

DIN EN 16924

ICS 67.200.10

**Lebensmittel –
Bestimmung von Zearalenon in pflanzlichen Speiseölen mit LC-FLD oder
LC-MS/MS;
Deutsche Fassung EN 16924:2017**

Foodstuffs –

Determination of zearalenone in edible vegetable oils by LC-FLD or LC-MS/MS;
German version EN 16924:2017

Produits alimentaires –

Dosage de la zéaralénone dans les huiles végétales alimentaires par CL-FLD ou CL-SM/SM;
Version allemande EN 16924:2017

Gesamtumfang 34 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16924:2017) wurde 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“ erarbeitet worden.

Das zuständige deutsche Arbeitsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-03 AA „Biotoxine“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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 in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

EN ISO 3696	siehe DIN ISO 3696
ISO 5725 (alle Teile)	siehe DIN ISO 5725 (alle Teile)

Der Text dieser Norm enthält neben den gesetzlichen Einheiten auch die Einheiten „psi“ und „Da“, die in Deutschland nicht zugelassen sind. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Anwendung dieser Einheiten im nationalen amtlichen und geschäftlichen Verkehr aufgrund des Gesetzes über Einheiten im Messwesen nicht zulässig ist.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN ISO 5725 (alle Teile), *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen*

Deutsche Fassung

Lebensmittel —
Bestimmung von Zearalenon in pflanzlichen Speiseölen
mit LC-FLD oder LC-MS/MS

Foodstuffs —
Determination of zearalenone in edible vegetable oils
by LC-FLD or LC-MS/MS

Produits alimentaires —
Dosage de la zéaralénone dans les huiles végétales
alimentaires par CL-FLD ou CL-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 27. Februar 2017 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 CEN-CENELEC-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, 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	5
3 Kurzbeschreibung	5
4 Chemikalien	5
5 Geräte und Ausrüstung	9
6 Durchführung	11
7 Auswertung	13
8 Präzision	15
9 Prüfbericht	17
Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme	18
Anhang B (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	24
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	29
Literaturhinweise	32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 16924:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis November 2017, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 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 wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben.

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

Das Mykotoxin Zearalenon ist ein Resorcylsäure-Derivat, das von einigen Arten der Schimmelpilzgattung *Fusarium*, vor allem von *Fusarium roseum* var. *graminearum* gebildet wird. Insbesondere Getreidearten wie Mais und Weizen werden befallen, so dass Zearalenon auch in den aus ihnen hergestellten Ölen nachgewiesen werden kann.

WARNUNG 1 — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, (EG) Nr. 1907/2006 [3], sowie auch geeignete nationale Erklärungen, wie z. B. in [4], sollten berücksichtigt werden.

WARNUNG 2 — Bei der Anwendung dieses Dokuments 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 3 — Von Zearalenon sind starke östrogene Wirkungen bekannt.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm beschreibt ein Verfahren für die Bestimmung des Zearalenongehalts in pflanzlichen Speiseölen, insbesondere in Maiskeimöl, mit einem der beiden folgenden Verfahren: Hochleistungsflüssigchromatographie mit Fluoreszenzdetektion (LC-FLD) oder Hochleistungsflüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) nach basischer Extraktion des verdünnten Öles.

Das Verfahren wurde für Zearalenon in natürlich kontaminiertem Maiskeimöl bei Konzentrationen von 61,2 µg/kg bis 515 µg/kg validiert [5].

Laborerfahrungen [6] haben gezeigt, dass das Verfahren auch für andere pflanzliche Öle wie z. B. Weizenkeimöl ($n = 4$), Sonnenblumenöl ($n = 5$), Kürbiskernöl ($n = 1$), Sojaöl ($n = 5$), Hanfsamenöl ($n = 5$), Rapsöl ($n = 11$) sowie Pflanzenölmischungen ($n = 3$), die Maiskeimöl enthalten, anwendbar ist. Jedoch können Proben gelegentlich zu Interferenzen in den FLD-Chromatogrammen führen. In diesem Fall wird die Detektion mit MS/MS empfohlen.

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 Zwecke; Anforderungen und Prüfungen (ISO 3696)*

3 Kurzbeschreibung

Nach dem Verdünnen des pflanzlichen Speiseöles wird Zearalenon durch Schütteln mit einem alkalischen Gemisch aus Methanol und Ammoniumhydrogencarbonat extrahiert.

Bei der Bestimmung mit LC-FLD wird ein Aliquot des zentrifugierten methanolisch-alkalischen Extraktes bis zur Trockene eingengt, anschließend wird der Rückstand in angesäuertem LC-Elutionsmittel aufgenommen und der Zearalenongehalt wird mit LC-FLD bestimmt.

Bei der Bestimmung mit LC-MS/MS wird ein Aliquot des zentrifugierten methanolisch-alkalischen Extraktes direkt für die Analyse verwendet.

4 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Die Lösemittel müssen, wenn nicht anders festgelegt, von geeignetem Reinheitsgrad für die LC-Analyse sein.

4.1 Methanol, pro analysi (p. a.), für die Extraktion

4.2 Verdünnungslösemittel (Lösemittel zum Entfetten), *n*-Hexan oder alternativ *n*-Heptan, p. a.

n-Heptan darf anstelle von *n*-Hexan verwendet werden, jedoch wurde lediglich *n*-Hexan im Ringversuch eingesetzt.

4.3 Acetonitril, LC-Reinheitsgrad

4.4 Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)**4.5 Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung**, Massenkonzentration $\rho = 10 \text{ g/l}$

1 g Ammoniumhydrogencarbonat (4.4) wird in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und der Kolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird am Tag der Untersuchung frisch hergestellt.

4.6 Alkalische Methanol-Extraktionslösung.

9 Volumenteile Methanol (4.1) werden mit 1 Volumenteil Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (4.5) gemischt. Die alkalische Methanol-Extraktionslösung wird am Tag der Untersuchung frisch hergestellt.

4.7 Zearalenon, z. B. kristallin, Reinheit größer als 98 % Massenanteil oder als zertifizierte Standardlösung mit $100 \mu\text{g/ml}$.

4.8 Zearalenon-Stammlösung, Massenkonzentration $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$

10 mg kristallines Zearalenon (4.7) werden auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und der Kolben wird mit Acetonitril (4.3) bis zur Marke aufgefüllt. Die Stammlösung ist bei Lagerung bei $< -18^\circ\text{C}$ mindestens 4 Wochen bis 12 Wochen stabil [7].

Dieser Arbeitsschritt kann entfallen, sofern die zertifizierte Standardlösung verwendet wird. Die zertifizierte Standardlösung dient dann als Stammlösung.

4.9 Zearalenon-Standardlösung, Massenkonzentration $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$

1 ml Zearalenon-Stammlösung (4.8) wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und der Kolben wird mit Acetonitril (4.3) bis zur Marke aufgefüllt. Die genaue Konzentration von Zearalenon in dieser Standardlösung wird spektralphotometrisch bestimmt.

Dazu wird die Absorptionskurve der Standardlösung zwischen 190 nm und 350 nm gegen Acetonitril aufgezeichnet. Die Massenkonzentration von Zearalenon in der Standardlösung ρ_{st} in $\mu\text{g/ml}$, wird nach Gleichung (1) berechnet:

$$\rho_{\text{st}} = \frac{E_{\text{max}} \cdot M \cdot 100}{\delta \cdot \varepsilon} \quad (1)$$

Dabei ist

E_{max} der aus der Absorptionskurve bestimmte maximale Extinktionswert (hier: 274 nm);

M die molare Masse von Zearalenon = 318,4 g/mol;

δ die Schichtdicke der Küvette, in cm;

ε der molare Extinktionskoeffizient in Acetonitril: $1\,262 \text{ m}^2/\text{mol}$.

4.10 Chemikalien, mobile Phasen und Kalibrierlösungen für die LC-FLD-Analyse:**4.10.1 Eisessig für LC-FLD**, Volumenanteil φ (CH_3COOH) etwa 99 %**4.10.2 Mobile Phase A für LC-FLD:** Acetonitril/Wasser/Eisessig (47 + 52 + 1, v + v + v).

47 Volumenteile Acetonitril (4.3) werden mit 52 Volumenteilen Wasser und 1 Volumenteil Eisessig (4.10.1) gemischt.

Für die Stabilität der chromatographischen Trennung ist es notwendig, die mobile Phase anzusäuern.

4.10.3 Mobile Phase B für LC-FLD: Acetonitril (100 %) (4.3)

4.10.4 Zearalenon-Kalibrierlösungen für LC-FLD

Aus der Zearalenon-Standardlösung (4.9) wird eine Kalibrierreihe erstellt. Hierfür werden nach dem Pipettierschema in Tabelle 1 die entsprechenden Volumina der Zearalenon-Standardlösung in Messkolben pipettiert, das Lösemittel wird mit Stickstoff bei etwa 40 °C bis zur Trockene eingengt und der Rückstand wird bei Raumtemperatur in der mobilen Phase A (4.10.2) mit einem Laborschüttler (5.4) oder einem Ultraschallbad (5.3) gelöst. Anschließend wird der Kolben bis zur Marke aufgefüllt. Der Kalibrierbereich muss an den gewünschten Arbeitsbereich angepasst werden. Die Kalibrierlösungen können bei Lagerung in einem Kühlschrank bei 4 °C etwa 1 Monat verwendet werden.

Tabelle 1 — Beispiele für geeignete Kalibrierlösungen für LC-FLD

Kalibrierlösung	Volumen des Messkolbens ml	Volumen der Standardlösung (4.9) µl	Massenkonzentration der Kalibrierlösung ng/ml
1	10	25	25
2	10	50	50
3	10	100	100
4	10	150	150
5	10	200	200
6	10	250	250

4.11 Chemikalien, mobile Phasen und zusätzliche Vergleichssubstanzen sowie Standardlösungen für die LC-MS/MS-Analyse:

4.11.1 Methanol, LC-Reinheitsgrad

4.11.2 Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3), für LC-MS, Molekülmasse: 79 g/mol

4.11.3 Mobile Phase A für LC-MS/MS: 1 mmol/l NH_4HCO_3 in Wasser/Methanol (95 + 5, v + v)

79 mg Ammoniumhydrogencarbonat (4.11.2) werden in 950 ml Wasser gelöst und mit 50 ml Methanol (4.11.1) gemischt.

4.11.4 Mobile Phase B für LC-MS/MS: 1 mmol/l NH_4HCO_3 in Wasser/Methanol (5 + 95, v + v)

79 mg Ammoniumhydrogencarbonat (4.11.2) werden in 50 ml Wasser gelöst und mit 950 ml Methanol (4.11.1) gemischt.

4.11.5 Zearalenon-Arbeitslösung für die Kalibrierung, $\rho = 200 \text{ ng/ml}$

0,5 ml der Standardlösung (4.9) werden in einen 25-ml-Messkolben überführt und der Kolben wird bis zur Marke mit Methanol (4.11.1) aufgefüllt.

4.11.6 Interner Zearalanon-Standard (ISTD 1), für LC-MS/MS, z. B. kristallin oder als zertifizierte Standardlösung mit 10 µg/ml.

4.11.7 Isotopenmarkierter interner Zearalenon-Standard (ISTD 2), für LC-MS/MS, als optionaler interner Standard, z. B. Zearalenon [$^{13}\text{C}_{18}$]-markiert.

4.11.8 Zearalanon-Stammlösung (ISTD 1), $\rho = 100 \text{ µg/ml}$

10 mg Zearalanon (ISTD 1) (4.11.6) werden auf 0,1 mg in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und der Kolben wird mit Acetonitril (4.3) bis zur Marke aufgefüllt.

Die ISTD 1-Stammlösung ist bei $< -18 \text{ °C}$ gelagert mindestens 4 Wochen bis 12 Wochen stabil [7].

Wenn die zertifizierte Standardlösung verwendet wird, ist die Herstellung der Zearalanon-Stammlösung (ISTD 1) nicht erforderlich.

4.11.9 Interne Zearalanon-Standardlösung (ISTD 1), $\rho = 10 \text{ µg/ml}$

1 ml Zearalanon-Stammlösung (4.11.8) wird in einen 10-ml-Messkolben überführt und der Kolben wird mit Methanol (4.11.1) bis zur Marke aufgefüllt.

Dieser Arbeitsschritt kann bei Verwendung der zertifizierten Standardlösung entfallen. Die zertifizierte Standardlösung dient dann als interne Zearalanon-Standardlösung (ISTD 1).

4.11.10 Arbeitslösung des internen Zearalanon-Standards (ISTD 1) für die Kalibrierung, $\rho = 200 \text{ ng/ml}$

0,5 ml der internen Zearalanon-Standardlösung (ISTD 1) (4.11.9) werden in einen 25-ml-Messkolben überführt und der Kolben wird bis zur Marke mit Methanol (4.11.1) aufgefüllt.

Alternativ ist es auch möglich, isotopenmarkiertes Zearalenon (ISTD 2) (4.11.7) anstelle von Zearalanon (ISTD 1) (4.11.6) als internen Standard zu verwenden, was üblicherweise ausreicht.

4.11.11 Kalibrierlösungen mit Zearalenon und Zearalanon (ISTD 1) für LC-MS/MS

Aus den Zearalenon- (4.11.5) und Zearalanon-(ISTD 1)-Arbeitslösungen (4.11.10) wird eine Kalibrierreihe erstellt. Hierzu werden die entsprechenden Volumina der Arbeitslösungen in ein LC-Fläschchen (5.11) pipettiert, das Lösemittel wird mit Stickstoff bei etwa 40 °C bis zur Trockene eingeeengt und der Rückstand wird in der alkalischen Methanol-Extraktionslösung (4.6) gelöst.

Die Massenkonzentration der ISTD und der Kalibrierbereich müssen an den gewünschten Arbeitsbereich angepasst werden. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte kann die Kalibrierung nach den Angaben in Tabelle 2 durchgeführt werden. Die Kalibrierlösungen können bei Lagerung in einem Kühlschrank bei 4 °C etwa 1 Monat verwendet werden.

Tabelle 2 — Beispiele für geeignete Kalibrierlösungen für LC-MS/MS

Kalibrierlösung	Volumen der Arbeitslösungen (200 ng/ml)		Endvolumen ml	Massenkonzentration der Kalibrierlösung ng/ml	
	Zearalenon (4.11.5) µl	ISTD 1 Zearalanon (4.11.10) µl		Zearalenon	ISTD 1 Zearalanon
1	25	100	1	5	20
2	50	100	1	10	20
3	100	100	1	20	20
4	150	100	1	30	20
5	200	100	1	40	20
6	250	100	1	50	20

Mögliche gegenseitige Interferenzen von Zearalenon und Zearalanon (ISTD 1) werden mit einem Kalibrierstandard, der nur die höchste Konzentration an Zearalenon aufweist, und mit einem Kalibrierstandard, der nur die höchste Konzentration an Zearalanon (ISTD 1) aufweist, bei den ausgewählten Messbedingungen geprüft.

5 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborgeräte und insbesondere Folgendes:

- 5.1 **Laborwaage**, Fehlergrenze: 0,01 g
- 5.2 **Analysenwaage**, Fehlergrenze: 0,1 mg
- 5.3 **Ultraschallbad**
- 5.4 **Laborschüttler für Reagenzgläser**
- 5.5 **Manuelle Dispenser, Mikroliterspritzen oder Mikroliterpipetten**, für 10 µl bis 2 ml
- 5.6 **Dispenser**, geeignet für 20 ml
- 5.7 **Lösemittelverdampfer mit Heizmodul**
- 5.8 **Zentrifuge**, geeignet für 3 000 g ¹⁾
- 5.9 **Mikrozentrifuge**, geeignet für 14 000 g
- 5.10 **Zentrifugenröhrchen**, 50 ml, hergestellt aus Polypropylen, mit Schraubkappe

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