

DIN EN 16006



ICS 65.120

**Futtermittel –
Bestimmung der Summe der Fumonisine B₁ und B₂ in Mischfutter durch
Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule und RP-HPLC mit
Fluoreszenzdetektion nach Vor- oder Nachsäulenderivatisierung;
Deutsche Fassung EN 16006:2011**

Animal feeding stuffs –

Determination of the sum of fumonisin B₁ and B₂ in compound animal feed with
immunoaffinity clean-up and RP-HPLC with fluorescence detection after
pre- or post-column derivatisation;
German version EN 16006:2011

Aliments pour animaux –

Dosage de la somme des fumonisines B₁ et B₂ dans les aliments pour animaux avec
purification par immuno-affinité et RP-HPLC avec détection par fluorescence après
dérivation pré- ou post-colonne;
Version allemande EN 16006:2011

Gesamtumfang 24 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16006:2011) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN (Niederlande) gehalten wird.

Die Mitarbeit des DIN beim Europäischen Komitee für Normung (CEN) wird für den Bereich des CEN/TC 327 über das nationale Spiegelgremium, den Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), wahrgenommen.

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

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen, wobei EN-ISO-Normen nur dann genannt sind, wenn sie nicht als DIN-EN-ISO-Normen mit gleicher Zählnummer veröffentlicht sind:

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

Deutsche Fassung

Futtermittel —
Bestimmung der Summe der Fumonisine B₁ und B₂ in
Mischfutter durch Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule und
RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion nach Vor- oder
Nachsäulenderivatisierung

Animal feeding stuffs —
Determination of the Sum of Fumonisin B₁ & B₂ in
compound animal feed with immunoaffinity clean-up and
RP-HPLC with fluorescence detection after pre- or post-
column derivatisation

Aliments pour animaux —
Dosage de la somme des fumonisines B₁ et B₂ dans les
aliments pour animaux avec purification par immuno-affinité
et RP-HPLC avec détection par fluorescence après
dérivation pré- ou post-colonne

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 25. Juni 2011 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, 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 Reagenzien und Werkstoffe	4
5 Geräte	8
6 Probenvorbereitung	10
7 Messungen	11
8 Bestimmung der Konzentrationen	14
9 Präzision	15
10 Untersuchungsbericht	17
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	18
Anhang B (informativ) Beispiele eines Chromatogramms	20
Literaturhinweise	22

Vorwort

Dieses Dokument (EN 16006:2011) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Februar 2012, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Februar 2012 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 EU-Richtlinien.

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.

WARNUNG — Fumonisine sind giftig. Handschuhe und eine Schutzbrille sollten ständig getragen werden und sämtliche Schritte bei der Standard- und Probenherstellung sollten unter einem Laborabzug durchgeführt werden.

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

Diese Europäische Norm ist für die Bestimmung des Gehaltes an Fumonisin B₁ (FB₁) und Fumonisin B₂ (FB₂) in Mischfuttermitteln bei Konzentrationen von 3 mg/kg bis zu 16 mg/kg anwendbar.

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 835, *Laborgeräte aus Glas — Messpipetten (ISO 835:2007)*

EN ISO 1042, *Laborgeräte aus Glas — Messkolben (ISO 1042:1998)*

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

3 Kurzbeschreibung

FB₁ und FB₂ werden aus dem Untersuchungsmaterial mit einem Lösemittelgemisch aus 50%igem Methanol in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) extrahiert. Der Extrakt wird anschließend mit PBS verdünnt und über Immunoaffinitätssäulen (IAS) gereinigt. FB₁ und FB₂ werden aus der IAS mit Methanol und anschließend mit Wasser eluiert. Nach der Volumeneinstellung wird das Eluat direkt in das HPLC-Gerät injiziert und FB₁ und FB₂ werden durch ihre Fluoreszenz entweder nach der Vor- oder nach der Nachsäulenderivatisierung bestimmt.

4 Reagenzien und Werkstoffe

Falls nicht anders angegeben, werden während der Analyse nur analysenreine Reagenzien verwendet. Die Lösemittel müssen für die HPLC geeignet sein oder von besserer Qualität und nur zweifach destilliertes Wasser oder Wasser mit mindestens der Qualität 2 nach EN ISO 3696 muss verwendet werden.

4.1 Zweifach destilliertes oder deionisiertes Wasser (EN ISO 3696)

4.2 Methanol, CH₃OH

WARNUNG — Methanol ist gefährlich und die Handhabung sollte unter einem Laborabzug durchgeführt werden. Eine geeignete Schutzausrüstung (Laborkittel, Schutzbrille, Handschuhe) sollte getragen werden.

4.3 Acetonitril, CH₃CN

WARNUNG — Acetonitril ist gefährlich und die Handhabung sollte unter einem Laborabzug durchgeführt werden. Eine geeignete Schutzausrüstung (Laborkittel, Schutzbrille, Handschuhe) sollte getragen werden.

4.4 Kaliumchlorid, KCl

4.5 Natriumchlorid, NaCl

4.6 Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, Na₂HPO₄ · 12 H₂O

4.7 Dinatriumtetraborat-Decahydrat, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$

4.8 Natriumcarbonat, Na_2CO_3

4.9 Borsäure, H_3BO_3

4.10 Kaliumsulfat, K_2SO_4

4.11 NAC, N-Acetyl-L-Cystein, $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$

4.12 OPA, o-Phthalaldehyd, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CHO})_2$

4.13 BME, β -Mercaptoethanol, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$

4.14 Ameisensäure, HCO_2H , 98%ig bis 100%ig

WARNUNG — Konzentrierte Ameisensäure ist gefährlich, und die Handhabung sollte unter einem Laborabzug durchgeführt werden. Eine geeignete Schutzausrüstung (Laborkittel, Schutzbrille, Handschuhe) sollte getragen werden.

4.15 PBS-Konzentrat, Konzentrat einer phosphatgepufferten Salzlösung

Folgendes ist in 1 800 ml Wasser (4.1) aufzulösen:

- 4 g KCl (4.4);
- 160 g NaCl (4.5);
- 72 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (4.6).

Der pH-Wert ist mit 10 mol/l HCl auf 7,4 einzustellen und das Volumen auf 2 000 ml aufzufüllen.

4.16 PBS, gebrauchsfertig

100 ml PBS-Konzentrat (4.15) sind mit Wasser (4.1) auf 1 000 ml zu verdünnen,

oder

PBS-Tabletten, Phosphatgepufferte Salzlösung in Tablettenform,

eine in 200 ml Wasser (4.1) aufgelöste Tablette ergibt 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 0,002 7 mol/l Kaliumchlorid und 0,137 mol/l Natriumchlorid, pH-Wert 7,4 bei 25 °C (z. B. Sigma P4417).

4.17 Verdünnungsmittel

50 Volumenteile Methanol (4.2) sind mit 50 Volumenteilen Wasser (4.1) zu durchmischen.

4.18 Extraktionslösemittel

50 Volumenteile Methanol (4.2) sind mit 50 Volumenteilen PBS (4.16) zu durchmischen.

4.19 Reaktionspuffer

4.19.1 Nachsäulenderivatisierung (0,006 mol/l OPA; 0,006 mol/l NAC; 0,384 mol/l Natriumcarbonat; 0,216 mol/l Borsäure und 0,108 mol/l Kaliumsulfat):

- 40,7 g Natriumcarbonat (4.8), 13,4 g Borsäure (4.9) und 18,8 g Kaliumsulfat (4.10) sind in 1,0 l Wasser (4.1) aufzulösen,
- für 10 min ist zu rühren,
- 800 mg OPA (4.12) sind in 1,0 l der vorstehenden Lösung hinzuzufügen,
- 1 g NAC (4.11) ist in 1,0 l der vorstehenden Lösung hinzuzufügen,
- für 10 min ist zu rühren,
- für 15 min ist zu sonifizieren,
- für 10 min ist zu rühren,
- für 15 min ist nochmals zu sonifizieren, und
- die Lösung ist durch ein 0,45-µm-Nylonfilter (5.17) zu filtrieren.

Eine einwandfreie Auflösung der OPA ist sehr wichtig!

Der Reaktionspuffer sollte innerhalb einer Sequenz von HPLC-Läufen nicht gewechselt werden.

Der Reaktionspuffer ist für jede Sequenz von HPLC-Läufen frisch herzustellen.

4.19.2 Vorsäulenderivatisierung (0,05 mol/l OPA; 0,12 mol/l BME; 0,08 mol/l Dinatriumtetraborat-Decahydrat; 16,7 % Methanol):

- 40 mg OPA (4.12) sind in 1,0 ml Methanol (4.2) aufzulösen,
- bis zur vollständigen Auflösung ist zu durchmischen,
- 5,0 ml einer 0,1 mol/l Dinatriumtetraborat-Decahydrat-Lösung (3,8 g/100 ml; 4.7) sind hinzuzufügen,
- es ist gründlich zu durchmischen,
- 50 µl BME (4.13) sind hinzuzufügen, und
- es ist gründlich zu durchmischen.

Alternativ:

- Phthaldialdehyd-Reagenz.