

DIN EN 17251



ICS 67.120.10

Einsprüche bis 2018-06-27

Entwurf**Lebensmittel –****Bestimmung von Ochratoxin A in Schweinefleisch und Schweinefleischerzeugnissen mit Hochleistungsflüssigchromatographie und Fluoreszenzdetektion (HPLC-FLD); Deutsche und Englische Fassung prEN 17251:2018****Foodstuffs –**

Determination of ochratoxin A in pork meat and derived products by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD); German and English version prEN 17251:2018

Produits alimentaires –

Dosage de l'ochratoxine A dans la viande de porc et les produits dérivés par CLHP-FLD; Version allemande et anglaise prEN 17251:2018

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 44 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17251:2018) 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 (alle Teile) 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 Schweinefleisch und Schweinefleischerzeugnissen mit Hochleistungsflüssigchromatographie und Fluoreszenzdetektion (HPLC-FLD)

Produits alimentaires — Dosage de l'ochratoxine A dans la viande de porc et les produits dérivés par CLHP-FLD

Foodstuffs — Determination of ochratoxin A in pork meat and derived products by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD)

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 Verfahren	10
7.1 Probenvorbereitung	10
7.2 Extraktion von Ochratoxin A aus der Probe	10
7.2.1 Allgemeines	10
7.2.2 Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule	10
7.3 Aufstockung	11
8 LC-MS/MS Analyse	11
8.1 Allgemeines	11
8.2 HPLC-Betriebsbedingungen	11
8.3 Kalibriergerade	12
8.4 Identifizierung	12
9 Berechnung	12
10 Präzision	13
10.1 Allgemeines	13
10.2 Wiederholpräzision	13
10.3 Vergleichpräzision	13
11 Prüfbericht	14
Anhang A (informativ) Beispielchromatogramme	15
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	19
Literaturhinweise	21

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17251:2018) 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 unter einem Normungsauftrag erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Einleitung

Ochratoxine gehören zur Klasse der Pentaketid-Moleküle, die aus Dihydroisocumarin verbunden mit β -Phenylalanin entstehen. Ochratoxin A (OTA) entsteht hauptsächlich durch *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* und *A. niger* in tropischen Regionen und *Penicillium verrucosum* in gemäßigten Breiten. Die Aufnahme geschieht hauptsächlich aus Getreiden und Getreideerzeugnissen, aber es wird auch in einer Vielzahl von Lebensmitteln nachgewiesen wie Kaffee, Nüssen, Wein, Bier, Trockenobst und Gewürzen. Ochratoxin A kann auch in Schweinefleisch und Schweinefleischerzeugnissen nachgewiesen werden.

WARNUNG 1 — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, (EG) Nr. 1907/2006 [3] (in ihrer letzten Fassung), sowie geeignete nationale Erklärungen sollten berücksichtigt werden.

WARNUNG 2 — 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 3 — Ochratoxin A wurde als Substanz der Gruppe 2B der International Agency for Research on Cancer (IARC) eingestuft, was bedeutet, dass ausreichende Kenntnisse über die Nierentoxizität bei Tieren und auch vermutlich beim Menschen vorliegen.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung von Ochratoxin A (OTA) in Schweinefleischerzeugnissen, insbesondere Schinken, Schweinefleischerzeugnisse (geschnittenes Schweinefleisch in Dosen) und Schweineleber mit Hochleistungsflüssigchromatographie mit Fluoreszenzdetektion (LC-FLD).

Das Verfahren wurde für Ochratoxin A in natürlich kontaminiertem Schinken, Schweinefleischerzeugnissen (geschnittenem Schweinefleisch in Dosen) und Schweineleber in Gehalten von etwa 5 µg/kg bis 11 µg/kg validiert [4], [5], [6].

Laborerfahrungen haben gezeigt, dass dieses Verfahren auch auf Pastete und Nieren anwendbar ist [4].

2 Normative Verweisungen

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

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696)*

3 Begriffe

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

Ochratoxin A wird durch Mischen der Untersuchungsprobe mit einer Mischung aus Methanol und wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Der Extrakt wird zentrifugiert, mit einer Mischung aus Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und einer Polysorbat-20-Lösung verdünnt und auf eine Immunoaffinitätsäule aufgebracht, die OTA-spezifische Antikörper enthält.

Der gereinigte Extrakt wird mit Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC) und Fluoreszenzdetektion (FLD) quantifiziert.

5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Die Lösemittel müssen, wenn nicht anders festgelegt, von geeignetem Reinheitsgrad für die LC-Analyse sein. Handelsübliche Lösungen mit vergleichbaren Eigenschaften zu den aufgelisteten dürfen verwendet werden.

5.1 Methanol, (CH₃OH) technisch.

5.2 Methanol, (CH₃OH) HPLC-Reinheit.

5.3 Acetonitril, (CH_3CN) HPLC-Reinheit.

5.4 Eisessig, Volumenanteil $\varphi(\text{CH}_3\text{COOH})$ etwa 99 %.

5.5 Toluol, UV-Reinheit.

5.6 Lösemittelmischung aus Toluol und Eisessig.

Toluol (5.5) und Eisessig (5.4) werden gemischt (99+1, v+v).

5.7 Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), Reinheit mindestens 99 %.

5.8 Natriumchlorid (NaCl), Reinheit mindestens 99 %.

5.9 Di-Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), Reinheit mindestens 99 %.

5.10 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Reinheit mindestens 99 %.

5.11 Kaliumchlorid (KCl), Reinheit mindestens 99 %.

5.12 Natriumhydroxid (NaOH), Reinheit mindestens 99 %.

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

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

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

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

8,0 g NaOH (5.12) werden in einen 1-l-Messkolben (6.11) eingebracht und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

5.16 Essigsäurelösung, Massenkonzentration $\rho(\text{CH}_3\text{COOH}) = 20 \text{ g/l}$ (2 %).

20 g Eisessig (5.4) werden zu 1000 ml Wasser gegeben.

5.17 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH = 7,4.

8,0 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 mit der Analysenwaage (6.2) eingewogen und in einen 1-l-Messkolben (6.11) eingebracht, in Wasser gelöst und mit 900 ml Wasser versetzt.

Nach dem Auflösen wird der pH-Wert mit Salzsäurelösung 1 (5.14) oder Natriumhydroxidlösung (5.15), auf pH = 7,4 eingestellt und der Kolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Alternativ darf eine PBS-Lösung mit gleichen Eigenschaften aus handelsüblichen PBS-Produkten hergestellt werden.

5.18 Polysorbat 20, z.B. Tween® 20¹ (C₁₈H₃₄O₆), Laurinsäure ≥ 40 %.

5.19 PBS 0,01 %/Polysorbatlösung, $\rho(\text{Tween}®20) = 0,1 \text{ g/l}$ (0,01 %).

100 mg Polysorbat 20 (5.18) werden mit der Analysenwaage (6.2) eingewogen, quantitativ in einen 1-l-Messkolben (6.11) überführt und mit PBS-Lösung (5.17) bis zur Marke aufgefüllt.

5.20 Natriumhydrogencarbonatlösung (NaHCO₃), $\rho(\text{NaHCO}_3) = 10,0 \text{ g/l}$ (1 %).

10 g Natriumhydrogencarbonat (5.7) werden in einen 1-l-Messkolben (6.11) eingebracht und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

5.21 Extraktionslösemittel.

Methanol (5.1) und Natriumhydrogencarbonatlösung (5.20) werden gemischt (3+2, v+v).

5.22 HPLC mobile Phase.

Methanol (5.2), Acetonitril (5.3) und Essigsäurelösung (5.16) werden gemischt (25+35+40, v+v+v).

5.23 Injektionslösemittel.

Methanol (5.2) wird mit Wasser gemischt (1+1, v+v).

5.24 Immunoaffinitätssäule (IAC).

Die Immunoaffinitätssäule(IAC, en: Immunoaffinitätssäule) enthält Antikörper gegen Ochratoxin A. Die Kapazität der IAC darf nicht geringer als 100 ng Ochratoxin A sein und die Wiederfindung darf nicht geringer als 85 % sein, wenn eine Ochratoxin-A-Standardlösung, die in einem Gemisch aus 3 Volumenteilen Methanol (5.1) und 17 Volumenteilen PBS-Lösung (5.17) 3 ng Ochratoxin A enthält, aufgegeben wird.

Immunoaffinitätssäulen müssen im Kühlschrank (+4 °C) aufbewahrt werden und müssen vor der Verwendung Raumtemperatur annehmen.

5.25 Ochratoxin A (OTA), z.B. kristallin oder als Film, Reinheit mehr als 98 % Massenanteil, oder als zertifizierte Standardlösung.

5.26 Ochratoxin-A-Stammlösung, $\rho = 20 \text{ µg/ml}$.

Kristallines OTA (5.25) oder der Inhalt einer Ampulle (wenn OTA als Film bezogen wurde) wird in der Lösemittelmischung (5.6) gelöst, wobei eine Lösung mit etwa 20 µg/ml bis 30 µg/ml OTA erhalten wird.

Dieser Schritt kann bei Verwendung einer zertifizierten Standardlösung ausbleiben. Die zertifizierte Standardlösung dient dann als Stammlösung.

Zur Bestimmung der genauen Konzentration wird die Absorptionskurve zwischen 300 nm und 370 nm in 5-nm-Schritten in 1-cm-Quarzküvetten mit einem UV-Spektralphotometer (6.13) gegen die Lösemittelmischung (5.6) aufgezeichnet.

¹ Tween 20 ist der Handelsname eines geeigneten handelsüblichen Produktes. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

Die Wellenlänge bei der höchsten Absorption wird ermittelt und die Massenkonzentration von Ochratoxin A, ρ , in Mikrogramm je Milliliter, wird nach Gleichung (1) berechnet:

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

Dabei ist

- $E_{\max}$ die im Maximum der Absorptionskurve ermittelte Absorption (hier bei 333 nm);
- M die Molmasse von Ochratoxin A ($M = 403,8$ g/mol), in Gramm je Mol;
- ε der molare Extinktionskoeffizient von Ochratoxin A im Lösemittelgemisch (5.6) (hier: 544 m²/mol), in Quadratmeter je Mol;
- δ die Schichtdicke (optische Weglänge) der Quarzküvette, in Zentimeter.

Diese Lösung kann bei Lagerung im Gefrierschrank bei –18 °C etwa 12 Monate verwendet werden. Die Lösung muss vor dem Öffnen Raumtemperatur annehmen. Die Massenkonzentration der Lösung muss bestätigt werden, wenn die Lösung älter als 6 Monate ist.

5.27 Ochratoxin-A-Standardlösung, Massenkonzentration $\rho = 100$ ng/ml.

Die Ochratoxin-A-Stammlösung (5.26) oder eine zertifizierte Ochratoxin-A-Standardlösung (5.25) wird mit dem Injektionslösemittel (5.23) verdünnt, was eine Standardlösung mit einer Massenkonzentration von 100 ng/ml ergibt. Diese Lösung ist bei Lagerung im Kühlschrank bei 4°C mindestens einen Monat stabil.

5.28 Ochratoxin-A-Kalibrierlösungen.

Aus der Standardlösung (5.27) werden sechs Kalibrierlösungen für die HPLC hergestellt.

Die Volumina der Ochratoxin-A-Standardlösung (5.27) werden einzeln mit geeigneten kalibrierten Pipetten oder Mikroliterpipetten (6.4) nach Tabelle 1 in Messkolben pipettiert. Jeder Messkolben wird bis zur Marke mit Injektionslösemittel (5.23) aufgefüllt, verschlossen und mit der Hand geschüttelt. Dies ergibt sechs Ochratoxin-A-Kalibrierlösungen mit ungefähr den Konzentrationen wie in Tabelle 1 angegeben. Diese sechs Lösungen decken einen Bereich von etwa 0,10 ng/ml bis 4,5 ng/ml ab, was 0,32 µg/kg bis 14,40 µg/kg entspricht.

Der Kalibrierbereich muss dem gewünschten Arbeitsbereich angepasst werden.

Die Kalibrierlösungen können bei Lagerung im Gefrierschrank bei –18 °C etwa 1 Monat verwendet werden.

Tabelle 1 — Beispiele geeigneter Kalibrierlösungen

Kalibrierlösung	Standardlösung (5.27)	Endvolumen	Massenkonzentration der Kalibrierlösung^a	Kontaminationslevel
	µl	ml	ng/ml	µg/kg ^a
1	10	10	0,10	0,32
2	50	25	0,20	0,64
3	50	10	0,50	1,60
4	50	5	1,00	3,20
5	125	5	2,50	8,00
6	225	5	4,50	14,40

^a Nominale Konzentrationen sind unter Berücksichtigung der Massenkonzentration der OTA_Standardlösung (5.27) berechnet, 100,0 ng/ml; entsprechende Kontaminationslevels sind mit dem hier beschriebenen Verfahren und einem Injektionsvolumen von 100 µl berechnet.

Die exakte Massenkonzentration an OTA in den OTA-Kalibrierlösungen werden aus der ursprünglichen Konzentration der Stammlösung (5.26) und den daraus folgenden Volumina berechnet.

Die Kalibrierlösungen (5.28) werden vor der Injektion in LC-Fläschchen (6.10) übertragen.

6 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborgeräte insbesondere die Folgenden:

6.1 Laborwaage, Fehlergrenze: 0,01 g.

6.2 Analysenwaage, Fehlergrenze: 0,01 mg.

6.3 Laborschüttler für Reagenzgläser and **Horizontalschüttler**.

6.4 Manuelle Dispenser oder Mikroliterpipetten für 10 µl bis 20 ml mit geeigneten Pipettenspitzen.

6.5 Dispenser, geeignet für 20 ml.

6.6 Einmal-Spritzenkolben und Spritze, zur Verwendung als Reservoir; 50 ml und 10 ml, Luer lock-Verbindungen und Verbindungsstücken zum Aufsetzen auf die Immunoaffinitätsäulen.

6.7 Glasmikrofaser Filterpapier, 125 mm Durchmesser, 1,6 µm Porengröße, oder gleichwertiges.

6.8 Zentrifuge, geeignet für eine relative Zentrifugalkraft von mindestens 3 500 g^2 .

6.9 Zentrifugenröhrchen, 50 ml, aus Polypropylen, mit Schraubverschluss.

6.10 LC-Fläschchen.

6.11 Messkolben, in verschiedenen Volumina (z.B. 5 ml, 10 ml, 15 ml, 1l).

² $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$.

6.12 SPE Unterdruck-Einheit/Elutionssystem.

6.13 UV-Spectralphometer mit Quartzküvetten.

6.14 HPLC-FLD system, mit den folgenden Komponenten:

6.14.1 LC-Pumpe, geeignet, einen Durchfluss von 1 ml/min aufrecht zu erhalten.

6.14.2 Injektionssystem.

6.14.3 LC-Säule, z. B. C18 RP-Säule, fully endcapped und vorzugsweise mit folgenden Säulendimensionen 150 mm × 4,6 mm i.D. Stationäre Phase mit Partikelgröße 5 µm, oder gleichwertig.

6.14.4 Vorsäule, mit derselben stationären Phase oder ähnlich wie die Trennsäule.

6.14.5 Säulenofen.

6.14.6 Fluoreszenzdetektor.

6.14.7 Datenauswertungssystem.

7 Verfahren

7.1 Probenvorbereitung

Die Laborprobe wird fein gemahlen, vor der Untersuchung homogenisiert und, falls erforderlich, im Gefrierschrank bei -18 °C aufbewahrt.

7.2 Extraktion von Ochratoxin A aus der Probe

7.2.1 Allgemeines

5 g [*m*] Probe (Einwaage) werden mit der Laborwaage (6.1) auf 0,1 g in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (6.9) eingewogen.

20,0 ml [*V*₁] Extraktionslösemittel (5.21) werden mit einem geeigneten Dispenser in das Röhrchen hinzugefügt, dieses wird verschlossen und 5 s kräftig von Hand und dann 40 min mit dem Laborschüttler (6.3) geschüttelt.

Zur Phasentrennung werden die Röhrchen 10 min bei 3 500 g zentrifugiert (6.8).

Der Extrakt wird auf einen Faltenfilter aus Glasfaser (6.7), gegeben.

7 ml [*V*₂] des filtrierte Extraktes wird mit 49 ml PBS 0,01 % Polysorbat-20-Lösung (5.19) verdünnt; das Volumen des verdünnten Extraktes beträgt schließlich 56 ml [*V*₃].

Wenn der Extrakt trüb ist, wird er durch einen Faltenfilter aus Glasfaser (6.7) filtriert.

Die IAC-Reinigung (7.2.2) muss am selben Tag erfolgen.

7.2.2 Reinigung an einer Immunoaffinitätssäule

Die Verwendung der Immunoaffinitätssäule (IAC) kann sich je nach Hersteller leicht unterscheiden. Den Herstelleranweisungen ist zu folgen.

Die IAC muss vor der Verwendung Raumtemperatur annehmen. Die IAC (5.24) wird an die SPE-Unterdruckeinheit (6.12) angeschlossen und ein Reservoir von 50 ml (6.6) wird auf die IAC aufgesteckt.

50 ml [V_4] des verdünnten Extraktes werden in das Reservoir (6.6) gegeben und durch die IAC mit einem Durchfluss von etwa 3 ml/min laufen gelassen (d.h. eine Tropfgeschwindigkeit von etwa 1 Tropfen/s).

Falls notwendig kann der Prozess durch Anlegen eines leichten Druckes oder Unterdruckes auf die IAC mit einer Spritze beschleunigt werden, in diesem Falle muss jedoch darauf geachtet werden, dass der Durchfluss nicht erhöht wird, da dadurch die Wiederfindung beeinflusst werden kann.

Nachdem der Extrakt durch die Säule gelaufen ist, wird diese mit 10 ml PBS-Lösung (5.17) gewaschen. Die Säule wird getrocknet, indem etwa 10 ml Luft mit einer Spritze (6.6) durchgedrückt wird. An dieser Stelle des Reinigungsschrittes werden alle Eluenten verworfen.

Schließlich wird ein 5-ml-Messkolben (6.11) unter der Säule angebracht. 750 µl Methanol (5.2) werden auf die Säule gegeben und diese durch Schwerkraft durchlaufen gelassen, weitere 750 µl Methanol (5.2) auf die Säule gegeben, diese wiederum durch Schwerkraft durchlaufen gelassen und die vereinigten Eluate im Messkolben gesammelt. Zum Sammeln letzter Eluatstropfen werden 10 ml Luft vorsichtig durch die Säule mit einer Spritze (5.6) gedrückt. 750 µl Wasser und erneut weitere 750 µl Wasser werden durch die Säule gegeben und im selben Messkolben gesammelt. Zum Sammeln letzter Wassertropfen werden 10 ml Luft vorsichtig durch die Säule mit einer Spritze (5.6) gedrückt. Der Kolben wird bis zur Marke mit Injektionslösemittel (5.23) aufgefüllt. Dies ergibt 5 ml [V_5] Probenmesslösung.

Der Messkolben wird verschlossen und heftig geschüttelt. Die Probenmesslösung wird in LC-Fläschchen übertragen und mit HPLC-FLD untersucht.

7.3 Aufstockung

Für die Wiederfindung wird die Probe mit Ochratoxin-A-Standardlösung (5.27) aufgestockt. Das Aufstocklevel muss innerhalb des Kalibrierbereiches liegen. Zum Beispiel werden für eine Aufstockung von 2 ng/g 5,0 g rückstandsfreie Probe auf 0,01 g in ein 50-ml-Zentrifugierröhrchen (6.9) eingewogen. 100 µl Ochratoxin-A-Standardlösung (5.27) werden der rückstandsfreien Probe zugefügt, was eine Aufstockung von 2 ng/g ergibt. Die aufgestockte Probe wird 30 min bis 2 h im Laborabzug stehen gelassen, damit das Lösemittel verdampfen kann.

Dann wird mit dem Extraktionsschritt nach 7.2 weiter verfahren.

8 LC-MS/MS Analyse

8.1 Allgemeines

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

8.2 HPLC-Betriebsbedingungen

Bei Verwendung der beispielhaft in 6.14.3 angegebenen Säule und der mobilen Phase nach 5.22, haben sich die folgenden Parameter als für die HPLC geeignet gezeigt:

Fluss:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	50 µl to 100 µl
Säulenofentemperatur (einschließlich Vorsäule):	z. B. 40 °C
Autosamplertemperatur (optional):	15 °C bis 20 °C

Detektor Wellenlänge:

Anregung 333 nm, Emission 460 nm.

Bei Verwendung der empfohlenen Säule und mobilen Phase eluiert Ochratoxin A bei einer Retentionszeit von etwa 7,1 min; die Retentionszeit muss jedoch durch Untersuchung einer Standardlösung unter gleichen Bedingungen bestätigt werden. Ochratoxin A muss von allen möglicherweise anwesenden Störsubstanzen durch Basislinientrennung abgetrennt sein. Es kann erforderlich sein, die mobile Phase für eine ausreichende Basislinientrennung anzupassen. Die größte Überlappung der Peaks muss weniger als 10 % betragen. Falls erforderlich darf der Wasseranteil in der mobilen Phase leicht (d.h. 20 %) erhöht werden. Andere Säulendimensionen dürfen verwendet werden, vorausgesetzt, dass die erforderliche Auflösung erreicht wird. Der Durchfluss darf je nach Säulendimension angepasst werden. Eine geeignete Vorsäule muss verwendet werden.

Beispielchromatogramme sind in Anhang A angegeben.

8.3 Kalibriergerade

Zu Beginn eines jeden Untersuchungstages wird eine Kalibriergerade durch Injektion von sechs OTA-Kalibrierlösungen (5.28) erstellt. Die Peakflächen werden gegen die Massen des injizierten OTA aufgezeichnet und die Gerade wird auf Linearität geprüft.

8.4 Identifizierung

Ochratoxin A wird durch Vergleichen der Retentionszeiten der Kalibrierlösungen mit denen der Probenmesslösung identifiziert. Die Massenkonzentration an Ochratoxin A in der Probenmesslösung muss innerhalb des Kalibrierbereiches liegen. Falls die Massenkonzentration an Ochratoxin A in der Probenmesslösung außerhalb des Kalibrierbereiches liegt, wird die Massenkonzentration entsprechend der erstellten Kalibriergerade verdünnt. Der Verdünnungsfaktor wird in alle folgenden Berechnungen einbezogen.

9 Berechnung

Die Peakflächen (y-Achse) werden gegen die Konzentration der Ochratoxin-A-Kalibrierlösungen (5.28) [ng/ml] (x-Achse) aufgetragen und die Kalibriergerade mit linearer Regression berechnet.

Die Massenkonzentration an Ochratoxin A im Aliquot der Probenmesslösung (gereinigter Extrakt), ρ in ng/ml wird mit der resultierenden Funktion ($y = ax + b$) nach Gleichung 2 berechnet:

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

Dabei ist:

- S das Signal für den Ochratoxin-A-Peak aus dem Probenchromatogramm;
- a der Wert für die Steigung der linearen Funktion;
- b der Wert, bei der die Kalibrierfunktion die y-Achse schneidet.

Der Massenanteil an Ochratoxin A in der Probe, w , in $\mu\text{g/kg}$, wird nach Gleichung 3 berechnet:

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times V_5}{m \times V_2 \times V_4} \quad (3)$$

Dabei ist