jedes PSP-Toxin in drei Stammlösungsgemischen

Stammlösungsgemische		Toxin-Konzentration	
		µg/ml ^a	nmol/ml
Gemisch 1	GTX1,4	0,192	0,467
	NEO	0,189	0,600
Gemisch 2	GTX2,3	0,265	0,670
	GTX5 (B1)	0,202	0,532
	STX	0,201	0,672
	dcSTX	0,054	0,211
	dcGTX2,3	0,080	0,227
Gemisch 3	C1,2	0,203	0,427
	C3,4	0,188	0,383
	dcNEO	0,137	0,503
^a bezogen auf die freie Base der Toxine			

ANMERKUNG Ampullen, die jeweils separat STX-, NEO-, GTX1,4-, GTX2,3-, C1,2-, GTX5-, dcGTX2,3-, dcNEO-, dcSTX-Standardsubstanzen in Salzsäure oder in wässriger Essigsäure mit einem Konzentrationsbereich von 100 µg/ml bis 2 000 µg/ml enthalten, sind kommerziell erhältlich.²⁾

- 2) Geeignete Kalibrierlösungen sind beim National Research Council Canada, Halifax, Kanada erhältlich. Weitere Informationen über geeignete Kalibrierlösungen sind z. B. von der Homepage des Europäischen Referenzlabors für Marine Biotoxine unter <http://aesan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/home.shtml> und http://www.aesan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/estandares_materiales_referencia/materiales_referencia.shtml erhältlich. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Bezugsquelle durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

Einige der Standardsubstanzen können mit anderen PSP-Toxinen kontaminiert sein; deshalb müssen die Verunreinigungen für die Kalibrierzwecke (durch Quantifizierung der Verunreinigungen, Erstellen verschiedener Kalibrierkurven oder durch ihre Einbeziehung in die Messunsicherheiten) berücksichtigt werden.

4.13.2 PSP-Toxin-Kalibrierlösungen

Für die Bestimmung der PSP-Toxine wird mit mindestens fünf Punkten kalibriert, beispielsweise mit einer unverdünnten PSP-Toxin-Stammlösung, sowie einer 2,5fachen, einer 5fachen, einer 7,5fachen und einer 10fachen Verdünnung der PSP-Toxin-Stammlösung (4.13.1) mit 0,1 mmol/l Essigsäuresäurelösung 3 (4.4.3). PSP-Toxin-Kalibrierlösungen dürfen auch durch Verdünnen der Stammlösungsgemische mit Wasser (sofern der pH-Wert im sauren Bereich liegt) hergestellt werden. Die Lösungen werden im Dunkel bei -18°C aufbewahrt und die Massenkonzentration wird regelmäßig nach 6 Monaten überprüft.

ANMERKUNG 1 Es ist wichtig, dass die verdünnten Standardlösungen in Kunststofffläschchen oder in deaktivierten Glasbehältern aufbewahrt werden: Diese Deaktivierung kann z. B. durch Eintauchen der Fläschchen in Natriumhydroxid über Nacht, Spülen mit Wasser und danach mit Methanol sowie anschließendem Trocknen erfolgen.

Für den Ringversuch in A.1 [4], [5], wurden drei Kalibrierpunkte angewendet. Um die Robustheit des Verfahrens jedoch zu erhöhen, wird die Anwendung von mindestens fünf Kalibrierpunkten empfohlen.

ANMERKUNG 2 Ein weiteres Verfahren ist es, die Kalibrierlösung im Oxidationsschritt (6.5.2 und 6.5.3) herzustellen. Dazu werden verschiedene Aliquote aus der PSP-Toxin-Stammlösung jeweils mit 0,1 mmol/l Essigsäurelösung 3 (4.4.3) auf ein Endvolumen von 100 μl aufgefüllt.

4.13.3 PSP-Lösung zur Prüfung der Wiederfindung

Zur Prüfung der Wiederfindung der Toxine auf den Festphasenextraktions-Kartuschen (SPE-Kartuschen) werden Lösungen von Toxinen mit geeigneten Massenkonzentrationen (z. B. in 0,6%iger Essigsäure) hergestellt.

4.14 Matrixmodifier für die Periodatoxidation

Ein PSP-freier Blindextrakt von Austern wird verwendet, der wie in 6.1 und 6.2 beschrieben hergestellt wird. Dieser PSP-freie Austernrohextrakt ist bei Lagerung im gefrorenen Zustand bei -20°C stabil und kann innerhalb mindestens der nächsten zwei Monate verwendet werden. Für die Verwendung als Matrixmodifier wird der Extrakt nach 6.3.1 gereinigt und der pH-Wert mit Natriumhydroxidlösung 1 (4.9.1) auf $\text{pH} = 6,5$ eingestellt. Die Lösung kann in einem Kühlschrank zwei bis drei Tage gelagert werden, damit mitextrahiertes Material ausfällt. Der Überstand wird dekantiert oder durch ein $0,45\text{-}\mu\text{m}$ -Filter (5.20) filtriert und der erhaltene Matrixmodifier in einem Kühlschrank aufbewahrt. Um vor der Verwendung die Abwesenheit von Toxinen sicherzustellen, wird der Matrixmodifier auf PSP-Toxine durch Periodat- und Peroxidoxidation untersucht. Er muss alle zwei Wochen hergestellt werden (z. B. erneut durch Reinigung aus dem Rohextrakt).

4.15 Eluenten für die HPLC

4.15.1 Eluent A: Ammoniumformiat, $c = 0,1 \text{ mol/l}$

6,31 g Ammoniumformiat werden in 1 l Wasser gelöst und durch Zugabe von etwa 6 ml Essigsäurelösung 2 (4.4.2) wird der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Die Lösung wird mit Unterdruck durch einen Membranfilter (5.18) filtriert.

4.15.2 Eluent B: Ammoniumformiat, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ in 5%igem Acetonitril.

6,31 g Ammoniumformiat werden in 950 ml Wasser gelöst und mit 50 ml Acetonitril (4.2) versetzt. Durch Zugabe von etwa 6 ml Essigsäurelösung 2 (4.4.2) wird der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Die Lösung wird mit Unterdruck durch einen Membranfilter (5.18) filtriert.

5 Geräte

Übliche Laborglasgeräte und -ausrüstung und insbesondere Folgendes:

- 5.1 **Zerkleinerungsgerät.**
- 5.2 **Waage**, für Wägungen auf 0,01 g.
- 5.3 **Analysenwaage**, für Wägungen auf 0,1 mg.
- 5.4 **Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff (Polypropylen)**, 50 ml, mit Verschlusskappen.
- 5.5 **Zentrifuge**, geeignet für 3 600 g^3) am äußeren Ende der Zentrifugenröhrchen.
- 5.6 **Pipetten**, Kolbenhubpipetten mit Einwegspitzen aus Kunststoff.
- 5.7 **Vortex-Mischer.**
- 5.8 **Wasserbad oder Heizplatte.**
- 5.9 **Messröhrchen oder Reagenzglas**, konisch, mit Graduierung, (2 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml).
- 5.10 **SPE-C18-Kartuschen**, z. B. 500 mg je 3 ml Volumen.

Um sicherzustellen, dass die mit der C18-Kartusche erhaltene Wiederfindung mindestens 80 % beträgt, wird jede neue Charge der SPE-C18-Kartuschen (z. B. Supelcoclean LC18) mit den Standardlösungen (4.13.3) geprüft. Diese Prüfung ist infolge der während der Verfahrensentwicklung gesammelten Erfahrungen notwendig, weil beobachtet wurde, dass Variationen auftreten können. Diese Prüfung ist für GTX6 und C3,4 nicht möglich, da Standardsubstanzen kommerziell derzeit nicht verfügbar sind.

Wenn das Laboratorium im Laufe der Zeit gezeigt hat, dass die Leistung der SPE-Kartuschen innerhalb einer Charge stabil ist, darf wie folgt vorgegangen werden: Jede neue Charge der SPE-C18-Kartuschen muss mit Probenlösungen mit genau bekannten Konzentrationen geprüft werden, um sicherzustellen, dass die Mindestwiederfindung der gesamten Verfahrensweise dem Mindestniveau der Validierungsdaten entspricht.

5.11 Kartuschen für den SPE-COOH-Ionenaustausch, z. B. 500 mg je 3 ml Volumen.

Um sicherzustellen, dass die mit der COOH-Kartusche erhaltene Wiederfindung mindestens 80 % beträgt und die korrekten Elutionsmuster nach 6.3.2 erhalten werden, wird jede neue Charge von SPE-COOH-Kartuschen (z. B. Bakerbond Carboxylic Acidsilane oder, optional, ein weicher Kationenaustauscher Strata-X® von Phenomenex) mit Standardlösungen (4.13.3) geprüft. Diese Prüfung ist infolge der während der Verfahrensentwicklung gesammelten Erfahrungen notwendig, weil beobachtet wurde, dass Variationen auftreten können. Diese Prüfung ist für GTX6 und C3,4 nicht möglich, da Standardsubstanzen kommerziell derzeit nicht verfügbar sind.

Wenn das Laboratorium im Laufe der Zeit gezeigt hat, dass die Leistung der COOH-Kartuschen innerhalb einer Charge stabil ist, darf wie folgt vorgegangen werden: Jede neue Charge der COOH-Kartuschen muss mit Probenlösungen mit genau bekannten Konzentrationen geprüft werden, um sicherzustellen, dass die Mindestwiederfindung der gesamten Verfahrensweise dem Mindestniveau der Validierungsdaten entspricht.

3) $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$

5.12 Mehrfach- oder Automatik-SPE-Station (für die SPE-Reinigungen).

5.13 Heizblock (oder ähnliches Gerät) für den Hydrolyse-Schritt.

5.14 Reaktionsgefäße, z. B. Glasröhrchen mit Schraubverschluss oder Fläschchen mit 1,5 ml.

5.15 pH-Indikatorpapier, geeignet zur präzisen Identifizierung eines pH-Wertes von $6,5 \pm 0,3$.

5.16 pH-Messgerät.

5.17 Rotationsverdampfer, optional für Proben mit geringen Konzentrationen.

5.18 Membranfilter, für wässrige Lösungen, mit einer Porengröße von $0,45 \mu\text{m}$, z. B. regenerierte Zellulose.

5.19 HPLC-Probenfläschchen, z. B. Braunglas.

5.20 HPLC-System, bestehend aus Folgendem:

5.20.1 Injektor, vorzugsweise ein gekühlter Injektor, geeignet für Injektionen bis zu $100 \mu\text{l}$.

5.20.2 Pumpe, geeignet zur Gradientenelution.

5.20.3 Säulenofen, geeignet zum Heizen auf $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

5.20.4 Trennsäule, z. B. RP C18, Partikelgröße $5 \mu\text{m}$, 150 mm (Länge) $\times$ $4,6 \text{ mm}$ (Durchmesser).

Die Messung darf mit unterschiedlichen Trennsäulen (Maße, Hersteller) durchgeführt werden. Jedoch müssen die PSP-Oxidationsprodukte basislinien-getrennt sein.

5.20.5 Fluoreszenzdetektor, Anregungswellenlänge $\lambda = 340 \text{ nm}$, Emissionswellenlänge $\lambda = 395 \text{ nm}$, geeignet für den Nachweis einer mit Peroxid behandelten (6.5.3) 400 pg STX-Substanz als freie Base auf der Säule mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 10:1.

6 Durchführung

6.1 Probenvorbereitung

Die Außenseite des Schalentiers wird gründlich mit Leitungswasser gereinigt. Das Schalentier wird durch das Durchtrennen des Adduktormuskels (Schließmuskel) geöffnet. Die Schalen werden einmal mit Leitungswasser abgespült, um Sand und Fremdstoffe zu entfernen. Durch Abtrennen des mit dem Scharnierbereich verbundenen Adduktormuskels und des Gewebes wird das Schalentiergewebe von den Schalen entfernt. Nach dem Entfernen der Schale wird das Gewebe 5 min in ein Sieb zum Abfließen des überschüssigen Wassers gegeben. Das Schalentiergewebe wird in einem Zerkleinerungsgerät (5.1) homogenisiert. Mindestens 100 g bis 150 g des zusammengefassten (gepoolten) homogenisierten Gewebes sollten verwendet werden. Wenn die Untersuchung nicht sofort im Anschluss durchgeführt wird, kann das homogenisierte Schalentiergewebe eingefroren werden.

6.2 Extraktionsverfahren

Die homogenisierte Probe wird im Kühlschrank oder bei Raumtemperatur aufgetaut oder direkt nach dem Zerkleinern (6.1) verwendet.

Die Probe wird nicht erhitzt.

Alle nicht verwendeten Extrakte und Lösungen werden gekühlt.

Eine Probenmenge von $(5 \pm 0,1)$ g Schalentierhomogenat wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (5.4) eingewogen und nach Zugabe von 3 ml 1%iger Essigsäurelösung 1 (4.4.1) mit einem Vortex-Mischer durchmischt. Das Röhrchen wird lose verschlossen, um einen Druckaufbau während des Erhitzens zu vermeiden, und so in ein siedendes Wasserbad (100 °C) gestellt, dass sich der Inhalt des Röhrchens unterhalb der Wasserlinie befindet. Die Proben werden 5 min erhitzt.

Es wird sichergestellt, dass das Wasserbad den Siedepunkt erreicht hat, bevor die Proben hineingestellt werden und die Erhitzungszeit beginnt. Um zu vermeiden, dass das Sieden des Wasserbades länger als 30 s unterbrochen wird, werden in das Wasserbad nicht zu viele Proben auf einmal gestellt.

Die Proben werden dem Wasserbad entnommen, erneut mit dem Vortex-Mischer durchmischt und durch Aufbewahren für 5 min in einem Kühlschrank oder in einem Becher mit kaltem Wasser abgekühlt und 10 min bei 3 600 g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein konisches 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit Graduierung (5.9) dekantiert.

3 ml 1%ige Essigsäurelösung 1 (4.5.1) werden in das Zentrifugenröhrchen gegeben, das die einmal extrahierte Probe (fester Rückstand) enthält, sorgfältig mit dem Vortex-Mischer durchmischt und nochmals 10 min bei 3 600 g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und in demselben konischen 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit Graduierung (5.9) gesammelt, das den zuerst gesammelten Rohextrakt enthält, und dann mit Wasser genau auf 10 ml aufgefüllt.

Das Verfahren kann an diesem Punkt unterbrochen werden und der Extrakt muss in einem Kühlschrank aufbewahrt werden.

6.3 Probenreinigung

6.3.1 SPE-C18-Reinigung

Die Kartusche wird nach den Anweisungen des Herstellers konditioniert, z. B. wird eine 3 ml SPE-C18-Kartusche (5.10) mit 6 ml Methanol gefolgt von 6 ml Wasser konditioniert. Die Lösungen, die die Kartusche durchlaufen haben, werden verworfen. Unter die Kartusche wird ein konisches 5-ml-Reagenzglas mit Graduierung (5.9) gestellt. Auf die Kartusche wird 1 ml (0,5 g Schalentiergewebe-Äquivalent) des Rohextraktes (6.2) aufgegeben. Die Durchflussrate wird für alle Elutionen auf 2 ml/min bis 3 ml/min eingestellt. Das Eluat wird in dem graduierten Reagenzglas gesammelt. Die Kartusche wird mit 2 ml Wasser gewaschen und die Waschflüssigkeit mit dem Eluat vereinigt, was den gereinigten Extrakt ergibt.

Das Trockenlaufen der Kartuschen ist während des gesamten Verfahrens zu vermeiden.

Der pH-Wert dieses gereinigten Extraktes wird mit 1 mol/l NaOH-Lösung (4.9.1) mit einem pH-Indikatorpapier (5.15) oder einem pH-Messgerät (5.16) auf 6,5 eingestellt und anschließend wird das Volumen mit Wasser auf genau 4 ml aufgefüllt.

Für Screeningzwecke kann die Probenreinigung an diesem Punkt beendet werden. Die Extrakte der SPE-C18-Reinigung sind üblicherweise in einem Gefrierschrank mehr als ein Jahr stabil, was jedoch zu verifizieren ist.

Aliquote dieses Extraktes dürfen für die in 6.5.2 und 6.5.3 beschriebene Periodat- und Peroxidoxidation verwendet werden.

Zusätzlich wird ein Aliquot dieses Extraktes als Kontrollprobe für die Peroxidoxidation ohne Oxidation analysiert, um sicherzustellen, dass die Peaks im Chromatogramm der oxidierten Probe durch die PSP-Toxine verursacht werden und nicht durch natürlich fluoreszierende Verbindungen. Außerdem muss ein Aliquot des Probenextraktes von der SPE-C18-Reinigung als Kontrollprobe für die Periodatoxidation mit dem Matrixmodifier und Wasser (anstelle von Periodat-Oxidationsmittel) gemischt und analysiert werden. Das sich ergebende Chromatogramm ermöglicht die Identifizierung der aus den natürlich fluoreszierenden Proben-Coextrakten entstandenen Peaks. Unter diesen Bedingungen erzeugen PSP-Toxine keine Peaks.

Sofern N-hydroxylierte PSP-Toxine in diesem Extrakt nachgewiesen werden, wird mit der nachstehend beschriebenen Reinigung über eine SPE-COOH-Ionenaustauscher-Kartusche fortgefahren.

ANMERKUNG Bei der Untersuchung von mit NEO und GTX1,4 kontaminierten ganzen Großen Pilgermuscheln (*Pecten maximus*) und ganzen Kleinen Pilgermuscheln (*Aequipecten opercularis*) erhöht die Verwendung von 1,5 ml Rohextrakt für die SPE-C18-Reinigung die Wiederfindung von GTX1,4 und NEO [3].

6.3.2 SPE-COOH-Reinigung (Fraktionierung)

Nach der SPE-C18-Reinigung werden nur die Extrakte fraktioniert, die N-hydroxylierte PSP-Toxine (z. B. NEO, dcNEO, C3,4; GTX6 (B2) und GTX1,4) enthalten.

Die Kartusche wird nach den Anweisungen des Herstellers konditioniert, z. B. wird eine 3 ml SPE-COOH-Kartusche (5.11) durch Aufgabe von 10 ml 0,01 mol/l Ammoniumacetatlösung 2 (4.6.2) konditioniert. Die Durchflussrate wird für alle Elutionen auf 2 ml/min bis 3 ml/min eingestellt. Das Eluat wird verworfen.

Fraktion 1: 2 ml Aliquot (0,25 g Schalentiergewebe-Äquivalent) des Schalentierextraktes aus der SPE-C18-Reinigung (6.3.1) werden durch die Kartusche laufen gelassen und das Eluat in einem als Fraktion 1 gekennzeichneten, konischen 10-ml-Zentrifugenröhrchen mit Graduierung gesammelt. Anschließend werden 4 ml Wasser durch die Kartusche laufen gelassen und in demselben Röhrchen gesammelt. Das Endvolumen wird auf insgesamt 6 ml aufgefüllt. Diese Fraktion enthält die C-Toxin-Gruppe. Es folgen die Oxidationsschritte wie unter 6.5.2 und/oder 6.5.3 beschrieben. Falls C3,4 vorhanden ist, wird nach 6.4 fortgefahren.

Fraktion 2: 4 ml 0,05 mol/l NaCl-Lösung 1 (4.6.1) werden durch dieselbe Kartusche laufen gelassen und das Eluat (gekennzeichnet als Fraktion 2) wird in einem konischen 5-ml-Zentrifugenröhrchen mit Graduierung gesammelt. Das Endvolumen wird auf 4 ml aufgefüllt. Diese Fraktion enthält die Toxine GTX1,4, GTX2,3, GTX5 (B1), GTX6 (B2) und dcGTX2,3. Es folgen die Oxidationsschritte wie unter 6.5.2 und/oder 6.5.3 beschrieben. Falls GTX6 (B2) vorhanden ist, wird nach 6.4 fortgefahren.

Fraktion 3: 5 ml 0,3 mol/l NaCl-Lösung 2 (4.6.2) werden durch dieselbe Kartusche laufen gelassen und in einem als Fraktion 3 gekennzeichneten, konischen 5-ml-Zentrifugenröhrchen mit Graduierung gesammelt. Das Endvolumen wird auf 5 ml aufgefüllt. Diese Fraktion enthält STX, NEO, dcNEO und dcSTX. Es folgen die Oxidationsschritte wie unter 6.5.2 und/oder 6.5.3 beschrieben.

Das Trockenlaufen der Kartuschen ist während des gesamten Verfahrens zu vermeiden.

Falls Probleme mit der Detektorempfindlichkeit auftreten, kann jede Fraktion konzentriert werden. Hierzu wird empfohlen, jede Fraktion aus der SPE-COOH-Reinigung in einem 50-ml-Rundkolben anstelle eines konischen Zentrifugenröhrchens mit Graduierung zu sammeln und auf etwa 1 ml einzuengen, und zwar z. B. mit einem Rotationsverdampfer oder einem anderen gleichwertigen Verdampfer in einem auf 45 °C eingestellten Wasserbad. Die Lösung wird mit einer Pasteurpipette in ein konisches 5-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Der 50-ml-Rundkolben wird dreimal mit je etwa 0,2 ml bis 0,3 ml Wasser ausgespült, dabei wird die Spülflüssigkeit in das konische Zentrifugenröhrchen mit Graduierung überführt, sodass das

Endvolumen der Fraktion 2 aus der SPE-COOH Reinigung genau 2 ml beträgt. Die Fraktionen 1, 2 und 3 werden mit HPLC nach den Periodat- und Peroxidoxidationen entsprechend 6.5.2 und/oder 6.5.3 analysiert.

ANMERKUNG Um die Empfindlichkeit des Verfahrens zu verbessern, wurde während einer laborinternen Validierung [2], [11], ein alternatives Reinigungsverfahren mit Ionenaustausch-SPE entwickelt (Verfahrensweise siehe 6.3.3).

Die Probenreinigung kann an diesem Punkt unterbrochen werden. Gleich anschließend wird die Oxidation und die HPLC-FLD-Analyse durchgeführt oder die Fraktion aus der SPE-COOH-Reinigung wird in einem Kühlschrank nicht mehr als eine Woche oder in einem Gefrierschrank nicht mehr als ein Jahr aufbewahrt.

6.3.3 Alternative Reinigung durch SPE mit schwachem Kationenaustausch [2], [11]

Zur Verbesserung der Empfindlichkeit und zur Reduzierung der Verschleppung in die angrenzenden Fraktionen mit geringen PSP-Toxingehalten kann die folgende modifizierte Reinigung nach der SPE-C18-Reinigung angewendet werden, jedoch wurde diese Verfahrensweise nur laborintern validiert.

Das Fraktionierungsverfahren entspricht dem in 6.3.2 beschriebenen. Im Gegensatz zu [1] differieren nur die Konzentration der Natriumchloridlösungen und das Volumen für die Elution (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5 — Vergleich der Fraktionierbedingungen [2], [11]

Fraktion	Toxine	COOH-SPE (z. B. Bakerbond Carboxylic Acidsilane)		schwacher Kationenaustauscher (z. B. Strata-X-CW, Phenomenex)	
		Elutionslösemittel	Volumen	Elutionslösemittel	Volumen
F1	C1,2; C3,4	Wasser	6,0 ml	Wasser	5,0 ml
F2	GTX1,4; GTX2,3; dcGTX2,3; GTX5; GTX6	0,05 mol/l NaCl	4,0 ml	0,3 mol/l NaCl	3,0 ml
F3	STX; NEO; dcNEO; dcSTX	0,3 mol/l NaCl	5,0 ml	2,0 mol/l NaCl	3,0 ml

6.4 Umwandlung von GTX6 (B2) in NEO und/oder C3,4 in GTX1,4

6.4.1 Allgemeines

Derzeit ist keine GTX6 (B2)-Standardsubstanz verfügbar. Um GTX6 (B2) analysieren zu können, muss daher das Toxin zu NEO hydrolysiert werden, das dann quantifiziert werden kann [7], [8]. Der Gehalt an GTX6 (B2) kann indirekt durch Hydrolyse der Fraktion 2 aus der SPE-COOH-Reinigung bestimmt werden, in der NEO nicht vorkommt.

Derzeit ist keine C3,4-Standardsubstanz kommerziell verfügbar. Das Toxin, das in Fraktion 1 der SPE-COOH-Reinigung vorhanden ist, kann indirekt durch die Hydrolyse zu GTX1,4 bestimmt werden [10].

6.4.2 Hydrolyse der SPE-COOH-Fraktion 1 oder 2

In ein HPLC-Probenfläschchen oder in ein Glasröhrchen mit Schraubverschluss werden 75 µl 1 mol/l HCl zu 300 µl der Fraktion 2 des SPE-COOH-Extraktes (6.3.2) gegeben. Das Fläschchen/Röhrchen wird fest verschlossen und gewogen. Das Gemisch wird 20 min bei 90 °C in einem Wasserbad oder Heizblock erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und das Fläschchen erneut gewogen, um den Extrakt auf eine mögliche Verdampfung zu überprüfen (falls ein Teil verdampft ist, wird Wasser bis zur ursprünglichen Masse hinzugefügt). Von der 1 mol/l NaOH-Lösung 1 (4.9.1) werden beispielsweise 5 mal kleine 15 µl-Anteile hinzugegeben und der Inhalt jedes Mal durchmischt, bis insgesamt 75 µl hinzugefügt sind. Diese Schritte sind erforderlich, um die Säure zu neutralisieren, dabei aber die Überalkalisierung der hydrolysierten Fraktion 2 zu vermeiden. Ein neutraler pH-Wert wird eingestellt.

Während der Periodatoxidation (Kombination von hydrolysierte Fraktion 2, Matrixmodifizier und Periodat-Derivatisierungsreagenz) sollte sich der pH-Wert auf 8,2 einstellen. Wenn jedoch die oxidierte hydrolysierte Fraktion den pH-Wert von 8,2 nicht erreicht, muss die hydrolysierte Fraktion 2 durch Zugabe von etwas mehr NaOH-Lösung eingestellt und die zusätzliche Menge für die Berechnungen [12] aufgezeichnet werden.

Die Probe wird mit der HPLC nach der Periodatoxidation, wie in 6.5.2 beschrieben, analysiert.

In dieser Weise kann auch mit der Fraktion 1 der SPE-COOH-Reinigung verfahren werden.

ANMERKUNG Abhängig vom kleinsten gemessenen Volumen des verwendeten pH-Messgerätes ist es möglich, die Volumina sämtlicher Reagenzien im gleichen Verhältnis zu vergrößern (d. h. 900 µl Fraktion 2 des SPE-COOH-Extraktes (filtriert) + 225 µl 1 mol/l HCl und nach der Reaktion 225 µl 1 mol/l NaOH-Lösung 1).

6.5 Oxidationsverfahren

6.5.1 Allgemeines

Während der Oxidationsreaktionen ist es wichtig, dass die Reaktionszeit für alle Proben- und Standard-Gemische gleich bleibt, da Abweichungen die Effizienz der Oxidation beeinflussen und die Ausbeute von Oxidationsprodukten verändern können, was die Wiederholpräzision der Ergebnisse beeinträchtigt. Eine Kontrollprobe, die die Abwesenheit natürlicher fluoreszierender Bestandteile beweist, ist wie in Abschnitt 6 von 6.3.1. angegeben, erforderlich.

Bei der Untersuchung von mit NEO und GTX1,4 kontaminierten ganzen Großen Pilgermuscheln (*Pecten maximus*) und ganzen Kleinen Pilgermuscheln (*Aequipecten opercularis*) kann diese Vorgehensweise die Empfindlichkeit vermindern. Zur Verbesserung der Empfindlichkeit kann die Modifikation in dem Periodat-oxidationsschritt, wie in der Anmerkung in 6.5.2 beschrieben, angewendet werden.

6.5.2 Periodatoxidation

Für alle in den Oxidationsreaktionen verwendeten Reagenzien und Lösungen werden Kolbenhubpipetten mit Einwegspitzen aus Kunststoff benutzt.

Es ist sehr wichtig, den pH-Wert vor der Periodatoxidation auf 6,5 einzustellen [12].

100 µl der Standardlösung oder des Probenextraktes nach der SPE-C18-Reinigung (6.3.1) oder der Fraktion nach der SPE-COOH-Reinigung (6.3.2) werden zu 100 µl Matrixmodifizier-Lösung in ein 1,5-ml-Fläschchen gegeben. Anschließend werden 500 µl Periodat-Oxidationsreagenz (4.13) hinzugegeben und sorgfältig mit einem Vortex-Mischer durchmischt. Der Lösung wird bei Raumtemperatur ermöglicht, 1 min zu reagieren. Anschließend werden 5 µl Eisessig (4.4) hinzugegeben und die Lösung wird durchmischt. Das Gemisch wird mindestens 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor 50 µl bis 100 µl in das HPLC-System injiziert werden.

Die Lösung ist für nicht-hydroxylierte Toxine mindestens einen Tag stabil. Jedoch findet bei NEO, GTX6 (B2) und GTX1,4 eine langsame Zersetzung der Oxidationsprodukte statt. Die Quantifizierung darf trotz dieses Abbaus durchgeführt werden, wenn Standard- und Prüflösungen unter den gleichen Bedingungen gelagert und analysiert werden, siehe [5].

ANMERKUNG Bei der Untersuchung von mit NEO und GTX1,4 kontaminierten ganzen Großen Pilgermuscheln (*Pecten maximus*) und ganzen Kleinen Pilgermuscheln (*Aequipecten opercularis*) wurde festgestellt, dass die Verwendung eines Matrixmodifiers der Großen Pilgermuschel anstelle des Modifiers aus Austern (4.14) für die Oxidation der Kalibrierstandards zu guten Wiederfindungen führt. Ein modifiziertes Periodatreagenz, das das 5-fache der normalen relativen Mengen der Periodsäure enthält, zeigte eine gute Empfindlichkeit. Das für die Oxidation aller Standardlösungen und Proben verwendete Periodat wurde mit 0,03 mol/l Periodsäurelösung 2 (4.11.2), 0,3 mol/l Ammoniumformiatlösung (4.3) und 0,3 mol/l Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (4.8) im Verhältnis von 5:1:1 hergestellt und der pH-Wert vor der Verwendung auf 8,2 eingestellt. Auch die Empfindlichkeit wurde mit der Verwendung von großen Injektionsvolumina (100 µl) erhöht [3].

6.5.3 Peroxidoxidation

25 µl 10%ige (w/v) wässrige H₂O₂-Lösung (4.10) werden zu 250 µl 1 mol/l NaOH-Lösung 1 (4.9.1) in ein 1,5-ml-Fläschchen gegeben und durchmischt. Dann werden 100 µl Standardlösung oder Probenextrakt nach der SPE-C18-Reinigung (6.3.1) oder SPE-COOH-Reinigung (6.3.2) hinzugegeben. Die Lösung wird durchmischt. Nach 2-minütiger Reaktion bei Raumtemperatur werden 20 µl Eisessig (4.4) hinzugegeben und die Lösung wird erneut durchmischt. 25 µl bis 50 µl dieser Lösung werden in das HPLC-System injiziert. Die Lösung ist bei Raumtemperatur mindestens 8 h stabil, siehe [5].

ANMERKUNG Die Injektion von mehr als 50 µl kann zur Peakverbreiterung führen.

7 HPLC-Bestimmung

Der Anwender prüft die Stabilität des Systems (% der Abweichung der Peakflächen und % der Abweichung der Retentionszeit) anhand der eigenen HPLC-Bedingungen. Die PSP-Oxidationsprodukte werden injiziert und chromatographisch getrennt, um die individuelle Identifizierung und Quantifizierung der Toxine zu ermöglichen.

Es ist zu beachten, dass dcGTX2,3 und dcSTX jeweils zu zwei Peaks führen, da sie bei der Peroxidoxidation jeweils zwei Oxidationsprodukte bilden, die chromatographisch mit einer Auflösung größer als 1,5 getrennt werden müssen. Der FLD sollte zum Nachweis von 400 pg STX-Standardsubstanz als freie Base auf der Säule, die mit Peroxid (6.5.3) behandelt wurde, mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 10:1 geeignet sein.

Die folgenden HPLC-Bedingungen haben zu zufriedenstellenden Ergebnissen geführt:

Säule	C18 Umkehrphase, 5 µm, 150 mm × 4,6 mm
Temperatur	40 °C
Durchfluss	2 ml/min
Injektionsvolumen	25 µl bis 50 µl (für Peroxidoxidation) oder 50 µl bis 100 µl (bei der Periodatoxidation)
Fluoreszenzdetektor	Anregung: 340 nm Emission: 395 nm

Ein geeigneter HPLC-Gradient mit einem Durchfluss von 2 ml/min ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6 — Empfohlener Gradient der mobilen Phase bei einem Durchfluss von 2 ml/min

Zeit min	Eluent A %	Eluent B %
0	100	0
5	95	5
9	30	70
11	100	0
15	100	0

ANMERKUNG 1 Die Messung kann mit unterschiedlichen Trennsäulen (Maße, Hersteller) durchgeführt werden.

Der jeweilige pH-Wert der Eluenten A und B ist über die Zeit instabil. Sie müssen daher vor jeder analytischen Sequenz frisch hergestellt werden [12].

Das folgende Injektionsschema hat sich bewährt: Vor der Injektion einer Probenreihe wird eine Reihe der Kalibrierlösungen injiziert. Während der Analyse der Proben werden die Kalibrierlösungen und/oder eine Lösung mit definierter Konzentration in regelmäßigen Abständen injiziert, um die Stabilität des Systems zu überprüfen (z. B. ist jede vierte Injektion eine Lösung mit festgelegter Konzentration). Nach Abschluss der Probenreihe wird die Reihe der Kalibrierlösungen erneut injiziert.

ANMERKUNG 2 Bei der Anwendung eines automatischen Probengebers bei Raumtemperatur sind einige Toxin-oxidationsprodukte instabil, deshalb können sich die Empfindlichkeiten dieser Toxine (z. B. dcNEO und NEO) während einer Sequenz verringern. Dies konnte durch die Anwendung eines gekühlten automatischen Probengebers (z. B. +6 °C) verringert werden [12].

Die mit Periodat und Peroxid oxidierten Extrakte nach der SPE-C18-Reinigung (6.3.1) oder Fraktionen aus der SPE-COOH-Reinigung werden untersucht. Extrakte nach der SPE-C18-Reinigung ohne Oxidation sollten in der Periodat- und Peroxidsequenz analysiert werden, um zu verifizieren, dass die in den Chromatogrammen gefundenen PSP-Toxinpeaks tatsächlich auf PSP und nicht auf die natürlich fluoreszierenden Proben-Coextrakte zurückzuführen sind (6.3.1). Extrakte mit PSP-Toxingehalten, die den höchsten Kalibrierstandard überschreiten, müssen mit Wasser verdünnt werden. Die Verdünnungsfaktoren werden aufgezeichnet.

Um dieses Verfahren effizient in der Routineanalyse anwenden zu können, bei der die Analyse einer großen Anzahl von Proben notwendig ist, wird die Verfahrensweise in Bild 2 empfohlen: