

DIN EN 16187

ICS 67.230

Entwurf

Einsprüche bis 2013-03-07
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 16187
(DIN SPEC 91259):2011-06

**Lebensmittel –
Bestimmung von Fumonisin B₁ und B₂ in Säuglings- und
Kleinkindernahrung auf Maisbasis –
HPLC-Verfahren mit Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule und
Fluoreszenzdetektion nach Vorsäulenderivatisierung;
Deutsche Fassung prEN 16187:2012**

Foodstuffs –

Determination of fumonisin B₁ and fumonisin B₂ in processed maize containing foods for infants and young children –
HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection after precolumn derivatization;
German version prEN 16187:2012

Denrées alimentaires –

Dosage de la fumonisine B₁ et de la fumonisine B₂ dans les aliments pour nourrissons et jeunes enfants contenant du maïs transformé –
Méthode par CLHP avec purification sur colonne d'immunoaffinité et détection de fluorescence après dérivation précolonne;
Version allemande prEN 16187:2012

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2013-01-07 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 Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN, 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 21 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieser Europäische Norm-Entwurf (prEN 16187) wurde vom Technischen Komitee TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) nach eingehenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 5 „Biotoxine (Mycotoxine und Phycotoxine)“ erarbeitet.

Das zuständige deutsche Arbeitsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-03 AA „Biotoxine“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

Fumonisine sind weltweit verbreitete, wasserlösliche Mykotoxine, die durch bestimmte pflanzenpathogene Pilze der Gattung *Fusarium* insbesondere auf Mais gebildet werden. Am stärksten belastet sind nach Literaturangaben Maisgrieß und Maismehl. Höchstgehalte für die Fumonisine B₁ und B₂ wurden für Deutschland mit der Verordnung zur Änderung der Mykotoxin-Höchstmengenverordnung festgelegt. Sie enthält seit 2004 nicht nur Regelungen für Aflatoxine, sondern auch für Ochratoxin A, Fumonisine, Deoxynivalenol und Zearalenon. Seit 2001 werden die nationalen Bestimmungen durch EU-weit geltende Höchstgehaltregelungen für Kontaminanten in Lebensmitteln ergänzt. Höchstgehalte an Mykotoxinen in bestimmten Lebensmitteln werden außerdem noch durch verschiedene andere Verordnungen geregelt.

Für die im Inhalt zitierten Normen wird im Folgenden auf die entsprechende Deutsche Norm hingewiesen:

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696

Änderungen

Gegenüber DIN CEN/TS 16187 (DIN SPEC 91259):2011-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Die DIN SPEC wurde inhaltlich voll übernommen.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke; Anforderungen und Prüfungen (ISO 3696:1987)*

Lebensmittel — Bestimmung von Fumonisin B₁ und Fumonisin B₂ in Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Maisbasis — HPLC-Verfahren mit Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule und Fluoreszenzdetektion nach Vorsäulenderivatisierung

Denrées alimentaires — Dosage de la fumonisine B₁ et de la fumonisine B₂ dans les aliments pour nourrissons et jeunes enfants contenant du maïs transformé — Méthode par CLHP avec purification sur colonne d'immunoaffinité et détection de fluorescence après dérivation précolonne

Foodstuffs — Determination of fumonisin B₁ and fumonisin B₂ in processed maize containing foods for infants and young children — HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection after pre-column derivatization

ICS:

Deskriptoren

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

STD Version 2.4e - RC2

Inhalt

Seite

Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Chemikalien	4
5 Geräte	7
6 Durchführung	9
6.1 Extraktion	9
6.2 Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule	9
6.3 Aufstockverfahren	10
6.4 Derivatisierung und Bestimmung mit HPLC	10
6.4.1 Programm für die automatisierte Vorsäulenderivatisierung	10
6.4.2 HPLC-Injektionen	11
6.4.3 Peakidentifizierung	11
6.4.4 Bestimmung	11
7 Berechnung	11
8 Präzision	11
8.1 Allgemeines	11
8.2 Wiederholpräzision	12
8.3 Vergleichpräzision	12
9 Prüfbericht	13
Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme	14
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	15
Anhang C (informativ) Vergleich der Verfahren zur Bestimmung von Fumonisin in Mais im vorliegenden Dokument mit EN 14352:2004 und EN 13585:2001	18
Literaturhinweise	19

Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16187:2012) 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 die CEN/TS 16187:2011 ersetzen.

Bei der Umwandlung der CEN/TC 16187:2011 in diesen Europäischen Norm-Entwurf sind keine fachlichen Änderungen vorgenommen worden.

WARNUNG — Bei der Anwendung dieses Dokuments werden gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung die Anwendbarkeit einschränkender Vorschriften zu bestimmen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung von Fumonisin B₁ (FB₁) und Fumonisin B₂ (FB₂) in verarbeiteten Mais enthaltenden Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder fest. Hierzu wird die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule und Fluoreszenzdetektion (FLD) eingesetzt. Dieses Verfahren wurde in einem Ringversuch durch die Untersuchung sowohl von natürlich kontaminierten Proben als auch von aufgestockten Proben mit Gehalten von 112 µg/kg bis 458 µg/kg für FB₁ + FB₂, 89 µg/kg bis 384 µg/kg für FB₁ und 22 µg/kg bis 74 µg/kg für FB₂ validiert.

Weitere Informationen zur Validierung befinden sich in Abschnitt 8 und Anhang B.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente 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

Die Fumonisine werden mit einem Gemisch aus Citrat-Phosphat-Pufferlösung, Methanol und Acetonitril aus der Probe extrahiert. Der filtrierte Extrakt wird mit Wasser verdünnt und auf eine Immunoaffinitätssäule aufgebracht, die spezifische Antikörper gegen Fumonisine enthält. Die Fumonisine werden mit Methanol und Wasser von der Säule eluiert und durch HPLC/FLD mit Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd-Reagenz (OPA) quantitativ bestimmt.

4 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696:1995 verwendet. Die Lösemittel müssen, wenn nicht anders festgelegt, von geeignetem Reinheitsgrad für die HPLC-Analyse sein. Handelsübliche Lösungen mit gleichwertigen Eigenschaften wie die angegebenen dürfen verwendet werden.

WARNUNG — Die Entsorgung von Lösemittelabfällen muss nach den geltenden Umweltschutzregeln und -bestimmungen erfolgen. Die Internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer (IARC)) hat Dekontaminationshinweise für Laborabfälle herausgegeben, siehe [3].

4.1 Acetonitril.

WARNUNG — Acetonitril ist ein Gefahrstoff. Proben müssen mit einem Kreisschüttler im Abzugsschrank geschüttelt werden. Nach dem Schütteln müssen die Proben im Abzugsschrank filtriert werden.

4.2 Methanol

4.3 *o*-Phthaldialdehyd (OPA)

4.4 Citronensäure-Lösung, Stoffmengenkonzentration $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$

21,0 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ werden in Wasser gelöst und auf 1 l verdünnt.

4.5 Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung, $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,2 \text{ mol/l}$

28,4 g Na_2HPO_4 werden in Wasser gelöst und auf 1 l verdünnt.

4.6 2-Mercaptoethanol

4.7 Citrat-Phosphat-Pufferlösung

Ein Volumenteil Citronensäure-Lösung (4.4) wird mit einem Volumenteil Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (4.5) gemischt.

4.8 Extraktionslösemittel

Zwei Volumenteile Citrat-Phosphat-Pufferlösung (4.7) werden mit einem Volumenteil Methanol (4.2) und einem Volumenteil Acetonitril (4.1) gemischt.

4.9 Eisessig

4.10 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), $c(\text{NaCl}) = 137 \text{ mmol/l}$, $c(\text{KCl}) = 2,7 \text{ mmol/l}$, $c(\text{Phosphatpuffer}) = 10 \text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 7,4$ bei $T = 25^\circ\text{C}$

Eine Tablette aus handelsüblichen PBS-Substanzen wird in 200 ml Wasser gelöst.

4.11 Gemisch A aus Acetonitril und Wasser

Ein Volumenteil Acetonitril (4.1) wird mit einem Volumenteil Wasser gemischt. Dieses Lösemittel wird für die Herstellung von Aufstocklösungen verwendet.

4.12 Gemisch B aus Acetonitril und Wasser

Drei Volumenteile Acetonitril (4.1) werden mit sieben Volumenteilen Wasser gemischt. Dieses Lösemittel wird für die Herstellung von Kalibrierlösungen und zum erneuten Lösen von getrockneten Extrakten nach der Reinigung an der Immunoaffinitätssäule verwendet.

4.13 Natriumtetraborat-Lösung, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3,8 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ werden in 100 ml Wasser gelöst.

4.14 OPA-Reagenzlösung

40 mg OPA (4.3) werden in 1 ml Methanol (4.2) gelöst und mit 5 ml Natriumtetraborat-Lösung (4.13) verdünnt. Nach Hinzufügen von 50 μl 2-Mercaptoethanol (4.6) wird 1 min gemischt. Diese Reagenzlösung ist bei Raumtemperatur im Dunkeln in einem geschlossenen Braunglasfläschchen bis zu einer Woche stabil.

4.15 Mobile Phase für die HPLC

4.15.1 Mobile Phase A für die HPLC

30 Volumenteile Acetonitril (4.1) werden mit 69 Volumenteilen Wasser und einem Volumenteil Eisessig (4.9) gemischt.

4.15.2 Mobile Phase B für die HPLC

60 Volumenteile Acetonitril (4.1) werden mit 39 Volumenteilen Wasser und einem Volumenteil Eisessig (4.9) gemischt.