

# ILNAS

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

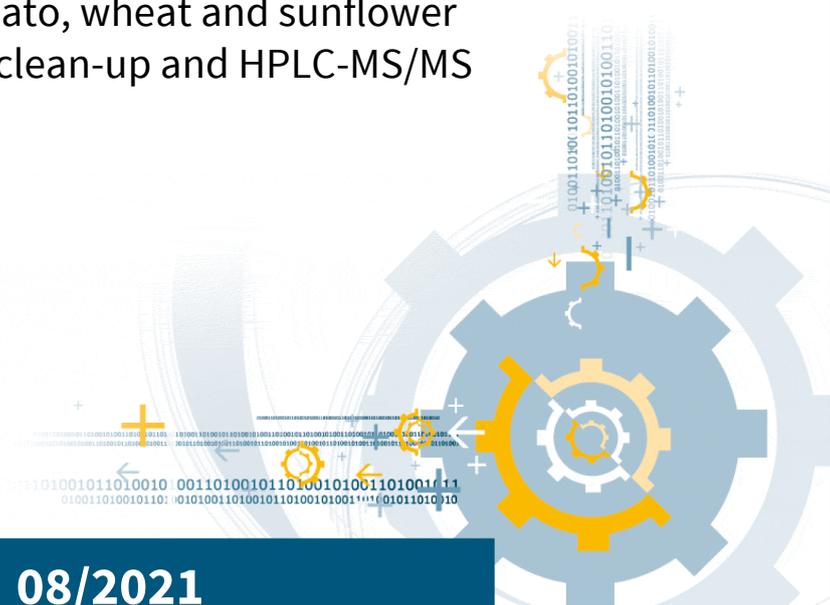
## ILNAS-EN 17521:2021

### **Lebensmittel - Bestimmung von Alternariatoxinen in Tomaten, Weizen und Sonnenblumenkernen mit SPE clean-up und HPLC-MS/MS**

Produits alimentaires - Détermination de  
la teneur en toxines d'Alternaria dans la  
tomate, le blé et les graines de tournesol  
purification par SPE et CLHP-SM/SM

Foodstuffs - Determination of Alternaria  
toxins in tomato, wheat and sunflower  
seeds by SPE clean-up and HPLC-MS/MS

08/2021

A decorative graphic in the bottom right corner featuring several interlocking gears in shades of blue and yellow. Overlaid on the gears is a vertical column of binary code (0s and 1s) and various mathematical symbols like plus, minus, and multiplication signs.

## Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm EN 17521:2021 wurde als luxemburgische Norm ILNAS-EN 17521:2021 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!

EUROPÄISCHE NORM

ILNAS-EN 17521:2021 **EN 17521**

EUROPEAN STANDARD

NORME EUROPÉENNE

August 2021

ICS 67.050

Deutsche Fassung

## Lebensmittel - Bestimmung von Alternariatoxinen in Tomaten, Weizen und Sonnenblumenkernen mit SPE clean-up und HPLC-MS/MS

Foodstuffs - Determination of Alternaria toxins in  
tomato, wheat and sunflower seeds by SPE clean-up  
and HPLC-MS/MS

Produits alimentaires - Détermination de la teneur en  
toxines d'Alternaria dans la tomate, le blé et les graines  
de tournesol purification par SPE et CLHP-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 21. Juni 2021 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, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, 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
Einleitung .....	4
1 Anwendungsbereich.....	5
2 Normative Verweisungen .....	5
3 Begriffe .....	5
4 Kurzbeschreibung .....	6
5 Reagenzien .....	6
6 Geräte und Ausrüstung.....	10
7 Durchführung.....	11
8 Berechnung.....	15
9 Präzision .....	15
10 Prüfbericht.....	18
Anhang A (informativ) Beispielchromatogramme.....	19
Anhang B (informativ) Beispielbedingungen für geeignete HPLC-MS/MS-Systeme.....	23
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten.....	28
Literaturhinweise.....	39

## Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17521:2021) 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 Februar 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Februar 2022 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 Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, 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

Die Spezies *Alternaria*, unter denen *A. alternata* die am weitesten verbreitete ist, bilden mehr als 70 Sekundärmetabolite, von denen jedoch nur wenige ihrer Struktur nach als Mykotoxine identifiziert und dokumentiert wurden [1]. Bei *Alternaria*-Pilzen handelt es sich um häufige Pflanzenschadorganismen an Getreide, Ölsaaten, Obst und Gemüse und anderen Lebensmitteln, und das Auftreten von *Alternaria*-Toxinen bei diesen Erzeugnissen wurde umfassend dokumentiert [1]. Diese Toxine kontaminieren nicht nur Ernten, sondern können Lebensmittel auch bei Kühlschranktemperaturen verderben.

Von diesen *Alternaria*-Toxinen sind Altenuen (ALT), Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME), Tentoxin (TEN) und Tenuazonsäure (TEA) von größtem Belang. ALT, AOH und AME sind Dibenzo- $\alpha$ -Pyrone, TEN ist ein zyklisches Tetrapeptid und TEA ein Derivat der Tetramsäure. ALT und TEA weisen *in vitro* sowie in Tierversuchen eine akute Toxizität auf. AME und AOH sind nicht sehr akut toxisch, wurden jedoch als Auslöser von genotoxischen und mutagenen Wirkungen beschrieben [1 - 3].

Im Allgemeinen treten diese Toxine bei Tomatenerzeugnissen, Getreide und Ölsaaten (z. B. Sonnenblumenkernen) auf, weshalb diese in diesem Dokument schwerpunktmäßig behandelt werden.

## 1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung von fünf *Alternaria*-Toxinen an Weizen, Tomatenmark und Sonnenblumenkernen durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC, en: high-performance liquid chromatography) in Verbindung mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) fest.

Das Verfahren wurde mit natürlich kontaminierten als auch dotierten Weizen-, Tomatenmark- und Sonnenblumenkernproben validiert.

Die Validierungsstufe für Alternuen (ALT) lagen im Bereich von 2,18 µg/kg bis 13,8 µg/kg.

Die Validierungsstufe für Alternariol (AOH) lagen im Bereich von 1,82 µg/kg bis 46,7 µg/kg.

Die Validierungsstufe für Alternariolmonomethylether (AME) lagen im Bereich von 1,29 µg/kg bis 47,2 µg/kg.

Die Validierungsstufe für Tentoxin (TEN) lagen im Bereich von 5,29 µg/kg bis 218 µg/kg.

Die Validierungsstufe für Tenuazonsäure (TEA) lagen im Bereich von 41,8 µg/kg bis 1 618 µg/kg.

Mit diesem Verfahren sind Bestimmungsgrenzen von 1 µg/kg für ALT (ausgenommen bei Weizen und Sonnenblumenkernen – 1,4 µg/kg bzw. 1,2 µg/kg), AOH und AME, von 5 µg/kg für TEN und von 10 µg/kg für TEA oder niedriger erreichbar.

**WARNUNG 1** — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, müssen geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen getroffen werden. Die aktuelle Version der Gefahrenstoffverordnung, Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 [4], sowie geeignete nationale Mitteilungen, sollten berücksichtigt werden.

**WARNUNG 2** — Die Anwendung dieses Dokuments kann die Verwendung gefährlicher Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte einschließen. 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** — Einige *Alternaria*-Toxine weisen genotoxische und mutagene Wirkungen auf.

## 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, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (ISO 3696)*

## 3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

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 <https://www.iso.org/obp>

## 4 Kurzbeschreibung

Eine Prüfmenge der Probe, die mit den isotopenmarkierten internen Standards dotiert ist, wird mit einem Gemisch aus Methanol, Wasser und Essigsäure extrahiert. Das Gemisch aus Probe und Extraktionsmittel wird zentrifugiert und ein Aliquot des Überstands wird aufgefangen. Der Extrakt wird mit einem gleichen Volumen 1 %iger ( $\varphi$ ) wässriger Essigsäurelösung verdünnt und an einem Adsorbens zur polymerischen Festphasen-Extraktion (SPE, en: solid-phase extraction) aufkonzentriert. Der Extrakt wird von der SPE-Säule mit einer Lösung aus Methanol und Essigsäureethylester eluiert. Dann wird das Eluat verdampft, rekonstituiert, durch einen Spritzenfilter aus Polytetrafluorethylen (PTFE) gefiltert und anschließend per HPLC-MS/MS analysiert.

## 5 Reagenzien

Sofern keine anderslautenden Festlegungen bestehen, werden nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Die Lösungen müssen, sofern nicht anders festgelegt, von geeigneter Qualität für die LC-MS-Analyse sein. Handelsübliche Lösungen mit gleichwertigen Eigenschaften wie die aufgeführten dürfen verwendet werden.

**5.1 Stickstoff-Druckgas**, Reinheit von  $\varphi = 99,99\%$  oder besser.

**5.2 Wasser (H<sub>2</sub>O)**, HPLC-Qualität.

**5.3 Wasser (H<sub>2</sub>O)**, LC-MS-Qualität.

**5.4 Methanol (CH<sub>3</sub>OH)**, analysenrein.

**5.5 Methanol (CH<sub>3</sub>OH)**, LC-MS-Qualität.

**5.6 Essigsäureethylester (CH<sub>3</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)**, analysenrein oder höher.

**5.7 Ammoniumhydroxid (NH<sub>4</sub>OH)**, LC-MS-Qualität, Massenanteil  $w(\text{NH}_4\text{OH}) = 25\%$ .

**5.8 Ammoniumhydroxid (NH<sub>4</sub>OH)**,  $w(\text{NH}_4\text{OH}) = 2,3\%$ .

1 ml Ammoniumhydroxid 25 % (5.7) wird in einen mit ungefähr 5 ml Wasser (5.3) gefüllten 10-ml-Messkolben gegeben und bis zur Marke mit Wasser (5.3) aufgefüllt.

**5.9 Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH)**,  $w \geq 99,7\%$ .

**5.10 Ammoniumacetat (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>)**, LC-MS-Qualität.

**5.11 Ammoniumacetat-Lösung (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>)**, Stoffmengenkonzentration  $c = 1 \text{ mol/l}$ .

77,08 g Ammoniumacetat (5.10) werden in 1 l Wasser (5.3) gelöst.

**5.12 Extraktionsgemisch**, Gemisch aus Methanol + Wasser + Essigsäure (85 + 14 + 1,  $V + V + V$ ).

850 ml Methanol (5.4) werden mit 140 ml Wasser (5.2) und 10 ml Essigsäure (5.9) gemischt.

**5.13 Wässrige Essigsäurelösung**, Essigsäure + Wasser (1 + 99,  $V + V$ ),  $\varphi = 1\%$ .

10 ml Essigsäure (5.9) werden mit 990 ml Wasser (5.2) gemischt und gut homogenisiert.

**5.14 Elutionslösung**, Methanol + Essigsäureethylester (75 + 25,  $V + V$ ).

750 ml Methanol (5.4) werden mit 250 ml Essigsäureethylester (5.6) gemischt und gut homogenisiert.