

DIN EN 18034



ICS 13.020.55

Einsprüche bis 2024-01-03

Entwurf**Algen und algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte –
Verfahren zur Probenentnahme und Analyse –
Quantifizierung von Chlorophyll;
Deutsche und Englische Fassung prEN 18034:2023**

Algae and algae products or intermediates –
Methods of sampling and analysis –
Determination of chlorophyll a content;
German and English version prEN 18034:2023

Algues et produits à base d'algues –
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Détermination de la teneur en chlorophylle a;
Version allemande et anglaise prEN 18034:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-11-03 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 nagus@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 Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 80 Seiten

DIN-Normenausschuss Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 18034:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 172-00-16 AA „Algen und Algenprodukte“ im DIN-Normenausschuss Grundlagen des Umweltschutzes (NAGUS).

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.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Algen und algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte – Verfahren zur Probenentnahme und Analyse – Quantifizierung von Chlorophyll

Algae and algae products or intermediates – Methods of sampling and analysis – Determination of chlorophyll a content

Algues et produits à base d'algues – Méthodes d'échantillonnage et d'analyse – Détermination de la teneur en chlorophylle a

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
5 Geräte	8
6 Reagenzien und Hilfsmittel	8
7 Probenahme und Probenvorbereitung	9
7.1 Probenahme	9
7.2 Probebehandlung	9
8 Durchführung	10
8.1 Extraktion	10
8.2 Bestimmung der Konzentration der Chlorophyll- <i>a</i> -Standardlösung	11
8.3 Erstellen der Kalibrierkurve	11
8.4 Geräte für die Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle	12
8.5 HPLC-Analyse	12
8.5.1 HPLC-Aufbau	12
8.5.2 Dreifachgradient	13
8.5.3 Doppelgradient	13
8.5.4 Identifizierung	14
9 Berechnung der Chlorophyll <i>a</i> -Konzentration	14
9.1 Allgemeines	14
9.2 Vergleichpräzision zwischen Laboratorien	15
10 Prüfbericht	15
Anhang A (informativ) Chlorophyll-Standardlösungen und Standardkurven für die Kalibrierung	17
A.1 Wahl der Chlorophyll-Standardlösungen	17
Anhang B (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs und des Ringvergleichs für Chlorophyll <i>a</i> , <i>b</i> und <i>c</i>	18
B.1 Einleitung	18
B.2 Ergebnisse des Ringversuchs für Chlorophyll <i>a</i>	18
B.2.1 Einleitung	18
B.2.2 Material A — <i>Saccharina latissima</i>	18
B.2.3 Material B — <i>Nannochloropsis</i>	19
B.2.4 Schlussfolgerungen	19
B.3 Ergebnisse des Ringversuchs für Chlorophyll <i>b</i> und <i>c</i>	20
B.3.1 Material A — <i>Saccharina latissima</i>	20
B.3.2 Material B — <i>Nannochloropsis</i>	20
B.3.3 Schlussfolgerungen	20
B.4 Ergebnisse des Ringvergleichs für Chlorophyll <i>a</i>	21
B.4.1 Einleitung	21
B.4.2 Material A — <i>Saccharina latissima</i> — Methanolextraktion	21
B.4.3 Material A — <i>Saccharina latissima</i> — Aceton-/Methanolextraktion	22
B.4.4 Material B — <i>Nannochloropsis</i> — Methanolextraktion	22
B.4.5 Material B — <i>Nannochloropsis</i> — Aceton-/Methanolextraktion	23
B.4.6 Material C — <i>Phaeodactylum</i> — Methanolextraktion	24
B.4.7 Material C — <i>Phaeodactylum</i> — Aceton-/Methanolextraktion	24
B.4.8 Material D — <i>Ulva</i> — Methanolextraktion	25
B.4.9 Material D — <i>Ulva</i> — Aceton-/Methanolextraktion	26
B.4.10 Diskussion	26
B.4.11 Schlussfolgerungen	28

B.5	Ergebnisse des Ringvergleichs für Chlorophyll <i>b</i>	28
B.5.1	Material B — Chlorophyll <i>b</i> — <i>Nannochloropsis</i>	28
B.5.2	Material C — Chlorophyll <i>b</i> — <i>Phaeodactylum</i>	28
B.5.3	Material D — Chlorophyll <i>b</i> — <i>Ulva</i>	29
B.5.4	Diskussion	30
B.5.5	Schlussfolgerungen	30
B.6	Ergebnisse des Ringvergleichs für Chlorophyll <i>c</i>	30
B.6.1	Material A — Chlorophyll <i>c</i> — <i>Saccharina latissima</i>	30
B.6.2	Material B — Chlorophyll <i>c</i> — <i>Nannochloropsis</i>	31
B.6.3	Material C — Chlorophyll <i>c</i> — <i>Phaeodactylum</i>	31
B.6.4	Material D — Chlorophyll <i>c</i> — <i>Ulva</i>	31
B.6.5	Diskussion	32
B.6.6	Schlussfolgerungen	32
B.7	Schlussfolgerungen des Ringvergleichs	32
B.7.1	Schlussfolgerungen für Chlorophyll <i>a</i>	32
B.7.2	Schlussfolgerungen für Chlorophyll <i>b</i> und <i>c</i>	33
Anhang C (informativ)	Identifizierung von Chlorophyll <i>a</i>	34
C.1	Identifizierung von Chlorophyll <i>a</i>	34
C.2	Chlorophyll- <i>a</i> -Standardlösung: Dreifachgradient — stationäre C18-Phase	34
C.2.1	Allgemeines	34
C.2.2	Positive Identifizierung	35
C.2.3	Negative Identifizierung	36
C.3	Chlorophyll- <i>a</i> -Standardlösung: Doppelgradient — stationäre C8-Phase	37
C.3.1	Allgemeines	37
C.3.2	Positive Identifizierung	38
C.3.3	Negative Identifizierung	39
Literaturhinweise		40

Bilder

Bild B.1	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>a</i> in Material A	19
Bild B.2	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>a</i> in Material B	19
Bild B.3	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>b</i> und <i>c</i> in Material A	20
Bild B.4	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>b</i> und <i>c</i> in Material B	20
Bild B.5	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>a</i> in Material A — Methanolextraktion	21
Bild B.6	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>a</i> in Material A — Aceton-/Methanolextraktion	22
Bild B.7	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>a</i> in Material B — Methanolextraktion	23
Bild B.8	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>a</i> in Material B — Aceton-/Methanolextraktion	23
Bild B.9	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>a</i> in Material C — Methanolextraktion	24
Bild B.10	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>a</i> in Material C — Aceton-/Methanolextraktion	25
Bild B.11	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>a</i> in Material D — Methanolextraktion	25
Bild B.12	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>a</i> in Material D — Aceton-/Methanolextraktion	26
Bild B.13	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>a</i> in Material D — beide Extraktionsverfahren	27
Bild B.14	— Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll <i>b</i> in Material B	28

Bild B.15 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll b in Material C .	29
Bild B.16 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll b in Material D .	29
Bild B.17 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll c in Material A .	30
Bild B.18 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll c in Material B .	31
Bild B.19 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll c in Material C .	31
Bild B.20 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll c in Material D .	32
Bild C.1 — Chromatogramm der Chlorophyll- <i>a</i> -Standardlösung, bestimmt mit Dreifachgradient und stationärer C18-Phase	34
Bild C.2 — Spektrum der Chlorophyll- <i>a</i> -Standardlösung, bestimmt mit Dreifachgradient und stationärer C18-Phase	35
Bild C.3 — Chromatogramm der <i>Nannochloropsis</i> -Biomasse, ermittelt mit Dreifachgradient und stationärer C18-Phase	35
Bild C.4 — Spektren der <i>Nannochloropsis</i> -Biomasse, ermittelt mit Dreifachgradient und stationärer C18-Phase	36
Bild C.5 — Chromatogramm der <i>Nannochloropsis</i> -Biomasse, ermittelt mit Dreifachgradient und stationärer C18-Phase	36
Bild C.6 — Spektren der <i>Nannochloropsis</i> -Biomasse, ermittelt mit Dreifachgradient und stationärer C18-Phase	37
Bild C.7 — Chromatogramm der Chlorophyll- <i>a</i> -Standardlösung, bestimmt mit Doppelgradient und stationärer C8-Phase	37
Bild C.8 — Spektrum der Chlorophyll- <i>a</i> -Standardlösung, bestimmt mit Doppelgradient und stationärer C8-Phase	38
Bild C.9 — Chromatogramm der <i>Nannochloropsis</i> -Biomasse, ermittelt mit Doppelgradient und stationärer C8-Phase	38
Bild C.10 — Spektren der <i>Nannochloropsis</i> -Biomasse, ermittelt mit Doppelgradient und stationärer C8-Phase	39
Bild C.11 — Chromatogramm der <i>Nannochloropsis</i> -Biomasse, ermittelt mit Doppelgradient und C8-Säule	39
Bild C.12 — Spektren der <i>Nannochloropsis</i> -Biomasse, ermittelt mit Doppelgradient und C8-Säule	39

Tabellen

Tabelle 1 — Extinktionskoeffizienten von Chlorophyllen und Abbauprodukten auf Grundlage von Anhang G von Jeffrey et al. [1]	11
Tabelle 2 — Dreifachgradient-Einstellwerte	13
Tabelle 3 — Doppelgradient-Einstellwerte	14
Tabelle 4 — Qualitätsparameter der Ergebnisse des Ringvergleichs für das Chlorophyll <i>a</i> -Verfahren	15
Tabelle A.1 — Chlorophylle und Abbauprodukte und deren Kategorie- und CAS-Nummer (CAS-Nr.)	17
Tabelle B.1 — Berichtete Chlorophyll- <i>a</i> -Konzentrationen und resultierende RSD mit den verschiedenen verwendeten Lösemitteln	26

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 18034:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 545 „Algen und Algenprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

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

Einleitung¹

Dieses Dokument wurde von den Fachleuten des CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ erarbeitet.

Das Europäische Komitee für Normung (CEN) wurde von der Europäischen Kommission (EK) beauftragt, Europäische Normen oder europäische Normungsergebnisse zu erarbeiten, um die Umsetzung von Artikel 3 der Richtlinie 2009/28/EG für Algen und algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte zu unterstützen.

Dieser als Normungsauftrag M/547² vorgelegte Auftrag trägt auch zum Informationsaustausch über „Innovation für nachhaltiges Wachstum: Eine Bioökonomie für Europa“ bei.

Die frühere Arbeitsgruppe 218 „Algen“ des Technischen Lenkungsausschusses von CEN wurde im Jahr 2016 gegründet, um ein Arbeitsprogramm als Teil dieses Normungsauftrags zu erarbeiten. Das Technische Komitee CEN/TC 454 „Algen und Algenprodukte“ wurde gebildet, um das Arbeitsprogramm auszuführen, mit dem eine Normenreihe erarbeitet wird.

Das Interesse an Algen und algenbasierten Produkten oder Zwischenprodukten als wertvolle Quelle, u. a. von Kohlenhydraten, Proteinen, Lipiden und verschiedenen Pigmenten, hat in Europa deutlich zugenommen. Diese Stoffe eignen sich für ein breites Spektrum an Anwendungen, von Lebensmitteln und Futtermitteln bis hin zu anderen Bereichen wie Textilien, Kosmetika, Biopolymeren, Biokraftstoffen und Dünger/Biostimulanzien. Es wurde festgestellt, dass die Normung eine wichtige Rolle spielt, um die Nutzung von Algen und Algenprodukten zu fördern.

Die Arbeit des CEN/TC 454 sollte die Zuverlässigkeit der Lieferkette verbessern und so das Vertrauen der Industrie und der Verbraucher in Algen steigern, zu denen Makroalgen, Mikroalgen, Cyanobakterien, Labyrinthulomyceten (Netzschleimpilze), algenbasierte Produkte oder Zwischenprodukte gehören, und wird die Kommerzialisierung der europäischen Algenindustrie fördern und unterstützen.

Aufgrund der Bedeutung von Chlorophyll *a* in Algen und Algenprodukten ist es wichtig, ein gutes standardisiertes Verfahren zur Quantifizierung von Chlorophyll *a* zur Verfügung zu haben.

1 Text in grau ist fest (auf Grundlage von Entscheidung 5-2019, getroffen durch CEN/TC 454 am 29.01.2019/Thema: CEN/TC 454 – Genehmigung des Allgemeinen Einleitungstexts).

2 Abrufbar unter http://ec.europa.eu/growth/toolsdatabases/mandates/index.cfm?fuseaction=refSearch_search#

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Laborverfahren zur Quantifizierung von Chlorophyll *a* in Algen fest. Das Verfahren wurde ursprünglich an der Mikroalgenart *Nannochloropsis* und einer wärmebehandelten Algenprodukt-Tomatensuppe mit *Nannochloropsis*-Zusatz und an den Makroalgenarten *Ulva* sp, *Furcellaria lumbricalis* und *Saccharina latissima* geprüft und evaluiert. Während eines Ringversuchs wurde das Verfahren an der Mikroalgenart *Nannochloropsis* und der Makroalgenart *Saccharina latissima* untersucht. Die Mikroalgenarten *Nannochloropsis* und *Phaeodactylum* und die Makroalgenarten *Ulva* sp und *Saccharina latissima* wurden in einem Ringvergleich untersucht. Dieses Dokument ist nur für Chlorophyll *a* validiert, aber es kann auch für andere Chlorophyllarten verwendet werden.

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 17399, *Algen und Algenprodukte — Begriffe*

EN 17605:2022, *Algen und Algenprodukte — Methoden zur Probeentnahme und Analyse — Probebehandlung*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 17399 und die folgenden Begriffe.

3.1

Chlorophylle

Chlorophyll *a*, *b*, *c1*, *c2* und *d* unter Ausschluss von Abbauprodukten

3.2

Carotinoide

alle akzessorischen Pigmente der Tetraterpenklasse, einschließlich Carotine und Xanthophylle

3.3

Carotine

nicht oxygenierte (sauerstofffreie) Carotinoide wie beispielsweise α -Carotin, β -Carotin und Lycopin

3.4

Chlorophyll-Standardlösung

Lösung mit einer definierten Konzentration des interessierenden Chlorophylls, die zur Bestimmung des interessierenden Analyts mithilfe von Standardkurven verwendet wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Detailliertere Angaben dazu finden sich in Anhang A.

3.5

Abbauprodukt

Ergebnis einer physikalischen oder chemischen Wechselwirkung, z. B. durch Licht-, Enzym-, Wärme- oder Säureeinwirkung, wobei eine vollständig oder teilweise abgebaute Pigmentverbindung zurückbleibt

3.6

Mutterlösung

Anfangsbestandteil der Standardlösung, aus dem die Verdünnungen zur Erstellung von Standardkurven entnommen werden

3.7

Phäophytin a

Abbauprodukt von Chlorophyll *a*

3.8

Pigmente

alle farbigen Substanzen in Algen und Algenprodukten, wie beispielsweise Chlorophylle, Carotinoide und Phycobiliproteine, einschließlich ihrer Abbauprodukte

3.9

Xanthophylle

Carotinoid-Moleküle, die Sauerstoff enthalten, wie beispielsweise Lutein und Zeaxanthin

4 Kurzbeschreibung

Die Chlorophylle werden mittels Methanol aus der Probe extrahiert und mittels HPLC getrennt. Die getrennten Bestandteile werden bei 440 nm mit einem Photodiodenarray-Detektor analysiert.

5 Geräte

Übliche Laborgeräte und insbesondere Folgendes:

- 5.1 Analysenwaage** mit einer Fehlergrenze von möglichst 0,01 mg.
- 5.2 Hochleistungs-Flüssigchromatograph (HPLC)** mit Photodiodenarray-Detektor (PDA).
- 5.3 Zentrifuge.**
- 5.4 Vortexmischer.**
- 5.5 Spektrophotometer.**
- 5.6 Abzugshaube.**
- 5.7 Lagerbehälter**, dunkel, zur Lagerung der Proben vor der Analyse.

6 Reagenzien und Hilfsmittel

6.1 HPLC-Reagenzien.

Alle Reagenzien sollten von HPLC-Qualität sein.

Für den Dreifachgradienten (siehe 8.6.1.1):

6.1.1 Gemisch aus Methanol mit einem Volumenanteil von 80 % und 0,5 M Ammoniumacetatpuffer pH-Wert 7,2 mit einem Volumenanteil von 20 %.

6.1.2 Gemisch aus Acetonitril mit einem Volumenanteil von 90 %, und gereinigtem Wasser, z. B. Milli-Q, mit einem Volumenanteil von 10 %.

6.1.3 Ethylacetat.

Für den Doppelgradienten (siehe 8.6.1.2):

6.1.4 Gemisch aus Methanol mit einem Volumenanteil von 70 % und 0,028 M TBAA (Tetrabutylammoniumacetat) in gereinigtem Wasser, z. B. Milli-Q.

6.1.5 Methanol.

6.2 HPLC-Säule.

Für den Dreifachgradienten (siehe 8.6.1.1):

6.2.1 Stationäre C18-Phase, z. B. Nova-Pak 4 µm (3,9 × 150 mm).

Für den Doppelgradienten (siehe 8.6.1.2).

6.2.2 Stationäre C8-Phase, z. B. Zorbax Eclipse XDB-C8 3,5 µm (4,6 × 150 mm).

6.3 Pyrex-Röhrchen mit Schraubverschluss, 10 ml (1/Messprobe) und 20 ml (1/Messprobe).

6.4 Mikropipetten.

6.5 Pasteurpipetten.

6.6 Glasperlen, Ø 0,75 mm bis 1 mm.

6.7 HPLC-Fläschchen und Verschlüsse.

6.8 Spritze mit einem Volumen von 1 ml und Filter (0,20 µm, Ø 15 mm).

6.9 Methanol mit einem Volumenanteil von ≥ 99,0 %.

6.10 Quarzküvetten.

6.11 Chlorophyll-Standardlösungen, zur Identifizierung und Quantifizierung von Chlorophyll, die den folgenden Qualitätsparametern entsprechen müssen:

- Konzentrationsbereich von 0,5 bis 3,0 µg/ml;
- in Lösemittel gelöst;
- vom Lieferanten auf Trockeneis transportiert;
- nach Eintreffen bei mindestens –20 °C und vorzugsweise bei –80 °C gelagert.

Empfehlungen für Chlorophyll-Standardlösungen werden in Anhang A gegeben.

6.12 Aluminiumfolie.

7 Probenahme und Probenvorbereitung

7.1 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Labor eine Probe erhält, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Die Probenahme ist nicht Teil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens.

7.2 Probebehandlung

Probenahme und Probebehandlung sind nicht Teil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenhandhabungsverfahren ist in EN 17605:2022 angegeben, mit den folgenden Anpassungen/Ergänzungen:

- die Feinvermahlung muss wie in EN 17605:2022, 3.13 definiert durchgeführt werden;
- der Transport muss auf Trockeneis erfolgen;
- die Lagerung muss bei -80 °C erfolgen. Auch müssen Makroalgen gefriergetrocknet werden.

Übermäßige Lagerungszeiten der Probe sollten vermieden werden. Falls diese nicht vermieden werden konnten, sollte die Probe vor der Verwendung erneut gefriergetrocknet werden.

Es müssen drei Messproben der Probe analysiert werden, um den Mittelwert und die Standardabweichung berechnen zu können.

Die Proben müssen vor und während der Analyse jederzeit vor Licht geschützt werden, z. B. mithilfe von Aluminiumfolie.

Proben dürfen nicht länger als einen Monat gelagert werden, weil durch die Lagerung selbst bei gefrorenen Proben Chlorophyll abgebaut werden können.

8 Durchführung

8.1 Extraktion

Das gesamte Extraktionsverfahren, ausgenommen das Wägen, muss unter einer Abzugshaube durchgeführt werden.

Das Extraktionsverfahren muss in den folgenden Schritten durchgeführt werden:

- 1) Eine Messprobe von etwa 25 mg der Probe wird in ein 10-ml-Pyrex-Röhrchen mit Schraubverschluss eingewogen (d. h. Masse der Messprobe).
- 2) Die Masse wird auf 0,01 mg gerundet aufgezeichnet.
- 3) Ungefähr 850 mg Glasperlen werden zugegeben.
- 4) 5 ml Methanol werden zugegeben.
- 5) Es wird 30 s lang kräftig geschüttelt.
- 6) Es wird bei 450 g 10 min lang zentrifugiert.
- 7) Das Lösemittel wird in ein 20-ml-Pyrex-Röhrchen mit Schraubverschluss überführt, z. B. mit einer Pasteurpipette.
- 8) Das Pellet wird im 10-ml-Pyrex-Röhrchen belassen.
- 9) Schritt 4) bis Schritt 8) wird noch dreimal wiederholt; dabei sollte ein vereinigter Extrakt aus 4 aufeinanderfolgenden Extraktionen entstehen.
- 10) Der vereinigte Extrakt wird mit einem Gesamtvolumen von 20 ml durch Umdrehen des Röhrchens homogenisiert.
- 11) Der Extrakt wird mit einer Spritze unter Verwendung eines 0,20- μm -Filters in das HPLC-Fläschchen überführt.

Die Chlorophyllkonzentration nimmt während der Lagerung der Extrakte ab, sogar bei Temperaturen von -20 °C und -80 °C . Daher sollten die Extrakte so schnell wie möglich nach der Extraktion im HPLC analysiert werden.

8.2 Bestimmung der Konzentration der Chlorophyll-*a*-Standardlösung

Für die Kalibrierkurve muss die Konzentration der Chlorophyll-*a*-Standardlösung wie unten beschrieben mit den in Tabelle 1 angegebenen veröffentlichten Extinktionskoeffizienten spektrophotometrisch gemessen werden.

Eine Mutterlösung mit einem Volumenanteil von 90 % Aceton, die 0,025 mg/ml BHT enthält, wird hergestellt; die Konzentration der Standardlösung beträgt 1 µg/ml.

Die Lösungen werden unter einer Abzugshaube und weit weg von direktem Licht aufbewahrt. Die Absorption ($A_{\max}$) wird in einer 1-cm-Küvette bei der Standardwellenlänge $\lambda_{\max}$ (zusammen mit dem veröffentlichten Extinktionskoeffizienten angegeben) und bei 750 nm gemessen, um die Lichtstreuung zu kompensieren. Es ist zu beachten, dass die Absorption der Chlorophylle bei einem bekannten $\lambda_{\max}$ im Bereich 0,2-0,8 liegen sollte. Wenn die Absorption außerhalb dieses Bereichs liegt, wird die Lösung verdünnt, bis die Absorption innerhalb des Bereichs liegt.

Auch sollte bei neu erworbenen Chlorophyll-Standardlösungen die Konzentration spektrophotometrisch gemessen werden, da nach der Bestimmung der Konzentration durch den Lieferanten schon ein gewisser Abbau stattgefunden haben kann.

Zur Bestimmung der Konzentration der Chlorophylle ist die folgende Gleichung zu verwenden:

$$CiSTD = 10^3 \frac{Ai(\lambda_{\max}) - Ai(750)}{b\alpha} \quad (1)$$

Dabei ist

$CiSTD$ die Konzentration von Pigment *i* in der Standardlösung (in µg/ml);

$Ai(\lambda_{\max})$ die Absorption bei $\lambda_{\max}$;

$Ai(750)$ die Absorption bei 750 nm;

b die Pfadlänge der Küvette (cm) (=1 cm); und

α der massespezifische Extinktionskoeffizient ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$) von Chlorophyll *i* (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 — Extinktionskoeffizienten von Chlorophyllen und Abbauprodukten auf Grundlage von Anhang G von Jeffrey et al. [1]

<i>Pigmentname</i>	<i>Lösemittel</i>	$\Lambda(nm)$	$\alpha(L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1})$
Chlorophyll <i>a</i> (MVChla)	90 % Aceton	664.3	87.67
Chlorophyll <i>b</i>	90 % Aceton	646.8	51.36
Chlorophyll <i>c2</i>	90 % Aceton	443.8	374.00
Phäophorbid <i>a</i>	90 % Aceton	667.0	74.20
Phäophytin <i>a</i>	90 % Aceton	667.0	51.20

8.3 Erstellen der Kalibrierkurve

Es muss eine Kalibrierkurve erstellt werden, indem Chlorophyll-Standardlösungen mit dem Extraktionslösemittel Methanol verdünnt werden. Es sind stets Mehrpunktkalibrierungen durchzuführen. Daher sollten mindestens 6 Verdünnungen der Mutterlösung mit einem Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 1,5 µg/ml her-

gestellt werden. Für jede Verdünnung ist die Peakfläche zweimal durch HPLC-Analyse mit dem in 8.5 beschriebenen Verfahren zu bestimmen, und die Kalibrierkurve ist als Peakfläche gegen die Konzentration zu erstellen. Es muss eine Kalibrierkurve auf Grundlage der doppelten Ergebnisse bei jeder Konzentration erstellt werden. Die resultierenden Kalibrierkurven sollten linear nach folgender Gleichung sein:

$$y = ax + b \quad (2)$$

Dabei ist

- y die Absorption;
- x die Konzentration in µg/ml;
- a die Steigung;
- b der Schnittpunkt mit der y-Achse.

Es sollte beachtet werden, dass die Bestimmungskoeffizienten (R^2 -Werte) nie niedriger als 0,99 sein dürfen.

In den folgenden Fällen muss eine neue Kalibrierkurve erstellt werden:

- Es wurde ein neuer Referenzstandard gekauft.
- Es muss eine neue Chlorophyllart analysiert werden.
- Es wird ein anderer Gradient verwendet.
- Die Art der verwendeten stationären Phase wird geändert.
- Die Einstellungen des HPLC-Verfahrens wurden geändert.
- Das HPLC wurde an einen anderen Standort gebracht.

8.4 Geräte für die Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle

Kalibrierkurven sollten regelmäßig überprüft werden. Mindestens einmal jährlich müssen neue Chlorophyll-Standardlösungen zur Erstellung von Kalibrierkurven beschafft werden.

Wenn eine neue Probensequenz am HPLC initiiert wird, sollten 3 Qualitätsprüfungen mit der Verdünnungsreihe durchgeführt werden, um die Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle der Geräte sicherzustellen. Für diese Qualitätsprüfungen sollten 3 Fläschchen mit bekannten Konzentrationen, die vorher bei der Erstellung von Kalibrierkurven eingesetzt wurden, verwendet werden. Es ist unerheblich, welche Konzentration gewählt wird, wenn die Konzentration ursprünglich bei der Erstellung der Standardkurve gemessen wurde, so dass ein Vergleich der resultierenden Peakflächen mit den zuvor ermittelten möglich ist. Die Qualität wird als gut angesehen, wenn die Abweichung der resultierenden Konzentrationen nicht höher als 10 % ist.

Nachdem die Chlorophyll-Standardlösungen erstmalig gemessen wurden, muss der Verschluss der Fläschchen erneuert werden. Die Fläschchen müssen bei einer Temperatur von –20 °C oder niedriger gelagert werden. Falls möglich, wird eine Lagerung bei –80 °C empfohlen.

8.5 HPLC-Analyse

8.5.1 HPLC-Aufbau

Es wird empfohlen, den Dreifachgradienten (siehe 8.5.2) mit der stationären C18-Phase (siehe 6.2.1) zu verwenden. Falls die vorhandene Ausrüstung für die Anwendung eines Dreifachgradienten nicht geeignet ist, darf der Doppelgradient (siehe 8.5.3) mit der stationären C8-Phase (siehe 6.2.2) verwendet werden.

8.5.2 Dreifachgradient

8.5.2.1 Mobile Phasen

- A: Gemisch aus Methanol mit einem Volumenanteil von 80 % und 0,5 M Ammoniumacetatpuffer pH-Wert 7,2 mit einem Volumenanteil von 20 %
- B: Gemisch aus Acetonitril mit einem Volumenanteil von 90 % und gereinigtem Wasser, z. B. Milli-Q, mit einem Volumenanteil von 10 %
- C: Ethylacetat

8.5.2.2 Einstellwerte

Tabelle 2 — Dreifachgradient-Einstellwerte

Zeit (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	100	0	0
3	0	100	0
14	0	50	50
16	50	0	50
22.5	20	0	80
26	20	0	80
30	0	0	100
32	80	0	20
33	100	0	0

- a) Injektionsvolumen: 40 µl
- b) Durchflussrate: 0,7 ml/min
- c) Säule T: 30 °C
- d) Probe T: 10 °C
- e) PDA: 440 nm (für Phäophytin wird die Absorption bei 410 nm verwendet)

8.5.3 Doppelgradient

8.5.3.1 Mobile Phase

- A: Gemisch aus Methanol mit einem Volumenanteil von 70 % und 0,028 M TBAA (Tetrabutylammonium-acetat) in Wasser mit einem Volumenanteil von 30 %
- B: Methanol

8.5.3.2 Einstellwerte

Tabelle 3 — Doppelgradient-Einstellwerte

Zeit (min)	A	B
0	95	5
27	5	95
34	5	95
35	0	100
38	0	100
40	95	5
46	95	5

- a) Injektionsvolumen: 100 µl
- b) Durchflussrate: 0,9 ml/min
- c) Säule T: 60 °C
- d) Probe T: 4 °C

PDA: 440 nm (für Phäophytin a wird die Absorption bei 410 nm verwendet)

8.5.4 Identifizierung

Um Chlorophyll *a* zu identifizieren, sollten die Retentionszeit und das Spektrum mit der Chlorophyll-Standardlösung konsistent sein. Eine Abweichung der Retentionszeit von höchstens 5 % ist zulässig.

Während der Integration und Verarbeitung der Ergebnisse müssen die Peaks konsistent integriert werden. Es kann vorkommen, dass mehrere Chlorophyll-Peaks nebeneinander erkannt werden. Wenn dies der Fall ist, müssen die Flächen aller Peaks mit dem gleichen Spektrum wie die Chlorophyll-Standardlösung eingeschlossen werden. Anhang C enthält mehrere Beispiele für Chromatogramme und Spektren, die dies illustrieren.

9 Berechnung der Chlorophyll *a*-Konzentration

9.1 Allgemeines

Die Chlorophyll *a*-Konzentrationen ist folgendermaßen aus den Kalibrierkurven zu berechnen:

$$C_{\text{chlorophyll } a} = \frac{(A_{\text{chlorophyll } a} - \text{intersection})}{\text{slope} \times \frac{V_x}{M_f}} \quad (3)$$

Dabei ist

$C_{\text{chlorophyll } a}$ die Konzentration von Chlorophyll *a* in der Probe (µg/g);

$A_{\text{chlorophyll } a}$ die Peakfläche von Chlorophyll *a*;

Schnittpunkt der Wert *b* aus Gleichung (2);

Steigung der Wert *a* aus Gleichung (2);

V_x das Extraktionsvolumen (in ml);

Mf die Probenmasse (in g).

9.2 Vergleichpräzision zwischen Laboratorien

Bei der Analyse von drei Messproben der gleichen Probe muss eine höchste relative Standardabweichung von 10 % erreicht werden.

Bei der statistischen Evaluierung des Ringversuchs (ILT, en: Interlaboratory Trial) und des Ringvergleichs (RR, en: Round Robin) für das Chlorophyllanalyseverfahren wurde eine annehmbare höchste Standardabweichung von 25 % des Konsenswerts verwendet.

Auf Grundlage der ILT- und RR-Ergebnisse (Anhang B) wurde nachgewiesen, dass das Verfahren annehmbare Werte für mehrere Algenarten liefert. Das 25-%-Annahmekriterium wurde für die Makroalgenart *Ulva* sp nicht erfüllt. Robuste statistische Verfahren konnten auf die beim RR erhaltenen Daten aufgrund der stark abweichenden Ergebnisse der drei Laboratorien nicht angewendet werden; nach Beratung konnte hierfür keine angemessene Ursache ermittelt werden und/oder es erfolgte durch manche dieser Laboratorien keine Reaktion.

Auf Grundlage der RR-Ergebnisse ist der RSD_R -Wert für die anderen drei Algenarten ziemlich stabil. Daher wird erwartet, dass die in Tabelle 4 angegebenen Merkmale auch für andere Algenarten anwendbar sind.

Tabelle 4 — Qualitätsparameter der Ergebnisse des Ringvergleichs für das Chlorophyll α -Verfahren

Algenart	Chloro- phyll α-Gehalt (absoluter Massenanteil)	1 σ-Wert (absoluter Massenanteil)	RSD_R (in %)	R_{abs} (in %)	R_{rel} (in %)
<i>Nannochloropsis</i>	2,8	0,73	26	2,0	73
<i>Phaeodactylum</i>	0,67	0,13	19	0,4	54
<i>Saccharina latissima</i>	0,0061	0,0019	31	0,01	87
Legende RSD_R relative Standardabweichung der Vergleichpräzision zwischen Laboratorien R_{abs} absolute Vergleichpräzision zwischen Laboratorien R_{rel} relative Vergleichpräzision zwischen Laboratorien					

10 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

- alle zur vollständigen Identifizierung der Probe notwendigen Angaben;
- das angewendete Probenahmeverfahren (falls bekannt);
- das angewendete Prüfverfahren mit Verweisung auf dieses Protokoll, einschließlich Einzelheiten zur stationären Phase und zum Gradienten;
- alle in diesem Protokoll nicht festgelegten oder als optional angesehenen Betriebsbedingungen, einschließlich Einzelheiten zu allen Zwischenfällen, die das (die) Prüfergebnis(se) beeinflusst haben könnten;
- der Gehalt an Chlorophyll α , ausgedrückt in mg/g relative Trockenmasse;
- die mit dem/den Prüfergebnis(sen) verbundene Unsicherheit;

g) das Prüfdatum.

Anhang A (informativ)

Chlorophyll-Standardlösungen und Standardkurven für die Kalibrierung

A.1 Wahl der Chlorophyll-Standardlösungen

Für die Identifizierung und Quantifizierung werden aufgrund der hohen Qualität und Reinheit Chlorophyll-Standardlösungen von DHI empfohlen.

Kategorie- und CAS-Nummern von Chlorophyllen und Abbauprodukten sind in Tabelle A.1 enthalten.

Tabelle A.1 — Chlorophylle und Abbauprodukte und deren Kategorie- und CAS-Nummer (CAS-Nr.)

Pigmentname	Kategorie-Nr.	CAS-Nr.
Chlorophyll a	C5753	479-61-8
Chlorophyll b	PPS-CHLB	519-62-0
Chlorophyll c2	PPS-CHLC2	27736-03-4
Chlorophyll c3		
Phäophytin a	PPS-PHAE	603-17-8

Anhang B (informativ)

Ergebnisse des Ringversuchs und des Ringvergleichs für Chlorophyll *a*, *b* und *c*

B.1 Einleitung

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Ergebnissen wurden zur Optimierung der Norm ein Ringversuch und ein Ringvergleich durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse sind in diesem Anhang angegeben.

Die statistische Herangehensweise kann dem Bericht über den Ringversuch für Algen und Algenprodukte entnommen werden [2].

B.2 Ergebnisse des Ringversuchs für Chlorophyll *a*

B.2.1 Einleitung

Von April 2021 bis Juni 2021 wurde durch das Forschungsinstitut Wageningen Food Safety Research der Universität Wageningen im Auftrag von CEN TC 454 an Algen und Algenprodukten ein Ringversuch (ILT) über Chlorophyll in Mikro- und Makroalgen organisiert. Dieser ILT ermöglichte es den Teilnehmenden, die analytische Leistung nach dem „Protokollentwurf für die Analyse von Chlorophyll in Algen und Algenprodukten“ zu untersuchen.

Für diesen ILT wurden zwei Materialien an die Teilnehmenden gesendet:

- Material A: *Saccharina latissima*, eine braune Makroalge;
- Material B: *Nannochloropsis*, eine Mikroalgenart.

Zehn Laboratorien registrierten sich für die Analyse des Chlorophylls, aber die meisten davon entschieden sich nach Erhalt des Protokollentwurfs für den Rückzug ihrer Teilnahme.

B.2.2 Material A — *Saccharina latissima*

Es wurden drei quantitative Ergebnisse berichtet, und ein Teilnehmender wies das Vorhandensein von Chlorophyll *a* nicht nach. Bei der Homogenitätsuntersuchung betrug der Mittelwert der 20 Analysen 0,05 % Chlorophyll *a*. Bild B.1 zeigt die Ergebnisse der Laboratorien und der Homogenitätsuntersuchung.

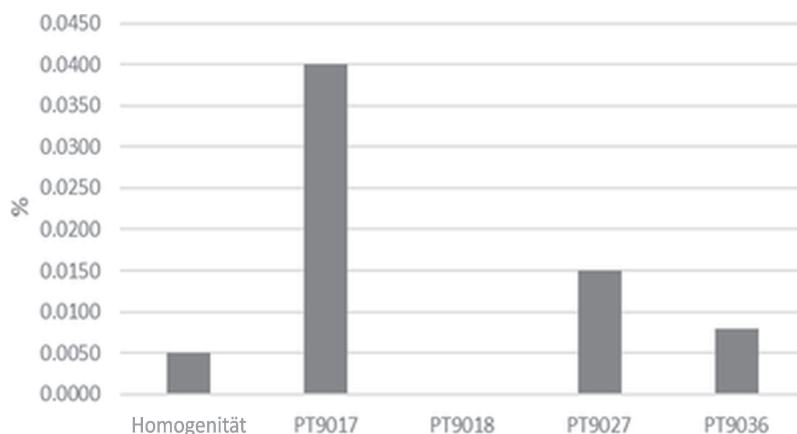


Bild B.1 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll a in Material A

B.2.3 Material B — *Nannochloropsis*

Es wurden vier quantitative Ergebnisse berichtet. Bei der Homogenitätsuntersuchung betrug der Mittelwert der 20 Analysen 1,92 % Chlorophyll *a*. Bild B.2 zeigt die Ergebnisse der Laboratorien und der Homogenitätsuntersuchung.

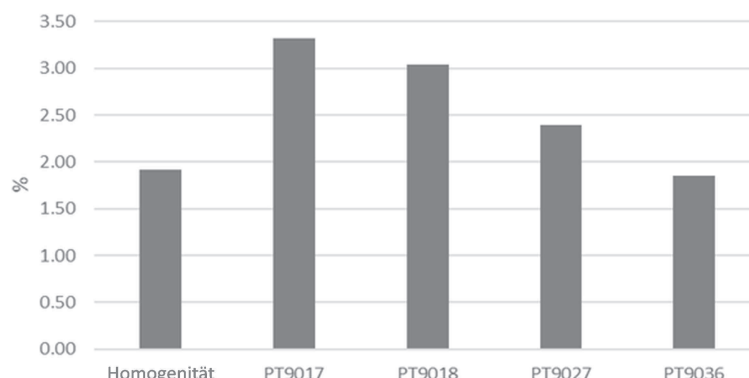


Bild B.2 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll a in Material B

B.2.4 Schlussfolgerungen

Die Anzahl der am ILT teilnehmenden Laboratorien war niedrig und nicht ausreichend, um robuste statistische Verfahren anzuwenden. Die Ergebnisse für Material B (*Nannochloropsis*) waren vielversprechend; die höchsten Abweichungen der Ergebnisse waren etwa um den Faktor 2 höher als der für die Homogenitätsproben bestimmte Wert. Bei den Ergebnissen, die für Material A (*Saccharina latissimi*) berichtet wurden, wurde eine wesentlich höhere Abweichung festgestellt; die Ergebnisse waren etwa um den Faktor 8 höher als der für die Homogenitätsproben bestimmte Wert. Im Allgemeinen wurde bei den Laboratorien, die Ergebnisse berichteten, das gleiche Muster beobachtet wie beim Wert, der für die Homogenitätsproben bestimmt wurde.

Daraus wurde geschlossen, dass für die Ringvergleiche die wesentlichen Schritte im Protokollentwurf detaillierter erklärt werden müssen und dass die Suche nach am Ringvergleich teilnehmenden Laboratorien intensiviert werden muss. Daneben wurden den Teilnehmenden des Ringvergleichs die Chlorophyll-Standardlösungen *a*, *b* und *c1* zur Verfügung gestellt, um auszuschließen, dass möglicherweise Unterschiede aufgrund abgelaufener Standardlösungen auftreten.

B.3 Ergebnisse des Ringversuchs für Chlorophyll *b* und *c*

B.3.1 Material A — *Saccharina latissima*

Für Chlorophyll *b* wurde ein quantitatives Ergebnis berichtet und für Chlorophyll *c* drei. Bei der Homogenitätsuntersuchung betrug der Mittelwert der 20 Analysen 0,001 035 % Chlorophyll *c*. Bild B.3 zeigt die Ergebnisse der Laboratorien und der Homogenitätsuntersuchung.

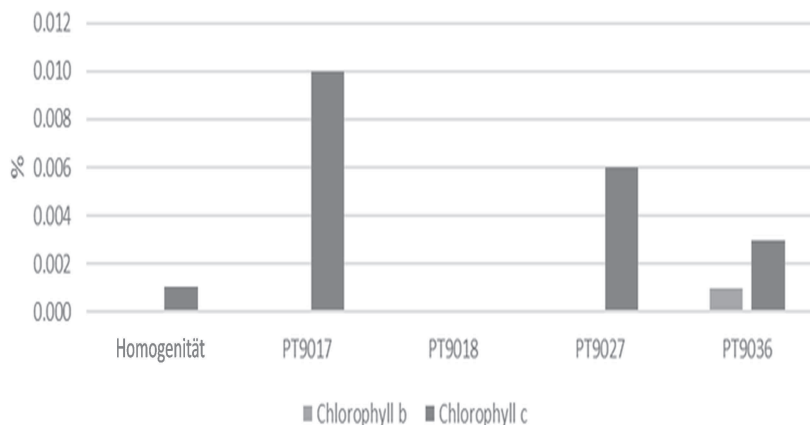


Bild B.3 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll *b* und *c* in Material A

B.3.2 Material B — *Nannochloropsis*

Für Chlorophyll *b* wurden zwei quantitative Ergebnisse berichtet und für Chlorophyll *c* drei. Bei der Homogenitätsuntersuchung betrug der Mittelwert der 20 Analysen 0,026 % Chlorophyll *b*. Bild B.4 zeigt die Ergebnisse der Laboratorien und der Homogenitätsuntersuchung.

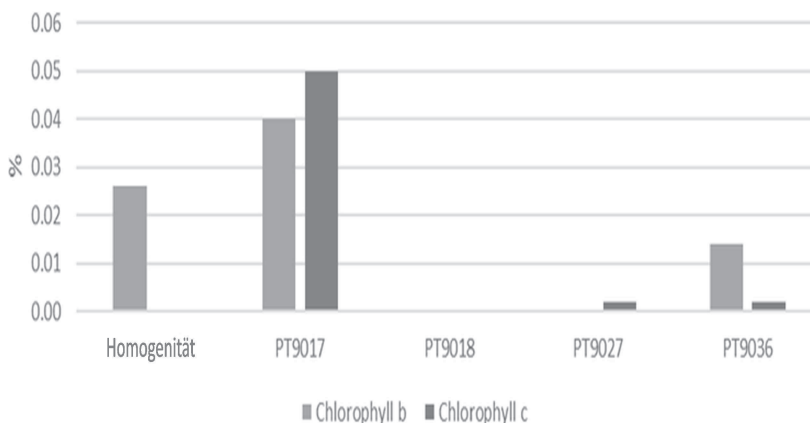


Bild B.4 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll *b* und *c* in Material B

B.3.3 Schlussfolgerungen

Die Schlussfolgerungen für den Gehalt an Chlorophyll *b* und *c* in Material A und B sind mit den Ergebnissen des ILT für Chlorophyll *a* vergleichbar. Die Abweichungen sind ziemlich identisch, und die Unterschiede im Vergleich zum Wert der Homogenitätsproben zeigen ein ähnliches Muster. Es sollte beachtet werden, dass die berichteten Werte verhältnismäßig niedrig sind, was möglicherweise dazu führen kann, dass Fälle nicht berichtet werden.

B.4 Ergebnisse des Ringvergleichs für Chlorophyll *a*

B.4.1 Einleitung

Von März 2022 bis Mai 2022 wurde durch das Forschungsinstitut Wageningen Food Safety Research der Universität Wageningen im Auftrag von CEN TC 454 an Algen und Algenprodukten ein Ringvergleich (RR) über Chlorophyll organisiert. Dieser RR ermöglichte es den Teilnehmenden, die analytische Leistung zu untersuchen.

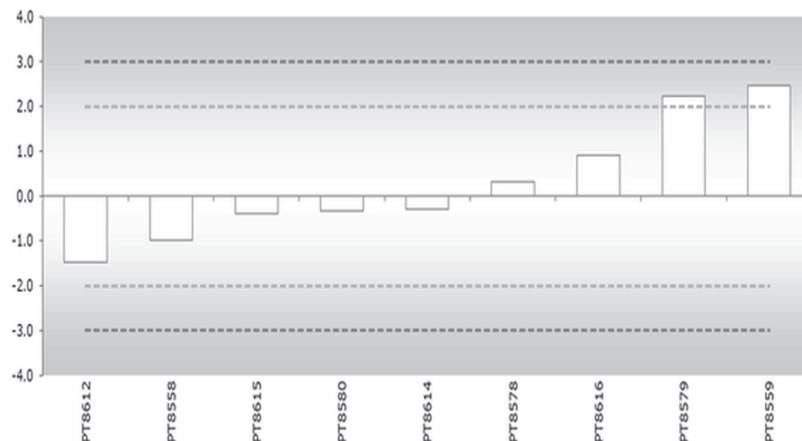
Für diesen RR wurden vier Materialien an die Teilnehmenden gesendet:

- Material A: *Saccharina latissima*, eine braune Makroalgenart;
- Material B: *Nannochloropsis*, eine Mikroalgenart;
- Material C: *Phaeodactylum*, eine Mikroalgenart;
- Material D: *Ulva* sp, eine grüne Makroalgenart.

B.4.2 Material A — *Saccharina latissima* — Methanolextraktion

Bei Verwendung der Methanolextraktion wurden neun quantitative Ergebnisse berichtet. Bild B.5 zeigt die Ergebnisse der Laboratorien. Das Ergebnis während der Homogenitätsuntersuchung betrug 0,007 7 %.

Der niedrigste berichtete Wert betrug 0,0036 %, und der höchste Wert beträgt 0,010 %. Der Konsenswert beträgt 0,0061 % mit einer robusten Standardabweichung von 0,0019 % (RSD von 31 %). Dieser Wert ist etwas höher als der zwecktaugliche Konsenswert von 25 % des Konsenswerts (= 0,0015 %). Die Unsicherheit des Konsenswerts beträgt 0,000 78 %; dieser Wert überschreitet $0,3 \sigma_p$, sodass die Unsicherheit bei der statistischen Evaluierung berücksichtigt wird. In Bezug auf die Genauigkeit sind zwei Ergebnisse fraglich (PT 8559 und PT 8579), da die betreffenden Laboratorien Z-Wert-Ergebnisse > 2 hatten.



Legende

x-Achse Labor-Code

y-Achse Z-Wert

Bild B.5 — Graphische Darstellung der berichteten Ergebnisse für Chlorophyll *a* in Material A — Methanolextraktion

