

DIN EN 14176

ICS 67.120.30

Einsprüche bis 2015-06-17
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 14176:2004-03

Entwurf**Lebensmittel –****Bestimmung von Domainsäure in rohen Schalentieren, gekochten Miesmuscheln und rohem Fisch mit RP-HPLC und UV-Detektion; Deutsche und Englische Fassung prEN 14176:2015****Foodstuffs –**

Determination of domoic acid in raw shellfish, raw finfish and cooked mussels by RP-HPLC using UV detection;
German and English version prEN 14176:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-04-17 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 37 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 14176:2015) ist vom Technischen Komitee TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) nach eingehenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 14 „Marine Biotoxine“ erarbeitet worden.

Das zuständige deutsche Arbeitsgremium ist der Arbeitskreis NA 057-01-03 -01 AK „Algantoxine“ des DIN-Normenausschusses „Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte“ (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 14176 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 14176:2005 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Die Extraktionsvorschrift in Abschnitt 6.2 wurde überarbeitet;
- b) die chromatographischen Bedingungen in Abschnitt 6.3 wurden überarbeitet;
- c) das Verfahren wurde nachvalidiert, und die Validierungsdaten im Anhang A wurden überarbeitet.

Lebensmittel — Bestimmung von Domoinsäure in rohen Schalentieren, rohen Fischen und gekochten Miesmuscheln mit RP-HPLC und UV-Detektion

Foodstuffs — Determination of domoic acid in raw shellfish, raw finfish and cooked mussels by RP-HPLC using UV detection

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.5a

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Kurzbeschreibung	5
4 Chemikalien	5
5 Geräte.....	7
6 Durchführung	8
7 Auswertung von Ergebnissen	11
8 Präzision	12
9 Untersuchungsbericht	12
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	13
A.1 Präzisionsdaten für Verfahren A mit isokratischer Elution.....	13
A.2 Präzisionsdaten für Verfahren B mit Gradientenelution.....	14
A.3 Präzisionsdaten aus den Laborvergleichsuntersuchungen von EURLMB	15
Anhang B (informativ) Typisches Chromatogramm	16
Literaturhinweise	17

Vorwort

Dieses Dokument (prEN 14176:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 14176:2003 ersetzen.

Die prEN 14176:2005 enthält die folgenden signifikanten technischen Änderungen im Vergleich zur EN 14176:2003:

- Die Extraktionsvorschrift in 6.2 wurde überarbeitet;
- Die chromatographischen Bedingungen in 6.3 wurden überarbeitet;
- Das Verfahren wurde nachvalidiert, und die Validierungsdaten im Anhang A wurden überarbeitet.

Einleitung

Das Toxin der amnesischen Schalentiervergiftung (ASP, en: amnesic shellfish poisoning), Domoinsäure (DA, en: domoic acid) gehört zur Gruppe der Aminosäuren, die als Kainoide bezeichnet werden, die als Neuro-exzitatoren (Reizmittel) oder Exzitotoxine eingeordnet werden, da sie die Neurotransmissionsmechanismen des Gehirns stören. Das Toxin kann sich in der Nahrung der Schalentiere in einer Vielzahl von toxischen *Pseudonitzschia*-Arten anreichern. Die Nahrungsaufnahme von mit DA kontaminierten Meeresfrüchten kann zu einer Vergiftung mit Symptomen führen, die (unter anderem) abdominale Krämpfe, Erbrechen, Orientierungslosigkeit und Gedächtnisverlust (Amnesie) umfassen, und sie können in bestimmten Fällen schwere gesundheitliche Folgen haben.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion (HPLC-UV, en: high performance liquid chromatography with ultraviolet detection) war das zuerst verwendete chemische Analysenverfahren für DA und ist immer noch das am meisten für kontinuierliche die Überwachung von Schalentieren eingesetzte Verfahren. Der DA-Nachweis wird durch die starke Extinktion der DA bei 242 nm [1] erleichtert.

Diese Europäische Norm beruht auf zwei vergleichbaren Verfahren. Eine Verfahrensweise zur quantitativen Bestimmung von DA und deren Isomeren, z. B. Epi-Domoinsäure (epi-DA) in ungesalzenen rohen Meeresfrüchten (Verfahren A), ist in [2] beschrieben. Die andere Verfahrensweise zur quantitativen Bestimmung von DA und deren Isomeren, z. B. Epi-Domoinsäure (epi-DA) in gekochten Miesmuscheln (Verfahren B), ist in [3] beschrieben.

Verfahren A nutzt eine Ein-Schritt-Extraktion mit 50%igem wässrigen Methanol und eine selektive Reinigung sowie Voranreicherung (Vorkonzentration) mit starker Festphasenextraktion (SPE, en: solid phase extraction) mit Anionenaustauscher. Die Analyten werden mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unter isokratischen Bedingungen und ultravioletter Absorptionsdetektion bestimmt. Verfahren A ermöglicht die Eliminierung des Reinigungsschrittes im Hinblick auf die im Validierungsverfahren ermittelten Ergebnisse.

Verfahren B nutzt eine Ein-Schritt-Extraktion mit 50%igem wässrigen Methanol und einen optionalen Arbeitsschritt zum Erhitzen, der ein besseres Dekantieren des Überstandes ermöglicht. Jedoch wurde beobachtet, dass durch das Erhitzen DA und epi-DA abgebaut werden kann. DA und epi-DA werden mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit binärem Gradienten sowie ultravioletter Absorptionsdetektion bestimmt.

Beide Verfahren können für die quantitative Bestimmung von DA angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt die Verfahren für die quantitative Bestimmung von Domoinsäure in rohen Muscheln und Fischen als auch in gekochten Miesmuscheln fest. Abhängig von der Empfindlichkeit des UV-Detektors liegt die Nachweisgrenze bei etwa 10 ng/ml bis 80 ng/ml (0,05 mg/kg bis 0,4 mg/kg). Die Quantifizierungsgrenze (Bestimmungsgrenze) für DA mit diesen Verfahren beträgt mindestens 2,7 mg/kg. Verfahren A wurde in Bezug auf die Bestimmung von DA in verschiedenen rohen Matrices, beispielsweise Miesmuscheln, Venusmuscheln, Jakobsmuscheln und Anchovis (Sardellen), aufgestockt und/oder natürlich kontaminiert bei Konzentrationen validiert, die im Bereich von 2,7 mg/kg bis 85,1 mg/kg liegen. Verfahren B wurde in Bezug auf die Bestimmung von DA bei Konzentrationen validiert, die im Bereich von 5 mg/kg bis 12,9 mg/kg in gekochten Miesmuscheln liegen.

Hinsichtlich weiterer Informationen zu den Validierungsdaten siehe Abschnitt 8 und Anhang A.

Laborerfahrungen haben gezeigt, dass die vorliegende Norm auch für andere Schalentier-Arten angewendet werden kann, jedoch wurde bisher noch kein vollständiger Ringversuch nach ISO 5725 durchgeführt.

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 Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696)*

3 Kurzbeschreibung

DA und epi-DA werden mit einem Gemisch von Methanol und Wasser aus Muschelgewebe extrahiert. Der Extrakt wird durch ein Membranfilter filtriert und mit einem HPLC-Gerät mit isokratischer Elution (Verfahren A) oder mit Gradientenelution (Verfahren B) sowie UV-Absorptionsdetektion gemessen. Der Anteil an DA wird mit dem Verfahren des externen Standards berechnet.

4 Chemikalien

4.1 Allgemeines

Soweit nicht anders festgelegt, ist während der Analyse nur Wasser mit Qualität 1 nach EN ISO 3696 zu verwenden.

Soweit nicht anders angegeben, müssen alle Chemikalien analysenrein (p. a.) sein.

Referenzmaterialien (Toxinstandards) anderer als der angegebenen Herkunft dürfen ebenfalls verwendet werden, wenn sie eindeutig identifiziert sind und eine klar festgelegte Massenkonzentration aufweisen.

4.2 Methanol, HPLC-Qualität.

4.3 Acetonitril, HPLC-Qualität.

4.4 Extraktionslösemittel, Methanol/Wasser 50:50 v/v.

4.5 Acetonitril/Wasser, 10:90 v/v (Verfahren A).

4.6 Trifluoressigsäure (TFA), spektrophotometrische Güte ($\geq 99\%$) (Verfahren A).

4.7 Ameisensäure, Massenkonzentration $\geq 98\%$ (Verfahren B).

4.8 Eluenten

4.8.1 Eluent 1 (isokratische Bedingungen)

Wässriges 10 % v/v Acetonitril (4.3) mit 1 % v/v TFA (4.6). Bei Ein-Pumpensystemen werden 100 ml Acetonitril mit etwa 400 ml Wasser gemischt, 1,0 ml TFA hinzugegeben und die Lösung wird mit Wasser auf 1 l verdünnt.

4.8.2 Eluent 2 (Gradientenbedingungen)

100 ml Acetonitril (4.3) werden mit 900 ml Wasser gemischt und mit Ameisensäure (4.7) auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt.

4.8.3 Eluent 3 (Gradientenbedingungen)

300 ml Acetonitril (4.3) werden mit 700 ml Wasser gemischt und mit Ameisensäure (4.7) auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt.

4.9 Standardsubstanz

4.9.1 Domoinsäure als zertifizierte Kalibrierlösung

DA ist als zertifizierte Kalibrierlösung beispielsweise vom Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, Nova Scotia-Canada erhältlich¹⁾. Verschlussene (abgeschmolzene) Ampullen sollten im Dunklen in einem Kühlschrank (bei etwa +4 °C) aufbewahrt werden. Die Lösung darf nicht einfrieren. Vor dem Öffnen sollte jede Ampulle Raumtemperatur haben. Sobald die Ampulle geöffnet wurde, sollten die genauen Aliquoten mit kalibrierten volumetrischen Geräten entnommen und möglichst schnell in andere Fläschchen aus Braunglas für die Verdünnung und/oder Analyse überführt werden. Die Fläschchen werden verschlossen und im Dunkeln in einem Kühlschrank (bei etwa +4 °C) nicht länger als 3 Monate aufbewahrt.

ANMERKUNG Epi-DA ist als ein geringfügigen Bestandteil in der zertifizierten Kalibrierlösung vom Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, Nova Scotia-Canada¹⁾ enthalten.

4.9.2 Domoinsäure, kristallines Pulver, Reinheit $> 95\%$.

4.10 Standardlösungen

4.10.1 Allgemeines

Entweder werden kommerziell erhältliche zertifizierte Kalibrierlösungen verwendet oder die Kalibrierlösungen werden durch Verdünnung von DA in Form von kristallinem Pulver hergestellt, für beide Verfahrensweisen wurde nachgewiesen, dass sie zu erfolgreichen Validierungsdaten führen.

4.10.2 Stammlösung

DA in Form von kristallinem Pulver (4.9.2) wird in einen Messkolben eingewogen und/oder in Methanol bis zu einer Endkonzentration von 500 µg/ml gelöst. Die verschlossenen Fläschchen sollten im Dunklen in einem Kühlschrank (bei etwa +4 °C) aufbewahrt werden.

1) Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Bezugsquelle durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

4.10.3 Standardlösung

Die Stammlösung (4.10.2) wird mit Methanol bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml verdünnt. Die Massenkonzentration dieser Lösung wird durch den Vergleich mit den zertifizierten Kalibrierlösungen (4.9.1) überprüft.

4.10.4 Kalibrierlösungen

Entweder durch Verdünnung der Standardlösung (4.10.3) oder durch Verdünnung der zertifizierten Kalibrierlösung (4.9.1) werden Kalibrierlösungen mit geeigneten Massenkonzentrationen von DA und epi-DA hergestellt.

Für die Validierung von Verfahren A mit isokratischer Elution wurden durch Verdünnung der zertifizierten Kalibrierlösung (4.9.1) mit Acetonitril/Wasser, 1:9 v/v (4.5) Kalibrierlösungen im Bereich von 0,2 µg/ml bis 25 µg/ml hergestellt.

Für die Validierung von Verfahren B mit Gradientenelution wurden durch Verdünnung der Standardlösung (4.10.3) mit einer Acetonitril/Wasser-Lösung (4.4) Kalibrierlösungen im Bereich von 0,5 µg/ml bis 10 µg/ml hergestellt.

Die Lösungen werden im Dunklen und gekühlt (bei etwa +4 °C) aufbewahrt, wenn sie nicht gebraucht werden. Die Lösungen nicht einfrieren. Vor der Verwendung werden die Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt.

4.11 Referenzmaterial (optional für nicht amtliche Kontrolllaboratorien)

Referenzmaterial von Muschelgewebe für DA ist beispielsweise vom Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, Nova Scotia-Canada¹⁾ zu beziehen. Muschelhomogenat sollte im Gefrierschrank (bei -12 °C oder niedriger) aufbewahrt werden. Jede Flasche sollte vor dem Öffnen auf Raumtemperatur erwärmt und der Inhalt mit dem Vortex-Mischer für mindestens 2 min sorgfältig gemischt werden. Ist eine Flasche geöffnet, sollte der gesamte Inhalt umgehend verwendet werden. Das Referenzmaterial kann zur Prüfung der Genauigkeit einer gegebenen analytischen Verfahrensweise verwendet werden.

ANMERKUNG Epi-DA ist als ein geringfügigen Bestandteil in dem zertifizierten Referenzmaterial vom Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, Nova Scotia-Canada¹⁾ enthalten.

5 Geräte

5.1 Allgemeines

Übliche Laborgeräte und insbesondere Folgendes:

5.2 Analysenwaage, auf 0,1 mg genau.

5.3 Zerkleinerungsgerät (Mühle) oder Mischer

5.4 Mechanischer Mischer, hoher Drehzahlbereich bei 8 000 min⁻¹ bis 45 000 min⁻¹ (z. B. Ultra-Turrax).

5.5 Zentrifuge, geeignet für 3 000 g (geköhlt bei +4 °C, sofern möglich).

5.6 Zentrifugenröhrchen, Nennvolumen 30 ml bis 50 ml, mit Schraubverschlüssen.

5.7 Zentrifugenröhrchen mit Graduierung, Nennvolumen ≥ 30 ml, mit Schraubverschlüssen.

5.8 Membranfilter, kompatibel mit Methanol, mit einer Porenweite von 0,2 µm bis 0,45 µm, z. B. Tensid-freies Zelluloseazetat (SFCA) mit Glasfaser-Vorfilter.

5.9 Einstellbare automatische Pipetten, geeignet für einen Bereich von 20 µl bis 1 000 µl.

5.10 Elektrischer Heizer, (Verfahren B).

5.11 PPLC-System, bestehend aus:

5.11.1 Injektionssystem

ANMERKUNG Ein gekühlter Injektor kann besonders bei hoher Raumtemperatur die Zerstörung der DA mit der Zeit verhindern.

5.11.2 Pumpe, geeignet für die isokratische Elution (Verfahren A) oder für die Gradientenelution (Verfahren B).

5.11.3 Säulenofen, geeignet zum Heizen bis $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$ (Verfahren A) oder $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$ (Verfahren B).

5.11.4 Analytische Trennsäule, Umkehrphasen-C18-Säule, z. B. 250 mm × 4,6 mm ID (Verfahren A) oder 4,0 mm ID (Verfahren B) gepackt mit 5-µm-Partikeln.

ANMERKUNG Andere LC-Säulen und Maße können geeignet sein, wenn der Durchfluss der mobilen Phase und/oder die Injektionsvolumina angepasst sind. Die Anwendung einer Vorsäule wird empfohlen. Sofern die HPLC milliporenkompatibel ist, kann eine Säule von 250 mm × 2,1 mm ID, gepackt mit der gleichen stationären Phase mit einem Injektionsvolumen von 5 µl und einer Durchflussrate der mobilen Phase von 0,2 ml/min bis 0,3 ml/min angewendet werden.

5.11.5 UV-Spektrometer, eingestellt auf eine Wellenlänge von 242 nm, das ein Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) von 10:1 bei Injektion einer 0,2 µg/ml DA-Lösung mit den Bedingungen nach 6.3 bietet.

5.11.6 Datensystem

5.11.7 HPLC-Fläschchen

5.11.8 Fläschchen aus Braunglas, 2 ml oder weniger, z. B. mit Bördelverschlüssen (zur Aufbewahrung der DA-Arbeitskalibrierlösungen).

6 Durchführung

6.1 Probenvorbereitung

6.1.1 Rohe Muscheln mit Schale

Die Außenseite der Schalentiere wird gründlich mit klarem Wasser gereinigt. Das Öffnen erfolgt durch das Durchtrennen des Adduktormuskels (Schließmuskel). Die Innenseite wird mit klarem Wasser gespült und Sand und Fremdstoffe entfernt. Das Schalentierfleisch von der Schale entfernt, indem der mit dem Scharnierbereich verbundene Adduktormuskel und Gewebe abgetrennt wird. Vor dem Öffnen der Schale dürfen weder Wärme noch Betäubungsmittel (Anästhetika) angewendet werden. Nach dem Abtrennen von Schalentier werden die Gewebe für 5 min in ein Sieb gegeben und das Salzwasser ablaufen gelassen. Für eine repräsentative Probenahme sollten mindestens 100 g bis 150 g des zusammengefassten (gepoolten) Gewebes in einem Zerkleinerungsgerät oder einer Mühle (5.3) homogenisiert werden [4]. Teilproben von diesem Homogenat können unmittelbar nach dem Mischen, während noch sorgfältig durchmischt wird, oder nach dem erneuten Mischen entnommen werden. Im Fall von Jakobsmuscheln sollten mindestens 10 Proben (einzelne Teile) entsprechend [5] entnommen werden.

6.1.2 Rohe Muscheln ohne Schale (gesamter Körper oder einzeln verzehrbare Teile)

Falls notwendig wird die Außenseite mit klarem Wasser gereinigt und ablaufen gelassen. Für eine repräsentative Probenahme sollten mindestens 100 g bis 150 g des vereinigten (gepoolten) Gewebes in einem Zerkleinerungsgerät oder einer Mühle (5.3) homogenisiert werden [4]. Teilproben von diesem Homogenat können unmittelbar nach dem Mischen, während noch sorgfältig durchmischt wird, oder nach

dem erneuten Mischen entnommen werden. Im Fall von Jakobsmuscheln sollten mindestens 10 Proben oder einzeln verzehrbare Teile (Muskel, Muskel plus Keimdrüse (Gonade)) entsprechend [5] entnommen werden.

6.1.3 Roher Fisch

Der Fisch wird gesäubert, geschuppt und ausgenommen. Bei kleinen Fischen ≤ 15 cm werden 5 bis 10 Fische verwendet. Bei Fischen mittlerer Größe werden Köpfe, Schuppen, Schwanz- und andere Flossen, Eingeweide sowie ungenießbare Gräten entfernt und verworfen: der Fisch wird filetiert, um das gesamte Fleisch und die Haut vom Kopf bis zum Schwanz und von der Rückenlinie bis zum Bauch von beiden Seiten zu erhalten [4]. Für eine repräsentative Probenahme sollten mindestens 100 g bis 150 g des vereinigten Gewebes in einem Zerkleinerungsgerät oder einer Mühle (5.3) homogenisiert werden. Teilproben von diesem Homogenat können unmittelbar nach dem Mischen, während noch sorgfältig durchmischt wird, oder erneut nach dem Mischen entnommen werden.

6.1.4 Gekochte Muscheln

Für eine repräsentative Probenahme sollten mindestens 100 g bis 150 g des vereinigten, gekochten Muschelgewebes (6.1.4) in einem Zerkleinerungsgerät oder einer Mühle (5.3) homogenisiert werden. Im Fall von Jakobsmuscheln sollten mindestens 10 Proben (einzelne Teile) entnommen werden. Falls das Laboratorium rohe Muscheln erhält, aber das Verfahren B anwenden möchte, müssen die Muscheln zuerst gekocht werden bis die Schalen sich öffnen. Die Schalen werden entfernt.

6.2 Extraktionsverfahren

ANMERKUNG Es ist erforderlich, Veränderungen der Extraktionsbedingungen vor der Anwendung laborintern zu verifizieren.

6.2.1 Verfahren A

4,0 g $\pm$ 0,1 g Muschelhomogenat werden genau in ein Zentrifugenröhrchen mit Graduierung (5.6) oder in einen Mikromischer-Becher aus nichtrostendem Stahl eingewogen. 16 ml Methanol/Wassergemisch (4.4) werden zugegeben und die Probe wird ausführlich (3 min bei 10 000 min⁻¹) homogenisiert (5.4). Es nicht zu versuchen, alles Gewebe in der Homogenisatorsonde oder im Mischerbecher zurückzugewinnen, jedoch werden diese anschließend gründlich gewaschen, um eine Kontamination der nächsten Probe zu verhindern.

Sofern ein Mischer für die Homogenisierung angewendet wurde, wird der entstandene Brei in ein Zentrifugenröhrchen gegossen.

6.2.2 Verfahren B

Eine Einwaage von 5,0 g $\pm$ 0,1 g homogenisiertem Muschelmateriale wird in ein graduiertes Zentrifugenröhrchen (5.7) eingewogen. Das Methanol/Wasser-Gemisch (4.4) wird zugegeben, der Inhalt bis auf 20 ml verdünnt und etwa 2 min mit einem mechanischen Mischer (5.4) gemischt.

Durch Erhitzen der Extrakte kann der Überstand besser dekantiert werden. In diesem Fall wird das Röhrchen verschlossen und das Gemisch 15 min bei 60 °C bis 70 °C erhitzt. Die Probe wird auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Es ist zu beachten, dass das Erhitzen des Extraktes eine geringe Degradation der DA zur Folge hat.

6.2.3 Zentrifugieren, Verdünnen und Lagerung

Der Extrakt wird 10 min bei 3 000 g oder höher zentrifugiert. Ein Anteil des Überstandes wird durch ein trockenes methanol-kompatibles 0,45-µm- oder 0,2 µm-Filter filtriert. Die Probenextrakte sollten möglichst schnell analysiert werden. Erfolgt die Analyse nicht unmittelbar, darf der Extrakt in mit Schraubverschlüssen dicht verschlossenen Aufbewahrungsbehältern in einem Kühlschrank bei etwa +4 °C gelagert werden.

Blindwertextraktion: das Extraktionsverfahren (siehe vorstehend) wird durchgeführt, indem das Probengewebe durch Wasser ersetzt wird (die Chromatogramme sollten keine Elutionspeaks in der Nähe der DA aufweisen oder einen übermäßigen Grundlinienanstieg verursachen).

Für Screening-Proben mit einem bekannten oder vermuteten hohen Kontaminationsgrad kann ein abgemessener Anteil des Extraktes mithilfe eines kalibrierten Messkolbens oder einer graduierten Pipette oder Mikropipetten mit Methanol/Wasser (50:50) auf ein festgelegtes Volumen verdünnt werden. Dieser wird durchmischt und analysiert.

6.3 HPLC-Messung

6.3.1 Allgemeines

Für die Ringversuche wurden die nach 6.2.1 extrahierte Proben unter den in 6.3.2 beschriebenen isokratischen HPLC-Bedingungen und die nach 6.2.2 extrahierten Proben unter den in 6.3.2 beschriebenen Gradienten-HPLC-Bedingungen bestimmt. Jedoch zeigte die Laborerfahrung, dass die für Verfahren A und Verfahren B festgelegten HPLC-Bedingungen für beide Extraktionsarten angewendet werden können. Ein typisches Chromatogramm ist in Anhang B dargestellt.

6.3.2 HPLC-Bedingungen

Der DA-Gehalt in einer Probe wird nach chromatographischer Trennung an einer Umkehrphasen-Säule, entweder unter isokratischen Bedingungen mit Eluent 1 (4.8.1) oder unter *Gradienten-Bedingungen* mit Eluent 2 (4.8.2) und Eluent 3 (4.8.3), bestimmt.

Die folgenden HPLC-Bedingungen führen zu zufriedenstellenden Ergebnissen:

Säule: C18-Umkehrphase, 5 µm, 250 mm × 4,6 mm *oder* 4,0 mm

Temperatur: 40 °C *oder* 35 °C

Durchfluss: 1 ml/min *oder* 0,7 ml/min

Injektionsvolumen: 5 µl bis 20 µl

UV-Detektor: 242 nm

Isokratische Laufzeit: etwa 15 min bis 20 min

ANMERKUNG 1 Diese Werte wurden im Ringversuch mit Verfahren A unter isokratischen Bedingungen angewendet, die kursiv angegebenen Werte wurden im Ringversuch mit Verfahren B unter Gradientenbedingungen angewendet.

ANMERKUNG 2 Große Injektionsvolumina können eine Verdünnung mit Wasser erfordern, um die Verbreiterung des DA-Peaks zu vermeiden, verbunden mit dem Injizieren einer Lösung mit stärkerer Elutionskraft als die mobile Phase (Lösemittel-Auswasch-Effekt („solvent wash-out“-Effekt)).

Geeignete Gradientenbedingungen sind in Tabelle 1 beschrieben.

Tabelle 1 — Zeit-Gradienten-Programm für Chromatographie und Säulen-Reäquilibration

Zeit min	Eluent 2 %	Eluent 3 %
0,00	90	10
30,00	90	10
30,10	60	40
40,00	60	40
40,10	90	10
50,00	Ende	