

**DIN EN 17250**

ICS 67.140.30; 67.220.10

**Lebensmittel –  
Bestimmung von Ochratoxin A in Gewürzen, Süßholz, Kakao und  
Kakaoerzeugnissen nach IAC-Reinigung mit HPLC-FLD;  
Deutsche Fassung EN 17250:2020**

Foodstuffs –

Determination of ochratoxin A in spices, liquorice, cocoa and cocoa products by IAC clean-up and HPLC-FLD;

German version EN 17250:2020

Produits alimentaires –

Dosage de l' ochratoxine A dans les épices, la réglisse, les produits à base de réglisse, le cacao et les produits à base de cacao par purification sur colonne d'immuno-affinité et CLHP-DL;

Version allemande EN 17250:2020

Gesamtumfang 28 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

## Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17250:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

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

|                      |       |                            |
|----------------------|-------|----------------------------|
| DIN ISO 3696         | siehe | DIN ISO 3696 <sup>*)</sup> |
| ISO 5725 (all parts) | siehe | DIN ISO 5725 (alle Teile)  |

## 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*

---

<sup>\*)</sup> Die Internationale Norm ISO 3696:1987 wurde 1995 von CEN als EN ISO 3696:1995 übernommen. Davor war ISO 3696:1987 bereits als DIN ISO 3696:1991-06 in das Deutsche Normenwerk aufgenommen worden. Für EN ISO 3696:1995 erfolgte eine Anerkennungsnotiz, die Nummer DIN ISO 3696 wurde beibehalten.

Deutsche Fassung

Lebensmittel —  
Bestimmung von Ochratoxin A in Gewürzen, Süßholz, Kakao  
und Kakaoerzeugnissen nach IAC-Reinigung mit HPLC-FLD

Foodstuffs —  
Determination of ochratoxin A in spices, liquorice,  
cocoa and cocoa products by IAC clean-up and  
HPLC-FLD

Produits alimentaires —  
Dosage de l'ochratoxine A dans les épices, la réglisse, les  
produits à base de réglisse, le cacao et les produits à  
base de cacao par purification sur colonne  
d'immuno-affinité et CLHP-DFL

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 18. November 2019 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, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, 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: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

## Inhalt

|                                                     | Seite |
|-----------------------------------------------------|-------|
| Europäisches Vorwort .....                          | 3     |
| Einleitung .....                                    | 4     |
| 1 Anwendungsbereich .....                           | 5     |
| 2 Normative Verweisungen .....                      | 5     |
| 3 Begriffe .....                                    | 5     |
| 4 Kurzbeschreibung .....                            | 5     |
| 5 Chemikalien .....                                 | 6     |
| 6 Geräte und Ausrüstung .....                       | 9     |
| 7 Durchführung .....                                | 10    |
| 8 HPLC-Analyse .....                                | 12    |
| 9 Berechnung .....                                  | 14    |
| 10 Präzision .....                                  | 15    |
| 11 Prüfbericht .....                                | 17    |
| Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme ..... | 18    |
| Anhang B (informativ) Präzisionsdaten .....         | 22    |
| Literaturhinweise .....                             | 26    |

## **Europäisches Vorwort**

Dieses Dokument (EN 17250:2020) 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 Juli 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juli 2020 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 Mandats 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 Republik Nordmazedonien, 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

Die chemische Struktur des Mykotoxins Ochratoxin A enthält eine Dihydrocumarin-Einheit, die mit einem L- $\beta$ -Phenylalanin-Molekül über eine Amidbindung verbunden ist. Ochratoxin A wird von einigen Pilzarten der *Penicillium*- und *Aspergillus*-Gattungen, vor allem *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* und *Aspergilli* der Sektion *Nigri*, insbesondere *A. carbonarius*, gebildet. Getreidearten wie Weizen sind besonders betroffen sowie eine Vielzahl anderer Lebensmittel, wie zum Beispiel Trockenobst, Gewürze, Kakao, Kaffee, Wein, Bier und Süßholzwurzel und Erzeugnisse daraus.

**WARNUNG 1 — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, (EU) Nr. 1907/2006 [3] sowie geeignete nationale Mitteilungen, 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. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung festzulegen, welche einschränkenden Vorschriften gelten.**

**WARNUNG 3 — Ochratoxin A ist ein starkes nephrotoxisches Mittel, ein Karzinogen und hat genotoxische Eigenschaften. Ochratoxin A wurde von der IARC in die Gruppe 2B eingestuft.**

## 1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung von Ochratoxin A (OTA) in Chili, Paprika, schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss, einer Gewürzmischung, Süßholzwurzel (Wurzel und Extrakte), Kakao und Kakaoerzeugnissen fest, wobei die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, en: high performance liquid chromatography) und Fluoreszenzdetektion (FLD) nach Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule angewendet wird.

Das Verfahren wurde in Ringversuchen an sowohl natürlich kontaminierten als auch an aufgestockten Proben von 1,0 µg/kg bis 84,9 µg/kg für Gewürze (Paprika und Chili [5], schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss und einer Gewürzmischung [6]), von 7,7 µg/kg bis 96,8 µg/kg für Süßholzwurzel und Süßholzwurzelerzeugnisse [7] und von 2,1 µg/kg bis 26,3 µg/kg für Kakao und Kakaoerzeugnisse [6] validiert.

Weitere Informationen zur Validierung siehe Abschnitt 10 und Anhang B.

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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 — Anforderungen und Prüfungen (ISO 3696)*

## 3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

## 4 Kurzbeschreibung

Gewürze oder Süßholzwurzel und Süßholzwurzelerzeugnisse werden mit einem Gemisch aus Methanol und einer wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert, wohingegen Kakao und Kakaoerzeugnisse mit wässrigem Methanol extrahiert werden. Der Extrakt wird filtriert, mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, en: phosphate buffered saline), Polysorbat 20 (mit Ausnahme von Süßholzwurzel und Süßholzwurzelerzeugnissen) verdünnt und auf eine Immunoaffinitätssäule aufgetragen, die für Ochratoxin A spezifische Antikörper enthält. Das Ochratoxin A wird auf der Säule festgehalten, gereinigt und konzentriert und anschließend mit Methanol gelöst. Der gereinigte Extrakt wird durch Hochleistungsflüssigchromatographie an einer Umkehrphase (RP-HPLC, en: reversed phase high performance liquid chromatography) mit Fluoreszenzdetektion (FLD) quantifiziert.

## 5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Handelsübliche Lösungen mit gleichwertigen Eigenschaften wie die aufgeführten dürfen verwendet werden.

**5.1 Stickstoff**, Reinheitsgrad mindestens 99,95 %.

**5.2 Methanol**, technischer Reinheitsgrad.

**5.3 Methanol**, für HPLC.

**5.4 Acetonitril**, für HPLC.

**5.5 Eisessig**, Reinheitsgrad 99 %.

**5.6 Toluol**, UV-Reinheitsgrad.

**5.7 Natriumhydrogencarbonat**, Reinheitsgrad mindestens 99,5 %.

**5.8 Natriumchlorid (NaCl)**, Reinheitsgrad mindestens 99 %.

**5.9 Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ )**, Reinheitsgrad mindestens 99 %.

**5.10 Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )**, Reinheitsgrad mindestens 99 %.

**5.11 Kaliumchlorid (KCl)**, Reinheitsgrad mindestens 99 %.

**5.12 Natriumhydroxid (NaOH)**, Reinheitsgrad mindestens 99 %.

**5.13 Salzsäurelösung**, Volumenanteil  $\varphi(\text{HCl}) = 37 \%$  (acidimetrisch).

**5.14 Salzsäurelösung**, Stoffmengenkonzentration  $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ .

8,28 ml Salzsäurelösung (5.13) werden mit Wasser auf 1 l verdünnt.

**5.15 Natriumhydroxidlösung**,  $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$ .

8 g Natriumhydroxid (5.12) werden in 1 l Wasser gelöst.

**5.16 Essigsäurelösung**, Massenkonzentration  $\rho(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10 \text{ g/l}$ .

9,5 ml Eisessig (5.5) werden mit Wasser auf 1 l verdünnt.

**5.17 Polysorbat 20**

**5.18 Polysorbat-20-Lösung**,  $\rho(\text{Tween}^{\text{®}}20^1) = 20 \text{ g/l}$ .

20 g Polysorbat 20 (5.17) werden in 1 000 ml Wasser verdünnt.

---

1 Tween<sup>®</sup>20 ist die Herstellerbezeichnung eines nichtionischen Detergenzes der Art Polysorbat 20, das von verschiedenen Herstellern bezogen werden kann. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

### 5.19 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH = 7,4.

8 g Natriumchlorid (5.8), 2,9 g Dinatriumhydrogenphosphat (5.9), 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (5.10) und 0,2 g Kaliumchlorid (5.11) werden in 900 ml Wasser gelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit Salzsäurelösung (5.14) oder Natronlauge (5.15) je nach Bedarf auf pH = 7,4 eingestellt und dann mit Wasser auf 1 l verdünnt.

Alternativ kann eine PBS-Lösung mit gleichen Eigenschaften aus handelsüblichem PBS-Material hergestellt werden.

### 5.20 Natriumhydrogencarbonatlösung, $\rho(\text{NaHCO}_3) = 30 \text{ g/l}$ .

30 g Natriumhydrogencarbonat (5.7) werden in 1 000 ml Wasser verdünnt.

### 5.21 Extraktionslösung A (für Gewürze Süßholzwurzel und Süßholzwurzelerzeugnisse).

Methanol (5.2) wird mit Natriumhydrogencarbonatlösung (5.20) gut gemischt (50 + 50, v + v).

### 5.22 Extraktionslösung B (für Kakao und Kakaoerzeugnisse).

Methanol (5.2) wird mit Wasser gut gemischt (80 + 20, v + v).

### 5.23 Mobile Phase A (für Paprika und Chili).

Methanol (5.3) wird mit Acetonitril (5.4), Wasser und Eisessig (5.5) gemischt (35 + 35 + 29 + 1, v + v + v + v).

### 5.24 Mobile Phase B (für Süßholzwurzel und Süßholzwurzelerzeugnisse).

Methanol (5.3) wird mit Wasser und Eisessig (5.5) gemischt (70 + 30 + 1, v + v + v).

### 5.25 Mobile Phase C (für schwarzen und weißen Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischung, Kakao und Kakaoerzeugnisse).

Methanol (5.3) wird mit Acetonitril (5.4), Wasser und Eisessig (5.5) gemischt (28 + 28 + 39 + 1, v + v + v + v).

### 5.26 Mobile Phase D (HPLC-Säulen-Spüllösung für Süßholzwurzel und Süßholzwurzelerzeugnisse).

100 % Methanol (5.3).

### 5.27 Immunoaffinitätssäule

Die Immunoaffinitätssäule enthält Antikörper gegen Ochratoxin A. Die Kapazität der Säule darf nicht geringer als 100 ng Ochratoxin A sein und die Wiederfindung darf nicht geringer als 85 % sein, wenn eine Standardlösung von Ochratoxin A in einem Gemisch aus 15 Volumenteilen Methanol (5.2) und 85 Volumenteilen PBS-Lösung (5.19), die 3 ng Ochratoxin A enthält, aufgegeben wird.

### 5.28 Ochratoxin A, in Kristallform oder als Film in Ampullen oder als zertifizierte Standardlösung.

### 5.29 Ochratoxin-A-Stammlösung, $\rho(\text{Ochratoxin A}) = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ .

Eine Ochratoxin-A-Stammlösung (5.28) mit einer Nennkonzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  wird in einem Gemisch aus Toluol (5.6) und Eisessig (5.5) im Verhältnis 99 + 1 (v + v) hergestellt.