

DIN EN 17424



ICS 67.050

Einsprüche bis 2019-09-26

Entwurf**Lebensmittel –****Bestimmung von Aflatoxinen in Gewürzen außer Paprika mit IAC
Reinigung und HPLC-FLD mit Nachsäulenderivatisierung;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17424:2019****Foodstuffs –**

Determination of aflatoxins in spices other than paprika by IAC clean-up and HPLC-FLD with post-column derivatization;

German and English version prEN 17424:2019

Produits alimentaires –

Détermination des aflatoxines dans les épices (pour lesquelles un niveau maximal a été établi par l'UE) autres que le paprika;

Version allemande et anglaise prEN 17424:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-07-26 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, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 67 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Lebensmittel — Bestimmung von Aflatoxinen in Gewürzen außer Paprika mit IAC Reinigung und HPLC-FLD mit Nachsäulenderivatisierung

Produits alimentaires — Détermination des aflatoxines dans les épices (pour lesquelles un niveau maximal a été établi par l'UE) autres que le paprika

Foodstuffs — Determination of aflatoxins in spices other than paprika by IAC clean-up and HPLC-FLD with post-column derivatization

ICS:

Deskriptoren

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

STD Version 2.9p

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	11
7.1 Extraktion von Aflatoxinen aus der Probe	11
7.2 Bestimmung der Wiederfindung	12
7.3 Reinigung mit Immunoaffinitätssäule	12
7.4 HPLC-FLD-Analyse	12
7.4.1 Allgemeines	12
7.4.2 Bestätigung	13
7.4.3 Nachsäulenderivatisierung	13
7.4.4 Identifizierung	14
7.4.5 Kalibrierung	14
8 Berechnung	14
9 Präzision	15
9.1 Allgemeines	15
9.2 Wiederholpräzision	15
9.3 Vergleichpräzision	15
10 Prüfbericht	16
Anhang A (informativ) Beispielbedingungen für geeignete HPLC-FLD-Systeme	17
A.1 Allgemeines	17
A.2 Beispiel für HPLC-Bedingungen	17
A.3 Andere Beispiele für geeignete Säulen und Bedingungen für die mobile Phase	17
Anhang B (informativ) Typische Chromatogramme	19
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	23
Anhang D (informativ) Zusätzliche Informationen	27
Literaturhinweise	32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17424:2019) 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 Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Einleitung

Bei Aflatoxinen handelt es sich um eine Gruppe von ungefähr zwanzig verwandten Pilzmetaboliten, von denen jedoch üblicherweise nur die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ in Lebensmitteln zu finden sind. Die Aflatoxine B₂ und G₂ sind die Dihydroderivate der entsprechenden Ausgangsverbindungen. Aflatoxine werden von mindestens drei Arten von *Aspergillus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* und *A. nomius* gebildet und können in einer Vielzahl wichtiger roher Lebensmittelerzeugnisse, einschließlich Getreide, Nüssen, Gewürzen, Feigen und Trockenobst, vorkommen.

WARNUNG 1 — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, müssen geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen getroffen werden. Die aktuelle Version der EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 [3], sowie geeignete nationale Mitteilungen, wie z. B. in [4], sollten berücksichtigt werden.

WARNUNG 2 — Bei der Anwendung dieses Dokuments ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. 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 festzulegen, welche einschränkenden Vorschriften gelten.

WARNUNG 3 — Es ist bekannt, dass Aflatoxine karzinogene Wirkungen haben und sowohl akut als auch chronisch toxisch sind.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ und des Gesamtgehalts an Aflatoxinen (Summe von B₁, B₂, G₁ und G₂) in Gewürzen außer Paprika, für die EU-Höchstwerte festgelegt wurden, mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (en: High Performance Liquid Chromatography, HPLC) mit Nachsäulenderivatisierung (en: post column derivatization, PCD) und Fluoreszenzdetektion (FLD) nach Reinigung an der Immunoaffinitätssäule.

Das Verfahren ist anwendbar auf die Gewürze Capsicum, Pfeffer, Muskatnuss, Ingwer, Kurkuma und Mischungen daraus.

Dieses Verfahren wurde für die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ und die Gesamtaflatoxine in einer Reihe von Untersuchungsproben validiert. Diese umfassten: Ingwer, Pfeffer, Muskatnuss, Chili, Kurkuma als einzelne Gewürze und gemischten Pfeffer + Chili + Muskatnuss (90 + 5 + 5, m + m + m), gemischte Gewürze + Ingwer (6 + 4, m + m) gemischte Gewürze, gemischtes Kurkuma + Ingwer (2 + 8, m + m).

Die Validierung wurde für die folgenden Konzentrationsbereiche durchgeführt: Aflatoxin B₁ = 1 µg/kg bis 16 µg/kg und Gesamtaflatoxine = 2,46 µg/kg bis 36,1 µg/kg.

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: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>

4 Kurzbeschreibung

Aflatoxine werden aus den Gewürzen mit einem Gemisch aus Methanol, Acetonitril und Wasser extrahiert. Der Probenextrakt wird filtriert, mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) verdünnt und auf eine Immunoaffinitätssäule (en: immunoaffinity column, IAC) gebracht, die spezifische Antikörper gegen die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ enthält. Die Aflatoxine werden von der Säule wieder eluiert. Die Aflatoxine werden durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit NSD gefolgt von FLD bestimmt.

5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Chemikalien von anerkannter Analysereinheit, p.a. (pro analysi), und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Die Lösemittel müssen, wenn nicht anders festgelegt, von geeignetem Reinheitsgrad für die HPLC-Analyse sein.

WARNUNG 1 — Verfahren zur Dekontamination von Aflatoxin haltigen Laborabfällen sind von der „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) entwickelt worden, siehe [5], [6].

WARNUNG 2 — Aflatoxine sind lichtempfindlich. Das Labor, in dem die Untersuchungen durchgeführt werden, muss ausreichend vor Tageslicht geschützt sein, z. B. durch Anbringen von UV-Licht absorbierender Folie an den Fenstern in Verbindung mit Dämmerlicht (kein direktes Sonnenlicht) oder durch Vorhänge oder Jalousien in Verbindung mit künstlichem Licht (Leuchtstoffröhren können verwendet werden). Aflatoxin enthaltende Lösungen müssen so weit wie möglich vor Licht geschützt werden (im Dunklen aufbewahren unter Verwendung von Aluminiumfolie oder Braunglas) und bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur (z. B. $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt werden.

5.1 Methanol (CH_3OH).

5.2 Acetonitril (CH_3CN).

5.3 Kaliumbromid (KBr).

5.4 Natriumhydroxid (NaOH).

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

8,0 g Natriumhydroxid (5.4) werden in 100 ml Wasser gelöst.

5.6 Natriumhydroxidlösung, $c(\text{NaOH}) = 0,1\text{ mol/l}$.

0,4 g Natriumhydroxid (5.4) werden in 100 ml Wasser gelöst.

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

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

8,28 ml Salzsäurelösung (5.7) werden mit Wasser auf 1 l verdünnt.

5.9 Schwefelsäurelösung, zum Spülen von Glasgeräten, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2\text{ mol/l}$.

5.10 Natriumchlorid (NaCl).

5.11 Kaliumchlorid (KCl).

5.12 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

5.13 Dinatriumhydrogenorthophosphat (Na_2HPO_4).

5.14 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), $\text{pH} = 7,4$.

0,20 g Kaliumchlorid (5.11), 0,20 g Kaliumdihydrogenphosphat (5.12), 1,16 g Dinatriumhydrogenorthophosphat (5.13) und 8,00 g Natriumchlorid (5.10) werden auf 0,01 g gewogen und in einen 1-l-Messkolben gefüllt. Die Chemikalien werden in Wasser gelöst, und es werden 900 ml Wasser hinzugefügt.

Nach dem Auflösen wird der pH-Wert mit Salzsäurelösung (5.8) oder Natriumhydroxidlösung (5.6) je nach Bedarf auf $\text{pH} = 7,4$ eingestellt und der Kolben mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

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

5.15 Polysorbat 20, z. B. Tween® 20¹, Laurinsäure ≥ 40 %.

5.16 PBS/Polysorbat-20-Lösung.

Polysorbat 20 (5.15) wird mit PBS (5.14) gemischt (1 + 9, v + v).

5.17 Extraktionslösung.

Acetonitril (5.2), Methanol (5.1) und Wasser werden gemischt (40 + 35 + 25, v + v + v).

5.18 Salpetersäurelösung (HNO₃), $c(\text{HNO}_3) = 4$ mol/l.

25,5 ml konzentrierte HNO₃ (70 %, Massenkonzentration $\rho(\text{HNO}_3) = 1,413$ g/ml bei 25 °C) werden langsam zu 25 ml Wasser hinzugefügt, das Endvolumen wird mit Wasser auf 100 ml erhöht.

5.19 Pyridiniumbromidperbromid-Lösung (PBPB), $\rho(\text{PBPB}) = 50$ mg/l.

50 mg $\pm$ 10 mg PBPB werden in ein 20-ml-Glasfläschchen eingewogen. Das PBPB wird in etwa 20 ml Wasser gelöst, bei Bedarf unter Verwendung eines Ultraschallbades, und die Lösung wird quantitativ in eine 1-l-Flasche aus Braunglas gefüllt. Die Lösung wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung kann in einem dunklen Raum bei Raumtemperatur vier Tage lang gelagert werden.

5.20 Aflatoxin B₁, z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.

5.21 Aflatoxin B₂, z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.

5.22 Aflatoxin G₁, z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.

5.23 Aflatoxin G₂, z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.

5.24 Aflatoxin(B₁, B₂, G₁ und G₂)-Stammlösungen.

Die Aflatoxine B₁ (5.20), B₂ (5.21), G₁ (5.22) und G₂ (5.23) werden jeweils einzeln in Acetonitril (5.2) gelöst, sodass sich Lösungen mit Massenkonzentrationen von jeweils 10 µg/ml ergeben. Die Stammlösungen werden in Fläschchen aus Braunglas gefüllt und bei Nichtbenutzung bei unter 4 °C gelagert.

Zur Bestimmung der exakten Massenkonzentration des Aflatoxins in jeder Stammlösung wird die Absorptionskurve zwischen 330 nm und 370 nm in 1-cm-Quarzküvetten unter Verwendung eines Spektralphotometers (6.5) gegen Acetonitril (5.2) aufgenommen. Die Massenkonzentration jedes Aflatoxins, ρ , in µg/ml, wird nach Gleichung (1) berechnet:

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

Dabei ist

$A_{\max}$ der aus der Absorptionskurve bestimmte maximale Extinktionswert (hier: 350 nm);

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 nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

- M die relative Molmasse des jeweiligen Aflatoxins, in g/mol;
- δ die Schichtdicke (optische Weglänge) der Quarzküvette, in cm;
- ε der molare Absorptionskoeffizient des jeweiligen Aflatoxins in Acetonitril (5.2), in m²/mol.

M und ε der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ sind in Tabelle 1 [7] aufgeführt.

Tabelle 1 — Molare Masse und molarer Absorptionskoeffizient der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ in Acetonitril (5.2)

Aflatoxin	M g/mol	ε m ² /mol
B ₁	312	2 070
B ₂	314	2 250
G ₁	328	1 760
G ₂	330	1 890

5.25 Gemischte Stammlösung.

Eine gemischte Stammlösung wird hergestellt, die jeweils 1 000 ng/ml Aflatoxin B₁ und Aflatoxin G₁ sowie jeweils 500 ng/ml Aflatoxin B₂ und Aflatoxin G₂ in Acetonitril (5.2) enthält. Hierzu werden die Aflatoxin-Stammlösungen (5.24) geeignet gemischt und verdünnt.

Alternativ darf eine zertifizierte gebrauchsfertige Aflatoxin-Standard-Stammlösung verwendet werden.

Bei Nichtbenutzung wird die Lösung vor Lichteinstrahlung geschützt und bei unter 4 °C gelagert. Unter diesen Bedingungen kann die Lösung zwei Monate lang gelagert werden.

5.26 Gemischte Zwischenlösung.

Eine gemischte Zwischenlösung wird hergestellt, indem 2,0 ml der gemischten Stammlösung (5.25) in einen 10-ml-Messkolben pipettiert werden. Der Messkolben wird bis zur Marke mit Acetonitril (5.2) aufgefüllt und gut geschüttelt. Die Massenkonzentration dieser gemischten Zwischenlösung beträgt 200 ng/ml Aflatoxin B₁ und G₁ und 100 ng/ml Aflatoxin B₂ und G₂.

Bei Nichtbenutzung wird die Lösung vor Lichteinstrahlung geschützt und bei unter 4 °C gelagert. Unter diesen Bedingungen kann die Lösung zwei Monate lang gelagert werden.

5.27 Gemischte Standardlösung.

1,0 ml der gemischten Zwischenlösung (5.26) wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, und der Kolben wird bis zur Marke mit Acetonitril (5.2) aufgefüllt und gut geschüttelt. Dies ergibt eine Lösung, die 20 ng/ml Aflatoxin B₁ und G₁ und 10 ng/ml Aflatoxin B₂ und G₂ enthält und zur Herstellung der Kalibrierlösungen verwendet werden kann.

Bei Nichtbenutzung wird die Lösung vor Lichteinstrahlung geschützt und bei unter 4 °C gelagert. Unter diesen Bedingungen kann die Lösung zwei Monate lang gelagert werden.

5.28 Kalibrierlösungen.

Verschiedene Volumina der gemischten Standardlösung (5.27) werden nach Tabelle 2 in fünf verschiedene 10-ml-Messkolben gegeben, sodass fünf Kalibrierwerte über den gesamten Kalibrierbereich verteilt erhalten werden. Die in Tabelle 2 angegebenen Werte wurden im Ringversuch verwendet.

Das Acetonitril wird bei Raumtemperatur unter einem Stickstoffstrom bis gerade zur Trockne eingedampft. Der Rückstand eines jeden Kolbens wird in 4 ml Methanol (5.1) aufgenommen, die Aflatoxine werden durch Mischen gelöst, auf 10 ml aufgefüllt und gut geschüttelt. Beim Mischen von Methanol und Wasser gibt es eine Volumenkontraktion, daher wird erneut mit Wasser aufgefüllt.

Die Kalibrierlösungen decken den Bereich von 0,48 µg/kg bis 9,6 µg/kg für die Aflatoxine B₁ und G₁ und den Bereich von 0,24 µg/kg bis 4,8 µg/kg für die Aflatoxine B₂ und G₂ ab.

Tabelle 2 — Herstellung der HPLC-Kalibrierlösungen

Kalibrierlösung	Gemischte Standardlösung (5.27) µl	Angestrebte Massenkonzentration je Analyt			
		B ₁ ng/ml	B ₂ ng/ml	G ₁ ng/ml	G ₂ ng/ml
1	10	0,02	0,01	0,02	0,01
2	20	0,04	0,02	0,04	0,02
3	50	0,10	0,05	0,10	0,05
4	100	0,20	0,10	0,20	0,10
5	200	0,40	0,20	0,40	0,20

Die Lösungen sollten an jedem Analysentag frisch hergestellt werden.

5.29 Mobile Phase A für die HPLC.

Wasser, Acetonitril (5.2) und Methanol (5.1) werden gemischt (56 + 30 + 14, v + v + v). Falls bei der HPLC (6.13) kein Online-System verfügbar ist, wird die Lösung vor Gebrauch entgast.

5.30 Mobile Phase B für die HPLC.

Wasser, Acetonitril (5.2) und Methanol (5.1) werden gemischt (56 + 30 + 14, v + v + v). Je Liter mobiler Phase werden 350 µl Salpetersäurelösung (5.18) und 119 mg Kaliumbromid (5.3) zugegeben. Falls bei der HPLC (6.13) kein Online-System verfügbar ist, wird die Lösung vor Gebrauch entgast.

5.31 Immunoaffinitätssäule (IAC).

Die Immunoaffinitätssäule (IAC) enthält Antikörper gegen die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂. Die Säule muss über eine Kapazität von nicht weniger als 100 ng Aflatoxin B₁ verfügen.

6 Geräte und Ausrüstung

Die Verwendung von Glasgeräten, die nicht mit Säure behandelt wurden, kann zu Verlusten an Aflatoxinen führen. Es wird empfohlen, vor dem Gebrauch alle Laborgeräte aus Glas, die mit wässrigen Lösungen von Aflatoxinen in Berührung kommen, mit Säurelösung zu spülen. Dieser Schritt ist bereits im Waschprogramm vieler Laborspülmaschinen enthalten. Anderenfalls werden solche Glasgeräte mehrere Stunden (z. B. 15 h

über Nacht) in Schwefelsäure (5.9) aufbewahrt und anschließend ausreichend (z. B. dreimal) mit Wasser abgespült, um alle Säurespuren zu entfernen. Die Säurefreiheit wird mit pH-Indikatorpapier geprüft.

In der Praxis ist diese Behandlung notwendig bei Rundkolben, Messkolben, Messzylindern, Fläschchen und Reagenzgläsern, die die Standard- und Messlösungen enthalten (besonders Autosamplerfläschchen), sowie bei Pasteur-Pipetten, falls sie zum Überführen von Kalibrierlösungen und Messlösungen verwendet werden.

Übliche Laborgeräte und insbesondere Folgendes:

- 6.1 Laborwaage**, Fehlergrenze von 0,01 g.
- 6.2 Analysenwaage**, Fehlergrenze von 0,1 mg.
- 6.3 Zentrifugenflasche**, z. B. 250 ml.
- 6.4 Zentrifuge**, die für eine relative Zentrifugalbeschleunigung von 2 000 *g* bis 2 500 *g* geeignet ist.

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

- 6.5 UV-Spektralphotometer mit Quarzküvetten.**
- 6.6 Labormixer**, z. B. Ultra Turrax^{®2}.
- 6.7 Laborschüttler**, verstellbar.
- 6.8 pH-Messgerät.**
- 6.9 Filterpapier**, z. B. 190 mm Durchmesser, vorgefaltet, nassfest, nominales Partikelrückhaltevermögen von 30 µm.
- 6.10 Pipetten**, 25 µl, 50 µl, 250 µl, 1 ml und 10 ml.
- 6.11 Spritze**, Kunststoff, zum Einmalgebrauch, Kapazität von 5 ml.
- 6.12 Spritzenfilter**, 0,45 µm Polytetrafluorethylen (PTFE).
- 6.13 HPLC-FLD-System**, bestehend aus:
 - 6.13.1 HPLC-Pumpe**, geeignet für einen Durchfluss von 1,0 ml/min.
 - 6.13.2 Injektionssystem**, geeignet für die Injektion des gesamten Probenschleifeninhaltes. (eine Schleife von 100 µl wird empfohlen).
 - 6.13.3 HPLC-Säule**, z. B. C18 oder ODS-1 (Länge 250 mm, innerer Durchmesser 4,6 mm und Teilchengröße 5 µm), die eine Basislinienauftrennung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ von allen anderen Signalen sicherstellt. Eine geeignete Vorsäule muss verwendet werden.
 - 6.13.4 Säulenofen.**

2 Ultra Turrax[®] ist die Herstellerbezeichnung eines Produktes, das bei verschiedenen Lieferanten erhältlich ist. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

6.13.5 System zur Nachsäulenderivatisierung, mit PBPB (nur für die mobile Phase A (5.29)). Bestehend aus einer pulsfreien Pumpe, einem T-Stück ohne Totvolumen und einer Reaktionskapillare mit einer Länge von mindestens 34 cm und einem Innendurchmesser von 0,5 mm, aus Polytetrafluorethylen (PTFE).

6.13.6 System zur Derivatisierung mit elektrochemisch hergestelltem Brom, z. B. KOBRA®-Zelle³ (nur für mobile Phase B (5.30)), und einer Reaktionskapillare mit einer Länge von mindestens 34 cm und einem Innendurchmesser von 0,5 mm aus PTFE.

6.13.7 Alternatives System zur Derivatisierung durch photochemische Reaktion, z. B. Photochemical Reactor for Enhanced Detection (PHRED^{TM4}), nur für mobile Phase A (5.29). Der photochemische Reaktor wird zwischen die HPLC-Säule und den Detektoreingang eingesetzt. Der Reaktor besteht aus einer 25-m-PTFE-Reaktionskapillare mit 1/16 Zoll AD × 0,25 mm ID.

6.13.8 Fluoreszenzdetektor, mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 360$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda > 420$ nm oder Entsprechendes (z. B. Detektor mit einstellbarem Monochromator).

Empfohlene Einstellungen für einstellbare Detektoren sind Wellenlängen von $\lambda = 364$ nm (Anregung) und $\lambda = 440$ nm (Emission), Bandbreite 18 nm.

6.13.9 Datenauswertungssystem.

7 Durchführung

7.1 Extraktion von Aflatoxinen aus der Probe

Aufgrund der mangelnden Stabilität der Analyte in extrahierten Proben müssen alle Proben am Analyseag, extrahiert und an der Immunoaffinitätssäule gereinigt werden.

ANMERKUNG Bei der Entwicklung des Verfahrens und der Validierung wurden bei Probenextrakten, die nicht am selben Tag gereinigt wurden, niedrigere Wiederfindungswerte beobachtet.

Eine Einwaage von 25 g [m_s] wird auf 0,1 g in eine 250-ml-Zentrifugenflasche (6.3) eingewogen und 5,0 g Natriumchlorid (5.10) werden hinzugefügt. Eine größere Probeneinwaage darf verwendet werden, vorausgesetzt, dass das Verhältnis vom Volumen der Probe oder des Extraktionslösemittels zur Masse des Natriumchlorids gewahrt bleibt.

100 ml [V_e] der Extraktionslösung (5.17) werden hinzugefügt und mit einem Mixer (6.6) ungefähr 3 min bis 5 min gemischt. Alternativ wird ungefähr 15 bis 30 s mit der Hand und dann ungefähr 30 min mit einem Schüttler (6.7) kräftig geschüttelt. Die Bewegungsgeschwindigkeit der verschiedenen Schüttelmaschinen (z. B. Horizontalschüttler oder Wippschüttler [vertical wrist shaker]) muss so eingestellt werden, dass eine maximale Durchmischung des Kolbeninhaltes erfolgt.

Nach der Extraktion werden die Flaschen in eine Zentrifuge (6.4) gestellt und etwa 10 min bei etwa 2 000 g bis 2 500 g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand durch Filterpapier (6.9) gefiltert.

3 KOBRA®-Zelle ist ein Beispiel für ein handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

4 PHREDTM ist die Herstellerbezeichnung für ein handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

59 ml PBS/Polysorbat-20-Lösung (5.16) und 1,0 ml des Filtrats werden in einen Erlenmeyerkolben (oder Ähnliches) gefüllt. Das Gemisch wird per Hand gut geschüttelt. Der pH-Wert des verdünnten Extrakts wird geprüft und gegebenenfalls mit von Natriumhydroxidlösung (5.5) auf pH 7,4 eingestellt. Für die Reinigung an der Immunoaffinitätssäule (7.3) wird ein Aliquot des verdünnten Probenextrakts verwendet.

7.2 Bestimmung der Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate durch Ersatzdotierung werden vor der Extraktion 125 µl gemischte Stammlösung (5.25) zu einer bekannten Blindprobe hinzugefügt (entspricht einem Massenanteil von 5 µg/kg Aflatoxin B₁ und G₁ und 2,5 µg/kg Aflatoxin B₂ und G₂ in der Probe), und die Lösung wird bei Raumtemperatur etwa 30 min stehen gelassen.

Für die dotierten und nicht dotierten Proben wird das Verfahren nach 7.1 und 7.3 befolgt.

Wenn verfügbar, darf geeignetes Referenzmaterial zur Bestimmung der Wiederfindungsrate verwendet werden.

7.3 Reinigung mit Immunoaffinitätssäule

Die Anwendung der Immunoaffinitätssäulen kann je nach Hersteller leicht unterschiedlich sein. Die Anweisungen des Herstellers müssen befolgt werden.

30 ml des verdünnten Filtrats (dieses enthält 0,5 ml des ursprünglichen Extrakts, V_c) werden mit einem Durchfluss von etwa 3 ml/min (d. h. mit einer Tropfgeschwindigkeit von etwa 1 Tropfen/s) oder durch Schwerkraft durch die Immunoaffinitätssäule (IAC) (5.31) laufen gelassen. Der Durchfluss darf dabei 5 ml/min nicht übersteigen.

Nachdem das Filtrat durch die Säule gelaufen ist, wird die Säule mit etwa 20 ml PBS (5.14) bei einem Durchfluss von maximal 5 ml/min gewaschen und getrocknet, wobei etwa 5 s bis 10 s ein leichter Unterdruck angelegt wird oder etwa 10 s mit einer Spritze (6.11) Luft durch die Säule gedrückt wird.

Die Aflatoxine werden in einem zweistufigen Prozess eluiert: 0,50 ml Methanol (5.1) werden auf die Säule gegeben und nur durch die Schwerkraft durchlaufen gelassen. Das Eluat wird in einem mit Deckel verschließbaren 4-ml-Fläschchen aufgefangen. Ein zweites Mal wird 1,0 ml Methanol (5.1) auf die Säule gegeben. Um auch noch die letzten Tropfen aufzusammeln, wird Luft mit einer Spritze durch die Säule gedrückt.

1,5 ml Wasser werden durch die Säule gegeben und in demselben Glasfläschchen aufgefangen, sodass das Endvolumen 3,0 ml (V_{final}) beträgt. Das 4-ml-Fläschchen wird verschlossen und etwa 5 s gemischt. Die klare Lösung kann direkt zur HPLC eingesetzt werden. Wenn die Lösung nicht klar ist, wird sie vor der HPLC-Injektion durch einen Spritzenfilter (6.12) gegeben.

7.4 HPLC-FLD-Analyse

7.4.1 Allgemeines

Das Injizieren des gesamten Inhaltes der Probenschleife stellt die größtmögliche Präzision sicher.

Es wird empfohlen (je nach Injektionssystem), eine Probenmenge zu injizieren, die ungefähr die dreifache Menge der Probenschleife beträgt, und mindestens 2/3 der Probenmenge in das Ventil zu injizieren, um sicherzustellen, dass der mittlere Teil in der Injektionsschleife verbleibt. Auf diese Weise wird die Schleife mit dem Injektionslösemittel gespült, während ausreichend Lösemittel im Ventil verbleibt.

Die Aflatoxine werden durch isokratische Umkehrphasen-HPLC an einer Umkehrphasensäule (6.13.3) mit einer geeigneten mobilen Phase A (5.29) oder B (5.30) getrennt.

Der Durchfluss wird entsprechend der Säulenabmessungen angepasst.

Dabei wird ein Durchfluss von 1 ml/min bei Säulen mit einem inneren Durchmesser von 4,6 mm empfohlen.

Die Aflatoxine werden in der Reihenfolge G₂, G₁, B₂ und B₁ mit Retentionszeiten von jeweils etwa 9 min, 10 min, 12 min und 15 min eluiert und sollten bis zur Grundlinie getrennt sein. Falls erforderlich, wird die mobile Phase durch Zugabe von Wasser, Methanol oder Acetonitril eingestellt, um eine maximale Peaktrennung und ein optimales Chromatogramm zu erhalten.

7.4.2 Bestätigung

Zur Bestätigung von Aflatoxin B₁ und G₁ wird die HPLC-Säule vom PCD-Gerät abgenommen und direkt mit dem Fluoreszenzdetektor verbunden. Die Peaks für Aflatoxin B₁ und G₁ sind deutlich kleiner (Faktor 10 oder mehr), wenn das Derivatisierungssystem entfernt wird. Wenn die KOBRA®-Zelle verwendet wird, darf der Strom nicht abgestellt werden, wenn das Gerät noch verbunden ist, da sich die Reaktion fortsetzen könnte, wenn verbliebenes Brom in die Zellmembran diffundieren kann.

7.4.3 Nachsäulenderivatisierung

Folgende Optionen haben sich als für die Nachsäulenderivatisierung geeignet gezeigt.

Nachsäulenzugabe von PBPB-Lösung:

Bei der Verwendung von PBPB werden das T-Stück und die Reaktionskapillare zusammengesteckt und die folgenden Parameter eingestellt:

- 1,00 ml/min Durchfluss für die mobile Phase A (5.29);
- 0,30 ml/min Durchfluss für die PBPB-Lösung (5.19) (der Durchfluss darf angeglichen werden, wenn der mobile Durchfluss geändert wurde oder um das Ansprechverhalten von Aflatoxin B₁ und G₁ zu optimieren).

Elektrochemisch hergestelltes Brom:

Bei der Verwendung von elektrochemisch hergestelltem Brom (KOBRA®-Zelle) wird die Zelle entsprechend den Angaben des Herstellers eingebaut, und nachfolgende Parameter werden eingestellt:

- 1,00 ml/min Durchfluss für die mobile Phase B (5.30), es wird ein PTFE-Reaktionskapillar mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm und einer Länge von 34 cm verwendet;
- 100 µA Stromstärke.

WARNUNG — Es darf nie 100%ig organisches Lösemittel durch die KOBRA®-Zelle gespült werden, da dies die Membran beschädigen kann. Die HPLC-Pumpe darf nie vor dem Abstellen der Stromzufuhr der KOBRA®-Zelle ausgeschaltet werden.

Photochemischer Reaktor:

Bei Verwendung des Photochemical Reactor for Enhanced Detection (PHRED™) wird der photochemische Reaktor zwischen die HPLC-Säule und den Detektoreingang eingesetzt [9]. Der Reaktor besteht aus einer 25-m-PTFE-Reaktionskapillare mit 1/16 Zoll AD × 0,25 mm ID; und

- 1,00 ml/min Durchfluss für die mobile Phase A (5.29).

7.4.4 Identifizierung

Jedes Aflatoxin wird durch Vergleich der Retentionszeiten der Kalibrierlösung mit denen der Probenmesslösung identifiziert. Die Retentionszeit des Analyten im Probenextrakt entspricht der in der gleichen Folge gemessenen durchschnittlichen Retentionszeit der Kalibrierlösungen mit einer zulässigen Abweichung von $\pm 0,2$ min oder ± 50 % der Peakbreite bei halber Höhe (der jeweils größere Wert gilt), wie in [10] dargestellt.

7.4.5 Kalibrierung

Die Kalibrierkurven werden mit den Kalibrierlösungen (5.28) und nach Tabelle 2 erstellt. Die Peakflächen (y-Achse) der einzelnen Analyten werden gegen die entsprechenden Massenkonzentrationen (ng/ml) aufgetragen, und der Ausdruck wird auf Linearität geprüft. Eine Regressionsanalyse darf durchgeführt werden, um auf Signifikanz der Regressionsparameter zu prüfen.

8 Berechnung

Zuerst wird die Konzentration jedes einzelnen Aflatoxins, ρ , in ng/ml, in der Injektionslösung jeder Probe berechnet.

Dann wird der Massenanteil jedes Aflatoxins, w , in $\mu\text{g/kg}$, in der Probe mit Gleichung (2) berechnet:

$$w = \frac{\rho \times V_e \times V_{\text{final}}}{m_s \times V_c} \quad (2)$$

Dabei ist

ρ die mit der linearen Regression berechnete Massenkonzentration des Aflatoxins in der Injektionslösung, in ng/ml;

V_e das Extraktionsvolumen, in ml (hier: 100,0 ml);

V_{final} das nach Elution aus der IAC erhaltene Endvolumen, in ml (hier: 3,0 ml);

m_s die Masse der Einwaage, in g (hier: 25,0 g);

V_c das Volumen des auf die IAC gegebenen Extraktes, in ml (hier: 0,5 ml).

Wenn die Aflatoxinkonzentration der Probe außerhalb der Aflatoxinkonzentration der Kalibriergeraden liegt, wird die Probenmesslösung geeignet verdünnt, sodass sie wieder innerhalb der Kalibriergeraden liegt, und in das HPLC-System injiziert.

Die Menge des in der dotierten Probe festgestellten Aflatoxins wird anhand der relevanten Kalibrierkurve, die für die jeweilige Analysenserie vorbereitet wurde, berechnet.

Die Wiederfindungsrate RR , in %, wird mit Gleichung (3) berechnet:

$$RR = \frac{(w_s - w_u) \times 100}{w_a} \quad (3)$$

Dabei ist

w_s der Massenanteil von Aflatoxin in der dotierten Probe, in $\mu\text{g/kg}$;

w_u der Massenanteil von Aflatoxin in der nicht dotierten Probe, in $\mu\text{g/kg}$;

w_a der Massenanteil von Aflatoxin, das der dotierten Probe hinzugefügt wurde, in $\mu\text{g/kg}$.

Für die Aflatoxine B_1 , B_2 , G_1 und G_2 werden die jeweiligen Wiederfindungswerte berechnet.

Falls erforderlich, wird der durch die Wiederfindung korrigierte Massenanteil, ρ_c in $\mu\text{g/kg}$, mit Gleichung (4) berechnet:

$$\rho_c = \frac{(\rho_m) \times 100}{RR} \quad (4)$$

Dabei ist

ρ_m der Massenanteil des in der Einwaage gemessenen Aflatoxins, in $\mu\text{g/kg}$.

9 Präzision

9.1 Allgemeines

Einzelheiten über den Ringversuch zur Präzision des Verfahrens sind in Anhang C zusammengefasst. Die aus diesem Ringversuch abgeleiteten Werte sind nicht unbedingt auf andere Konzentrationsbereiche und andere Matrices anwendbar als in Anhang C angegeben.

9.2 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 nicht häufiger als in 5 % der Fälle (siehe Tabelle 3 und 4).

9.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Ergebnissen, die von zwei Laboratorien für identisches Untersuchungsmaterial erhalten werden, wird die Vergleichsgrenze R nicht häufiger als in 5 % der Fälle überschreiten (siehe Tabelle 3 und 4).

Tabelle 3 — Validierungsdaten für Aflatoxin B_1

Probe	$\bar{x}$ $\mu\text{g/kg}$	r $\mu\text{g/kg}$	R $\mu\text{g/kg}$
Chilipulver	16,7	3,60	5,70
Ingwer	5,41	1,92	2,32
gemischte Gewürze	4,84	4,74	4,74
Muskatnuss	3,89	1,88	2,23
Muskatnuss	11,2	2,32	4,62
Pfeffer	1,03	0,33	0,48
gemischte Gewürze + Ingwer	2,53	0,70	1,51
Pfeffer + Chili + Muskatnuss	1,38	0,31	0,48

Probe	$\bar{x}$ µg/kg	r µg/kg	R µg/kg
Kurkuma	2,28	2,28	2,38
Kurkuma + Ingwer	5,59	2,05	2,58
gemischte Gewürze	12,0	6,59	7,76

Tabelle 4 — Validierungsdaten für Gesamtaflatoxine

Probe	$\bar{x}$ µg/kg	r µg/kg	R µg/kg
Chilipulver	21,0	4,27	15,0
Ingwer	14,5	8,97	11,7
gemischte Gewürze	10,3	6,60	6,76
Muskatnuss	10,6	6,23	9,66
Muskatnuss	36,1	7,49	22,9
Pfeffer	2,46	0,75	2,61
gemischte Gewürze + Ingwer	4,59	1,32	3,22
Pfeffer + Chili + Muskatnuss	6,57	3,28	3,42
Kurkuma	6,61	6,78	2,91
Kurkuma + Ingwer	14,5	8,97	11,7
gemischte Gewürze	26,3	10,4	20,9

10 Prüfbericht

Der Prüfbericht sollte EN ISO/IEC 17025 entsprechen und muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe (Art, Herkunft, Bezeichnung der Probe);
- eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- das Datum der Probenahme und die Art des Probenahmeverfahrens (falls bekannt);
- das Datum des Probeeingangs;
- das Datum der Untersuchung;
- die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- alle Besonderheiten, die während der Untersuchung festgestellt wurden;
- alle Arbeitsschritte, die nicht in diesem Verfahren festgelegt sind oder als wahlfrei angesehen wurden und die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben.

Anhang A (informativ)

Beispielbedingungen für geeignete HPLC-FLD-Systeme

A.1 Allgemeines

Die aufgeführten HPLC-Parameter können als Richtwerte angesehen werden. Abhängig von der Trennsäule (RP-18-Säulenpackung, verschiedene Säulenmaße) sollte das Elutionsmittelverhältnis und/oder der Durchfluss so angepasst werden, dass die beste Trennung zwischen dem Analyten und den anderen extrahierten Bestandteilen der Matrix erreicht wird. Beispielchromatogramme, die unter Anwendung der folgenden Bedingungen erzeugt wurden, finden sich in Anhang B.

A.2 Beispiel für HPLC-Bedingungen

HPLC-Säule:	Spherisorb® ODS-1 Excel ⁵ , 250 mm × 4,6 mm ID, 5 µm
Injektionsvolumen:	100 µl
Säulentemperatur:	30 °C
Durchfluss:	1,0 ml/min
Mobile Phase:	Mobile Phase B (5.30)
Anregungswellenlänge:	364 nm
Emissionswellenlänge:	440 nm
Derivatisierungsverfahren:	KOBRA®-Zelle

A.3 Andere Beispiele für geeignete Säulen und Bedingungen für die mobile Phase

Die in Tabelle A.1 aufgeführten Bedingungen wurden von den Ringversuchsteilnehmern angewendet und stellten sich als geeignet dar.

5 Spherisorb® ODS-1 Excel wird nur als Beispiel verwendet, und dies bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

Tabelle A.1 — Beispiel für HPLC-Bedingungen, die zur Bestimmung von Aflatoxinen in Gewürzen geeignet sind

HPLC-Säule ⁶	Mobile Phase	Derivatisierungsverfahren	Durchfluss ml/min
Ascentis® C18 ⁶ , 150 × 4,6 mm ID, 5 µm	Wasser + Methanol + Acetonitril (60 + 24,5 + 15,5, v + v + v) mit 120 mg Kaliumbromid und 350 µl Salpetersäure (c = 4 mol/l) je Liter mobiler Phase	KOBRA®-Zelle	1
Inertsil® ODS-3V ⁶ , 150 × 4,6 mm ID, 5 µm	Wasser + Methanol (60 + 40, v + v) mit 119 mg Kaliumbromid und 350 µl Salpetersäure (c = 4 mol/l) je Liter mobiler Phase	KOBRA®-Zelle	1
Supelcosil™ LC-18 ⁶ , 250 × 4,6 mm ID, 5 µm	Wasser + Methanol + Acetonitril (6 + 3 + 2, v + v + v)	PBPB oder PHRED™	1
Venusil® XBP C18 ⁶ , 250 × 4,6 mm ID, 5 µm	Wasser + Methanol + Acetonitril (6 + 17 + 27, v + v + v) mit 119 mg Kaliumbromid und 350 µl Salpetersäure (c = 4 mol/l) je Liter mobiler Phase	KOBRA®-Zelle	1
Genesis® C18 ⁶ , 150 × 4,6 mm ID, 4 µm	Wasser + Acetonitril + Methanol (60 + 10 + 30, v + v + v) mit 119 mg Kaliumbromid und 350 µl Salpetersäure (c = 4 mol/l) je Liter mobiler Phase	KOBRA®-Zelle	1,5
Kinetex® XB-C18 ⁶ , 250 × 4,6 mm ID, 5 µm	Wasser + Acetonitril + Methanol (6 + 2 + 2, v + v + v) mit 119 mg Kaliumbromid und 350 µl Salpetersäure (c = 4 mol/l) je Liter mobiler Phase	KOBRA®-Zelle	1
Synergi™ Polar RP ⁶ , 250 × 4,6 mm ID, 4 µm	Wasser + Methanol + Acetonitril (56 + 14 + 30, v + v + v) und Wasser + Methanol + Acetonitril (30 + 24 + 46, v + v + v)	PBPB oder PHRED™	1,2
Symmetry® C18 ⁶ , 250 × 4,6 mm ID, 5 µm	Wasser + Methanol + Acetonitril (60 + 30 + 20, v + v + v) mit 120 mg Kaliumbromid und 350 µl Salpetersäure (c = 4 mol/l) je Liter mobiler Phase	KOBRA®-Zelle	1

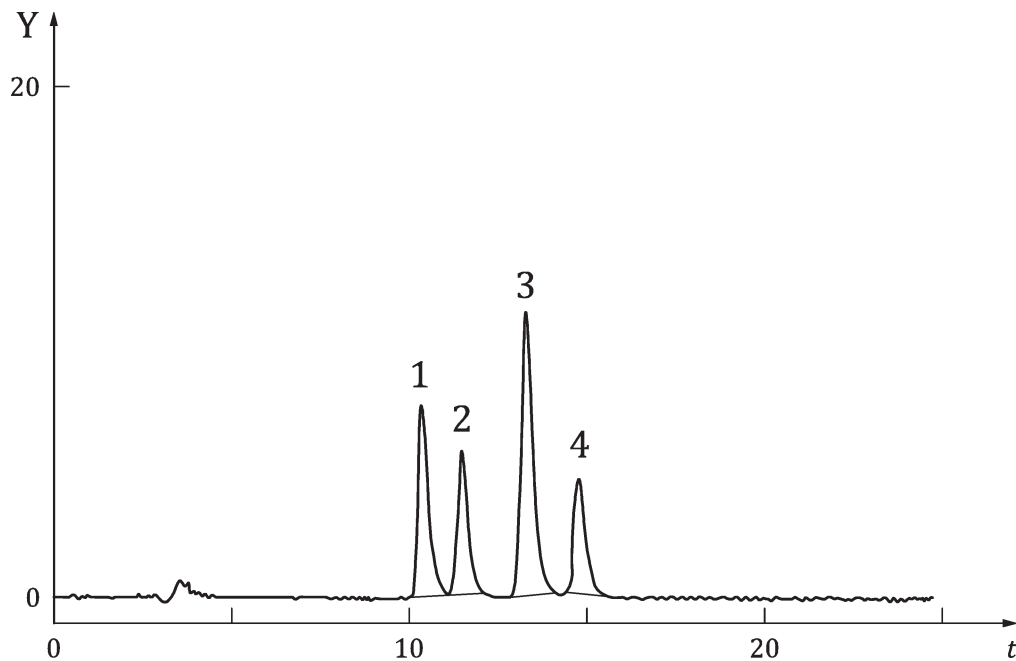
Falls Schwierigkeiten (z. B. chromatographische Interferenzen) während der Analyse auftreten, wird empfohlen, die LC-MS/MS für den Nachweis- und Bestätigungsschritt anzuwenden.

⁶ Ascentis® C18, Inertsil® ODS-3V, Supelcosil™ LC-18, Venusil® XBP C18, Genesis® C18, Kinetex® XB-C18, Synergi™ Polar RP und Symmetry® C18 werden als Beispiele verwendet. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

Anhang B (informativ)

Typische Chromatogramme

Alle Chromatogramme in Bild B.1 bis Bild B.5 wurden unter Anwendung der in A.1 angegebenen Bedingungen erzeugt.



Legende

- t Zeit, in min
 Y Signalintensität, in Millivolt
1 Aflatoxin G₂, Retentionszeit 10,45 min
2 Aflatoxin G₁, Retentionszeit 11,55 min
3 Aflatoxin B₂, Retentionszeit 13,39 min
4 Aflatoxin B₁, Retentionszeit 14,93 min

Bild B.1 — Chromatogramm einer Kalibrierlösung, die 1 µg/kg jedes Aflatoxins entspricht