

DIN EN 17424



ICS 67.050

**Lebensmittel –
Bestimmung von Aflatoxinen in Gewürzen außer Paprika mit
IAC-Reinigung und HPLC-FLD mit Nachsäulenderivatisierung;
Deutsche Fassung EN 17424:2020**

Foodstuffs –

Determination of aflatoxins in spices other than paprika by IAC clean-up and HPLC-FLD with
post-column derivatization;

German version EN 17424:2020

Produits alimentaires –

Dosage des aflatoxines dans les épices autres que le paprika par purification sur colonne
d'immunoaffinité et CLHP-FLD avec dérivation post-colonne;

Version allemande EN 17424:2020

Gesamtumfang 34 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17424:2020) 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 internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696*

ISO 5725 siehe DIN ISO 5725 (alle Teile)

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

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*

* 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 Aflatoxinen in Gewürzen außer Paprika mit
IAC Reinigung und HPLC-FLD mit Nachsäulenderivatisierung

Foodstuffs —
Determination of aflatoxins in spices other than paprika
by IAC clean-up and HPLC-FLD with post-column
derivatization

Produits alimentaires —
Dosage des aflatoxines dans les épices autres que le
paprika par purification sur colonne d'immunoaffinité
et CLHP-FLD avec dérivation post-colonne

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 14. September 2020 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	5
6 Geräte und Ausrüstung	10
7 Durchführung	11
7.1 Extraktion von Aflatoxinen aus der Probe	11
7.2 Bestimmung der Wiederfindung	12
7.3 IAC-Reinigung	12
7.4 HPLC-FLD-Analyse	13
7.4.1 Allgemeines	13
7.4.2 Bestätigung	13
7.4.3 Nachsäulenderivatisierung	13
7.4.4 Identifizierung	14
7.4.5 Kalibrierung	14
8 Berechnung	14
9 Präzision	15
9.1 Allgemeines	15
9.2 Wiederholpräzision	15
9.3 Vergleichpräzision	15
10 Prüfbericht	17
Anhang A (informativ) Beispielbedingungen für geeignete HPLC-FLD-Systeme	18
A.1 Allgemeines	18
A.2 Beispiel für HPLC-Bedingungen	18
A.3 Andere Beispiele für geeignete Säulen und Bedingungen für die mobile Phase	18
Anhang B (informativ) Typische Chromatogramme	20
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	24
Anhang D (informativ) Zusätzliche Informationen	27
Literaturhinweise	32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17424:2020) 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 Mai 2021, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2021 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, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation 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

Bei Aflatoxinen handelt es sich um eine Gruppe von ungefähr zwanzig verwandten Pilzmetaboliten, von denen jedoch üblicherweise nur die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ in Lebensmitteln zu finden sind. Die Aflatoxine B₂ und G₂ sind die Dihydroderivate der entsprechenden Ausgangsverbindungen. Aflatoxine werden von mindestens drei Arten von *Aspergillus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* und *A. nominus*, gebildet und können in einer Vielzahl wichtiger roher Lebensmittelerzeugnisse, einschließlich Getreide, Nüssen, Gewürzen, Feigen und Trockenobst, vorkommen.

WARNUNG 1 — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, müssen geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen getroffen werden. Die aktuelle Version der Gefahrenstoffverordnung, Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 [3], sowie geeignete nationale Mitteilungen, wie z. B. in [4], sollten berücksichtigt werden.

WARNUNG 2 — Die Anwendung dieses Dokuments kann die Verwendung gefährlicher Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte einschließen. 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 — Es ist bekannt, dass Aflatoxine karzinogene Wirkungen haben und sowohl akut als auch chronisch toxisch sind.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ und des Gesamtgehalts an Aflatoxinen (Summe von B₁, B₂, G₁ und G₂) in Gewürzen außer Paprika, für die EU-Höchstgehalte festgelegt wurden, mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (en: High Performance Liquid Chromatography, HPLC) mit Nachsäulenderivatisierung (en: post-column derivatization, PCD) und Fluoreszenzdetektion (FLD) nach Reinigung an der Immunoaffinitätssäule (en: immunoaffinity column, IAC).

Das Verfahren ist anwendbar auf die Gewürze *Capsicum* (außer Paprika), Pfeffer, Muskatnuss, Ingwer, Kurkuma und Mischungen daraus.

Dieses Verfahren wurde für die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ und die Gesamtaflatoxine in einer Reihe von Untersuchungsproben validiert. Diese umfassten: Ingwer, Pfeffer, Muskatnuss, Chili, Kurkuma als einzelne Gewürze und gemischten Pfeffer + Chili + Muskatnuss (90 + 5 + 5, $m + m + m$), gemischte Gewürze + Ingwer (6 + 4, $m + m$) gemischtes Gewürz, gemischtes Kurkuma + Ingwer (2 + 8, $m + m$).

Die Validierung wurde für die folgenden Konzentrationsbereiche durchgeführt: Aflatoxin B₁ = 1 µg/kg bis 16 µg/kg und Gesamtaflatoxine = 2,46 µg/kg bis 36,1 µg/kg.

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 — Spezifikation und Prüfverfahren (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

Aflatoxine werden aus den Gewürzen mit einem Gemisch aus Methanol, Acetonitril und Wasser extrahiert. Der Probenextrakt wird filtriert, mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (en: phosphate buffered saline, PBS) verdünnt und auf eine Immunoaffinitätssäule gebracht, die spezifische Antikörper gegen die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ enthält. Die Aflatoxine werden aus der IAC eluiert und durch Umkehrphasen-HPLC mit PCD gefolgt von FLD quantifiziert.

5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Chemikalien von anerkannter Analysereinheit, p.a. (pro analysis), und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Die Lösemittel müssen, wenn nicht anders festgelegt, von geeignetem Reinheitsgrad für die HPLC-Analyse sein.

WARNUNG 1 — Verfahren zur Dekontamination von aflatoxinhaltigen Laborabfällen sind von der „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) entwickelt worden, siehe [5], [6].

WARNUNG 2 — Aflatoxine sind lichtempfindlich. Das Labor, in dem die Untersuchungen durchgeführt werden, muss ausreichend vor Tageslicht geschützt sein, z. B. durch Anbringen von UV-Licht absorbierender Folie an den Fenstern in Verbindung mit Dämmerlicht (kein direktes Sonnenlicht) oder durch Vorhänge oder Jalousien in Verbindung mit künstlichem Licht (Leuchtstoffröhren können verwendet werden). Aflatoxin enthaltende Lösungen müssen so weit wie möglich vor Licht geschützt werden (im Dunklen aufbewahren unter Verwendung von Aluminiumfolie oder Braunglas) und bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur (z. B. $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt werden.

5.1 Methanol (CH_3OH)

5.2 Acetonitril (CH_3CN)

5.3 Kaliumbromid (KBr)

5.4 Natriumhydroxid (NaOH)

5.5 Natriumhydroxidlösung, Stoffmengenkonzentration $c(\text{NaOH}) = 2\text{ mol/l}$

8,0 g Natriumhydroxid (5.4) werden in 100 ml Wasser gelöst.

5.6 Natriumhydroxidlösung, $c(\text{NaOH}) = 0,1\text{ mol/l}$

0,4 g Natriumhydroxid (5.4) werden in 100 ml Wasser gelöst.

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

5.8 Salzsäurelösung, $c(\text{HCl}) = 0,1\text{ mol/l}$

8,28 ml Salzsäurelösung (5.7) werden mit Wasser auf 1 l verdünnt.

5.9 Schwefelsäurelösung, zum Spülen von Glasgeräten, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2\text{ mol/l}$

5.10 Natriumchlorid (NaCl)

5.11 Kaliumchlorid (KCl)

5.12 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

5.13 Dinatriumhydrogenorthophosphat (Na_2HPO_4)

5.14 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH = 7,4

0,20 g Kaliumchlorid (5.11), 0,20 g Kaliumdihydrogenphosphat (5.12), 1,16 g Dinatriumhydrogenorthophosphat (5.13) und 8,00 g Natriumchlorid (5.10) werden auf 0,01 g gewogen und in einen 1-l-Messkolben gefüllt. Die Chemikalien werden in Wasser gelöst, und es werden 900 ml Wasser hinzugefügt.

Nach dem Auflösen wird der pH-Wert mit Salzsäurelösung (5.8) oder Natriumhydroxidlösung (5.6) je nach Bedarf auf pH = 7,4 eingestellt und mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

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

5.15 Polysorbat 20, z. B. Tween® 20¹, Laurinsäure ≥ 40 %

5.16 PBS/Polysorbat-20-Lösung

Polysorbat 20 (5.15) wird mit PBS (5.14) gemischt (1 + 9, V + V).

5.17 Extraktionslösung

Acetonitril (5.2), Methanol (5.1) und Wasser werden gemischt (40 + 35 + 25, V + V + V).

5.18 Salpetersäurelösung (HNO₃), $c(\text{HNO}_3) = 4$ mol/l

Langsam werden 25,5 ml konzentrierte HNO₃ (70 %, Massenkonzentration $\rho(\text{HNO}_3) = 1,413$ g/ml bei 25 °C) zu 25 ml Wasser hinzugefügt, das Endvolumen wird mit Wasser auf 100 ml erhöht.

5.19 Pyridiniumbromidperbromid-Lösung (PBPB), $\rho(\text{PBPB}) = 50$ mg/l

50 mg $\pm$ 10 mg PBPB werden in ein 20-ml-Glasfläschchen eingewogen. Das PBPB wird in etwa 20 ml Wasser gelöst, bei Bedarf unter Verwendung eines Ultraschallbades, und die Lösung wird quantitativ in eine 1-l-Flasche aus Braunglas gefüllt. Die Lösung wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung kann in einem dunklen Raum bei Raumtemperatur vier Tage lang gelagert werden.

5.20 Aflatoxin B₁, z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung

5.21 Aflatoxin B₂, z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung

5.22 Aflatoxin G₁, z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung

5.23 Aflatoxin G₂, z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung

5.24 Aflatoxin (B₁, B₂, G₁ und G₂)-Stammlösungen

Die Aflatoxine B₁ (5.20), B₂ (5.21), G₁ (5.22) und G₂ (5.23) werden jeweils einzeln in Acetonitril (5.2) gelöst, sodass sich einzelne Lösungen mit einer Massenkonzentration von 10 µg/ml für jedes Aflatoxin ergeben. Die Stammlösungen werden in Fläschchen aus Braunglas gefüllt und bei Nichtbenutzung bei unter 4 °C gelagert.

1 Tween 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 nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

Zur Bestimmung der exakten Massenkonzentration des Aflatoxins in jeder Stammlösung wird die Absorptionskurve zwischen 330 nm und 370 nm in 1-cm-Quarzküvetten unter Verwendung eines UV-Spektralphotometers (6.5) mit Acetonitril (5.2) als Referenz aufgenommen. Die Massenkonzentration jedes Aflatoxins, ρ , in $\mu\text{g/ml}$, wird nach Gleichung (1) berechnet:

$$\rho = \frac{A_{\max} \times M \times 100}{\delta \times \varepsilon} \quad (1)$$

Dabei ist

$A_{\max}$ der aus der Absorptionskurve bestimmte maximale Extinktionswert (hier bei einer Wellenlänge von 350 nm bestimmt);

M die relative Molmasse des jeweiligen Aflatoxins, in g/mol;

δ die optische Weglänge der Quarzküvette, in cm;

ε der molare Absorptionskoeffizient des jeweiligen Aflatoxins in Acetonitril (5.2), in m^2/mol .

M und ε der Aflatoxine B_1 , B_2 , G_1 und G_2 sind in Tabelle 1 [7] aufgeführt.

Tabelle 1 — Relative Molmasse und molarer Absorptionskoeffizient der Aflatoxine B_1 , B_2 , G_1 und G_2 in Acetonitril (5.2)

Aflatoxin	M g/mol	ε m^2/mol
B_1	312	2 070
B_2	314	2 250
G_1	328	1 760
G_2	330	1 890

5.25 Gemischte Stammlösung

Durch geeignete Verdünnung der Aflatoxin-Stammlösungen (B_1 , B_2 , G_1 und G_2 ; 5.24) wird eine gemischte Stammlösung hergestellt, die jeweils 1 000 ng/ml Aflatoxin B_1 und G_1 sowie jeweils 500 ng/ml Aflatoxin B_2 und G_2 in Acetonitril (5.2) enthält.

Alternativ darf eine zertifizierte gebrauchsfertige Aflatoxin-Standard-Stammlösung verwendet werden.

Die Lösung vor Licht schützen und bei Nichtgebrauch unter 4 °C lagern. Unter diesen Bedingungen kann die Lösung zwei Monate lang gelagert werden.

5.26 Gemischte Zwischenlösung

Eine gemischte Zwischenlösung wird hergestellt, indem 2,0 ml der gemischten Stammlösung (5.25) in einen 10-ml-Messkolben pipettiert werden. Der Messkolben wird bis zur Marke mit Acetonitril (5.2) aufgefüllt und gut geschüttelt. Die Massenkonzentration dieser gemischten Zwischenlösung beträgt 200 ng/ml Aflatoxin B_1 und G_1 und 100 ng/ml Aflatoxin B_2 und G_2 .

Die Lösung vor Licht schützen und bei Nichtgebrauch unter 4 °C lagern. Unter diesen Bedingungen kann die Lösung zwei Monate lang gelagert werden.

5.27 Gemischte Standardlösung

1,0 ml der gemischten Zwischenlösung (5.26) wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, bis zur Marke mit Acetonitril (5.2) aufgefüllt und gut geschüttelt. Dies ergibt eine Lösung, die 20 ng/ml Aflatoxin B₁ und G₁ und 10 ng/ml Aflatoxin B₂ und G₂ enthält zur Herstellung von Kalibrierlösungen.

Die Lösung vor Licht schützen und bei Nichtgebrauch unter 4 °C lagern. Unter diesen Bedingungen kann die Lösung zwei Monate lang gelagert werden.

5.28 Kalibrierlösungen

Verschiedene Volumina der gemischten Standardlösung (5.27) werden in fünf verschiedene 10-ml-Messkolben gegeben, sodass fünf Kalibrierwerte über den gesamten Kalibrierbereich verteilt erhalten werden. Die in Tabelle 2 angegebenen Werte wurden in der Methodenvalidierungsstudie verwendet.

Das Acetonitril wird bei Raumtemperatur unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Zu jedem Messkolben werden 4 ml Methanol (5.1) gegeben, die Aflatoxine durch Mischen gelöst, bis zur 10-ml Marke mit Wasser aufgefüllt und gut geschüttelt. Methanol und Wasser unterliegen beim Mischen einer Volumenkontraktion, daher ist das Volumen mit Wasser wieder auf das vorgegebene Volumen einzustellen.

Die Kalibrierlösungen decken den Bereich von 0,48 µg/kg bis 9,6 µg/kg für die Aflatoxine B₁ und G₁ und den Bereich von 0,24 µg/kg bis 4,8 µg/kg für die Aflatoxine B₂ und G₂ ab.

Tabelle 2 — Beispiel für die Herstellung der HPLC-Kalibrierlösungen

Kalibrierlösung	Gemischte Standardlösung (5.27)	Angestrebte Massenkonzentration je Analyt			
	µl	B ₁ ng/ml	B ₂ ng/ml	G ₁ ng/ml	G ₂ ng/ml
1	10	0,02	0,01	0,02	0,01
2	20	0,04	0,02	0,04	0,02
3	50	0,10	0,05	0,10	0,05
4	100	0,20	0,10	0,20	0,10
5	200	0,40	0,20	0,40	0,20

Die Lösungen sollten an jedem Analysetag frisch hergestellt werden.

5.29 Mobile Phase A für die HPLC

Wasser, Acetonitril (5.2) und Methanol (5.1) werden gemischt (56 + 30 + 14, V + V + V). Falls bei der HPLC (6.13) kein Online-System verfügbar ist, wird die Lösung vor Gebrauch entgast.