

ILNAS

Institut luxembourgeois de la normalisation
de l'accréditation, de la sécurité et qualité
des produits et services

ILNAS-EN 17203:2018

Lebensmittel - Bestimmung von Citrinin in Lebensmitteln mit Flüssigchromatographie und Tandem- Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Determination of citrinin in food by liquid
chromatography tandem mass
spectrometry (LC-MS/MS)

Produits alimentaires - Dosage de la
citrinine dans les produits alimentaires
par chromatographie liquide couplée à
une spectrométrie de masse en tandem

12/2018



Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm EN 17203:2018 wurde als luxemburgische Norm ILNAS-EN 17203:2018 übernommen.

Alle interessierten Personen, welche Mitglied einer luxemburgischen Organisation sind, können sich kostenlos an der Entwicklung von luxemburgischen (ILNAS), europäischen (CEN, CENELEC) und internationalen (ISO, IEC) Normen beteiligen:

- Inhalt der Normen beeinflussen und mitgestalten
- Künftige Entwicklungen vorhersehen
- An Sitzungen der technischen Komitees teilnehmen

<https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html>

DIESES WERK IST URHEBERRECHTLICH GESCHÜTZT

Kein Teil dieser Veröffentlichung darf ohne schriftliche Einwilligung weder vervielfältigt noch in sonstiger Weise genutzt werden - sei es elektronisch, mechanisch, durch Fotokopien oder auf andere Art!

ICS 67.050

Deutsche Fassung

Lebensmittel - Bestimmung von Citrinin in Lebensmitteln mit Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Foodstuffs - Determination of citrinin in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Produits alimentaires - Dosage de la citrinine dans les produits alimentaires par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 9. November 2018 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
1 Anwendungsbereich.....	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Chemikalien.....	5
6 Ausrüstung und Geräte.....	8
7 Verfahren.....	9
7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....	9
7.2 Extraktion von Citrinin.....	9
7.3 Aufstocken.....	10
7.4 Vorbereitung der Probenmesslösung.....	10
7.5 Bestimmung mit LC-MS/MS	10
7.6 Identifizierung.....	12
8 Auswertung.....	12
8.1 Allgemeines	12
8.2 Berechnung mit internem Standard Citrinin (ISTD)	13
9 Präzision	14
9.1 Allgemeines	14
9.2 Wiederholpräzision.....	14
9.3 Vergleichpräzision	14
10 Prüfbericht.....	15
Anhang A (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS Systeme	16
A.1 Chromatographische Einstellungen für WATERS Acquity H-class, verbunden mit Xevo® TQ-S.....	16
A.2 Massenspektrometrische Detektionseinstellungen.....	17
Anhang B (informativ) Typische Chromatogramme	18
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten.....	21
Literaturhinweise.....	24

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17203:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Juni 2019, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2019 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

Das Mycotoxin Citrinin ist ein Polyketid-Sekundärmetabolit, das hauptsächlich nach der Ernte in Lebensmitteln und Futtermitteln durch mehrere Pilze der Gattungen *Penicillium* (z. B. *P. citrinum*), *Aspergillus* (z. B. *A. candidus*) und *Monascus* (z. B. *M. purpureus*) gebildet wird. Citrinin tritt vorwiegend in gelagerten Körnern wie Reis, Mais, Weizen, Gerste, Hafer und Roggen auf. Citrinin kann als Schadstoff in rotem mit *Monascus purpureus* fermentiertem Reis und daraus formulierten Nahrungsergänzungsmitteln gefunden 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 [5] (in der neuesten Fassung), sowie geeignete nationale Erklärungen 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 — Von Citrinin sind nephrotoxische Eigenschaften bekannt, die proximale Tubuli der Niere schädigen [6].

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung des Citriningehalts in Lebensmitteln (Getreide, rotem Reis [RYR, en: red yeast rice]), Kräutern und Nahrungsergänzungsmitteln mit Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

Dieses Verfahren wurde für Citrinin in rotem Reis und in entsprechend zusammengesetzten Nahrungsergänzungsmitteln im Bereich von 2,5 µg/kg bis 3 000 µg/kg sowie für Citrinin in Weizenmehl im Bereich von 2,5 µg/kg bis 100 µg/kg validiert.

Laborerfahrungen haben gezeigt, dass dieses Verfahren auch auf weißen Reis, auf Kräuter wie *Ginkgo-Biloba*-Blätter in Pulverform und entsprechend zusammengesetzte Nahrungsergänzungsmittel im Bereich von 2,5 µg/kg bis 50 µg/kg anwendbar ist.

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

Eine Einwaage wird mit einer wässrigen Salzsäurelösung versetzt und mit einem Ethylacetat/Acetonitril/Eisessig-Gemisch 60 min extrahiert. Der Extrakt wird mit Magnesiumsulfat und Natriumchlorid versetzt, gerührt und zum Abscheiden des Wassers zentrifugiert, um die Phasentrennung der Mischung zu ermöglichen. Ein Aliquot des Überstands wird gesammelt, filtriert, mit einer Isotopen-markierten internen Standardlösung (ISTD) versetzt und mit Umkehrphasen-LC-MS/MS analysiert. Der Analyt wird anhand des entsprechenden Citrinin/Citrinin-¹³C-Verhältnisses und den Citrininkonzentrationen quantifiziert.

5 Chemikalien

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

- 5.1 **Ethylacetat**, analysenrein oder höher.
- 5.2 **Acetonitril**, LC-MS-Reinheit.
- 5.3 **Eisessig (CH₃COOH)**, analysenrein oder höher.

- 5.4 **Eisessig (CH₃COOH)**, LC-MS-Reinheit.
- 5.5 **Magnesiumsulfat, wasserfrei (MgSO₄)**, analysenrein oder höher.
- 5.6 **Natriumchlorid (NaCl)**, analysenrein oder höher.
- 5.7 **Salzsäure-Lösung (HCl)**, analysenrein oder höher, Volumenanteil φ (HCl) = 37 % (acidimetrisch).
- 5.8 **Wasser (H₂O)**, entionisiert (Ultrapure).
- 5.9 **Wasser (H₂O)**, LC-MS-Reinheit.
- 5.10 **Methanol (MeOH)**, LC-MS-Reinheit.
- 5.11 **Ammoniumacetat (CH₃COONH₄)**, LC-MS-Reinheit.

5.12 **Extraktionslösung 1.**

990 ml Wasser (5.8) werden mit 10 ml Eisessig (5.3) versetzt und gemischt (Wasser+Eisessig, 99+1, v+v). 100 g Natriumchlorid (5.6) werden in 1 l dieser Mischung aufgelöst und diese mit 16 ml Salzsäurelösung (5.7) versetzt. Diese Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert 1 Monat verwendet werden.

5.13 **Extraktionslösung 2.**

240 ml Acetonitril (5.2) werden mit 750 ml Ethylacetat (5.1) und 10 ml Eisessig (5.3) versetzt und gemischt. Diese Lösung (Ethylacetat+Acetonitril+Eisessig, 75+24+1, v+v+v) kann bei Raumtemperatur gelagert 1 Monat verwendet werden.

5.14 **Verdünnungslösung.**

80 ml Methanol (5.10) werden mit 18 ml Wasser (5.9) und 2 ml Eisessig (5.4) versetzt und gemischt. Diese Lösung (Methanol+Wasser+Eisessig, 80+18+2, v+v+v) kann bei Raumtemperatur gelagert 1 Monat verwendet werden.

5.15 **Ammoniumacetat/Eisessig in Wasser.**

9,5 g Ammoniumacetat (5.11) werden in 12,5 ml Wasser (5.9) aufgelöst, mit 12,5 ml Eisessig (5.4) versetzt und sorgfältig gemischt. Diese Lösung kann bei < -18 °C gelagert 12 Monate verwendet werden.

5.16 **Mobile Phase A:** Ammoniumacetat/Eisessig in Wasser, $c = 5$ mmol/l.

999 ml Wasser (5.9) werden mit 1 ml Ammoniumacetat/Eisessig in Wasser (5.15) versetzt und sorgfältig gemischt.

5.17 **Mobile Phase B:** Ammoniumacetat/Eisessig in Methanol, $c = 5$ mmol/l.

999 ml Methanol (5.10) werden mit 1 ml Ammoniumacetat/Eisessig (5.15) versetzt und sorgfältig gemischt.

5.18 **Citrinin**, analytischer Standard > 99 %, z. B. kristallin oder als zertifizierte Standardlösung.

5.19 **Citrinin-Stammlösung**, Massenkonzentration $\rho = 500$ µg/ml.

5 mg kristallines Citrinin werden auf 0,1 mg in einen 10-ml-Messkolben eingewogen, in Acetonitril (5.2) gelöst und damit bis zur Marke aufgefüllt. Die Massenkonzentration dieser Stammlösung muss überprüft werden. Dies kann mit LC-MS/MS gegen die zertifizierte Standardlösung (5.18) oder durch photometrische Konzentrationsbestimmung mit dem molaren Extinktionskoeffizienten geschehen [8].

Die zertifizierte Standardlösung (5.18) kann alternativ als Stammlösung verwendet werden.