

DIN EN 17250

ICS 67.140.30; 67.220.10

Einsprüche bis 2018-06-27

Entwurf**Lebensmittel –**

Bestimmung von Ochratoxin A in Paprika, Chilli, schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischung, Süßholz, Kakao und Kakaoerzeugnissen nach Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule mit Hochleistungsflüssigchromatographie und Fluoreszenzdetektion; Deutsche und Englische Fassung prEN 17250:2018

Foodstuffs –

Determination of ochratoxin A in paprika, chilli, black & white pepper, nutmeg, spice mix, liquorice, cocoa and cocoa products by immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography with fluorescence detection;
German and English version prEN 17250:2018

Produits alimentaires –

Détermination de la teneur en ochratoxine A dans du paprika, des piments, des poivres noir et blanc, de la noix de muscade, dans un mélange d'épices, dans la réglisse, dans le cacao et les produits à base de cacao, par purification sur colonne d'immunoaffinité et chromatographie liquide haute performance avec détection de fluorescence;
Version allemande et anglaise prEN 17250:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-04-27 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe 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/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe 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, 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 53 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17250:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

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

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

ISO 5725 (all parts) siehe DIN ISO 5725 (alle Teile)

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725 (alle Teile), *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen*

Lebensmittel — Bestimmung von Ochratoxin A in Paprika, Chilli, schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischung, Süßholz, Kakao und Kakaoerzeugnissen nach Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule mit Hochleistungsflüssigchromatographie und Fluoreszenzdetektion

Produits alimentaires — Détermination de la teneur en ochratoxine A dans du paprika, des piments, des poivres noir et blanc, de la noix de muscade, dans un mélange d'épices, dans la réglisse, dans le cacao et les produits à base de cacao, par purification sur colonne d'immunoaffinité et chromatographie liquide haute performance avec détection de fluorescence

Foodstuffs — Determination of ochratoxin A in paprika, chilli, black & white pepper, nutmeg, spice mix, liquorice, cocoa and cocoa products by immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography with fluorescence detection

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Chemikalien	5
6 Geräte und Ausrüstung	9
7 Durchführung	10
8 HPLC-Analyse	12
9 Berechnung	13
10 Präzision	14
11 Prüfbericht	16
Anhang A (informativ) Beispielchromatogramme	17
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	21
Literaturverzeichnis	25

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17250:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben.

Einleitung

Die chemische Struktur des Mykotoxins Ochratoxin A enthält eine Dihydrocumarin-Einheit, die mit einem L- β -Phenylalanin-Molekül über eine Amidbindung verbunden ist. Ochratoxin A wird von einigen Pilzarten der *Penicillium*- und *Aspergillus*-Gattungen, vor allem *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* und *Aspergilli* der Sektion *Nigri*, insbesondere *A. carbonarius*, gebildet. Vor allem werden Getreidearten wie Weizen sowie eine Vielzahl von anderen Lebensmitteln, wie zum Beispiel Trockenobst, Gewürze, Kakao, Kaffee, Wein, Bier und Süßholzwurzel befallen.

WARNUNG — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, (EU) Nr. 1907/2006 [3] sowie geeignete nationale Mitteilungen, wie z. B. in [4] sollten berücksichtigt werden.

WARNUNG — 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.

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

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung von Ochratoxin A (OTA) in Chilli, Paprika, schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss, einer Gewürzmischung, Süßholzwurzel (Wurzel und Extrakte), Kakao und Kakaoerzeugnisse durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, en: high performance liquid chromatography) und Fluoreszenzdetektion nach Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule.

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

Weitere Informationen zur Validierung siehe Abschnitt 9 und Anhang B.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Laborzwecke — Anforderungen und Prüfungen (ISO 3696)*

3 Begriffe

Es werden keine Begriffe in diesem Dokument angegeben.

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

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

4 Kurzbeschreibung

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

5 Chemikalien

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

5.1 Stickstoffgas, gereinigt, Reinheitsgrad mindestens 99,95 %.

5.2 Methanol, technischer Reinheitsgrad.

5.3 Methanol, für HPLC.

5.4 Acetonitril, für HPLC.

5.5 Eisessig, Reinheitsgrad 100 %.

5.6 Toluol, UV-Reinheitsgrad.

5.7 Natriumhydrogencarbonat, Reinheitsgrad mindestens 99,5 %.

5.8 Natriumchlorid (NaCl), Reinheitsgrad mindestens 99 %.

5.9 Dinatriumhydrogenorthosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), Reinheitsgrad mindestens 99 %.

5.10 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Reinheitsgrad mindestens 99 %.

5.11 Kaliumchlorid (KCl), Reinheitsgrad mindestens 99 %.

5.12 Natriumhydroxid (NaOH), Reinheitsgrad mindestens 99 %.

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

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

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

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

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

5.16 Essigsäurelösung, Massenkonzentration $\rho(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1 \text{ g/l}$.

10 ml Eisessig (5.5) werden mit Wasser auf 1 l verdünnt.

5.17 Polysorbat 20

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

20 g Polysorbat 20 (5.17) werden in 1 000 ml Wasser der Qualität 3 (destilliert) verdünnt.

5.19 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH = 7,5.

8 g NaCl (5.8), 2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (5.9), 0,2 g KH_2PO_4 (5.10) und 0,2 g KCl (5.11) werden in 900 ml Wasser gelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit Salzsäurelösung (5.14) oder Natronlauge (5.15) je nach Bedarf auf pH = 7,4 eingestellt und dann mit Wasser auf 1 l verdünnt.

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

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

30 g Natriumhydrogencarbonat (5.7) werden 1 000 ml Wasser der Qualität 3 hinzugefügt.

5.21 Extraktionslösemittel A (für Paprika, Chilli, schwarzen und weißen Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischung und Süßholzwurzel).

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

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

5.22 Extraktionslösemittel B (für Kakao und Kakaoerzeugnisse).

Methanol (5.2) wird mit Wasser Grad 3 (destilliert) gut gemischt (80 + 20, v + v).

5.23 HPLC mobile Phase A (für eine annehmbare Trennung von Ochratoxin A bei Paprika und Chilli von anderen Störsubstanzen im Chromatogramm).

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

5.24 HPLC mobile Phase B (für eine annehmbare Trennung bei Süßholzwurzel).

Methanol (5.3), wird mit Wasser der Qualität 1 und Eisessig (5.5) gemischt (70 + 30 + 10, v + v + v).

5.25 HPLC mobile Phase C (für eine annehmbare Trennung bei schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss, einer Gewürzmischung, Kakao und Kakaoerzeugnissen).

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

5.26 HPLC mobile Phase D (HPLC-Säulen-Spüllösung für Süßholzwurzel).

100 % Methanol (5.3).

5.27 Immunoaffinitätssäule

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

5.28 Ochratoxin A, in Kristallform oder als Film in Ampullen.

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

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

Zur Bestimmung der genauen Konzentration wird die Absorptionskurve zwischen 300 nm und 370 nm in 5-nm-Schritten in 1-cm-Quarzküvetten (5.22) mit einem Spektralphotometer gegen das Lösemittelgemisch (Toluol + Eisessig, 99 + 1, v + v) aufgezeichnet. Die Wellenlänge bei der höchsten Absorption wird ermittelt und die Massenkonzentration von Ochratoxin A, ρ , in Mikrogramm je Milliliter, wird nach Gleichung (1) berechnet:

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

Dabei ist

- ρ die Massenkonzentration von Ochratoxin A in $\mu\text{g/ml}$;
- $A_{\max}$ die im Maximum der Absorptionskurve ermittelte Absorption (hier bei 333 nm);
- M die Molmasse von Ochratoxin A in g/mol (hier: $M = 403,8 \text{ g/mol}$);
- ε der molare Extinktionskoeffizient von Ochratoxin A im Lösemittelgemisch (Toluol + Eisessig: 99 + 1, v + v) in m^2/mol (hier: $544 \text{ m}^2/\text{mol}$);
- b die Schichtdicke (optische Weglänge) der Quarzküvette, in cm.

Diese Lösung kann bei Lagerung bei etwa -18 °C 6 Monate verwendet werden. Vor dem Öffnen muss die Lösung Raumtemperatur erreichen. Die Massenkonzentration muss geprüft werden, wenn die Lösung älter als 6 Monate ist.

Alternativ dürfen fertig vorbereitete Lösungen verwendet werden, ohne dass sie spektralphotometrisch überprüft werden, sofern mit dem Produkt ein Zertifikat geliefert wurde, das einen ausreichenden Nachweis für die Richtigkeit des angegebenen Massenanteils gibt.

5.30 Ochratoxin A-Standardlösung, $\rho(\text{Ochratoxin A}) = 1\text{ }\mu\text{g/ml}$.

100 μl Ochratoxin A-Stammlösung (5.29) werden in einen 1-ml-Messkolben (6.11) pipettiert (6.5), im leichten Stickstoffstrom (5.1) zur Trockene gebracht, auf 1 ml (bis zur Marke) mit der entsprechenden mobilen Phase (5.23, 5.24 oder 5.26) gelöst und kräftig geschüttelt. Dies ergibt eine Standardlösung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Ochratoxin A. Diese Lösung kann bei Lagerung bei etwa -18 °C 6 Monate verwendet werden.

5.31 Ochratoxin A-Aufstocklösung, $\rho(\text{Ochratoxin A}) = 400\text{ ng/ml}$.

1 ml Ochratoxin A-Stammlösung (5.29) wird in einen kalibrierten 25-ml-Messkolben (6.11) pipettiert, mit einem Gemisch aus Acetonitril (5.4) und Eisessig (5.5) im Verhältnis 99 + 1 [v/v] auf 25 ml aufgefüllt und geschüttelt. Dies ergibt eine Aufstocklösung mit 400 ng/ml Ochratoxin A.

Diese Lösung kann bei Lagerung bei etwa -18 °C 6 Monate verwendet werden. Vor dem Öffnen muss die Lösung Raumtemperatur erreichen. Die Massenkonzentration muss geprüft werden, wenn die Lösung älter als 6 Monate ist.

5.32 Kalibrierlösungen

Aus der Standardlösung (5.30) werden sechs HPLC-Kalibrierlösungen hergestellt.

Beispielsweise werden die Volumina der Ochratoxin A-Standardlösung (5.30) nach Tabelle 1 jeweils einzeln in die entsprechenden Messkolben gegeben. Jeder Messkolben wird mit der mobilen Phase (5.23; 5.24; 5.26) bis zur Marke aufgefüllt, verschlossen und von Hand geschüttelt. Dies ergibt sechs Ochratoxin A-Kalibrierlösungen mit etwa den in Tabelle 1 aufgeführten Konzentrationen.

Diese sechs Kalibrierlösungen decken einen Bereich von etwa 1,2 $\mu\text{g/kg}$ bis etwa 100 $\mu\text{g/kg}$ für Ochratoxin A in Paprika, Chili, schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischungen und Süßholzwurzel und von etwa 2,4 $\mu\text{g/kg}$ bis etwa 200 $\mu\text{g/kg}$ für Ochratoxin A in Süßholzwurzelernis ab.

Die Kalibrierlösungen müssen vor Licht geschützt werden und können bei Lagerung bei -18 °C 1 Monat verwendet werden.

Tabelle 1 — Herstellung der HPLC-Kalibrierlösungen

Kalibrierlösung	Standardlösung (5.30) μl	Endvolumen ml	Massenkonzentration der Kalibrierlösung ng/ml
1	15	50	0,3
2	15	25	0,6
3	25	25	1
4	50	10	5
5	150	10	15
6	250	10	25

Die exakten Konzentrationen an Ochratoxin A in den Kalibrierlösungen werden aus der ursprünglichen Konzentration der Stammlösung (5.29) und den nachfolgenden Volumina berechnet.

Diese Lösungen werden vor der Injektion in LC-Fläschchen (6.10) überführt.

6 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborglasgeräte und Ausrüstung, und insbesondere die Folgenden:

- 6.1 Erlenmeyerkolben**, mit Schraubverschluss, 500 ml Kapazität oder ähnliche Behälter.
- 6.2 Laborwaage**, Fehlergrenze: 0,01 g.
- 6.3 Analysenwaage**, Fehlergrenze: 0,1 mg.
- 6.4 Laborschüttler und Schüttler für Zentrifugenröhrchen.**
- 6.5 Pipetten**, z. B. 100 µl bis 2 000 µl und 4 ml Messpipetten, geeignet für organische Lösemittel.
- 6.6 Einwegspritzenbehälter**, 100 ml, mit Verbindungen zum Aufstecken an die Immunoaffinitätssäule.
- 6.7 Glas-Mikrofaser-Filterpapier**, 1,6 µm Porengröße, 150 mm Durchmesser oder gleichwertig. Alternativ darf Filterpapier (6.8) verwendet werden, wenn nachweislich äquivalente Ergebnisse erzielt wurden.
- 6.8 Zellulose-Filterpapier**, 11 µm Porengröße, 150 mm Durchmesser.
- 6.9 Automatisiertes SPE-Vakuumsystem**
- 6.10 LC-Fläschchen**, ca. 2 ml Fassungsvermögen, mit Bördekappen oder gleichwertig.
- 6.11 Messkolben**, mit verschiedenen Kapazitäten (z. B. 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml).
- 6.12 Erlenmeyerkolben**, 100 ml oder 500 ml mit Schraubverschluss.
- 6.13 HPLC-System**, bestehend aus:
 - 6.13.1 HPLC Pumpe**, für einen Gradienten und geeignet für einen Durchfluss von 0,8 ml/min pulsfrei und 1,0 ml/min pulsfrei.
 - 6.13.2 Injektionssystem**
 - 6.13.3 Vorsäule**, mit der gleichen stationären Phase oder ähnlich wie die Trennsäule, mit geeigneten Dimensionen.
 - 6.13.4 Umkehrphasen-Trennsäule** Eine geeignete Säule und geeignete HPLC-Bedingungen (isokratisch oder Gradientenprogramm) mit einem Retentionsfaktor von mindestens 2, die eine Basislinienauftrennung zum Unterscheiden des Ochratoxin-A-Peaks von allen anderen Peaks ermöglichen.

Einige Beispiele von Säulen, die sich als geeignet erwiesen haben, werden nachstehend angegeben:

Eine C18 RP-Säule (fully endcapped, stable bond) (250 mm × 4,5 mm ID × 5 µm) hat sich für die Untersuchung von Chili und Paprika mit der mobilen Phase A (5.23) als geeignet gezeigt. Für die Untersuchung von Süßholzwurzel und Süßholzwurzelerzeugnissen mit der gleichen Säule wurde die mobile Phase B (5.24) und die mobile Phase (Spüllösung) D (5.26) als geeignet befunden.

Eine Phenylhexylsäule (100 mm × 4,5 mm ID × 2,7 µm) hat sich für die Untersuchung von schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss, einer Gewürzmischung sowie Kakao und Kakaoyerzeugnissen als geeignet

gezeigt. Insbesondere hat diese Säule bei weißem Pfeffer Ochratoxin A gut von störenden Peaks getrennt, wobei die mobile Phase C (5.25) verwendet wurde.

6.13.5 Entgaser, optional, zum Entgasen von mobilen Phasen (5.23, 5.24, 5.25, 5.26).

6.13.6 Säulenofen, geeignet für eine gleichbleibende Temperatur.

6.13.7 Fluoreszenzdetektor.

6.13.8 Datenauswertungssystem.

7 Durchführung

7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Laborprobe wird gründlich gemischt oder gerührt, bevor die Einwaage entnommen wird. Die Einwaage wird in einen Erlenmeyerkolben oder ein ähnliches Gefäß von 500 ml (6.12) eingewogen.

7.2 Extraktion

Bei Paprika, Chilli, schwarzen und weißen Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischung, Kakao und Kakaoerzeugnisse wird beispielsweise eine Einwaage von 12,5 g (*m*) auf 0,1 g eingewogen und bei Süßholzwurzel wird beispielsweise eine Einwaage von 10 g (*m*) auf 0,1 g eingewogen.

Das Verhältnis der Einwaage zum Lösemittel beträgt 1 zu 8, außer bei Süßholzwurzel, bei der das Lösemittelverhältnis 1 zu 20 beträgt.

Bei Paprika, Chilli, schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss oder Gewürzmischung werden 100 ml (V_1) Extraktionslösemittel A (5.21) hinzugegeben. Bei Kakao und Kakaoerzeugnissen werden 100 ml (V_1) Extraktionslösemittel B (5.22) hinzugegeben. Bei Süßholzwurzel werden 200 ml (V_1) Extraktionslösemittel A (5.21) hinzugefügt. Der Inhalt wird einige Sekunden von Hand gemischt, um eine homogene Suspension zu erhalten, und dann 40 min mit einem Laborschüttler (6.4) geschüttelt.

Mindestens 10 ml Extrakt werden auf den 150-mm-Glasfaser- (oder Zellulose-) Faltenfilter (6.7, 6.8) geben. Der gefilterte Extrakt wird in einem Behälter mit Schraubverschluss (6.1) zur weiteren Untersuchung gesammelt. Anschließend wird sofort mit der Reinigung an der Immunoaffinitätssäule (7.3) fortgefahren.

7.3 Immunoaffinitätssäulenreinigung

Die Immunoaffinitätssäule (5.27) wird mit dem SPE-Vakuumsystem (6.9) verbunden und ein Einwegspritzenbehälter (6.6) an der Immunoaffinitätssäule befestigt.

Säulen müssen vor dem Gebrauch Raumtemperatur erreichen.

Für Paprika, Chilli, schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischung, Kakao und Kakaoerzeugnisse werden 50 ml PBS (5.19) und 1 ml 2 % Polysorbat 20® (5.18) in den Einwegspritzenbehälter (6.6) eingebracht sowie 4 ml [V_2] des gefilterten Extraktes nach 7.2 pipettiert (6.5) und der Inhalt gemischt.

Für Süßholzwurzel werden 15 ml PBS (5.19) in den Einwegspritzenbehälter (6.6) eingebracht sowie 0,5 ml [V_2] des gefilterten Extraktes nach 7.2 pipettiert (6.5) und der Inhalt gemischt.

Die Mischung (Extrakt und PBS) werden durch Schwerkraft bei konstantem Durchfluss (der Durchfluss muss eine Geschwindigkeit von 1 Tropfen/Sekunde betragen, was etwa 3 ml/min bedeutet) durch die Säule laufen gelassen bis der gesamte Extrakt durch die Säule gelaufen ist und der letzte Lösemittelanteil die Säulenfritte erreicht hat.

Falls erforderlich, darf der Prozess durch leichten Druck auf die Immunoaffinitätssäule mit einer Spritze oder durch leichten Unterdruck beschleunigt werden (z. B. unter Verwendung des unter 6.9 beschriebenen

SPE-Vakuumsystems). In beiden Fällen muss darauf geachtet werden, dass der Durchfluss 3 ml/min (= 1 Tropfen/s) nicht überschreitet.

ACHTUNG — Bei Verwendung eines automatisierten SPE-Vakuumsystems ist zusätzliche Vorsicht erforderlich, da sich die Durchflussmenge durch die Säule nicht so stark erhöhen darf, dass die Wiederfindung nachteilig beeinflusst wird.

7.4 Vorbereitung der Probenmesslösung

Bei Paprika und Chilli wird die Säule mit 10 ml Wasser bei maximal 3 ml/min gewaschen. Die Säule wird anschließend mit 50 ml Luft getrocknet, die mit einer Spritze durch die Säule gedrückt wird. Bei schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischung, Kakao und Kakaoerzeugnissen sowie Süßholzwurzel wird die Säule mit 1 ml 2 %iger Polysorbat® 20-Lösung (5.18), gefolgt von 10 ml Wasser bei maximal 3 ml/min gewaschen. Bei Süßholzwurzel werden die Waschschrte wiederholt. Die Säule wird getrocknet, indem Stickstoff oder Luft etwa 1 s bis 2 s durchgedrückt wird. Das Eluat aus diesem Reinigungsschritt wird verworfen.

Bei Paprika, Chilli, schwarzen und weißen Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischung, Kakao und Kakaoerzeugnisse wird ein 2-ml-Messkolben (6.11) unter die Säule gestellt, 0,5 ml Methanol (5.3) durch die Säule geben und das Eluat gesammelt. Nachdem die letzten Tropfen Methanol durch die Säule gelaufen sind, wird etwa 1 min gewartet. Dann werden weitere 0,5 ml Methanol (5.3) in gleicher Weise zugeben und das Eluat gesammelt. Schließlich werden erneut 0,5 ml Methanol (5.3) zugeben und das Eluat gesammelt. Durch die Säule wird vorsichtig Luft gedrückt wobei alle verbleibenden Tropfen gesammelt werden. Der Kolben wird mit Essigsäurelösung (5.16) bis zur Marke aufgefüllt und geschüttelt. Dies ergibt ein Endvolumen von exakt 2,0 ml [V_3]. Eine ausreichende Menge wird in ein LC-Fläschchen (6.10) übertragen und dieses wird verschlossen.

Für Süßholzwurzel wird ein 2-ml-Fläschchen (6.10) unter die Säule gestellt, 0,5 ml Methanol (5.3) durch die Säule laufen gelassen und das Eluat aufgefangen. Nachdem die letzten Tropfen Methanol durch die Säule gelaufen sind, wird etwa 1 min gewartet. Dann werden weitere 0,5 ml Methanol (5.3) nach dem gleichen Verfahren zugegeben und das Eluat gesammelt. Schließlich werden 0,5 ml Methanol (5.3) zugeben und auch dieses Eluat gesammelt. Durch die Säule wird vorsichtig Luft gedrückt wobei alle verbleibenden Tropfen gesammelt werden.

Das methanolische Eluat wird im leichten Stickstoffstrom (5.1) bei etwa 30 °C bis 35 °C bis zur Trockene eingengt. Der gereinigte Probenrückstand wird in 200 µl [V_3] mobiler Phase B (5.24) gelöst, das Fläschchen verschlossen und auf einem Vortex-Mischer (6.4) mindestens 15 s geschüttelt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der untere Teil des Fläschchens gründlich mit Lösemittel gespült wird. Die so erhaltene Prüflösung wird in ein Einsatzfläschchen (6.10) gegeben und untersucht.

ACHTUNG — Da das gesamte Eluat aus der Immunoaffinitätssäule für die quantitative Bestimmung verwendet wird, ist es sehr wichtig, die Immunoaffinitätssäule nach dem Waschvorgang und nach der Elution mit Methanol gründlich mit Luft zu trocknen. Es ist ebenso wichtig, dass die LC-Fläschchen vor der Injektion gut geschüttelt werden, damit die Homogenität der Lösung vor der Injektion sichergestellt ist.

7.5 Aufstockmethode (optional, wenn kein CRM benutzt wird)

Bei Paprika, Chilli, schwarzem und weißem Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischung, Kakao und Kakaoerzeugnisse werden 12,5 g auf 0,1 g und bei Süßholzwurzel werden von der rückstandsfreien Blindprobe 10 g auf 0,1 g in einen Erlenmeyerkolben oder einen ähnlichen Behälter von 500 ml (6.12) eingewogen. 40 µl Ochratoxin A-Aufstocklösung (5.31) werden auf die Blindprobe pipettiert. Nach Zugabe der Aufstocklösung wird das Lösemittel mindestens 2 h vor der Extraktion im Abzug verdampfen gelassen. Dann wird wie in 7.2 beschrieben vorgegangen, wobei mit der Zugabe des Extraktionslösemittels begonnen wird.

8 HPLC-Analyse

8.1 HPLC-Betriebsbedingungen

8.1.1 Allgemeines

Von der Probenmesslösung und jeder Kalibrierlösung werden gleiche Volumina in das HPLC-FLD-System injiziert.

8.1.2 Paprika und Chilli (mobile Phase A)

Bei Verwendung einer C18-Säule nach 6.13.4 und der mobilen Phase A nach 5.23 haben sich folgende Einstellungen als geeignet erwiesen:

Durchfluss:	0,8 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Temperatur des Säulenofens (einschließlich der Vorsäule):	22 °C ± 1 °C
Temperatur des Autosamplers (optional):	15 °C bis 20 °C
Anregungswellenlänge:	332 nm
Emissionswellenlänge:	476 nm

Ochratoxin A eluiert mit einer Retentionszeit von etwa 6,6 min. Andere Säulenabmessungen dürfen verwendet werden, sofern die erforderliche Auflösung erreicht wird. Dies muss nachgewiesen werden (die maximale Überschneidung von Ochratoxin A mit anderen eventuell vorhandenen Peaks muss weniger als 10 % betragen). Der Durchfluss darf entsprechend der Säulenabmessungen angepasst werden. Ein typisches Chromatogramm für Paprika ist in Anhang A, Bild A.1 dargestellt.

8.1.3 Süßholzwurzel (mobile Phase B)

Bei Verwendung einer C18-Säule nach 6.13.4 und der mobilen Phase B nach 5.24 haben sich folgende Einstellungen als geeignet erwiesen:

Durchfluss:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Temperatur des Säulenofens (einschließlich der Vorsäule):	22 °C ± 1 °C
Temperatur des Autosamplers (optional):	15 °C bis 20 °C
Anregungswellenlänge:	332 nm
Emissionswellenlänge:	476 nm

Ochratoxin A eluiert mit einer Retentionszeit von etwa 10 min. Ein typisches Chromatogramm für Süßholzwurzel ist in Anhang A, Bild A.2 dargestellt.

Da der gereinigte Extrakt nach der Reinigung an der Immunoaffinitätssäule noch Substanzen enthalten kann, die nach dem beabsichtigten chromatographischen Durchlauf als breite Peaks in einem weiteren chromatographischen Durchlauf eluieren können, wurde es als wichtig erkannt, dass die Säule 10 min mit der mobilen Phase D (5.26) als Spüllösung vor dem nächsten Durchlauf gewaschen wird, gefolgt von 10 min Equilibrierung mit der mobilen Phase B (5.24). Dieser Waschschrift kann ausgelassen werden, wenn keine Störungen durch spät eluierende Peaks festgestellt werden.

ANMERKUNG Die Notwendigkeit eines Waschschrifts variiert für verschiedene Probenarten.

8.1.4 Schwarzer und weißer Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischung, Kakao und Kakaoerzeugnisse (mobile Phase C)

Bei der Verwendung einer Phenylhexyl-Säule nach 6.13.4 und der in 5.25 angegebenen mobilen Phase C haben sich folgende Einstellungen als geeignet erwiesen:

Durchfluss:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Temperatur des Säulenofens (einschließlich der Schutzsäule):	50 °C ± 1 °C
Temperatur des Autosamplers (optional):	15 °C bis 20 °C
Anregungswellenlänge:	332 nm
Emissionswellenlänge:	476 nm

Ochratoxin A eluiert mit einer Retentionszeit von etwa 5,7 min. Typische Chromatogramme für weißen Pfeffer und Muskatnuss sind in Anhang A, Bild A.3 bzw. Bild A.4 dargestellt.

8.2 Kalibrierkurve

Eine Kalibrierkurve wird hergestellt, indem zu Beginn jedes Analysentages 20 µl der sechs Ochratoxin-A-Kalibrierlösungen (siehe Tabelle 1) injiziert werden.

Die Peakflächen werden als Fläche oder Höhe (Y-Achse) gegen die entsprechenden Massenkonzentrationen der Ochratoxin-A-Kalibrierlösungen (5.32) [ng/ml] (X-Achse) aufgezeichnet und die Kalibriergerade wird mit linearer Regression berechnet.

8.3 Peak-Identifizierung

20 µl der Probenmesslösungen werden in das HPLC-System unter denselben Bedingungen wie bei der Erstellung der Kalibriergerade injiziert.

Der Ochratoxin-A-Peak in der Probenmesslösung wird durch Vergleich der Retentionszeit der Probe mit der der Kalibrierlösungen identifiziert. Die Konzentration von Ochratoxin A in der Probenmesslösung muss innerhalb des Kalibrierbereichs liegen. Falls die Massenkonzentration von Ochratoxin A in der Probenmesslösung außerhalb des Kalibrierbereichs liegt, darf eine geeignete Kalibriergerade hergestellt werden. Alternativ darf die Probenmesslösung auf eine Massenkonzentration von Ochratoxin A verdünnt werden, die für die etablierte Kalibriergerade geeignet ist. Der Verdünnungsfaktor muss in allen nachfolgenden Berechnungen berücksichtigt werden.

9 Berechnung

Die Massenkonzentration an Ochratoxin A, ρ , in ng/ml, in der Probenmesslösung wird mit der sich daraus ergebenden Funktion ($y = ax + b$) und der Gleichung (2) berechnet:

$$\rho = \frac{S - b}{a} \quad (2)$$

Dabei ist

- S das Signal des Ochratoxin A-Peaks, der aus dem Chromatogramm der Testlösung erhalten wird;
- a der Wert der Steigung der linearen Funktion;
- b der Wert, bei dem die Kalibrierfunktion die Y-Achse schneidet.

Der Massenanteil an Ochratoxin A in der Einwaage, w , in ng/ml, wird mit Gleichung (3) berechnet:

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3}{m \times V_2} \quad (3)$$

Dabei ist

- ρ die Massenkonzentration von Ochratoxin A im Aliquot der injizierten Prüflösung, und entsprechend der Fläche des Ochratoxin A-Peak, in ng/ml;
- V_1 das Volumen des Extraktionslösemittels, das für die Extraktion der Untersuchungsprobe verwendet wird, in ml;
- V_2 das Volumen des auf die Immunoaffinitätssäule aufgetragenen Probenextraktes, in ml;
- V_3 das Endvolumen der Probenmesslösung, in ml;
- m das Gewicht der extrahierten Untersuchungsprobe, in g.

Dies ergibt $w = \rho \times 4$ für Paprika, Chilli, schwarzen und weißen Pfeffer, Muskatnuss, Gewürzmischung, Kakao und Kakaoerzeugnisse sowie in $w = \rho \times 8$ für Süßholzwurzel.

10 Präzision

10.1 Allgemeines

Einzelheiten über einen Ringversuch zur Präzision des Verfahrens sind in Anhang B zusammengefasst. Die aus diesem Ringversuch abgeleiteten Werte sind nicht unbedingt auf andere als die in Anhang B angegebenen Konzentrationsbereiche und Matrices anwendbar.

10.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Prüfergebnissen, die ein einzelner Bearbeiter an identischem Untersuchungsmaterial mit denselben Geräten innerhalb der kürzesten möglichen Zeitspanne erhält, überschreitet die Wiederholgrenze r in Tabelle 2 nicht häufiger als in 5 % der Fälle (siehe Tabelle 2).

10.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Prüfergebnissen, die zwei Laboratorien für identisches Untersuchungsmaterial erhalten, überschreitet die Vergleichgrenze R in Tabelle 2 nicht häufiger als in 5 % der Fälle, siehe Tabelle 2.