

DIN EN 15835

ICS 67.060; 67.230

**Lebensmittel –
Bestimmung von Ochratoxin A in Säuglings- und Kleinkindernahrung
auf Getreidebasis –
HPLC-Verfahren mit Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule und
Fluoreszenzdetektion;
Deutsche Fassung EN 15835:2010**

Foodstuffs –

Determination of ochratoxin A in cereal based foods for infants and young children –
HPLC method with immunoaffinity column clean up and fluorescence detection;
German version EN 15835:2010

Produits alimentaires –

Dosage de l'ochratoxine A dans les aliments à base de céréales pour nourrissons et
jeunes enfants –
Méthode CLHP avec purification sur colonne d'immuno-affinité et détection par
fluorescence;
Version allemande EN 15835:2010

Gesamtumfang 21 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 15835:2010) ist vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) nach eingehenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 5 „Biotoxine (Mycotoxine und Phycotoxine)“ erarbeitet worden.

Das zuständige deutsche Arbeitsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-03 AA „Biotoxine“ des Normenausschusses „Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte“ (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

Mykotoxine sind stark gesundheitsschädliche sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen. Lebensmittel, die unter feuchten Bedingungen angebaut, geerntet oder gelagert werden, können von Schimmelpilzen befallen werden, deren Stoffwechselprodukte dann in das Lebensmittel gelangen. Die Toxizität einiger Mykotoxine ist für den Menschen erheblich; deshalb ist ein sicherer Nachweis von besonderer Bedeutung für den gesundheitlichen Verbraucherschutz. In Deutschland gilt zur Verringerung der Mykotoxinbelastung die Mykotoxin-Höchstmengenverordnung. Sie enthält seit 2004 nicht nur Regelungen für Aflatoxine, sondern auch für Ochratoxin A, Fumonisine, Deoxynivalenol und Zearalenon. Seit 2001 werden die nationalen Bestimmungen durch EU-weit geltende Höchstgehaltregelungen für Kontaminanten in Lebensmitteln ergänzt. Höchstgehalte an Mykotoxinen in bestimmten Lebensmitteln werden außerdem noch durch verschiedene andere Verordnungen geregelt.

Für die im Inhalt zitierten Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

EN ISO 3696 siehe DIN EN ISO 3696

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 3696, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren*

Deutsche Fassung

Lebensmittel —
Bestimmung von Ochratoxin A in Säuglings- und
Kleinkindernahrung auf Getreidebasis —
HPLC-Verfahren mit Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule
und Fluoreszenzdetektion

Foodstuffs —
Determination of ochratoxin A in cereal based foods for
infants and young children —
HPLC method with immunoaffinity column cleanup and
fluorescence detection

Produits alimentaires —
Dosage de l'ochratoxine A dans les aliments à base de
céréales pour nourrissons et jeunes enfants —
Méthode CLHP avec purification sur colonne d'immuno-
affinité et détection par fluorescence

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 25. Dezember 2009 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 oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

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

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, 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: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Chemikalien	4
5 Geräte und Hilfsmittel	7
6 Durchführung	9
7 HPLC-Analyse	10
8 Berechnung	12
9 Präzision	12
10 Untersuchungsbericht	13
Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme	14
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	16
Anhang C (informativ) Daten des laborinternen Versuchs	17
Literaturhinweise	19

Vorwort

Dieses Dokument (EN 15835:2010) 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 August 2010, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2010 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EG-Richtlinien.

Die Anhänge A, B und C sind informativ.

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

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung von Ochratoxin A in Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule und Fluoreszenzdetektion fest. Dieses Verfahren wurde in einem Ringversuch an sowohl natürlich kontaminierten als auch aufgestockten Proben mit Gehalten von 0,050 µg/kg bis 0,217 µg/kg validiert. Weitere Informationen zur Validierung, siehe Abschnitt 8 und Anhang B. In weiteren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass das Verfahren auf Beikost, die 8 verschiedene Getreidearten, Honig und Kakao enthält, bis zu Gehalten von 3,540 µg/kg anwendbar ist, siehe Anhang C und [6].

WARNUNG — Bei der Anwendung dieser 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 die Anwendbarkeit einschränkender Vorschriften zu bestimmen.

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 3696:1995, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696:1987)*

3 Kurzbeschreibung

Die Probeneinwaage wird nach der Zugabe eines Gemisches aus 0,5 molarer Phosphorsäure und 2 molarer Natriumchlorid-Lösung mit *tert*-Butylmethylether extrahiert. Der Extrakt wird eingedampft und in einem Gemisch aus Methanol und phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) erneut gelöst. Nach dem Entfernen von lipophilen Verbindungen mit Hexan wird der Extrakt auf eine Immunoaffinitätssäule gegeben, die spezifische Antikörper gegen Ochratoxin A enthält. Das Toxin wird mit Methanol von der Säule eluiert. Ochratoxin A wird durch HPLC mit verbesserter Fluoreszenzdetektion unter Anwendung einer Nachsäulenreaktion mit Ammoniak bestimmt.

ANMERKUNG Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass die HPLC auch ohne die Verwendung von Ammoniak durchgeführt werden kann, obwohl das den Response für Ochratoxin A mindestens um das Zweifache verringert. In diesem Fall müssen die Bedingungen für die Fluoreszenzdetektion geändert werden (Anregungswellenlänge = 333 nm, Emissionswellenlänge = 460 nm).

4 Chemikalien

4.1 Allgemeines

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696:1995 verwendet. Die Qualität der Lösemittel muss für die HPLC-Analyse geeignet sein. Kommerziell erhältliche Lösungen mit gleichen Eigenschaften wie die hier aufgelisteten dürfen verwendet werden.

WARNUNG — Die Entsorgung von Lösemittelabfällen muss nach den geltenden Umweltschutzregeln und -bestimmungen erfolgen. Die Internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer (IARC)) hat Dekontaminationshinweise für Laborabfälle herausgegeben, siehe [4].

4.2 Helium, gereinigtes Druckgas

4.3 Stickstoff

4.4 Dinatriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4 , wasserfrei oder $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

4.5 Kaliumchlorid

4.6 Kaliumdihydrogenphosphat

4.7 Natriumchlorid

4.8 Natriumhydroxid

4.9 Ammoniumhydroxid-Lösung, der Massenanteil in Wasser beträgt $w(\text{NH}_4\text{OH}) = 25 \%$ (Nachsäulen-Reagens)

Die Lösung wird mit einem Entgasungsgerät (5.21.7) entgast.

4.10 Salzsäure-Lösung, $w(\text{HCl}) = 37 \%$ (acidimetrisch)

4.11 Phosphorsäure-Lösung, $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 85 \%$

4.12 Salzsäure-Lösung, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$

8,28 ml Salzsäure-Lösung (4.10) werden auf 1 l mit Wasser aufgefüllt.

4.13 Natriumhydroxid-Lösung, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

4 g Natriumhydroxid (4.8) werden in 1 l Wasser gelöst.

4.14 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS-Puffer), $c(\text{NaCl}) = 120 \text{ mmol/l}$, $c(\text{KCl}) = 2,7 \text{ mmol/l}$, $c(\text{Phosphatpufferlösung}) = 10 \text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 7,4$

8,0 g Natriumchlorid (4.7), 1,2 g wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat oder 2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (4.4), 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (4.6) und 0,2 g Kaliumchlorid (4.5) werden in 900 ml Wasser gelöst.

Nach dem Lösen wird der pH-Wert mit Salzsäure-Lösung (4.12) bzw. Natriumhydroxid-Lösung (4.13) auf $\text{pH} = 7,4$ eingestellt, und anschließend wird die Lösung mit Wasser auf 1 l aufgefüllt. Alternativ kann eine PBS-Lösung mit gleichwertigen Eigenschaften aus handelsüblichen PBS-Substanzen hergestellt werden.

4.15 Gemisch aus Phosphorsäure-Lösung und Natriumchlorid-Lösung, $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,5 \text{ mol/l}$, $c(\text{NaCl}) = 2 \text{ mol/l}$

118 g Natriumchlorid (4.7) werden in etwa 900 ml Wasser gelöst. 33 ml Phosphorsäure (4.11) werden hinzugefügt, und die Lösung wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

4.16 Eisessig, Massenanteil $\geq 99,7 \%$

4.17 Essigsäure-Lösung, der Volumenanteil beträgt 9 %

90 ml Eisessig (4.16) werden mit 910 ml Wasser gemischt.

4.18 Hexan

WARNUNG — Hexan ist leichtentzündlich. Arbeitsschritte, bei denen dieses Lösemittel verwendet wird, müssen in einem Laborabzug durchgeführt werden. Längerer Kontakt mit diesem Reagenz kann ernstzunehmende gesundheitliche Probleme zur Folge haben.