

DIN EN 14526

ICS 67.120.30

Einsprüche bis 2015-06-17
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 14526:2004-11

Entwurf

**Lebensmittel –
Bestimmung von Toxinen der Saxitoxin-Gruppe in Schalentieren –
HPLC-Verfahren mit Vorsäulenderivatisierung mit Peroxid- oder
Periodatoxidation;
Deutsche und Englische Fassung prEN 14526:2015**

Foodstuffs –

Determination of saxitoxin-group toxins in shellfish –

HPLC method using pre-column derivatization with peroxide or periodate oxidation;

German and English version prEN 14526:2015

Produits alimentaires –

Détermination de la teneur en PSP toxine dans les crustacés –

Méthode par CLHP utilisant une dérivation pré-colonne avec une oxydation par le peroxyde ou par le periodate;

Version allemande et anglaise prEN 14526:2015

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 141 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 14526:2015) 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 14526:2015 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 14526:2004 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Die Anwendbarkeit wurde erweitert, da das Verfahren an mehreren Proben in Ringversuchen geprüft wurde;
- b) die Extraktionsvorschrift in Abschnitt 6.2 wurde überarbeitet;
- c) die chromatographischen Bedingungen in Abschnitt 7 wurden überarbeitet;
- d) Richtlinien für die Berechnung bei Vorhandensein mehrerer Toxine wurden eingefügt;
- e) das Verfahren wurde in neuen Ringversuchen getestet und die Präzisionsdaten in Annex A wurden überarbeitet.

Lebensmittel — Bestimmung von Toxinen der Saxitoxingruppe in Schalentieren — HPLC-Verfahren mit Vorsäulenderivatisierung und Peroxid- oder Periodatoxidation

Produits alimentaires — Détermination de la teneur en PSP toxine dans les crustacés — Méthode par CLHP utilisant une dérivation pré-colonne avec une oxydation par le peroxyde ou par le periodate

Foodstuffs — Determination of saxitoxin-group toxins in shellfish — HPLC method using pre-column derivatization with peroxide or periodate oxidation

ICS:

Deskriptoren

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

STD Version 2.5a

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	6
3 Kurzbeschreibung	6
4 Chemikalien	9
5 Geräte	12
6 Durchführung	14
7 HPLC-Bestimmung	18
8 Kalibriergerade	20
9 Identifizierung	20
10 Berechnung	20
11 Präzision	33
12 Untersuchungsbericht	34
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	35
Literaturhinweise	67

Vorwort

Dieses Dokument (prEN 14526:2015) 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 14526:2004 ersetzen.

Die prEN 14526:2015 enthält die folgenden signifikant technischen Änderungen im Vergleich zur EN 14526:2004:

- Die Anwendbarkeit wurde verbreitert da das Verfahren an das mehreren Proben in Ringversuchen geprüft wurde;
- die Extraktionsvorschrift in 6.2 wurde überarbeitet;
- die chromatographischen Bedingungen in Abschnitt 7 wurden überarbeitet;
- Richtlinien für die Berechnung beim Vorhandensein mehrerer Toxine wurden eingefügt;
- das Verfahren wurde in einem neuen Ringversuch getestet und die Präzisionsdaten in Annex A wurden überarbeitet.

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.

Einleitung

Dieses Dokument basiert auf dem Verfahren nach Lawrence et al. [1]. Das Homogenat von Schalentieren wird durch Erhitzen mit Essigsäure extrahiert. Der Extrakt wird über eine C₁₈-Festphasen-Kartusche gereinigt. Falls N-hydroxylierte PSP-Toxine (paralytische Schalentiervergiftung, PSP, en: paralytic shellfish poisoning) vorhanden sind, muss eine Festphasenextraktion (SPE, en: solid phase extraction) mit einem Ionenaustauscher durchgeführt werden. Durch Elution mit mobilen Phasen verschiedener Ionenstärke und Polarität werden Schalentier-Toxine in drei verschiedene Fraktionen getrennt. Nach der Periodat- oder Peroxidoxidation werden die Reaktionsprodukte der verschiedenen Toxingruppen mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, en: high performance liquid chromatography) getrennt und mit Fluoreszenzdetektion (FLD, en: fluorescence detection) analysiert. Dieses Verfahren wurde durch einen Ringversuch [1], [2] validiert und als AOAC Official Method 2005.06 [3] veröffentlicht. Das Verfahren wurde, auch in Bezug auf die gesamte Toxizität durch eine Leistungsprüfung [4] und hinsichtlich neu vorliegender PSP-Toxine und eines Hydrolyse-Schrittes für das kommerziell nicht verfügbare GTX6 (B2), durch zwei erweiterte Ringversuche [5], [6] evaluiert.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren für die quantitative Bestimmung von Saxitoxin (STX), Decarbamoyl-Saxitoxin (dcSTX) Neosaxitoxin (NEO), Decarbamoyl-Neosaxitoxin (dcNEO), Gonyautoxin 1 und 4 (GTX1,4; Summe der Isomere), Gonyautoxin 2 und 3 (GTX2,3; Summe der Isomere), Gonyautoxin 5 (GTX5, auch als B1 bezeichnet), Gonyautoxin 6 (GTX6, auch als B2 bezeichnet), Decarbamoyl-Gonyautoxin 2 und 3 (dcGTX2,3; Summe der Isomere), N-Sulfocarbamoyl-Gonyautoxin 1 und 2 (C1,2; Summe der Isomere) und (je nach Verfügbarkeit eines zertifizierten Referenzmaterials (CRMs)) N-Sulfocarbamoyl-Gonyautoxin 3 und 4 (C3,4; Summe der Isomere) in (rohen) Miesmuscheln, Austern, Jakobsmuscheln und Venusmuscheln fest. Laborerfahrungen haben gezeigt, dass das Verfahren auch auf andere Schalentiere [10], [13] und gekochte Schalentiererzeugnisse anwendbar ist. Das beschriebene Verfahren wurde in einem Ringversuch validiert und als „AOAC Official Method“ [3] veröffentlicht. Das Verfahren wurde auch in einer EURL-Leistungsprüfung verifiziert, die auf die Gesamtoxizität der Proben ausgerichtet war. Toxine, die nicht im ersten Ringversuch [1], [2] verfügbar waren, wie z. B. dcGTX2,3 und dcNEO, wurden in zwei weiteren Untersuchungen [5], [6] validiert. Die niedrigsten validierten Werte sind in µg Toxin (freie Base) je kg Schalentierfleisch und auch in µmol/kg Schalentierfleisch angegeben und in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 — Niedrigste validierte Werte

Toxin		µg/kg	µmol/kg
Saxitoxin (STX) [2]		22 ^c	0,07 ^c
Gonyautoxin 2,3 (GTX2,3) [2]		< 125 ^b	< 0,32 ^b
Gonyautoxin 5 (GTX5, B1) [2]		27 ^c	0,07 ^c
dc-Saxitoxin (dcSTX) [2]		8 ^c	0,03 ^c
Neosaxitoxin (NEO) [2]		40 ^c	0,13 ^c
Gonyautoxin 1,4 (GTX1,4) [2]		50 ^c	0,12 ^c
N-Sulfocarbamoyl-Gonyautoxin 1,2 (C1,2) [2]		93 ^c	0,20 ^c
N-Sulfocarbamoyl-Gonyautoxin 3,4 (C3,4) [2]		< 725 ^b	< 1,48 ^b
Gonyautoxin 6 (GTX6, B2)	Direkt [1]	30	0,08
	Indirekt [7]	< 834 ^b	< 2,11 ^b
dc-Gonyautoxin 2,3 (dcGTX2,3) [6]		< 271 ^a	< 0,77 ^a
dc-Neosaxitoxin (dc-NEO) [6]		< 594 ^b	< 2,18 ^b
^a Niedrigster aufgestockter Wert, mittlere Wiederfindung: 58 % [6]. ^b Niedrigste untersuchte Konzentration. ^c Niedrigste untersuchte Konzentration mit einem Horrat-Wert < 2 [1], [2].			

GTX6 (B2) wurde im ersten Ringversuch nicht quantitativ bestimmt, jedoch wiesen mehrere Laboratorien dieses Toxin direkt nach der Reinigung durch Ionenaustausch nach und diese Laboratorien gaben eine Massenkonzentration von 30 µg/kg oder höher in bestimmten Proben an. Aus diesem Grund ist das vorliegende Verfahren, abhängig von der Verfügbarkeit des Standardmaterials, für die direkte Quantifizierung von GTX6 (B2) anwendbar. Derzeit ist es möglich, GTX6 nach einer Hydrolyse als NEO zu bestimmen. Die indirekte Quantifizierung von GTX6 wurde in zwei zusätzlichen Ringversuchen [5], [6] validiert.

C3,4 wurde im ersten Ringversuch quantitativ bestimmt. Das vorliegende Verfahren ist, abhängig von der Verfügbarkeit des Standardmaterials, für die direkte Quantifizierung von C3,4 anwendbar. Wenn C3,4 vorhanden ist, kann das für die GTX6 geltende Hydrolyse-Protokoll für die Fraktion 1 der SPE-COOH-Reinigung angewendet werden, um dieses Toxin als GTX1,4 [8] zu quantifizieren.

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 3696:1995, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696:1987)*

3 Kurzbeschreibung

WARNUNG — PSP-Toxine sind starke Neurotoxine. Handschuhe und Schutzbrille müssen ständig getragen werden und alle Arbeitsschritte der Standard- und Probenherstellung müssen unter dem Abzug durchgeführt werden.

Die PSP-Toxine werden aus dem Homogenat von Schalentierfleisch durch Erhitzen mit Essigsäure extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand durch Festphasenextraktion (SPE) über eine C₁₈-Reinigungskartusche gereinigt. Dieser Extrakt wird mittels HPLC nach der Periodat- oder Peroxidoxidation durch Fluoreszenzdetektion (FLD) analysiert. Die meisten Toxine (STX, C1,2, GTX5 (B1), dcSTX, GTX2,3 und dcGTX2,3) können nach der SPE-C₁₈-Reinigung quantifiziert werden.

Die Oxidation von PSP-Toxinen führt zu verschiedenen Reaktionsprodukten, die durch Umkehrphasen-HPLC getrennt und mit Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden. Tabelle 2 zeigt die entstandenen Reaktionsprodukte für PSP-Toxine nach der Periodat- oder Peroxidoxidation. Zusätzlich sind die entsprechenden Chromatogramme in Bild 1 dargestellt.

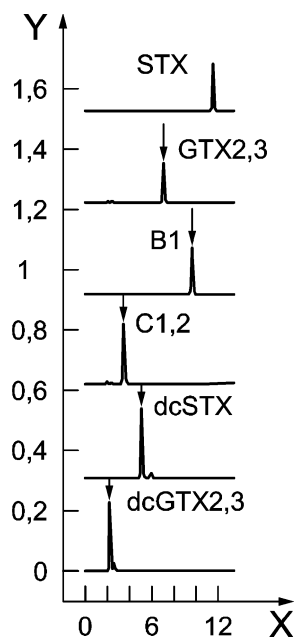
Die Gonyautoxine GTX2 und GTX3 sowie GTX1 und GTX4 und Decarbamoyl-Gonyautoxine dcGTX2 und dcGTX3 und die N-Sulfocarbamoyl-Gonyautoxine C1 und C2 sowie C3 und C4 sind Strukturisomere und führen mit beiden Oxidationsverfahren zu den gleichen Reaktionsprodukten. Der Anteil der Strukturisomere wird als Summe der beiden Toxine bestimmt.

STX, GTX2,3, GTX5 (B1) und C1,2 reagieren mit beiden Oxidationsreaktionen zu einzelnen Oxidationsprodukten. Im Gegensatz dazu ergeben dcSTX und dcGTX2,3 mit beiden Reaktionen zwei Oxidationsprodukte. Das Toxin dcNEO oxidiert nur mit der Periodatoxidation in zwei Oxidationsprodukte. Jedes der Toxine NEO, GTX6 (B2), GTX1,4 und C3,4 ergibt drei Peaks nach der Periodatoxidation, jedoch wird nur der zweite Elutionspeak bei der Quantifizierung angewendet (die Peroxidoxidation kann für die Quantifizierung nicht angewendet werden).

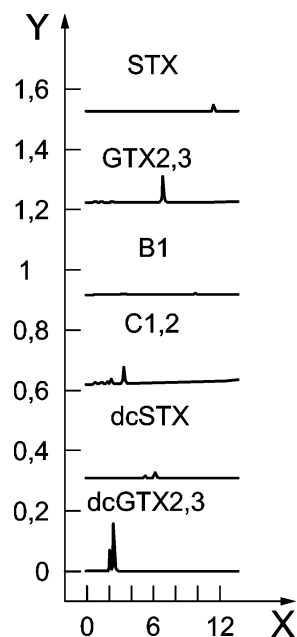
Das gleichzeitige Auftreten von verschiedenen PSP-Toxinen in Schalentieren könnte die Analysenergebnisse beeinflussen, denn einige PSP-Toxine könnten (teilweise) zu den gleichen Reaktionsprodukten führen. Daher müssen die Chromatogramme nach der SPE-C₁₈-Reinigung sorgfältig interpretiert werden.

Tabelle 2 — Reaktionsprodukte nach der Periodat- oder Peroxidoxidation

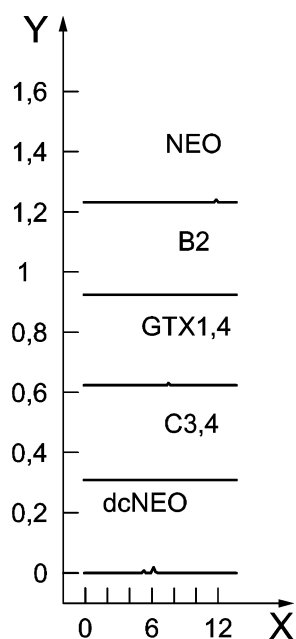
Toxin	Oxidationsprodukte und HPLC-Elutionsreihenfolge		Intensität		Oxidationsprodukt bei der gleichen Retentionszeit wie	
	Peroxid	Periodat	Peroxid	Periodat	Peroxid	Periodat
STX	ein Produkt	ein Produkt	++	+	NEO [3] ^a	NEO [3]; GTX6 (B2) [3]
dc-STX	erstes Signal [1]	erstes Signal [1]	++	-		dcNEO [1]
	zweites Signal [2]	zweites Signal [2]	+	+	NEO [2] ^a	NEO [2]; GTX6 (B2) [2]; dcNEO [2]
NEO	kein Produkt	erstes Signal [1]	—	+		GTX6 (B2) [1]
	zweites Signal [2]	zweites Signal [2]	-	++	dc-STX [2]	GTX6 (B2) [2]; dcSTX [2], dcNEO [2]
	drittes Signal [3]	drittes Signal [3]	-	+	STX	STX; GTX6 (B2)
C1,2	ein Produkt	ein Produkt	++	+		
C3,4	kein Produkt	erstes Signal [1]	—	+		GTX1,4 [1]
	kein Produkt	zweites Signal [2]	—	++		GTX1,4 [2]; dcGTX2,3 [2]
	kein Produkt	drittes Signal [3]	—	+		GTX1,4 [3]; GTX2,3
GTX1,4	kein Produkt	erstes Signal [1]	—	+		C3,4 [1]
	kein Produkt	zweites Signal [2]	—	++		C3,4 [2]; dcGTX2,3 [2]
	drittes Signal [3]	drittes Signal [3]	-	++	GTX2,3	C3,4 [3]; GTX2,3
GTX2,3	ein Produkt	ein Produkt	++	++	GTX1,4 [3] ^a	C3,4 [3]; GTX1,4 [3]
GTX5 (B1)	ein Produkt	ein Produkt	++	-		
GTX6 (B2)	kein Produkt	erstes Signal [1]	—	+		NEO [1]
	kein Produkt	zweites Signal [2]	—	++		NEO [2]; dcSTX [2]; dcNEO [2]
	kein Produkt	drittes Signal [3]	—	-		NEO [3]; STX
dcGTX2,3	erstes Signal [1]	erstes Signal [1]	++	+		
	zweites Signal [2]	zweites Signal [2]	+	++		C3,4 [2]; GTX1,4 [2]
dcNEO	erstes Signal [1]	erstes Signal [1]	—	++		dcSTX [1]
	zweites Signal [2]	zweites Signal [2]	-	+	dcSTX [2]	dcSTX [2]; NEO [2]; GTX6 (B2) [2]
Intensität: — nicht sichtbar - sehr gering + gering ++ hoch						
^a Die hohe Konzentration des angegebenen Toxins kann die Quantifizierung durch Erhöhung des Gehaltes beeinflussen.						



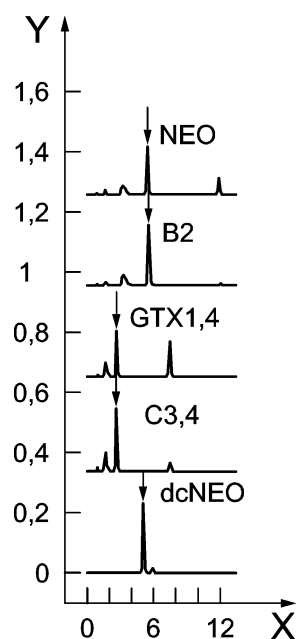
a) nicht-hydroxylierte Toxine: Peroxid



b) nicht-hydroxylierte Toxine: Periodat



c) N-hydroxylierte Toxine: Peroxid



c) N-hydroxylierte Toxine: Periodat

Legende

Y Nachweisresponse (V)
X Zeit (min)

**Bild 1 — Reaktionsprodukte nach der Derivatisierung mit Peroxid und Periodat
(die Peaks für die Quantifizierung sind gekennzeichnet)**

Für die quantitative Bestimmung von N-hydroxylierten Toxinen ist eine Fraktionierung durch SPE-COOH-Reinigung notwendig (in Tabelle 3 dargestellt), da die Oxidationsprodukte bestimmter PSP-Toxine (NEO und GTX6 (B2), GTX1,4 und C3,4) identisch sind. Dieser Arbeitsschritt trennt die PSP-Toxine durch Erhöhung der NaCl-Konzentration der Eluenten in drei eindeutige Gruppen, die als C-Toxine, GTX-Toxine und als Saxitoxin-Gruppe bezeichnet werden. Die C-Toxine eluieren verzögert mit Wasser, die GTX-Toxine (sowohl GTX1 bis GTX6 als auch dcGTX2 und dcGTX3) eluieren mit 0,05 mol/l NaCl-Lösung, während die Saxitoxin-Gruppe (STX, NEO, dc-NEO und dc-STX) für die Elution 0,3 mol/l NaCl-Lösung erfordert. Diese Fraktionen können mittels HPLC nach der Periodat- oder Peroxidoxidation analysiert werden.

Tabelle 3 — Toxin-Elutionsreihenfolge nach der SPE-COOH-Reinigung

Fraktion	Eluent	Eluiertes Toxin
1	Wasser	C1,2; C3,4
2	0,05 mol/l NaCl	dcGTX2,3; GTX2,3; GTX1,4; GTX5; GTX6 (B2)
3	0,3 mol/l NaCl	dcSTX; STX; NEO; dcNEO

4 Chemikalien

4.1 Allgemeines

Soweit nicht anders festgelegt, müssen analysenreine Chemikalien und für die HPLC-FLD geeignete Löse-mittel verwendet werden. Das verwendete Wasser muss in Glasgefäßen destilliert oder entmineralisiert werden oder von entsprechender Reinheit nach EN ISO 3696:1995 sein. Soweit nicht anders angegeben, müssen alle Chemikalien analysenrein (p. a.) sein. Referenzmaterialien (Standards der Toxine) 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 Ammoniumformiat

4.4.1 Ammoniumformiat, kristallines Pulver.

4.4.2 Ammoniumformiatlösung, Stoffmengenkonzentration $c = 0,3$ mol/l.

1,892 g Ammoniumformiat (4.4) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.5 Eisessig

4.5.1 Essigsäurelösung 1, Massenanteil $w = 1$ %.

1 ml Eisessig (4.5) wird mit Wasser auf 100 ml verdünnt.

4.5.2 Essigsäurelösung 2, $c = 0,1$ mol/l.

572 µl Eisessig (4.5) werden mit Wasser auf 100 ml verdünnt.

4.5.3 Essigsäurelösung 3, $c = 0,1$ mmol/l.

100 µl Essigsäurelösung 2 (4.5.2) werden mit Wasser auf 100 ml verdünnt.

4.6 Ammoniumacetat

4.6.1 Ammoniumacetatlösung 1, $c = 0,1$ mol/l.

0,77 g Ammoniumacetat (4.6) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.6.2 Ammoniumacetatlösung 2, $c = 0,01$ mol/l.

10 ml Ammoniumacetatlösung 1 (4.6.1) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.7 Natriumchlorid

4.7.1 Natriumchloridlösung 1, $c = 0,05$ mol/l.

0,29 g Natriumchlorid (4.7) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.7.2 Natriumchloridlösung 2, $c = 0,3$ mol/l.

1,75 g Natriumchlorid (4.7) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.8 Salzsäure, $c = 1$ mol/l.

4.9 Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung, $c = 0,3$ mol/l

4,26 g Dinatriumhydrogenphosphat werden in 100 ml Wasser oder 8,04 g Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.10 Natriumhydroxid

4.10.1 Natriumhydroxidlösung 1, $c = 1$ mol/l.

4 g Natriumhydroxid (4.10) werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.10.2 Natriumhydroxidlösung 2, $c = 0,2$ mol/l.

10 ml Natriumhydroxidlösung 1 (4.10.1) werden mit 50 ml Wasser gelöst.

4.11 Wasserstoffperoxidlösung, $w = 10$ %.

3 ml kommerziell erhältliche Wasserstoffperoxidlösung, Massenkonzentration $w = 30$ %, werden mit 6 ml Wasser verdünnt. Die Lösung wird täglich frisch hergestellt. Die Lösung wird im Dunkeln bei etwa $+4$ °C aufbewahrt.

4.12 Periodsäure

4.12.1 Periodsäurelösung 1, $c = 0,1$ mol/l.

0,227 9 g Periodsäure (4.12) werden in 10 ml Wasser gelöst.

4.12.2 Periodsäurelösung 2, $c = 0,034$ mol/l.

3,4 ml Periodsäurelösung 1 (4.12.1) werden mit 6,6 ml Wasser verdünnt. Die Lösung wird in einem Kühlschrank im Dunkeln bei etwa $+4$ °C aufbewahrt. Die Lösung wird täglich frisch hergestellt.

4.13 Periodat-Oxidationsreagenz

Ein Volumenteil Periodsäurelösung 2 (4.12.2) wird mit einem Volumenteil Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (4.9.1) und einem Volumenteil Ammoniumformiatlösung (4.4.2) gemischt. Durch tropfenweise Zugabe von Natriumhydroxidlösung 2 (4.10.2) wird der pH-Wert auf 8,2 eingestellt und der pH-Wert wird mit einem pH-Messgerät überprüft. Die Lösung wird an jedem Analysentag frisch hergestellt.

4.14 PSP-Toxin-Standardsubstanzen

4.14.1 PSP-Toxin-Stammlösung

Einfachheitshalber können die Standards durch geeignete Verdünnung der Standardlösungen mit Wasser in drei Gemische zusammengefasst werden. Die Lösungen sollten mit 0,1 mol/l Essigsäurelösung 2 (4.5.2) auf einen pH-Wert von etwa 4 eingestellt werden. Bei der Analyse von C1,2 sollten die Lösungen auf einen pH-Wert = 5 eingestellt werden, da ansonsten Degradation beobachtet wurde. Tabelle 4 zeigt zweckmäßige Konzentrationen für jedes PSP-Toxin in drei Standard-Stammlösungsgemischen. Die Lösung wird im Dunkeln bei etwa +4 °C aufbewahrt und die Massenkonzentration wird regelmäßig nach 2 Wochen überprüft oder die Lösung wird im Dunkeln bei etwa –18 °C oder darunter aufbewahrt und die Massenkonzentration wird regelmäßig nach 6 Monaten überprüft.

Tabelle 4 — Beispiele von zweckmäßigen Konzentrationen für jedes PSP-Toxin in drei Stammlösungsgemischen

Stammlösungsgemische		Toxin-Konzentration	
		µg/ml ^a	nmol/ml
Gemisch 1	GTX1,4	0,192	0,467
	NEO	0,189	0,600
Gemisch 2	GTX2,3	0,265	0,670
	GTX5 (B1)	0,202	0,532
	STX	0,201	0,672
	dc-STX	0,054	0,211
	dcGTX2,3	0,080	0,227
Gemisch 3	C1,2	0,203	0,427
	C3,4	0,188	0,383
	dcNEO	0,137	0,503
^a Bezogen auf die freie Base der Toxine.			

ANMERKUNG Ampullen, die jeweils separat STX-, NEO-, GTX1,4-, GTX2,3-, C1,2-, GTX5-, dcGTX2,3-, dcNEO-, dcSTX-Standards in Salzsäure oder in wässriger Essigsäure mit einem Konzentrationsbereich von 100 µg/ml bis 2 000 µg/ml enthalten, sind beispielsweise vom National Research Council Canada, Halifax, Canada¹⁾ (NRC) erhältlich.

Einige der zertifizierten Standards können mit anderen PSP-Toxinen kontaminiert sein; deshalb müssen die Verunreinigungen für die Kalibrierzwecke (durch Quantifizierung der Verunreinigungen, Erstellen verschiedener Kalibrierkurven oder durch deren Einbeziehung in die Messunsicherheiten) berücksichtigt werden.

4.14.2 PSP-Toxin-Kalibrierlösungen

Für die Bestimmung der PSP-Toxine wird eine Kalibrierlösung mit mindestens fünf Punkten hergestellt, beispielsweise eine unverdünnte PSP-Toxin-Stammlösung, eine 2,5fache, 5fache, 7,5fache und 10fache Verdünnung der PSP-Toxin-Stammlösung (4.14.1) mit 0,1 mmol/l Essigsäuresäurelösung 3 (4.5.3). PSP-Toxin-Kalibrierlösungen dürfen auch durch Verdünnen der Stammlösungsgemische mit Wasser (solange wie der pH-Wert im sauren Bereich ist) hergestellt werden. Die Lösungen werden im Dunkeln bei –18 °C aufbewahrt und die Massenkonzentration wird regelmäßig nach 6 Monaten überprüft.

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.

ANMERKUNG 1 Es ist wichtig, dass die verdünnten Standardlösungen in Kunststofffläschchen oder in Glasbehältern aufbewahrt werden, die z. B. durch Eintauchen der Fläschchen in Natriumhydroxid über Nacht, Spülen mit Wasser und danach mit Methanol und anschließendem Trocknen deaktiviert wurden.

ANMERKUNG 2 Für den Ringversuch in A.1 [1], [2], wurden drei Kalibrierpunkte angewendet. Um die Robustheit des Verfahrens jedoch zu erhöhen, wird die Anwendung von mindesten fünf Kalibrierpunkten empfohlen.

ANMERKUNG 3 Ein weiteres Verfahren zu Herstellung der Kalibrierlösung ist die Implementierung dieser in den Oxidationsschritt (6.5.2 und 6.5.3). Verschiedene Aliquote aus der PSP-Toxin-Stammlösung werden verwendet und mit 0,1 mmol/l Essigsäure (4.5.3) auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt.

4.14.3 PSP-Lösung zur Prüfung der Wiederfindung

Zur Prüfung der Wiederfindung der Kartusche zur Festphasenextraktion (SPE-Kartusche) werden Lösungen von Toxinen der geeigneten Massenkonzentration (z. B. in 0,6%iger Essigsäure) hergestellt.

4.15 Matrixmodifikator für die Periodatoxidation

Blindwertproben-Extrakt (PSP-frei) von Austern, wie in 6.1 und 6.2 beschrieben. Bei Lagerung im gefrorenen Zustand bei –20 °C ist dieser PSP-freie Ausgangsausternextrakt stabil und kann innerhalb der nächsten zwei Monate verwendet werden. Für die Verwendung als Matrixmodifikator wird der Extrakt nach 6.3.1 gereinigt und der pH-Wert mit Natriumhydroxidlösung 1 (4.10.1) auf pH = 6,5 eingestellt. Die Lösung kann zum Ausfällen von mitextrahiertem Material in einem Kühlschrank zwei bis drei Tage aufbewahrt werden. Der Überstand wird dekantiert oder durch ein 0,45-µm-Filter (5.20) filtriert und der erhaltene Matrixmodifikator in einem Kühlschrank aufbewahrt. Um vor der Verwendung die Abwesenheit von Toxinen sicherzustellen, wird der Matrixmodifikator für PSP-Toxine durch Periodat- oder Peroxidoxidation untersucht. Er muss alle zwei Wochen hergestellt werden.

4.16 Mobile Phase für die HPLC

4.16.1 Eluent A: Ammoniumformiat, 0,1 mol/l

6,31 g Ammoniumformiat (4.4.1) werden in 1 l Wasser gelöst und durch Zugabe von 6 ml Essigsäurelösung 2 (4.5.2) wird der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Die Lösung wird mit Unterdruck durch ein Membranfilter (5.20) filtriert.

4.16.2 Eluent B: Ammoniumformiat, 0,1 mol/l in 5%igem Acetonitril.

6,31 g Ammoniumformiat (4.4.1) werden in 950 ml Wasser gelöst und mit 50 ml Acetonitril (4.3) versetzt. Durch Zugabe von 6 ml Essigsäurelösung 2 (4.5.2) wird der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Die Lösung wird im Unterdruck durch ein Membranfilter (5.20) filtriert.

5 Geräte

5.1 Allgemeines

Übliche Laborglasgeräte und -ausrüstung und insbesondere Folgendes:

5.2 Zerkleinerungsgerät (Mühle)

5.3 Analysenwaage, auf 0,1 mg genau.

5.4 Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff (Polypropylen), 50 ml, mit Verschlusskappen.

5.5 Zentrifuge, geeignet für 35 000 g am äußeren Ende der Zentrifugenröhrchen.

5.6 Pipetten, Autopipetten mit Einwegspitzen aus Kunststoff.

5.7 Vortex-Mischer

5.8 Wasserbad oder Heizplatte

5.9 Konische Zentrifugenröhrchen (Messröhrchen) mit Graduierung, (2 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml).

5.10 C₁₈-SPE-Kartuschen, z. B. 500 mg je 3 ml Volumen.

Um sicherzustellen, dass die mit der C₁₈-Kartusche erhaltene Mindestwiederfindung 80 % beträgt, muss jede neue Charge der SPE-C₁₈-Kartuschen (z. B. Supelcoclean LC18) mit den Standardlösungen (4.14.3) geprüft werden. Diese Prüfung ist infolge der während der Verfahrensentwicklung gesammelten Erfahrungen notwendig, weil beobachtet wurde, dass Variationen auftreten können. Diese Prüfung ist für GTX6 und C3,4 nicht möglich, da Standards kommerziell nicht verfügbar sind.

Wenn das Laboratorium im Laufe der Zeit gezeigt hat, dass die Leistung der SPE-Kartuschen innerhalb einer Charge stabil ist, darf der folgende Ansatz angewendet werden: jede neue Charge der SPE-C₁₈-Kartuschen muss mit Probenlösungen mit genau bekannten Konzentrationen geprüft werden, um sicherzustellen, dass die Mindestwiederfindung der gesamten Verfahrensweise dem Mindestniveau der Validierungsdaten entspricht.

5.11 Kartuschen für den SPE-COOH-Ionenaustausch, z. B. 500 mg je 3 ml Volumen.

Um sicherzustellen, dass die mit der COOH-Kartusche erhaltene Mindestwiederfindung 80 % beträgt und die korrekten Elutionsmuster nach 6.3.2 ermittelt werden, muss jede neue Charge von SPE-COOH-Kartuschen (z. B. Bakerbond Carboxylic Acidsilane oder, optional, Strata-X-CW von Phenomenex) geprüft werden. Diese Prüfung ist infolge der während der Verfahrensentwicklung gesammelten Erfahrungen notwendig, weil beobachtet wurde, dass Variationen auftreten können. Diese Prüfung ist für GTX6 und C3,4 nicht möglich, da Standards kommerziell nicht verfügbar sind.

Wenn das Laboratorium im Laufe der Zeit gezeigt hat, dass die Leistung der COOH-Kartuschen innerhalb einer Charge stabil ist, darf der folgende Ansatz angewendet werden: jede neue Charge der COOH-Kartuschen muss mit Probenlösungen mit genau bekannten Konzentrationen geprüft werden, um sicherzustellen, dass die Mindestwiederfindung der gesamten Verfahrensweise dem Mindestniveau der Validierungsdaten entspricht.

5.12 Mehrfach- oder Automatik-SPE-Station (für die SPE-Reinigungen)

5.13 Heizblock (oder ähnliches Gerät) für den Hydrolyse-Schritt

5.14 Reaktionsgefäße, z. B. Glasröhrchen mit Schraubverschluss oder Fläschchen mit 1,5 ml.

5.15 pH-Indikatorpapier, präzise für die Identifizierung eines pH-Wert-Bereichs von $6,5 \pm 0,3$.

5.16 pH-Messgerät

5.17 Rotationsverdampfer, optional für Proben mit geringen Konzentrationen.

5.18 HPLC-Probenfläschchen, z. B. Braunglas.

5.19 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-(HPLC-)System, geeignet zur Bereitstellung eines binären Gradienten.

5.19.1 Injektor, vorzugsweise ein gekühlter Injektor, geeignet für Injektionen bis zu 100 µl.

5.19.2 Fluoreszenzdetektor, Anregungswellenlänge von $\lambda = 340$ nm und Emissionswellenlänge von $\lambda = 395$ nm und geeignet für den Nachweis eines mit Peroxid behandelten (6.5.3) 400 pg STX-Standards mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 1:10.

5.19.3 Analytische Trennsäule, z. B. RP C18, Partikelgröße 5 µm, 150 mm (Länge) × 4,6 mm (Durchmesser).

Die Messung darf mit unterschiedlichen Trennsäulen (Maße, Herstellung) durchgeführt werden. Jedoch müssen die PSP-Oxidationsprodukte chromatographisch getrennt sein.

5.20 Membranfilter, für wässrige Lösungen, mit einer Porengröße von 0,45 µm, z. B. regenerierte Zellulose.

6 Durchführung

6.1 Probenvorbereitung

Die Außenseite des Schalentiers wird gründlich mit Frischwasser gereinigt. Das Öffnen erfolgt durch das Durchtrennen des Adduktormuskels (Schließmuskel). Die Schalen werden einmal mit Leitungswasser abgespült, um Sand und Fremdstoffe zu entfernen. Durch Abtrennen des mit dem Scharnierbereich verbundenen Adduktormuskels und des Gewebes wird das Schalentierfleisch von den Schalen abgetrennt. Nach dem Abtrennen vom Schalentier werden die Gewebe für 5 min in ein Sieb zum Ablaufen des überschüssigen Wassers gegeben. Das Schalentierfleisch wird in einem Zerkleinerungsgerät (5.2) homogenisiert. Für die repräsentative Probenahme sollten mindestens 100 g bis 150 g des zusammengefassten (gepoolten) Gewebes verwendet werden. Wenn die Analyse nicht unmittelbar fortgesetzt wird, werden die homogenisierten Schalentiere eingefroren.

6.2 Extraktionsverfahren

Die homogenisierte Probe wird im Kühlschrank oder bei Raumtemperatur aufgetaut oder direkt nach dem Zerkleinern (6.1) verwendet.

Die Probe nicht erhitzen.

Alle nicht verwendeten Extrakte und Lösungen werden gekühlt.

Eine Analysenmenge (Einwaage) von $(5 \pm 0,1)$ g Schalentierhomogenat wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 3 ml 1%iger Essigsäurelösung 1 (4.5.1) mit einem Vortex-Mischer durchmischt. Das Röhrchen wird lose verschlossen, um einen Druckaufbau während des Erhitzens zu vermeiden, und so in ein siedendes Wasserbad (100 °C) gestellt, dass sich der Inhalt des Glases unterhalb der Wasserlinie befindet. Die Proben werden für 5 min erhitzt.

Es ist sicherzustellen, dass das Wasserbad den Siedepunkt erreicht hat, bevor die Proben in dieses gestellt werden und die Erwärmungszeit beginnt zu zählen. Um zu vermeiden, dass das Wasserbad das Sieden für mehr als 30 s unterbricht, dürfen in das Wasserbad nicht zu viele Proben auf einmal gestellt werden.

Die Proben werden aus dem Wasserbad entnommen, erneut mit dem Vortex-Mischer durchmischt und durch das Stellen in einen Kühlschrank oder in einen Becher mit kaltem Wasser für 5 min abkühlen zu lassen und sie werden dann 10 min bei $3\,600 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird in ein konisches 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit Graduierung (5.9) dekantiert.

3 ml 1%iger Essigsäurelösung 1 (4.5.1) werden in das Zentrifugenröhrchen gegeben, das die einmal eluierte Probe (fester Rückstand) enthält, sorgfältig mit dem Vortex-Mischer durchmischt und nochmals 10 min bei $3\,600 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und in demselben konischen 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit Graduierung (5.9) gesammelt, das die erste Extraktmenge enthält, und dann mit Wasser genau auf 10 ml eingestellt.

Das Verfahren kann an diesem Punkt beendet werden und der Extrakt wird dann in einem Kühlschrank aufbewahrt.

6.3 Probenreinigung

6.3.1 SPE-C₁₈-Reinigung

Die Kartusche wird nach den Anweisungen des Herstellers konditioniert, z. B. wird eine 3 ml SPE-C₁₈-Kartusche mit 6 ml Methanol gefolgt von 6 ml Wasser konditioniert. In die Kartusche wird 1 ml (0,5 g Schalentier-Äquivalent) des Rohextraktes (6.2) gegeben. Der Durchfluss wird für alle Elutionen bei 2 ml/min bis 3 ml/min belassen. Die abfließende Flüssigkeit wird in einem konischen 5-ml-Zentrifugenröhrchen mit Graduierung (5.9) gesammelt. Die Kartusche wird mit 2 ml Wasser gewaschen und die Waschflüssigkeit mit der abfließenden Flüssigkeit kombiniert.

Das Leerlaufen der Kartuschen ist während des gesamten Verfahrens zu vermeiden.

Der Extrakt wird mit 1 mol/l NaOH-Lösung (4.10.1) mithilfe des pH-Indikatorpapiers oder des pH-Messgerätes auf einen pH-Wert von 6,5 und anschließend das Volumen mit Wasser auf genau 4 ml eingestellt.

Für Screeningzwecke kann die Probenreinigung an diesem Punkt beendet werden. Die Extrakte sind in einem Gefrierschrank für mehr als ein Jahr stabil.

Aliquote dieses Extraktes dürfen für die in 6.5.2 und 6.5.3 beschriebene Periodat- und Peroxidoxidation verwendet werden.

Zusätzlich wird ein Aliquot dieses Extraktes als Kontrollprobe für die Peroxidoxidation ohne Oxidation analysiert, um zu verifizieren, dass die PSP-Toxinpeaks im Chromatogramm der oxidierten Probe durch die PSP-Toxine verursacht werden und nicht durch natürlich fluoreszierende Verbindungen. Außerdem muss ein Aliquot des Probenextraktes als Kontrollprobe für die Periodatoxidation mit dem Matrixmodifikator und Wasser (anstelle von Periodat-Oxidationsmittel) gemischt und analysiert werden. Das sich ergebende Chromatogramm wird die Identifizierung der aus den natürlich fluoreszierenden Proben-Coextrakten entstandenen Peaks ermöglichen. Unter diesen Bedingungen erzeugen PSP-Toxine keine Peaks.

Sofern N-hydroxylierte PSP-Toxine in diesen Extrakten nachgewiesen werden, wird mit der nachstehend beschriebenen Reinigung durch SPE-COOH-Ionenaustausch fortgesetzt.

ANMERKUNG Bei der Untersuchung von mit NEO und GTX1,4 kontaminierten ganzen Großen Pilgermuscheln (*Pecten maximus*) und ganzen Kleinen Pilgermuscheln (*Aequipecten opercularis*) erhöht die Verwendung von 1,5 ml Rohextrakt für die C₁₈-SPE-Reinigung die Wiederfindung von GTX1,4 und NEO [4].

6.3.2 SPE-COOH-Reinigung (Fraktionierung)

Es werden nach der SPE-C₁₈-Reinigung nur Extrakte fraktioniert, die N-hydroxylierte PSP-Toxine (z. B. NEO, dcNEO, C3,4; GTX6 (B2) und GTX1,4) enthalten.

Die Kartusche wird nach den Anweisungen des Herstellers konditioniert, z. B. wird eine 3 ml SPE-COOH-Kartusche durch Durchlaufen von 10 ml 0,01 mol/l Ammoniumacetatlösung 2 (4.6.2) durch diese konditioniert. Die Durchflussrate wird für alle Elutionen bei 2 ml/min bis 3 ml/min belassen. Die abfließende Flüssigkeit wird verworfen.

Fraktion 1: 2 ml Aliquot (0,25 g Schalentiergewebe-Äquivalent) des Schalentierextraktes aus der SPE-C₁₈-Reinigung (6.3.1) werden durch die Kartusche laufen gelassen und die abfließende Flüssigkeit in einem als Fraktion 1 gekennzeichneten, konischen 5-ml-Zentrifugenröhrchen mit Graduierung (5.9) gesammelt. Anschließend werden 4 ml Wasser durch die Kartusche laufen gelassen und in demselben Röhrchen gesammelt. Das Endvolumen wird auf insgesamt 6 ml eingestellt. Diese Fraktion enthält die C-Toxine. Mit 6.5.2 und/oder 6.5.3 wird hinsichtlich der Oxidationsschritte fortgesetzt.

Fraktion 2: 4 ml 0,05 mol/l NaCl-Lösung 1 (4.7.1) werden durch die gleiche Kartusche laufen gelassen und das Eluat (gekennzeichnet als Fraktion 2) wird in einem konischen 5-ml-Zentrifugenröhrchen mit Graduierung (5.9) gesammelt. Das Endvolumen wird auf 4 ml eingestellt. Diese Fraktion enthält die Toxine GTX1,4; GTX2,3; GTX5 (B1); GTX6 (B2) und dcGTX2,3. Mit 6.5.2 und/oder 6.5.3 wird hinsichtlich der Oxidationsschritte fortgesetzt. Falls GTX6 (B2) vorhanden ist, wird mit 6.4 fortgesetzt.

Fraktion 3: 5 ml 0,3 mol/l NaCl-Lösung 2 (4.7.2) werden durch die gleiche Kartusche laufen gelassen und in einem als Fraktion 3 gekennzeichneten, konischen 5-ml-Zentrifugenröhrchen mit Graduierung (5.9) gesammelt. Das Endvolumen wird auf 5 ml eingestellt. Diese Fraktion enthält STX, NEO, dcNEO und dcSTX. Mit 6.5.2 und/oder 6.5.3 wird hinsichtlich der Oxidationsschritte fortgesetzt.

Das Leerlaufen der Kartuschen ist während des gesamten Verfahrens zu vermeiden.

Falls Probleme mit der Detektorempfindlichkeit auftreten, kann jede Fraktion aufkonzentriert werden. Ein empfohlener Aufkonzentrationsschritt ist: Jede Fraktion wird aus der Ionenaustausch-Kartusche in 50-ml-Rundkolben anstelle konischer Zentrifugenröhrchen mit Graduierung (5.9) gesammelt und auf etwa 1 ml verdampft, d. h. ein Rotationsverdampfer oder andere gleichwertige Verdampfer mit einem auf 45 °C eingestellten Wasserbad. Die Lösung wird mit einer Pasteurpipette in ein konisches 5-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Der 50-ml-Rundkolben wird dreimal mit je etwa 0,2 ml bis 0,3 ml Wasser ausgespült, dabei wird die Spülflüssigkeit in das konische Zentrifugenröhrchen mit Graduierung überführt, sodass das Endvolumen des Extraktes genau 2 ml beträgt. Die Fraktionen 1, 2 und 3 werden durch HPLC nach den Periodat- und Peroxidoxidationen entsprechend 6.5.2 und/oder 6.5.3 analysiert.

ANMERKUNG Um die Empfindlichkeit des Verfahrens zu verbessern, wurde während einer laborinternen Validierung [10], [11], ein alternatives Reinigungsverfahren durch Ionenaustausch-SPE entwickelt (Verfahrensweise siehe 6.3.3).

Die Probenreinigung kann an diesem Punkt beendet werden. Unmittelbar anschließend wird mit der Oxidation und der HPLC-FLD-Analyse fortgesetzt oder der Extrakt wird in einem Kühlschrank für nicht mehr als eine Woche oder in einem Gefrierschrank für nicht mehr als ein Jahr aufbewahrt.

6.3.3 Alternative Reinigung durch SPE mit schwachem Kationenaustausch [10], [11]

Zur Verbesserung der Empfindlichkeit und zur Reduzierung der Übertragung in die angrenzenden Fraktionen mit geringen PSP-Toxingehalten kann die folgende modifizierte Reinigung nach der SPE-C₁₈-Reinigung angewendet werden, jedoch wurde diese Verfahrensweise nur laborintern validiert.

Das Fraktionierungsverfahren entspricht dem in 6.3.2 beschriebenen. Im Gegensatz zu der AOAC Official Method 2005.06 [3] differieren nur die Konzentration der Natriumchloridlösung und das Volumen für die Elution (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5 — Vergleich der Fraktionierungsbedingungen [10], [11]

Fraktion	Toxine	COOH-SPE (z. B. Bakerbond Carboxylic Acidsilane)		Schwacher Kationenaustauscher (z. B. Strata-X-CW, Phenomenex)	
		Elutionslösemittel	Fraktionsvolumen	Elutionslösemittel	Fraktionsvolumen
F1	C1,2; C3,4	Wasser	6,0 ml	Wasser	5,0 ml
F2	GTX1,4; GTX2,3; dcGTX2,3; GTX5	0,05 mol/l NaCl	4,0 ml	0,3 mol/l NaCl	3,0 ml
F3	STX; NEO; dcNEO; dcSTX	0,3 mol/l NaCl	5,0 ml	2,0 mol/l NaCl	3,0 ml

6.4 Umwandlung von GTX6 (B2) in NEO und/oder C3,4 in GTX1,4

6.4.1 Allgemeines

Derzeit ist kein GTX6 (B2)-Standard verfügbar. Dennoch muss zur Analyse von GTX6 (B2) das Toxin zu NEO hydrolysiert werden, das quantifiziert werden kann [5], [6]. Diese Reaktion kann am geeignetsten in der Fraktion 2 ausgeführt werden, in der NEO nicht vorkommt.

Derzeit ist kein C3,4-Standard kommerziell verfügbar. Das Toxin, das in Fraktion 1 der SPE-COOH-Reinigung vorhanden ist, kann indirekt durch die Hydrolyse zu GTX1,4 bestimmt werden [8].

6.4.2 Hydrolyse der SPE-COOH-Fraktion 1 oder 2

In ein HPLC-Probenfläschchen oder in ein Glasröhrchen mit Schraubverschluss werden zu 300 µl Fraktion 2 des SPE-COOH-Extraktes (6.3.2) 75 µl 1 mol/l HCl gegeben. Das Fläschchen/Röhrchen wird fest verschlossen und gewogen. Das Gemisch wird 20 min bei 90 °C in einem Wasserbad oder Blockheizer erhitzt. Der Extrakt wird auf Raumtemperatur abgekühlt und das Fläschchen erneut gewogen, um den Extrakt auf eine mögliche Verdunstung zu überprüfen (falls eine Verdunstung erfolgte, wird Wasser bis zur ursprünglichen Masse hinzugefügt). Kleine Volumina der 1 mol/l NaOH-Lösung 1 (4.10.1) werden hinzugegeben und jedes Mal durchmischt, bis die zur Neutralisierung der Säure erforderlichen 75 µl 1 mol/l NaOH-Lösung 1 vollständig sind (d. h. 15 µl der Natriumhydroxidlösung 1 (4.10.1) werden schrittweise bis zu insgesamt 75 µl hinzugefügt und die Lösung nach jedem Schritt durchmischt, um die oberflächliche Alkalisierung des hydrolysierten Extraktes zu verhindern). Der pH-Wert des Endextraktes wird überprüft.

Die Verfahrensweise kann auch für die Fraktion 1 der SPE-COOH-Reinigung angewendet werden.

ANMERKUNG 1 Abhängig vom kleinsten gemessenen Volumen des angewendeten pH-Messgerätes ist es möglich, die Volumina sämtlicher Reagenzien im gleichen Verhältnis zu vergrößern (d. h. 900 µl Fraktion 2 des SPE-COOH-Extraktes (filtriert) + 225 µl 1 mol/l HCl und nach der Reaktion 225 µl 1 mol/l NaOH-Lösung 1).

Die Probe wird mit HPLC nach der Periodatoxidation, wie in 6.5.2 beschrieben, analysiert.

Es ist notwendig, den pH-Wert des Extraktes vor und nach der Hydrolyse zu überprüfen. Während der Periodatoxidation (Kombination von hydrolysiertem Extrakt, Matrixmodifikator und Periodat-Derivatisierungsreagenz) sollte sich der Extrakt auf einen pH-Wert von 8,2 verändern. Ist das der Fall, braucht der pH-Wert des Extraktes dann nicht eingestellt werden. Wenn jedoch der oxidierte Extrakt den pH-Wert von 8,2 nicht erreicht, dann erfordert der hydrolysierte Extrakt eine Einstellung durch Zugabe von etwas mehr NaOH-Lösung und die zusätzliche Menge wird für die Berechnungen [12] aufgezeichnet.

6.5 Oxidationsverfahren

6.5.1 Allgemeines

Während der Oxidationsreaktionen ist es wichtig, dass die Reaktionszeit für alle Proben- und Standard-Gemische gleich bleibt, da Abweichungen die Effizienz der Oxidation beeinflussen und den Ertrag von Oxidationsprodukten verändern werden, das beeinträchtigt die Wiederholpräzision der Ergebnisse.

ANMERKUNG Bei der Untersuchung von mit NEO und GTX1,4 kontaminierten ganzen Großen Pilgermuscheln (*Pecten maximus*) und ganzen Kleinen Pilgermuscheln (*Aequipecten opercularis*) kann dieser Ansatz die Empfindlichkeit vermindern. Zur Verbesserung der Empfindlichkeit kann die folgende Modifikation in dem Periodatoxidationsschritt angewendet werden [9], [13].

6.5.2 Periodatoxidation

ANMERKUNG 1 Alle in den Oxidationsreaktionen verwendeten Reagenzien und Lösungen werden mit Autopipetten mit Einwegspitzen aus Kunststoff abgegeben.

ANMERKUNG 2 Es ist sehr wichtig, den pH-Wert vor der Periodatoxidation auf 6,5 einzustellen [12].

100 µl Standardlösung oder Probenextrakt nach der SPE-C₁₈-Reinigung (6.3.1) oder SPE-COOH-Reinigung (6.3.2) werden zu 100 µl Matrixmodifikator-Lösung in ein 1,5-ml-Fläschchen gegeben. Anschließend werden 500 µl Periodat-Oxidationsreagenz (4.13) hinzugegeben und sorgfältig mit einem Mischer durchmischt. Der Lösung wird bei Raumtemperatur ermöglicht, für 1 min zu reagieren und anschließend werden 5 µl Eisessig (4.5) hinzugegeben und die Lösung wird durchmischt. Das Gemisch wird mindestens 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor 50 µl bis 100 µl in das HPLC-System injiziert werden.

Die Lösung ist für nicht-hydroxylierte Toxine für mindestens einen Tag stabil. Jedoch findet bei NEO, GTX6 (B2) und GTX1,4 eine geringe Degradation der Oxidationsprodukte statt. Die Quantifizierung darf noch nach dieser durchgeführt werden, wenn Standards und Prüflösungen unter den gleichen Bedingungen gelagert und analysiert werden, siehe [2].

Folgendes ist zu beachten: Bei der Untersuchung von mit NEO und GTX1,4 kontaminierten ganzen Großen Pilgermuscheln (*Pecten maximus*) und ganzen Kleinen Pilgermuscheln (*Aequipecten opercularis*) wurde festgestellt, dass die Verwendung eines Matrixmodifikators der Großen Pilgermuschel anstelle des Austern-Modifikators für die Oxidation der Kalibrierstandards zu guten Wiederfindungen führt. Ein modifiziertes Periodatreagens, das das 5-Fache der normalen relativen Mengen der Periodsäure enthält, zeigte eine gute Empfindlichkeit. Das für die Oxidation aller Standards und Proben verwendete Periodat wurde mit 0,03 mol/l Periodsäurelösung 2 (4.12.2), 0,3 mol/l Ammoniumformiatlösung (4.4.2) und 0,3 mol/l Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (4.9.1) im Verhältnis von 5:1:1 hergestellt, der pH-Wert vor der Verwendung auf 8,2 eingestellt. Auch die Empfindlichkeit wurde mit der Verwendung von großen Injektionsvolumina (100 µl) erhöht [9], [13].

6.5.3 Peroxidoxidation

25 µl 10%iger (w/v) wässriger H₂O₂-Lösung (4.11) werden zu 250 µl 1 mol/l NaOH-Lösung 1 (4.10.1) in ein 1,5-ml-Fläschchen gegeben und die Lösung durchmischt. Dann werden 100 µl Standardlösung oder Probenextrakt nach der SPE-C₁₈-Reinigung (6.3.1) oder SPE-COOH-Reinigung (6.3.2) hinzugegeben. Die Lösung wird durchmischt und eine zweiminütige Reaktionszeit bei Raumtemperatur ermöglicht. 20 µl Eisessig (4.15) werden hinzugegeben und die Lösung durchmischt. 25 µl bis 50 µl dieser Lösung werden in das HPLC-System injiziert. Die Lösung ist bei Raumtemperatur für mindestens 8 h stabil [2].

ANMERKUNG Die Injektion von mehr als 50 µl kann zur Peakverbreiterung führen.

7 HPLC-Bestimmung

Die Stabilität des angewendeten Systems (% der Abweichung der Peakflächen und % der Abweichung der Retentionszeit) wird im Vergleich zu den jeweiligen HPLC-Spezifikationen geprüft. Die PSP-Oxidationsprodukte müssen chromatographisch getrennt werden, um die individuelle Identifizierung und Quantifizierung der Toxine zu ermöglichen. Peaks, die den Oxidationsprodukten von PSP-Toxinen entsprechen, die mehr als ein Oxidationsprodukt bei der Peroxidoxidation ergeben: zwei dcGTX2,3-Peaks und zwei dcSTX-Peaks, müssen chromatographisch mit einer Auflösung größer als 1,5 getrennt werden. Der FLD sollte zum Nachweis eines mit Peroxid behandelten (6.5.3) 400 pg STX-Standards mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 1:10 geeignet sein.

Ein empfohlener HPLC-Gradient mit einer Durchflussrate von 2 ml/min ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6 — Empfohlener Gradient der mobilen Phase bei einem Durchfluss von 2 ml/min

Zeit min	Eluent A %	Eluent B %
0	100	0
5	95	5
9	30	70
11	100	0
15	100	0

ANMERKUNG 1 Die Messung kann mit unterschiedlichen Trennsäulen (Maße, Herstellung) durchgeführt werden.

Der pH-Wert der Eluenten A und B ist über die Zeit instabil. Sie müssen vor jeder analytischen Reihe frisch hergestellt werden [12].

Der Fluoreszenzdetektor wird auf eine Anregungswellenlänge von $\lambda = 340$ nm und eine Emissionswellenlänge von $\lambda = 395$ nm eingestellt.

25 µl bis 50 µl der Kalibrierlösungen und der Probenmesslösungen nach der Peroxidoxidation und 50 µl bis 100 µl der Kalibrierlösungen und der Probenmesslösungen nach der Periodatoxidation werden injiziert.

Ein mögliches Injektionsschema könnte wie folgt sein: vor der Injektion einer Probenreihe wird eine Reihe der Kalibrierlösungen injiziert. Während der Analyse der Proben werden die Kalibrierlösungen und/oder eine Lösung mit definierter Konzentration in regelmäßigen Abständen injiziert, um die Stabilität des Systems (beispielsweise ist jede vierte Injektion eine Lösung mit festgelegter Konzentration) zu überprüfen. Nach Abschluss der Probenreihe wird die Reihe der Kalibrierlösungen erneut injiziert.

ANMERKUNG 2 Bei der Anwendung eines automatischen Probengebers bei Raumtemperatur sind einige Toxin-oxidationsprodukte instabil, deshalb verringert sich die Response dieser Toxinstandards (d. h. dc-NEO und NEO) während einer Sequenz. Diese Aspekte könnten durch die Anwendung eines gekühlten automatischen Probengebers (z. B. +6 °C) verbessert werden [12].

Die mit Periodat und Peroxid oxidierten Extrakte werden analysiert. Extrakte nach der SPE-C₁₈-Reinigung ohne Oxidation sollten mit der Periodatsequenz analysiert werden, um zu verifizieren, dass die in den Chromatogrammen gefundenen PSP-Toxinpeaks tatsächlich auf PSP und nicht auf die natürlich fluoreszierenden Proben-Coextrakte zurückzuführen sind (6.3.1). Extrakte mit PSP-Toxingehalten, die den höchsten Kalibrierstandard überschreiten, müssen mit Wasser verdünnt werden. Die Verdünnungsfaktoren werden aufgezeichnet.

Zur effizienten Umsetzung dieses Verfahrens für Bedingungen der Routineanalyse, bei denen die Analyse einer großen Anzahl von Proben notwendig ist, wird die folgende Verfahrensweise empfohlen (Bild 2):

Die Messextrakte werden nach der SPE-C₁₈-Reinigung und Periodatoxidation analysiert. Falls keine Peaks den PSP-Standards entsprechen, ist die Probe negativ und es sind keine weiteren Analysen erforderlich.

Falls nicht-hydroxylierte Toxine (STX, dcSTX, GTX2,3, dcGTX2,3, GTX5 (B1) oder C1,2) vorhanden sind und bei Abwesenheit der N-hydroxylierten Toxine (NEO, dcNEO, GTX1,4, GTX6 (B2) und C3,4) können dann die nicht-hydroxylierten Toxine durch direkten Vergleich mit bekannten Standards, bei denen die Periodatoxidation durchgeführt ist, quantifiziert werden. Jedoch ist die Peroxidoxidation viel empfindlicher für GTX5 (B1), C1,2 und dcSTX und wäre zu empfehlen, wenn die optimale Empfindlichkeit gefordert ist.

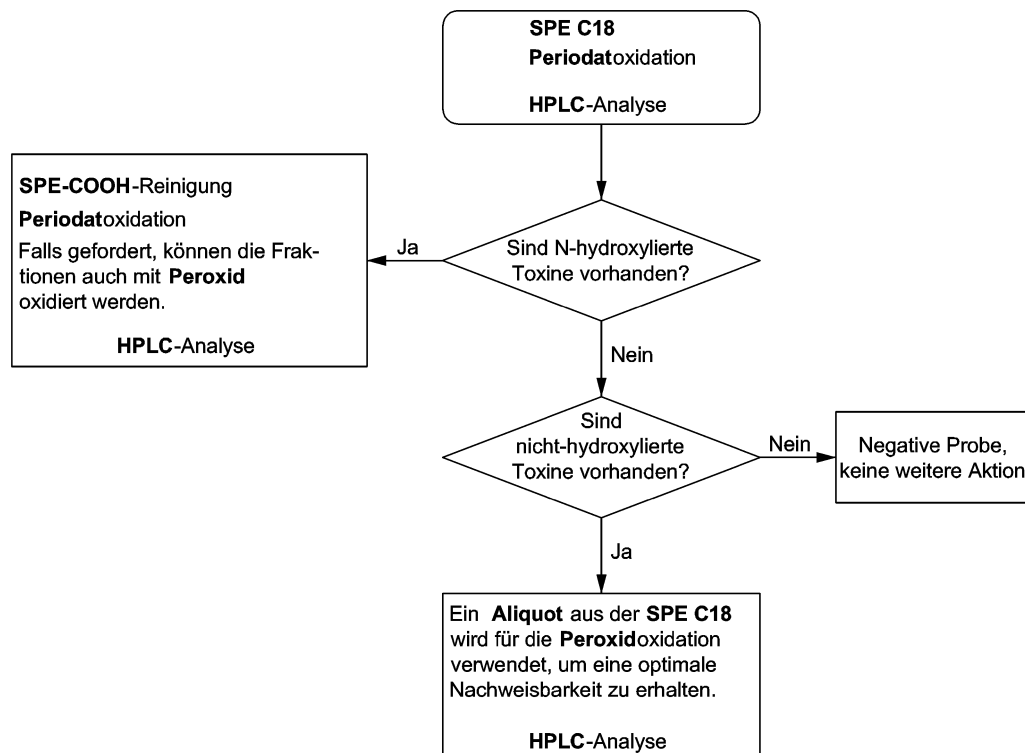


Bild 2 — Schematisches Diagramm der Verfahrensweise [1]

Falls N-hydroxylierte und nicht-hydroxylierte Toxine vorhanden sind, werden die nicht-hydroxylierte Toxine quantifiziert, nachdem ein weiterer Aliquot des Messextraktes mit Peroxid oxidiert ist, und die Peaks werden mit ähnlich oxidierten Standards verglichen. Die Gründe dafür sind, dass bei der Periodatoxidation einige der N-hydroxylierten Toxine zu den gleichen Produkten reagieren wie deren nicht-hydroxylierte Analoge. Weiterhin ergibt die Peroxidoxidation für einige Toxine (besonders GTX5 (B1), C1,2 und dcSTX) eine viel bessere Empfindlichkeit.

Bei der Quantifizierung von N-hydroxylierten Toxinen muss ein weiteres Aliquot des Messextraktes der C₁₈-Reinigung fraktioniert (6.3.2) und mit Periodat zur geeigneten Fraktion oxidiert werden. Dieser Schritt trennt C3,4 von GTX1,4 und GTX6 (B2) von NEO, das ermöglicht, alle Toxine durch direkten Vergleich mit Standards zu quantifizieren, bei denen das gleiche Oxidationsverfahren durchgeführt wird, siehe [2].

8 Kalibriergerade

Eine Kalibrierkurve wird zu Beginn der Analyse und bei jeder Veränderung der chromatographischen Bedingungen erstellt. Die Peakresponse wird gegen die Massenkonzentrationen der injizierten PSP-Toxin-Kalibrierlösungen aufgetragen. Die lineare Regression sollte für alle Toxine mindestens 0,98 betragen. Die Konzentration der PSP-Toxine wird durch den direkten Vergleich mit analytischen Standards mit vergleichbaren Konzentrationen bestimmten, wie sie für die Probe erwartet werden [2] (siehe 10.2.3 oder direkt zusammen mit der Kalibrierkurve (siehe 10.2.2)).

9 Identifizierung

Die PSP-Toxine werden durch Vergleich der Retentionszeiten und der Anzahl der Oxidationsprodukte der Probe mit den Standardsubstanzen identifiziert.

10 Berechnung

10.1 Allgemeines

Jedes Toxin wird in Schalentiergewebe mit der Kalibrierkurve (10.2.2) quantitativ bestimmt. Ein alternatives Verfahren nutzt den direkten Vergleich mit analytischen Standards mit vergleichbaren Konzentrationen, wie sie für die Analysenmenge erwartet werden (10.2.3). Einfachheitshalber können drei Standardgemische entsprechend Tabelle 4 für die Quantifizierung der Toxine verwendet werden. Tabelle 7 zeigt, inwiefern die Berechnung für die verschiedenen Toxinzusammensetzungen angewendet werden kann.

Tabelle 7 — Für die verschiedenen Toxinzusammensetzungen anzuwendende Berechnung

Toxin	Neo		C3,4	GTX1,4	GTX6	dcNeo	Andere
In Gegenwart von	dcSTX	STX, dcSTX, dcNeo		GTX2,3 dcGTX2,3		dcSTX	
Berechnung	10.3	10.8	10.5	10.7	10.4	10.6	10.8

Nach der Berechnung der Toxinkonzentrationen sollten diese durch Anwendung der in 10.9 genannten Gleichung in STX-2HCl-eq angegeben werden.

STX, GTX2,3, GTX5 (B1) und C1,2 reagieren mit beiden Oxidationsverfahren zu einzelnen Oxidationsprodukten. Im Gegensatz dazu ergeben dcSTX und dcGTX2,3 mit beiden Reaktionen zwei Oxidationsprodukte. Das dcNEO-Toxin oxidiert nur mit der Periodatoxidation in zwei Oxidationsprodukte. Jedes der Toxine NEO, GTX6 (B2), GTX1,4 und C3,4 ergibt drei Peaks nach der Periodatoxidation, jedoch wird nur der zweite Elutionspeak für die Quantifizierung angewendet (die Peroxidoxidation kann für die Quantifizierung nicht angewendet werden) (Tabelle 2). Da einige PSP-Toxine (NEO und GTX6 (B2), GTX1,4 und C3,4) die gleichen Oxidationsprodukte ergeben, kann deren quantitative Bestimmung nur nach der Trennung wie beschrieben (6.3.2 oder 6.3.3) durch die SPE-COOH-Reinigung erfolgen. Falls in hoher Konzentration vorhanden, wird dcSTX die Quantifizierung von NEO nach der Periodatoxidation beeinträchtigen. NEO kann durch Anwendung mathematischer Peakverhältnisse nach der Periodat- und Peroxidoxidation (10.3) quantifiziert werden. Falls in hoher Konzentration vorhanden, wird dcGTX2,3 die Quantifizierung von GTX1,4 nach der Periodatoxidation beeinträchtigen. GTX1,4 kann durch Anwendung des unterschiedlichen Gehalts des zweiten dcGTX2,3-Peaks nach der Periodat- und Peroxidoxidation (10.7) quantifiziert werden. Infolge des Fehlens von Standards kann GTX6 nach der Hydrolyse zu NEO (6.4.2), (10.4) quantifiziert werden. C3,4 kann nach der Hydrolyse zu GTX1,4 (6.4.2), (10.5) quantifiziert werden. Da dcNEO und dcSTX zwei gemeinsame Peaks aufweisen, wenn sie der Periodatoxidation unterzogen werden, ist die Quantifizierung in 10.6 beschrieben.

ANMERKUNG 1 Es ist wichtig, anzumerken, dass einige Toxine nach der SPE-COOH-Reinigung nicht vollständig in eine der drei Fraktionen getrennt werden können und manchmal kleine Mengen in der angrenzenden Fraktion auftreten können.

ANMERKUNG 2 Es wird vorgeschlagen, die Kalibrierstandards in $\mu\text{mol/ml}$ anzugeben, da das Risiko von Berechnungsfehlern nach der Analyse reduzieren kann und die Berechnungen vereinfacht.

10.2 Toxinberechnung

10.2.1 Allgemeines

Es gibt zwei Berechnungsverfahren zur Quantifizierung der Toxinkonzentration:

10.2.2 Berechnungsverfahren mit der Standardkalibrierkurve

Die Substanzkonzentration c , in $\mu\text{mol/kg}$, oder die Massenkonzentration w , in μg (freie Base)/kg, des Toxins wird mit der Anwendung der Kalibrierkurve und Gleichung (1) berechnet:

$$c \text{ oder } w = \frac{Ax - b}{a} \times \frac{Vx \times D \times 1000}{M} \quad (1)$$

Dabei ist

- Ax die Peakfläche des Toxins im analysiertem Extrakt;
- a die Steigung der Kalibrierkurve des Toxins;
- b der Schnittpunkt der Kalibrierkurve;
- Vx das Endvolumen des analysierten Extraktes, in Milliliter;
- D der Verdünnungsfaktor (bei den Extrakten, bei denen die PSP-Toxine über dem konzentriertesten Standardgemisch liegen, wird mit Wasser verdünnt);
- M die Masse der Analysenmenge (Einwaage), bei der das Reinigungsverfahren durchgeführt wird, in Gramm, üblicherweise 0,5 g für die SPE-C₁₈-Reinigung und 0,25 g für die SPE-COOH-Reinigung;
- 1 000 der Faktor zur Umwandlung des Ergebnisses von $\mu\text{mol/g}$ zu $\mu\text{mol/kg}$ oder $\mu\text{g/g}$ zu $\mu\text{g/kg}$.

Infolge der mehrfach geladenen funktionellen Gruppen können Toxine in unterschiedlichen Formen auftreten. Deshalb ist es wichtig, die genaue Salzform festzulegen (Molekularmasse), wenn die Ergebnisse in $\mu\text{g/kg}$ angegeben werden.

10.2.3 Alternatives Berechnungsverfahren mit der Ein-Punkt-Kalibrierung [1], [2]

Die Konzentration jedes Toxins in der Probe wird durch Vergleich der betreffenden Peakfläche mit der des bei den Messungen verwendeten analytischen Standards berechnet. Die Injektion des verwendeten Standards sollte sich in der Nähe der Injektion der unbekannten Probe befinden, weiterhin sollten die Konzentrationen des Standards und der Probe vergleichbar sein.

Die Substanzkonzentration c , in $\mu\text{mol/kg}$, oder die Massenkonzentration w , in μg (freie Base)/kg, des Toxins wird mit Gleichung (12) berechnet, siehe auch [1], [2]:

$$c \text{ oder } w = \frac{A_x \times C_s \times V_x \times D \times 1\,000}{A_s \times M} \quad (2)$$

Dabei ist

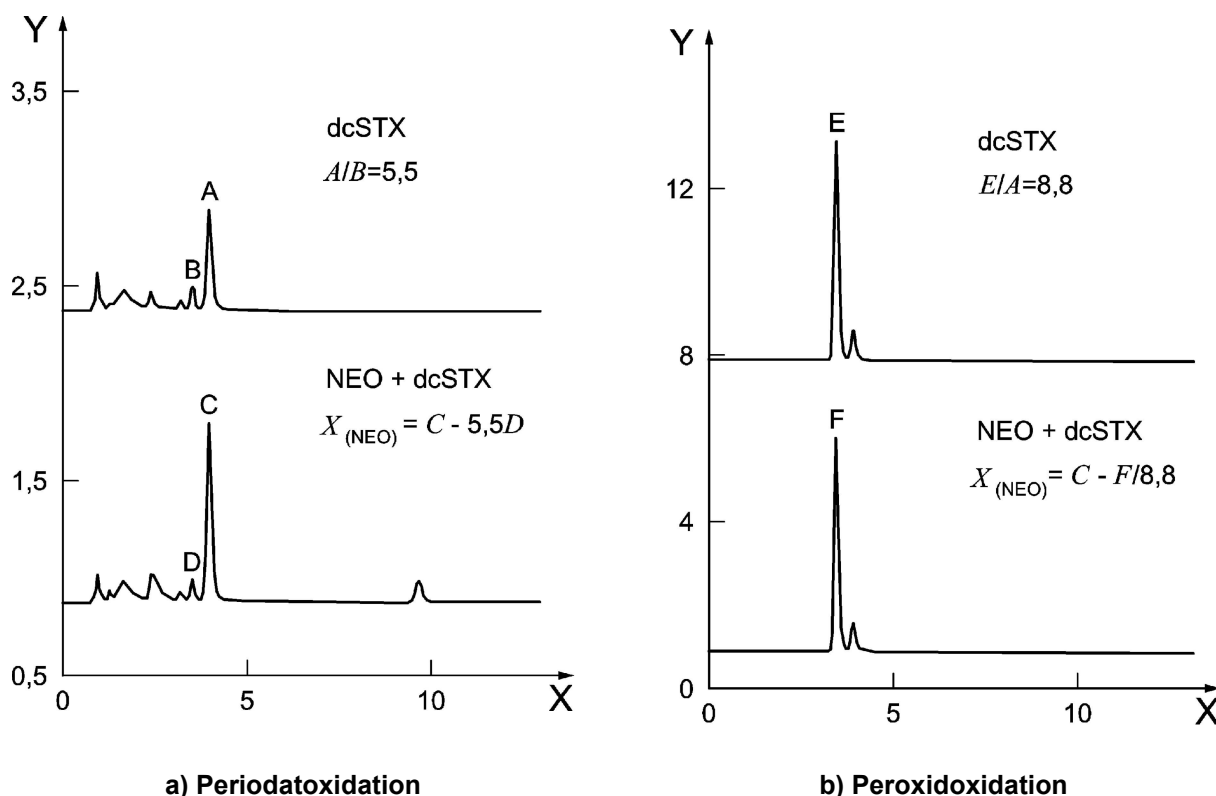
- A_x die Peakfläche des Toxins im analysiertem Extrakt;
- A_s die Peakfläche des nächstliegenden Standards;
- C_s die Substanz- oder Massenkonzentration des Standards, in $\mu\text{mol/ml}$ oder $\mu\text{g/ml}$;
- V_x das Endvolumen des analysierten Extraktes, in Milliliter;
- D der Verdünnungsfaktor (bei den Extrakten, bei denen die PSP-Toxine über dem konzentriertesten Standardgemisch liegen, wird mit Wasser verdünnt);
- M die Masse der Analysenmenge (Einwaage), bei der das Reinigungsverfahren durchgeführt wird, in Gramm, üblicherweise 0,5 g für die SPE- C_{18} -Reinigung und 0,25 g für die SPE-COOH-Reinigung;
- 1 000 der Faktor zur Umrechnung des Ergebnisses von $\mu\text{mol/g}$ zu $\mu\text{mol/kg}$ oder $\mu\text{g/g}$ zu $\mu\text{g/kg}$.

10.3 Berechnung von NEO in der Gegenwart von dcSTX [1], [2]

10.3.1 Allgemeines

Weil jeweils eines der Reaktionsprodukte der Reaktionsprodukte von NEO und von dcSTX identisch ist, ist eine Strategie für die Quantifizierung von NEO in der Gegenwart von dcSTX notwendig. Das zweite Oxidationsprodukt von NEO hat die gleiche Retentionszeit wie das zweite Oxidationsprodukt von dcSTX. Die NEO-Peakfläche in einer Probe, die NEO und dcSTX enthält, kann auf zwei Wegen berechnet werden. Bild 3 zeigt Chromatogramme nach der Periodat- und Peroxidoxidation eines dcSTX-Standards und einer unbekannten Probe, die eine Mischung von NEO und dcSTX enthält.

ANMERKUNG Die Berechnung des NEO-Gehalts in Gegenwart von dc-STX und dc-NEO führt dazu, dass AOAC Official Method 2005.06, Method 1 und Method 2, nicht anwendbar sind. Der einzige Weg zur Quantifizierung ist die Anwendung des dritten Periodatpeaks von NEO, wenn STX nicht vorhanden ist. Ist STX auch vorhanden, wird der STX-Gehalt nach der Peroxidoxidation berechnet. Es ist erforderlich, den Anteil von NEO im Peroxidpeak zu vernachlässigen. Der erreichte STX-Gehalt wird in die entsprechende Fläche der Periodatoxidation umgewandelt und von der Fläche des dritten Periodatoxidationspeak von NEO subtrahiert. Die Restfläche entspricht dem NEO-Gehalt, siehe 10.4.



Legende

Oberes Chromatogramm	Standard	Unteres Chromatogramm	unbekannte Probe
dcSTX-Standard:		Unbekannte Probe:	
A = zweiter (größerer) Peak, Periodatoxidation		C = zweiter (größerer) Peak, Periodatoxidation	
B = erster (kleinerer) Peak, Periodatoxidation		D = erster (kleinerer) Peak, Periodatoxidation	
E = erster (größerer) Peak, Peroxidoxidation		F = erster (größerer) Peak, Peroxidoxidation	
Y Detektorresponse (Lumineszenz, Lu)			
X Zeit (min)			

Bild 3 — Chromatogramme, die die Berechnung von NEO in Gegenwart von dcSTX erläutern
(die dargestellten Peakverhältnisse sind nur Beispiele)

links: nach der Periodatoxidation; rechts: nach der Peroxidoxidation [1], [2]

10.3.2 Verfahren 1

Ist die Konzentration von dcSTX in der Probe, die eine Mischung von NEO und dcSTX enthält, hinreichend signifikant, um einen gut integrierten ersten Peak (Peak D, Bild 3) mit der Periodatoxidation zu ergeben, dann kann die NEO entsprechende Peakfläche (Peak $X_{(NEO)}$) aus dem Verhältnis der beiden dcSTX-Peakflächen berechnet werden, die mit der Periodatoxidation des Standards erzeugt werden.

Für den mit der Periodatoxidation analysierten dcSTX-Standard wird das Verhältnis der beiden Peakflächen mit der Gleichung (3) berechnet:

$$\frac{A}{B} = \frac{X_{(dcSTX)}}{D} \Rightarrow X_{(dcSTX)} = \frac{D \times A}{B} \quad (3)$$

Dabei ist

A die Peakfläche des zweiten (größerer) dcSTX-Peaks aus der Periodatoxidation;

B die Peakfläche des ersten (kleineren) dcSTX-Peaks aus der Periodatoxidation;

D die Peakfläche des ersten (kleineren) dcSTX-Peaks in der unbekannten Probe aus der Periodatoxidation;

$X_{(\text{dcSTX})}$ die dcSTX-Peakfläche in Peak C.

Die NEO-Peakfläche wird mit der Gleichung (4) berechnet:

$$X_{(\text{NEO})} = C - X_{(\text{dcSTX})} = C - \frac{D \times A}{B} \quad (4)$$

Bei der Berechnung der NEO-Konzentration wird Gleichung (1) und/oder Gleichung (2) angewendet.

10.3.3 Verfahren 2

Ist die Konzentration von dcSTX in der Probe, die NEO und dcSTX enthält, nicht hinreichend signifikant, um einen gut integrierten ersten Peak (Peak D, Bild 3) mit der Periodatoxidation zu ergeben, dann wird die NEO entsprechende Peakfläche (Peak $X_{(\text{NEO})}$) aus dem Verhältnis des dcSTX-Peaks berechnet, der mit der Periodatoxidation erzeugt wird (Peak A) und der dcSTX-Peakfläche, die mit der Peroxidoxidation (Peak E) im Standard erzeugt wird.

Für einen mit den Periodat- und Peroxidoxidationen analysierten dcSTX-Standard wird das Verhältnis der beiden Peakflächen wie folgt berechnet:

$$\frac{E}{A} = \frac{F}{X_{(\text{dcSTX})}} \Rightarrow X_{(\text{dcSTX})} = \frac{F \times A}{E} \quad (5)$$

Dabei ist

E die Peakfläche des ersten (größeren) dcSTX-Peaks aus der Peroxidoxidation;

D die Peakfläche des ersten (größeren) dcSTX-Peaks in der unbekannten Probe aus der Peroxidoxidation;

$X_{(\text{dcSTX})}$ die dcSTX-Peakfläche in Peak C.

Die NEO-Peakfläche kann entsprechen Gleichung (6) berechnet werden:

$$X_{(\text{NEO})} = C - X_{(\text{dcSTX})} = C - \frac{F \times A}{E} \quad (6)$$

Dabei ist

C die Peakfläche des zweiten (größeren) Peaks von dcSTX + NEO aus der Periodatoxidation.

Bei der Berechnung der NEO-Konzentration wird Gleichung (1) und/oder Gleichung (2) angewendet.

ANMERKUNG Die Ergebnisse der beiden Verfahren unterscheiden sich. Verfahren 2 könnte genauer sein, da die in den Berechnungen angewendeten Peakflächen (Peaks E und F) viel größer als die in Verfahren 1 angewendeten Peaks B und D sind.

10.4 Berechnung von GTX6 (B2)

Falls GTX6 (B2) nachgewiesen wird, wird bei der Quantifizierung die Periodatoxidation der hydrolysierten Fraktion 2 angewendet. Die Hydrolyse wandelt GTX6 (B2) in NEO um. Bei der Quantifizierung wird die Kalibrierung, in $\mu\text{mol/kg}$, des zweiten NEO-Elutionspeaks angewendet. Die Molarität des GTX6 (B2)-Toxins ist gleich der Molarität des in der Fraktion 2 nach der Hydrolyse vorhandenen NEO-Toxins.

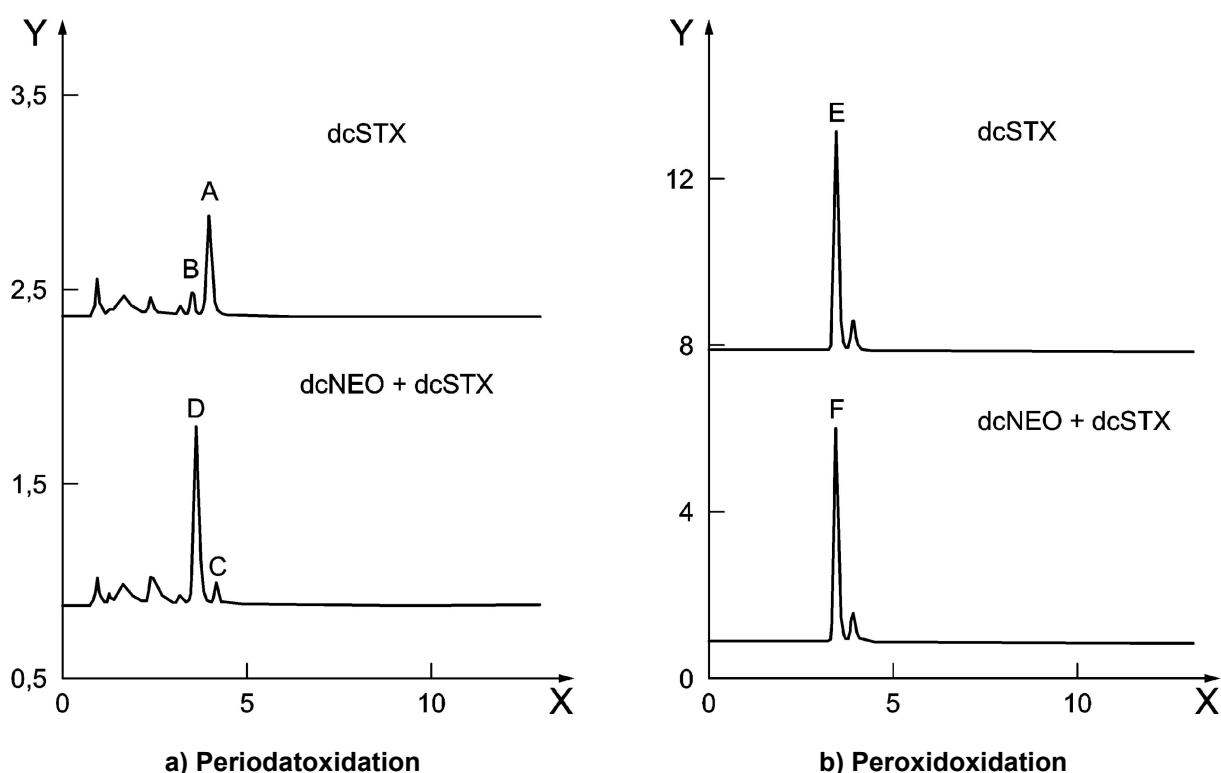
10.5 Berechnung von C3,4

Falls C3,4 nachgewiesen wird, wird bei der Quantifizierung die Periodatoxidation der hydrolysierten Fraktion 1 angewendet. Die Hydrolyse wandelt C3,4 in GTX1,4 um. Bei der Quantifizierung wird die Kalibrierung, in $\mu\text{mol/kg}$, des zweiten GTX1,4-Elutionspeaks angewendet. Die Molarität des C3,4-Toxins ist gleich der Molarität des in der Fraktion 1 nach der Hydrolyse vorhandenen GTX1,4-Toxins.

10.6 Berechnung von dcNEO in der Gegenwart von dcSTX

10.6.1 Allgemeines

Weil beide Reaktionsprodukte der Periodatoxidation von dcNEO in dcSTX (Peak D und C in Bild 4) identisch sind, ist eine Strategie für die Quantifizierung von dcNEO in der Gegenwart von dcSTX notwendig. Es gibt zwei Verfahren zur Quantifizierung der Toxinkonzentration.



Legende

Oberes Chromatogramm	dcSTX-Standard
Unteres Chromatogramm	unbekannte Probe
dcSTX-Standard	A = zweiter (größerer) Peak, Periodatoxidation B = erster (kleinerer) Peak, Periodatoxidation
Unbekannte Probe	E = erster (größerer) Peak, Peroxidoxidation C = zweiter (kleinerer) Peak, Periodatoxidation D = erster (größerer) Peak, Periodatoxidation F = erster (größerer) Peak, Peroxidoxidation
Y	Detektorresponse (Lumineszenz, Lu)
X	Zeit (min)

Bild 4 — Chromatogramme, die die Berechnung von dcNEO in Gegenwart von dcSTX erläutern

10.6.2 Verfahren 1

Ist die Konzentration von dcSTX in der Probe, die eine Mischung von dcNEO und dcSTX enthält, hinreichend signifikant, um einen gut integrierten ersten Peak (Peak D, Bild 4) mit der Periodatoxidation zu ergeben und ist der Beitrag von dcNEO in der Peroxidoxidation unwesentlich, dann kann die dcNEO entsprechende Peakfläche (Peak $X_{(\text{dcNEO})}$) aus dem Verhältnis der beiden dcSTX-Peakflächen berechnet werden, die mit der Peroxid- und der Periodatoxidation des Standards (Peak B und E) und der unbekannten Probe (Peak F) erzeugt werden.

$$\frac{E}{B} = \frac{F}{X_{(\text{dcSTX-Period})}} \Rightarrow X_{(\text{dcSTX-Period})} = \frac{F \times B}{E} \quad (7)$$

Dabei ist

- B die Peakfläche des ersten (kleineren) dcSTX-Peaks aus der Periodatoxidation;
- E die Peakfläche des ersten (größeren) dcSTX-Peaks aus der Peroxidoxidation;
- F die Peakfläche des ersten (größeren) dcSTX-Peaks in der unbekannten Probe aus der Peroxidoxidation;
- $X_{(\text{dcSTX-Period})}$ die dcSTX-Peakfläche in Peak D.

Die dcNEO-Peakfläche in Peak D kann mit der Gleichung (8) berechnet werden:

$$X_{(\text{dcNEO})} = D - X_{(\text{dcSTX-Period})} = D - \frac{F \times B}{E} \quad (8)$$

Bei der Berechnung der dcNEO-Konzentration wird Gleichung (1) und/oder Gleichung (2) angewendet.

10.6.3 Verfahren 2

Die Empfindlichkeit des Peroxidverfahrens für dcNEO ist sehr gering, deshalb ist der dcNEO-Gehalt bei der Berechnung von dcSTX nach der Peroxidoxidation vernachlässigbar. Der Anteil von dcSTX an der Fläche des Peaks D wird mit der mit der Kalibrierkurven-Gleichung wie folgt berechnet:

$$C_{(\text{dcSTX-H2O2})} = \frac{F - b_{\text{dcSTX-H2O2}}}{a_{\text{dcSTX-H2O2}}} = C_{(\text{dcSTX-Period})} \quad (9)$$

$$X_{(\text{dcSTX-Period})} = C_{(\text{dcSTX-H2O2})} \times a_{\text{dcSTX-Period}} + b_{\text{dcSTX-Period}} \quad (10)$$

$$X_{(\text{dcSTX-Period})} = \left(\frac{(F - b_{\text{dcSTX-H2O2}}) \times a_{\text{dcSTX-Period}}}{a_{\text{dcSTX-H2O2}}} \right) + b_{\text{dcSTX-Period}} \quad (11)$$

Dabei ist

- $C_{(\text{dcSTX-H2O2})}$ die dcSTX-Konzentration in Peak F;
- F die Fläche des Peaks F;
- $C_{(\text{dcSTX-Period})}$ die dcSTX-Konzentration in Peak D;
- $X_{(\text{dcSTX-Period})}$ die dcSTX-Peakfläche in Peak D;

- $a_{\text{dcSTX-H}_2\text{O}_2}$ die Steigung der Kalibrierkurve des mit Peroxid oxidierten Toxins;
 $a_{\text{dcSTX-Period}}$ die Steigung der Kalibrierkurve des mit Periodat oxidierten Toxins;
 $b_{\text{dcSTX-H}_2\text{O}_2}$ der Schnittpunkt der Kalibrierkurve des mit Peroxid oxidierten Toxins;
 $b_{\text{dcSTX-Period}}$ der Schnittpunkt der Kalibrierkurve des mit Periodat oxidierten Toxins.

Die dcNEO-Peakfläche in Peak D kann mit der Gleichung (12) berechnet werden:

$$X_{(\text{dcNEO})} = D - X_{(\text{dcSTX-Period})} = D - \left(\frac{(F - b_{\text{dcSTX-H}_2\text{O}_2}) \times a_{\text{dcSTX-Period}}}{a_{\text{dcSTX-H}_2\text{O}_2}} \right) + b_{\text{dcSTX-Period}} \quad (12)$$

Bei der Berechnung der dcNEO-Konzentration wird Gleichung (1) und/oder Gleichung (2) angewendet.

10.7 Berechnung von GTX1,4 in der Gegenwart von GTX2,3 und dcGTX2,3

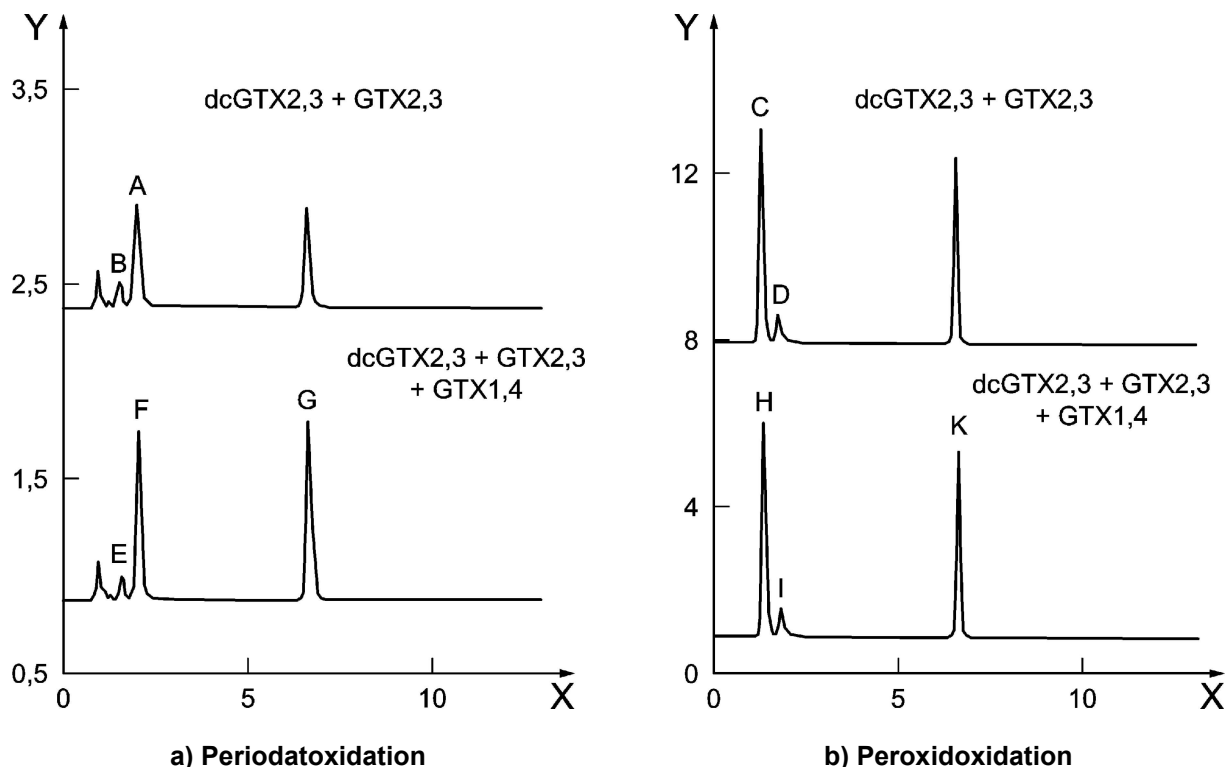
10.7.1 Allgemeines

Weil einige Reaktionsprodukte von sowohl GTX1,4 und GTX2,3 als auch von GTX1,4 und dcGTX2,3 identisch sind, ist eine Strategie für die Quantifizierung von GTX1,4 in der Gegenwart von GTX2,3 und dcGTX2,3 notwendig, **obwohl das Auftreten dieser Situation unwahrscheinlich ist**. Das zweite Oxidationsprodukt von GTX1,4 (Peak F, Bild 5) hat die gleiche Retentionszeit wie das zweite Oxidationsprodukt von dcGTX2,3. Das dritte Oxidationsprodukt von GTX1,4 (Peak G) hat die gleiche Retentionszeit wie das erste Oxidationsprodukt von GTX2,3.

Falls nur GTX2,3 vorhanden ist, kann der GTX1,4-Gehalt mit der Fläche des zweiten Oxidationspeaks von GTX1,4 berechnet werden.

Falls nur dcGTX2,3 vorhanden ist, kann der GTX1,4-Gehalt mit der Fläche des dritten Oxidationspeaks von GTX1,4 berechnet werden.

Der Anteil von GTX1,4 in einer Probe, die GTX1,4, dcGTX2,3 und GTX2,3 enthält, kann mit den folgenden beiden Verfahren berechnet werden.



Legende

Oberes Chromatogramm	Standard
Unteres Chromatogramm	unbekannte Probe
dcGTX2,3-Standard	A = zweiter (größerer) Peak, Periodatoxidation B = erster (kleinerer) Peak, Periodatoxidation C = erster (größerer) Peak, Peroxidoxidation D = zweiter (kleinerer) Peak, Peroxidoxidation E = erster (kleinerer) Peak, Periodatoxidation F = zweiter (größerer) Peak, Periodatoxidation G = dritter (größerer) Peak, Periodatoxidation H = erster (größerer) Peak, Peroxidoxidation I = zweiter (kleinerer) Peak, Peroxidoxidation K = dritter (größerer) Peak, Peroxidoxidation
Unbekannte Probe	
Y	Detektorresponse (Lumineszenz, Lu)
X	Zeit (min)

Bild 5 — Chromatogramme, die die Berechnung von GTX1,4 in der Gegenwart von GTX2,3 und dcGTX2,3 erläutern

10.7.2 Verfahren 1

Ist die Konzentration von dcGTX2,3 in der Probe, die eine Mischung von GTX1,4 und dcGTX2,3 enthält, hinreichend signifikant, um einen gut integrierten ersten Peak (Peak E, Bild 5) mit der Periodatoxidation zu ergeben, dann kann die GTX1,4 entsprechende Peakfläche (Peak $X_{(\text{GTX1,4})}$) aus dem Verhältnis der beiden dcGTX2,3-Peakflächen berechnet werden, die mit der Periodatoxidation des Standards erzeugt werden (Gleichung (13) wird angewendet).

$$\frac{A}{B} = \frac{X_{(\text{dcGTX2,3})}}{E} \Rightarrow X_{(\text{dcGTX2,3})} = \frac{E \times A}{B} \quad (13)$$

Dabei ist

- A die Peakfläche des zweiten (größeren) dcGTX2,3-Peaks aus der Periodatoxidation;
- B die Peakfläche des ersten (kleineren) dcGTX2,3-Peaks aus der Periodatoxidation;
- E die Peakfläche des ersten (kleineren) dcGTX2,3-Peaks in der unbekannten Probe aus der Periodatoxidation;
- $X_{(\text{dcGTX2,3})}$ die dcGTX2,3-Peakfläche in Peak F.

Die GTX1,4-Peakfläche wird mit der Gleichung (14) berechnet:

$$X_{(\text{GTX1,4})} = F - X_{(\text{dcGTX2,3})} = F - \frac{E \times A}{B} \quad (14)$$

Bei der Berechnung der GTX1,4-Konzentration wird Gleichung (1) und/oder Gleichung (2) angewendet.

10.7.3 Verfahren 2

Die Empfindlichkeit des Peroxidverfahrens für GTX1,4 ist sehr gering, deshalb ist der GTX1,4-Gehalt bei der Berechnung von GTX2,3 nach der Peroxidoxidation vernachlässigbar. Der Anteil von GTX2,3 an der Fläche des Peaks G wird mit der mit der Kalibrierkurven-Gleichung wie folgt berechnet:

$$C_{(\text{GTX2,3-H2O2})} = \frac{K - b_{\text{GTX2,3-H2O2}}}{a_{\text{GTX2,3-H2O2}}} = C_{(\text{GTX2,3-H2O2-Period})} \quad (15)$$

$$X_{(\text{GTX2,3-Period})} = C_{(\text{GTX2,3-H2O2})} \times a_{\text{GTX2,3-Period}} + b_{\text{GTX2,3-Period}} \quad (16)$$

$$X_{(\text{GTX2,3-Period})} = \left(\frac{(K - b_{\text{GTX2,3-H2O2}}) \times a_{\text{GTX2,3-Period}}}{a_{\text{GTX2,3-H2O2}}} \right) + b_{\text{GTX2,3-Period}} \quad (17)$$

Dabei ist

- $C_{(\text{GTX2,3-H2O2})}$ die GTX2,3-Konzentration in Peak K;
- $C_{(\text{GTX2,3-Period})}$ die GTX2,3-Konzentration in Peak G;
- K die Fläche des Peaks K;
- $X_{(\text{GTX2,3-Period})}$ die GTX2,3-Peakfläche in Peak G;
- $a_{\text{GTX2,3-H2O2}}$ die Steigung der Kalibrierkurve des mit Peroxid oxidierten Toxins;
- $a_{\text{GTX2,3-Period}}$ die Steigung der Kalibrierkurve des mit Periodat oxidierten Toxins;
- $b_{\text{GTX2,3-H2O2}}$ der Schnittpunkt der Kalibrierkurve des mit Peroxid oxidierten Toxins;
- $b_{\text{GTX2,3-Period}}$ der Schnittpunkt der Kalibrierkurve des mit Periodat oxidierten Toxins.

Die GTX1,4-Peakfläche in Peak G kann mit der Gleichung (18) berechnet werden:

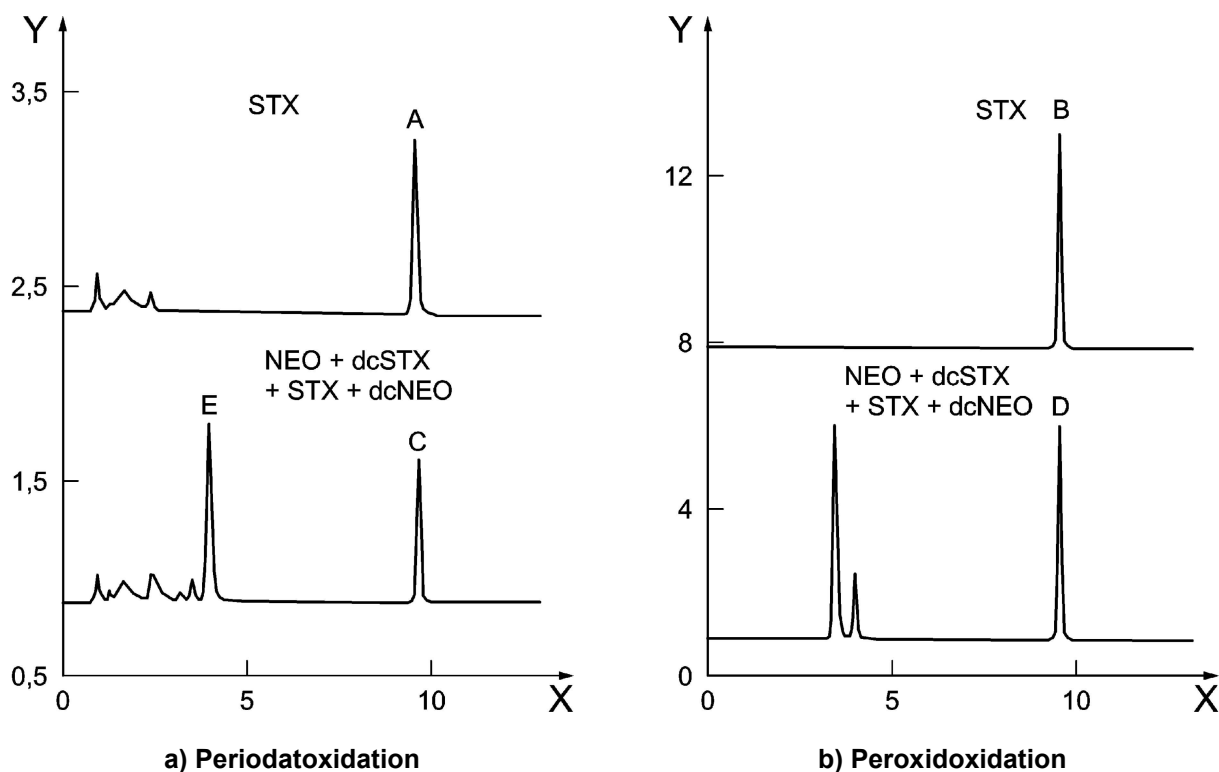
$$X_{(\text{GTX1,4})} = G - X_{(\text{GTX2,3-Period})} = G - \left(\frac{(F - b_{\text{GTX2,3-H2O2}}) \times a_{\text{GTX2,3-Period}}}{a_{\text{GTX2,3-H2O2}}} \right) + b_{\text{GTX2,3-Period}} \quad (18)$$

Bei der Berechnung der GTX1,4-Konzentration wird Gleichung (1) und/oder Gleichung (2) angewendet.

10.8 Berechnung von NEO in der Gegenwart von dcSTX, dcNEO und STX (optional)

10.8.1 Allgemeines

Weil einige der Reaktionsprodukte von NEO, dcNEO, STX und dcSTX identisch sind, ist eine Strategie für die Quantifizierung von NEO in der Gegenwart von dcNEO, dcSTX und STX notwendig, obwohl das Auftreten dieser Situation unwahrscheinlich ist. Das zweite Oxidationsprodukt von NEO hat die gleiche Retentionszeit wie das zweite Oxidationsprodukt von dcSTX und dcNEO (Peak E, Bild 6). Das dritte Oxidationsprodukt von NEO hat die gleiche Retentionszeit wie das Oxidationsprodukt von STX (Peak C). Die NEO-Peakfläche in einer Probe, die NEO, dcNEO, dcSTX und STX enthält, kann mit den folgenden beiden Verfahren berechnet werden. Bild 6 zeigt Chromatogramme nach der Periodat- und Peroxidoxidation eines STX-Standards und einer unbekannten Probe, die eine Mischung von NEO und dcNEO, dcSTX und STX enthält.



Legende

Oberes Chromatogramm	STX-Standard
Unteres Chromatogramm	unbekannte Probe
STX-Standard	A = Peak, Periodatoxidation
	B = Peak, Periodatoxidation
Unbekannte Probe	C = dritter (größerer) Peak, Periodatoxidation
	D = dritter (größerer) Peak, Peroxidoxidation
	E = zweiter (größerer) Peak, Periodatoxidation
Y	Detektorresponse (Lumineszenz, Lu)
X	Zeit (min)

Bild 6 — Chromatogramme, die die Berechnung von NEO in der Gegenwart von dcSTX, dcNEO und STX erläutern
links: nach der Periodatoxidation, rechts nach der Peroxidoxidation

10.8.2 Verfahren 1

Wenn die Probe NEO und dcSTX, dcNEO und STX (Peak C: NEO und STX sind zusammen, Peak E: NEO, dcNEO und dcSTX sind zusammen, Bild 6) enthält und der Beitrag von NEO im Peak D in der Peroxidoxidation unwesentlich ist, dann kann die NEO entsprechende Peakfläche (Peak $X_{(\text{NEO})}$) aus dem Verhältnis der STX-Peakflächen berechnet werden, die mit der Periodatoxidation (Peak A) und der Peroxidoxidation (Peak B) im Standard erzeugt werden.

Für einen mit den Periodat- und Peroxidoxidationen analysierten STX-Standard wird das Verhältnis der beiden Peakflächen wie folgt berechnet:

$$\frac{B}{A} = \frac{D}{X_{(\text{STX})}} \Rightarrow X_{(\text{STX})} = \frac{D \times A}{B} \quad (19)$$

Dabei ist

- A die Peakfläche des STX-Peaks aus der Periodatoxidation;
- B die Peakfläche des STX-Peaks aus der Peroxidoxidation;
- D die Peakfläche des STX- und NEO-Peaks in der unbekannten Probe aus der Peroxidoxidation;
- $X_{(\text{STX})}$ die STX-Peakfläche in Peak C.

Die NEO-Peakfläche kann entsprechend Gleichung (20) berechnet werden:

$$X_{(\text{NEO})} = C - X_{(\text{STX})} = C - \frac{D \times A}{B} \quad (20)$$

Bei der Berechnung der NEO-Konzentration wird Gleichung (1) und/oder Gleichung (2) angewendet.

10.8.3 Verfahren 2

Die Empfindlichkeit des Peroxidverfahrens für NEO ist sehr gering, deshalb ist der NEO-Gehalt bei der Berechnung von STX nach der Peroxidoxidation vernachlässigbar. Der Anteil von STX an der Fläche des Peaks C wird mit der mit der Kalibrierkurven-Gleichung wie folgt berechnet:

$$C_{(\text{STX}-\text{H}_2\text{O}_2)} = \frac{D - b_{\text{STX}-\text{H}_2\text{O}_2}}{a_{\text{STX}-\text{H}_2\text{O}_2}} = C_{(\text{STX}-\text{Period})} \quad (21)$$

$$X_{(\text{STX}-\text{Period})} = C_{(\text{STX}-\text{H}_2\text{O}_2)} \times a_{\text{STX}-\text{Period}} + b_{\text{STX}-\text{Period}} \quad (22)$$

$$X_{(\text{STX}-\text{Period})} = \left(\frac{(D - b_{\text{STX}-\text{H}_2\text{O}_2}) \times a_{\text{STX}-\text{Period}}}{a_{\text{STX}-\text{H}_2\text{O}_2}} \right) + b_{\text{STX}-\text{Period}} \quad (23)$$

Dabei ist

- $C_{(\text{STX}-\text{H}_2\text{O}_2)}$ die STX-Konzentration in Peak D;
- $C_{(\text{STX}-\text{Period})}$ die STX-Konzentration in Peak C;
- D die Fläche des Peaks D;
- $X_{(\text{STX}-\text{Period})}$ die STX-Peakfläche in Peak C;

$a_{\text{STX-H}_2\text{O}_2}$	die Steigung der Kalibrierkurve des mit Peroxid oxidierten Toxins;
$a_{\text{STX-Period}}$	die Steigung der Kalibrierkurve des mit Periodat oxidierten Toxins;
$b_{\text{STX-H}_2\text{O}_2}$	der Schnittpunkt der Kalibrierkurve des mit Peroxid oxidierten Toxins;
$b_{\text{STX-Period}}$	der Schnittpunkt der Kalibrierkurve des mit Periodat oxidierten Toxins.

Die NEO-Peakfläche in Peak C kann wie folgt berechnet werden:

$$X_{(\text{NEO})} = C - X_{(\text{STX-Period})} = C - \left(\frac{(D - b_{\text{STX-H}_2\text{O}_2}) \times a_{\text{STX-Period}}}{a_{\text{STX-H}_2\text{O}_2}} \right) + b_{\text{STX-Period}} \quad (24)$$

Bei der Berechnung der NEO-Konzentration wird Gleichung (1) und/oder Gleichung (2) angewendet.

10.9 Umwandlung zu STX-2HCl-Äquivalenten

Zur Kontrolle der gesetzlichen Grenze für PSP-Toxine in Schalentierfleisch ist es notwendig, die Gesamttoxizität als STX-2HCl-Äquivalente zu berechnen. Deshalb muss jede Massenfraktion des PSP-Toxins in die Substanzkonzentration, in $\mu\text{mol/kg}$, umgewandelt werden, falls das nicht bereits in 10.2 erfolgte.

$$C_i (\mu\text{mol/kg}) = \frac{w}{M} \quad (25)$$

Dabei ist

w die Massenfraktion des Toxins, in $\mu\text{g/kg}$ (berechnet in 10.2);

M die Molekularmasse des Toxins, in $\mu\text{g/mol}$.

Die Gesamtoxizität im Gewebe wird wie folgt angegeben:

$$\mu\text{g STX-2HCl-Äquivalente/kg} = \left(\sum_{i=1}^n C_i \times T_i \right) \times 372,2 \quad (26)$$

Dabei ist

C_i die Substanzkonzentration des Toxins von jedem nachgewiesenen Toxin, in $\mu\text{mol/kg}$;

T_i der Toxizitätsäquivalenzfaktor (TEF) der PSP-Toxine entsprechend Tabelle 8, siehe [14], [15];

372,2 die Molekularmasse von STX-2HCl, in g/mol .

Bei den Toxinen, die zusammen bestimmt werden, weil sie co-eluierten (dcGTX2 und dcGTX3; GTX1 und GTX4; GTX2 und GTX3; C1 und C2; C3 und C4), muss der höchste Toxizitätsfaktor der beiden Isomere ausgewählt werden, um den Anteil an der Toxizität für jedes Toxin zu berechnen.

ANMERKUNG Die vom European Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EURLMB) geleitete Europäische Arbeitsgruppe zur Bestimmung von PSP-Toxinen mit der AOAC Official Method 2005.06 vereinbarte 2009 auf dem 3. Meeting die in Tabelle 8 nach den Angaben der Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) dargestellten Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF).

Weitere Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF, en: toxicity equivalent factor), die nicht in der Tabelle 8 aufgeführt sind, dürfen unter der Voraussetzung angewendet werden, dass sie international anerkannt sind und deren Anwendung auch von der EU-Kommission, vom EU-Referenzlabor für marine Biotoxine (EURLMB) und dessen nationalen Referenzlaboratorien (NRL-Network) anerkannt wurde.

Tabelle 8 — Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) der PSP-Toxine

Name	TEF nach dem Gutachten der EFSA [15]	TEF nach Oshima [14]
GTX5 (B1)	0,1	0,064 4
GTX6 (B2)	0,1	0,064 4
C1	0,0	0,006 0
C2	0,1	0,096 3
C3	0,0	0,013 3
C4	0,1	0,057 6
dcGTX2	0,2	0,153 8
dcGTX3	0,4	0,376 6
dcNeo	0,4	nicht verfügbar
dcSTX	1	0,513 1
GTX1	1	0,994 0
GTX2	0,4	0,359 2
GTX3	0,6	0,637 9
GTX4	0,7	0,726 1
11-Hydroxy-STX	0,3	0,318 6
NEO	1	0,924 3
STX	1	1,000 0

11 Präzision

Einzelheiten zu den Ringversuchen und der Verfahrensleistung des Verfahrens sind in Anhang A angegeben.

12 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht sollte die erforderlichen Daten nach EN ISO/IEC 17025 und die folgenden Daten enthalten:

- a) alle für die Identifizierung der Probe erforderlichen Angaben (Art der Probe [z. B. gekocht, verarbeitet oder roh], Herkunft der Probe, Bezeichnung);
- b) alle für die Identifizierung des Kalibriermittels erforderlichen Angaben;
- c) eine Verweisung auf dieses Dokument;
- d) das Datum und die Art der Probenahme (falls bekannt);
- e) das Eingangsdatum;
- f) das Untersuchungsdatum;
- g) die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- h) alle im Verlauf der Untersuchung beobachteten besonderen Vorkommnisse;
- i) alle nicht im Verfahren festgelegten oder als wahlweise angesehenen Arbeitsgänge, die die Ergebnisse beeinflusst haben könnten.

Anhang A (informativ)

Präzisionsdaten

A.1 Ringversuch, von Health Canada (2001) organisiert

Die folgenden Daten wurden in einem Ringversuch ermittelt, der 2001 von Health Canada, Food Research Division, Ottawa, Canada in Übereinstimmung mit dem AOAC® Official Methods Validation Program [16] organisiert wurde. Für diesen Ringversuch wurden drei Kalibrierpunkte verwendet (4.14.2) Die Proben von Miesmuscheln, blindwertfrei und natürlich kontaminiert, wurden durchmischt und homogenisiert, um eine Vielzahl von PSP-Toxingemischen und Konzentrationsgraden bereitzustellen. Die gleiche Verfahrensweise wurde für Proben von Venusmuscheln, Austern und Jakobsmuscheln angewendet. Insgesamt 21 Proben wurden an 21 Teilnehmer verteilt, aber 3 Laboratorien traten nach dem Erhalt der Untersuchungsmaterialien zurück. Ergebnisse wurden von 18 Laboratorien ermittelt, die 14 verschiedene Länder repräsentierten. Die Daten von zwei Laboratorien waren nicht im Bericht enthalten, weil die eingereichten Informationen zur Verifizierung der Ergebnisse unzureichend waren. Die Daten (nicht in Bezug auf die Wiederfindung korrigiert) der verbleibenden 16 Laboratorien wurden statistisch analysiert und in Tabelle A.5 bis Tabelle A.19 zusammengefasst. Tabelle 20 und Tabelle 21 zeigen Ergebnisse, die von den Parallelblindwertproben für alle untersuchten Toxine ermittelt wurden. Alle Ergebnisse wurden mit Horrat-Werten unter 2 angenommen, siehe [1] und [2].

Die Untersuchung wendete den Ausreißertest nach Dixon auf jede der einzelnen Untersuchungsproben an, die eine ausreichende Anzahl von Datenpunkten hatten, um die statistischen Daten des Ringversuchs für die Untersuchungsproben zu ermitteln. Die Horrat-Werte (annehmbare Werte sind kleiner als 2) geben an, dass die Variabilität der Ergebnisse für die meisten Toxine bei unterschiedlichen Konzentrationen im annehmbaren Bereich liegt.

Dieses Untersuchungsmaterial umfasst Schalentiergewebe aus Spanien, Neuseeland und den östlichen und westlichen Küsten Kanadas und enthielt eine Vielzahl von PSP-Toxinmustern zur Untersuchung des Verfahrens mit geographisch unterschiedlichen Matrices und Gemischen von PSP-Toxinen, siehe Tabelle A.1.

GTX6 (B2) ist nicht in der Untersuchung zur quantitativen Bewertung enthalten, weil die Menge des verfügbaren analytischen Standards unzureichend war. Nach der SPE-COOH-Reinigung erbrachten jedoch die meisten Laboratorien den erfolgreichen Nachweis von GTX6 (B2) in bestimmten Proben mit einer Konzentration von etwa 30 µg/kg oder höher und meldeten dieses Ergebnis. Das zeigt, dass sobald ein analytischer Standard verfügbar ist, sollte dieses Verfahren bei dem quantitativen Nachweis dieses Toxins anwendbar sein.

Die folgenden Abkürzungen werden für alle Tabellen angewendet:

- nd nicht bestimmt;
- > HR Horrat-Werte größer als 2.

Die folgenden Probendaten sind für alle Tabellen der Präzisionsdaten gültig.

Tabelle A.1 — Probeneigenschaften

Proben-Nr	Matrix	Eigenschaften
Praxis	Miesmuschel, natürlich kontaminiert	
1	Jakobsmuschel, natürlich kontaminiert	
2	Venusmuschel, natürlich kontaminiert	
3	Auster, blindwertfrei	
4	Miesmuschel, blindwertfrei	
5	Venusmuschel, natürlich kontaminiert	Parallelblindwertprobe von 5D
5D	Venusmuschel, natürlich kontaminiert	Parallelblindwertprobe von 5
6	Venusmuschel, blindwertfrei	
7	Miesmuschel, natürlich kontaminiert	
8	Miesmuschel, natürlich kontaminiert	Parallelblindwertprobe von 8D
8D	Miesmuschel, natürlich kontaminiert	Parallelblindwertprobe von 8
9	Miesmuschel, natürlich kontaminiert	
10	Auster, natürlich kontaminiert	Parallelblindwertprobe von 10D
10D	Auster, natürlich kontaminiert	Parallelblindwertprobe von 10
11	Auster, natürlich kontaminiert	
12	Miesmuschel, natürlich kontaminiert	
Aufstockung 1	Miesmuschel, künstlich kontaminiert (aufgestockt)	aufgestockt mit NEO; STX; GTX1,4; GTX2,3
Aufstockung 2	Miesmuschel, künstlich kontaminiert (aufgestockt)	aufgestockt mit NEO; STX; GTX1,4; GTX2,3; C1,2; C3,4
Aufstockung 3	Miesmuschel, künstlich kontaminiert (aufgestockt)	aufgestockt mit dcSTX; STX; GTX5
Aufstockung 4	Miesmuschel, künstlich kontaminiert (aufgestockt)	aufgestockt mit dcSTX; STX; GTX5
Aufstockung 5	Miesmuschel, künstlich kontaminiert (aufgestockt)	aufgestockt mit dcSTX; GTX2,3; GTX5; C1,2; C3,4

A.2 Leistungsprüfung für die Gesamtoxität, vom Community Reference Laboratory of Marine Biotoxins (CRLMB)²⁾ 2006 geleitet

Die folgenden Daten wurden in einer Leistungsprüfung [4] ermittelt, die 2006 vom damaligen „Community Reference Laboratory of Marine Biotoxins (CRLMB)²⁾“ in Übereinstimmung mit dem AOAC Official Methods Validation Program [16] mit rohen und gefrorenen Proben geleitet wurde. Diese Untersuchung galt der Bewertung der Gebrauchstauglichkeit des HPLC-FLD-Verfahrens nach Lawrence zur amtlichen Kontrolle von PSP-Toxinen in den Europäischen Laboratorien. Die Leistung der teilnehmenden EU-Laboratorien bei der Anwendung dieses Verfahrens wurde mit der Leistung verglichen, die in dem von Lawrence [2] organisierten Ringversuch ermittelt wurde. Das Verfahren nach Lawrence [3] gibt den Weg zur Berechnung der

2) Der gegenwärtige Name lautet European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EURLMB), Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Vigo, Spain.

Konzentration für jedes PSP-Toxin (in μg freie Base des Toxins/kg Schalentierfleisch) an, sie gibt jedoch nicht an, wie zu verfahren ist, um die Ergebnisse als Gesamtoxizität anzugeben. Die Leistungsprüfung gibt die Ergebnisse in μg STX-Dihydrochlorid-Äquivalenten/100 g Schalentierfleisch an. In der vorliegenden Europäischen Norm wurden die Werte in μg STX-Dihydrochlorid-Äquivalenten/kg Schalentierfleisch umgewandelt. Die spezifischen Toxizitäten der PSP-Toxine (Oshima, 1995, [14], auch als „Supplemental Information for PSP toxin CRMs“ bezeichnet) mussten für die Berechnungen angewendet werden.

Proben von natürlich kontaminierten Miesmuscheln, Jakobsmuscheln, Venusmuscheln und *Acanthocardia tuberculata* (Warzige Herzmuschel) (siehe Tabelle A.2) wurden homogenisiert. Proben, die C1,2 (Standard zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar), dc-STX, GTX2,3, GTX5, STX und dcGTX2,3 enthielten, konnten nach der SPE-C₁₈-Reinigung quantifiziert werden. Extrakte enthielten auch GTX1,4, C3,4 (Standard nicht verfügbar), NEO und GTX6 (Standard nicht verfügbar).

Insgesamt wurden sechs Proben an 21 Teilnehmer verteilt, aber drei Laboratorien schickten ihre Ergebnisse nicht rechtzeitig zurück. Ergebnisse wurden von 18 Laboratorien ermittelt. Bei den Laboratorien, die ein PSP-Toxin mit einem anderen verwechselten (d. h. GTX6 mit NEO) wurden deren Ergebnisse als ungültige Daten angesehen und vor der statistischen Bewertung verworfen. Die Identifizierung der Ausreißer wurde für die Proben CRL/06/P/01 und CRL/06/P/05 (Parallelblindwertproben) mit den Cochran- und Grubbs-Tests durchgeführt. Bei den restlichen Proben wurde stattdessen der Ausreißertest nach Dixon ($\alpha = 0,05$) angewendet.

Die Präzisionsdaten sind in Tabelle A.22 und Tabelle A.23 dargestellt.

Tabelle A.2 — Eigenschaften der Proben aus der Leistungsprüfung

Probe-Nr	Matrix	Eigenschaften
CRL/06/P/01	Miesmuschel, natürlich kontaminiert	Parallelblindwertprobe von CRL/06/P/05
CRL/06/P/02	<i>Acanthocardia tuberculata</i> , Warzige Herzmuschel, natürlich kontaminiert	
CRL/06/P/03	Venusmuschel, natürlich kontaminiert	
CRL/06/P/04	Jakobsmuschel, natürlich kontaminiert	
CRL/06/P/05	Miesmuschel, natürlich kontaminiert	Parallelblindwertprobe von CRL/06/P/01
CRL/06/P/06	Miesmuschel, natürlich kontaminiert	

A.3 Bestimmung von PSP-Toxinen in Schalentieren einschließlich GTX6 nach der Hydrolyse, vom „Community Reference Laboratory of Marine Biotoxins (CRLMB)²⁾“ 2007 geleitet

Die Untersuchung [5] an rohen Proben wurde von Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins (CRLMB)²⁾, Agencia Espanola de Seguridad Alimentaria y Nutricion (AESAN) geleitet. Die wesentlichen Neuerungen im Vergleich mit der vorherigen Untersuchung waren die Verfügbarkeit des C1,2-Toxinstandards und die Bestimmung von GTX6 (B2) durch die saure Hydrolyse. Es sollte in einem kleinen Umfang festgestellt werden, ob das Hydrolyseprotokoll für die direkte Bestimmung von GTX6 (B2) anwendbar ist. Deshalb wurden zwei Proben (gefrorene und homogenisierte Miesmuscheln, siehe Tabelle A.3) durch sieben EU-Laboratorien analysiert. Das HPLC-Verfahren nach Lawrence wurde angewendet und zusätzlich eine saure Hydrolyse der gereinigten COOH-SPE-Fraktion 2 zur indirekten Bestimmung des GTX6 (B2)-Toxins (siehe 6.4).

Tabelle A.3 — Eigenschaften der Proben

Probe-Nr	Matrix	Art	Herkunft	Anmerkungen
CRL/07/HYDR/01	Miesmuschel	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Mittelmeer-Miesmuschel)	Galicien (Spanien)	natürlich kontaminiert
CRL/07/HYDR/02	Miesmuschel	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Mittelmeer-Miesmuschel)	Galicien (Spanien)	natürlich kontaminiert

Die Bestimmung von GTX6 (B2), GTX5 (B1), dcGTX2,3, C1,2, dcSTX und der Gesamtoxität wurde bewertet. Die spezifischen Toxizitäten der PSP-Toxine (Oshima, 1995, [14], auch als „Supplemental Information for PSP toxin CRMs“ bezeichnet) wurden für die Berechnungen der Gesamtoxität angewendet. Alle Labordaten wurden in die statistische Bewertung einbezogen. Die Ausreißer wurden durch den Ausreißertest nach Dixon ($\alpha = 0,05$) identifiziert und aus dem berechneten Mittelwert der Teilnehmer ausgeschlossen. Die ermittelten Daten sind in Tabelle A.24 bis Tabelle A.27 und Tabelle A.29 und Tabelle A.30 dargestellt.

A.4 Erweiterung der Validierung einschließlich dcGTX2,3 und dcNEO, bereitgestellt von Community Reference Laboratory of Marine Biotoxins (CRLMB)²⁾

Ein Ringversuch zur Bestimmung von PSP-Toxinen in rohen und gefrorenen Schalentieren [6] wurde von Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins (CRLMB)²⁾, Agencia Espanola de Seguridad Alimentaria y Nutricion (AESAN), durchgeführt. Dabei sollte die bestehende AOAC *Official Method* 2005.06 mit dcGTX2,3 und dcNEO erweitert werden. Weiterhin wurde das Protokoll der sauren Hydrolyse zur Umwandlung von GTX6 (B2) zu NEO einbezogen, das sich für die Quantifizierung von GTX6 [5] als zweckmäßig erwiesen hat.

Verschiedene natürlich kontaminierte oder aufgestockte Venusmuscheln und Miesmuscheln wurden homogenisiert und als Untersuchungsmaterial für die Untersuchung (siehe Tabelle A.4) verwendet. Insgesamt 11 Proben wurden an 11 Teilnehmer verteilt. Die von 10 verschiedenen Laboratorien ermittelten Daten wurden statistisch bewertet, um die Ausreißer zu identifizieren, die aus den weiteren Berechnungen ausgeschlossen wurden. Die Identifizierung der Ausreißer wurde für die Proben (Parallelblindwertproben) mit den Cochran- und Grubbs-Tests durchgeführt. Bei den restlichen Proben wurde stattdessen der Ausreißertest nach Dixon ($\alpha = 0,05$) angewendet.

Zum Abschluss wurden die Validierungsdaten für dcGTX2,3 während dieser Untersuchung festgelegt. Die Bestimmung von GTX6 (B2), GTX5 (B1), dcGTX2,3, C1,2, dcSTX, dcNEO und der Gesamtoxität wurde bewertet. Die spezifischen Toxizitäten der PSP-Toxine (Oshima, 1995, [14], auch als „Supplemental Information for PSP toxin CRMs“ bezeichnet) wurden für die Berechnungen der Gesamtoxität angewendet. Die ermittelten Daten sind in Tabelle A.24 bis Tabelle A.31 dargestellt.

Die komplizierte Berechnung zur Quantifizierung von dcNEO und GTX6 (B2) könnte die Ursache für die schlechte Leistung einiger Laboratorien in dieser Untersuchung sein.

Tabelle A.4 — Eigenschaften der Proben

Proben-Nr	Matrix	Art	Herkunft	Anmerkungen
CRL/08/P01 und CRL/08/P07	Venus-muschel	<i>Venerupis pullarstra</i> (Gemeine Teppichmuschel)	Lagune von Obidos (Portugal), Galicien (Spanien)	Parallelblindwertprobe, blindwertfreie Venusmuscheln (Galicien) wurden mit natürlich kontaminierten Venusmuscheln (Portugal) vermischt
CRL/08/P02	Mies-muschel	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Mittelmeer-Miesmuschel)	Galicien (Spanien)	blindwertfreie Probe, im Einzelhandel erworben
CRL/08/P03 und CRL/08/P08	Mies-muschel	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Galicien (Spanien)	Parallelblindwertproben, blindwertfreies Material, das mit einem natürlich kontaminierten vermischt wurde
CRL/08/P04	Venus-muschel	<i>Spisula solida</i> (Feste Trogmuschel)	Sines (Portugal)	natürlich kontaminiert
CRL/08/P05	Mies-muschel	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Galicien (Spanien)	Probe CRL/08/P02 aufgestockt mit NRC-dcGTx2,3-b mit 0,807 µmol/kg Probe
CRL/08/P06	Venus-muschel	<i>Meretrix lyrata</i> (Japanische Venusmuschel)	Vietnam	Probe CRL/08/P10 aufgestockt mit NRC-dcGTx2,3-b mit 0,773 µmol/kg Probe
CRL/08/P09	Mies-muschel	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Galicien (Spanien)	Probe CRL/08/P02 aufgestockt mit NRC-dcGTx2,3-b mit 1,84 µmol/kg Probe
CRL/08/P10	Venus-muschel	<i>Meretrix lyrata</i>	Vietnam	blindwertfreie Probe
CRL/08/P11	Venus-muschel	<i>Meretrix lyrata</i>	Vietnam	Probe CRL/08/P10 aufgestockt mit NRC-dcGTx2,3-b mit 1,80 µmol/kg Probe

Tabelle A.5 — Durch die Leistungsprüfung ermittelte Präzisionsdaten für STX nach der SPE-C18-Reinigung

Probe	Praxis	1	2	3	4	5	5D	6	7	8	8D	9	10	10D	11	12	Aufsto- ckung 1	Aufsto- ckung 2	Aufsto- ckung 3	Aufsto- ckung 4	Aufsto- ckung 5 > HR
Jahr des Ringversuchs	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002
Anzahl der Laboratorien	12	15	15	15	15	15	15	15	14	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	11
Anzahl der nach der Eliminierung der Ausreißer verbliebenen Laboratorien	11	15	15	15	15	15	15	15	14	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	11
Anzahl der Ausreißer (Laboratorien)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	11	15	15	15	15	15	15	15	14	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	11
Mittelwert $\bar{x}$, µg/kg	471	1048	338	nd	nd	522	518	nd	23,4	310	316	132	136	144	258	784	223	447	51,3	169	13,2
Standardabweichung der Vergleichpräzision s_R , µg/kg	41,2	229	90,9			69,4	73,9		8,48	78,1	70,3	33,4	46,1	41,6	59,5	215	52,5	112	17,0	43,0	8,65
Relative Standardabweichung der Vergleichpräzision, RSD_R , %	8,74	21,9	26,9			13,3	14,3		36,3	25,2	22,3	25,2	33,9	28,8	23,1	27,5	23,5	25,2	33,1	25,4	65,6
Vergleichgrenze R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/kg	115	642	254			194	207		23,7	219	197	93,5	129	117	167	603	147	315	47,5	120	24,2
Horrat-Wert	0,49	1,38	1,43			0,75	0,81		1,29	1,32	1,17	1,16	1,57	1,35	1,18	1,65	1,17	1,39	1,32	1,22	2,14
Wiederfindung, %																	74,4	74,5	93,2	76,8	

Tabelle A.6 — Durch die Leistungsprüfung ermittelte Präzisionsdaten für STX nach der SPE-COOH-Reinigung

Probe	Praxis	1	2	3	4	5	5D	6	7	8	8D	9	10	10D	11	12	Aufsto- ckung 1	Aufsto- ckung 2	Aufsto- ckung 3	Aufsto- ckung 4	Aufsto- ckung 5
Jahr des Ringversuchs	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002	2002
Anzahl der Laboratorien	15	15	14	14	14	15	15	14	12	15	13	14	14	15	15	14	13	15	11	15	9
Anzahl der nach der Eliminierung der Ausreißer verbliebenen Laboratorien	15	15	14	14	14	15	15	14	12	15	13	14	14	15	15	14	13	15	11	15	9
Anzahl der Ausreißer (Laboratorien)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	15	15	14	14	14	15	15	14	12	15	13	14	14	15	15	14	13	15	11	15	9
Mittelwert $\bar{x}$, µg/kg	452	956	295	nd	nd	510	474	nd	21,3	270	269	120	140	124	233	644	191	409	43,6	148	10,4
Standardabweichung der Vergleichpräzision s_R , µg/kg	122	188	82,8			85,8	82,6		6,80	68,8	49,8	38,2	45,2	26,9	37,9	78,9	39,2	123	11,4	31,4	4,48
Relative Standardabweichung der Vergleichpräzision, RSD_R , %	26,9	19,6	28,1			16,8	17,4		31,9	25,5	18,5	31,9	32,3	21,8	16,3	12,3	20,5	30,0	26,1	21,2	42,9
Vergleichgrenze R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/kg	341	526	232			240	231		19,0	193	139	107	127	75,4	106	221	110	343	31,8	88,0	12,5
Horrat-Wert	1,49	1,22	1,46			0,95	0,97		1,12	1,31	0,95	1,45	1,50	0,99	0,82	0,72	1,00	1,64	1,02	1,00	1,35
Wiederfindung, %																	63,7	68,2	79,2	67,2	