

DIN EN 16877

ICS 65.120; 71.040.50

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von T-2- und HT-2-Toxinen, Deoxynivalenol und Zearalenon
in Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln mittels LC-MS;
Deutsche Fassung EN 16877:2016**

Animal feeding stuffs –

Methods of sampling and analysis –

Determination of T-2 and HT-2 toxins, Deoxynivalenol and Zearalenone, in feed materials and compound feed by LC-MS;

German version EN 16877:2016

Aliments des animaux –

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –

Dosage par CL-SM des toxines T-2 et HT-2, du déoxynivalénol et de la zéaralénone dans les matières premières pour aliments et les aliments composés;

Version allemande EN 16877:2016

Gesamtumfang 34 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16877:2016) wurde von der Arbeitsgruppe 5 „Natürliche Toxine“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) des Technischen Komitees CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird, unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ (Spiegelausschuss zu CEN/TC 327) im DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 5725-5	siehe	DIN ISO 5725-5

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN ISO 5725-5, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 5: Alternative Methoden für die Ermittlung der Präzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

Deutsche Fassung

Futtermittel —
Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung von T-2- und HT-2-Toxinen, Deoxynivalenol
und Zearalenon in Einzelfuttermitteln und
Mischfuttermitteln mittels LC-MS

Animal feeding stuffs —
Methods of sampling and analysis —
Determination of T-2 and HT-2 toxins,
Deoxynivalenol and Zearalenone, in feed materials
and compound feed by LC-MS

Aliments des animaux —
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse —
Dosage par CL-SM des toxines T-2 et HT-2, du
déoxynivalénol et de la zéaralénone dans les matières
premières pour aliments et les aliments composés

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 26. September 2016 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 Management-Zentrum des CEN-CENELEC 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, 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: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort.....	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich.....	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Kurzbeschreibung.....	6
4 Reagenzien	6
5 Geräte.....	8
6 Durchführung	9
6.1 Probenvorbereitung.....	9
6.2 Extraktion	10
6.3 Probenmesslösung	10
6.4 Aufstockverfahren	11
7 Messungen.....	11
7.1 Allgemeines.....	11
7.2 LC-Bedingungen.....	11
7.3 MS-Bedingungen.....	11
7.4 Chargenabfolge	12
7.5 Identifizierung des Peaks	12
7.6 Bestimmung von DON, HT2, T2 und ZON in Kalibrier- oder/und Probenmesslösungen	12
7.7 Kalibrierung.....	12
8 Bestimmung des Massenanteils	13
9 Präzision	14
9.1 Ringversuch	14
9.2 Wiederholpräzision.....	14
9.3 Vergleichpräzision.....	15
10 Untersuchungsbericht.....	15
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten.....	16
Anhang B (informativ) Beispiele	21
B.1 Beispiel 1.....	21
B.1.1 Allgemeines.....	21
B.1.2 LC-Bedingungen.....	21
B.1.3 MS-Bedingungen.....	22
B.2 Beispiel 2.....	22
B.2.1 Allgemeines.....	22
B.2.2 LC-Bedingungen.....	23
B.2.3 MS-Bedingungen.....	23
B.3 Beispiel 3.....	24
B.3.1 Allgemeines.....	24
B.3.2 LC-Bedingungen.....	24
B.3.3 MS-Bedingungen.....	25

Anhang C (informativ) Beispiel-Chromatogramme entsprechend den Einstellungen in den
Beispielen in Anhang B..... 27

Literaturhinweise 32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 16877:2016) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 2017, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2017 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 unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem 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, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

WARNUNG — Das in dieser Norm beschriebene Verfahren erfordert den Einsatz gesundheitsgefährdender Reagenzien. Diese Norm beansprucht nicht, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, vor ihrer Anwendung geeignete Maßnahmen für die Sicherheit und den Gesundheitsschutz des Personals zu ergreifen, und dafür Sorge zu tragen, dass behördliche und gesetzliche Regelungen eingehalten werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Analysenverfahren ist für die Bestimmung von HT-2-Toxin (HT2) im geprüften Bereich von 22 µg/kg bis 178 µg/kg, von T-2-Toxin (T2) im geprüften Bereich von 7 µg/kg bis 50 µg/kg, von Deoxynivalenol (DON) im geprüften Bereich von 88 µg/kg bis 559 µg/kg und von Zearalenon (ZON) im geprüften Bereich von 14 µg/kg bis 430 µg/kg in Getreide und in Mischfuttermitteln auf Getreidebasis anwendbar. Die tatsächlichen Arbeitsbereiche dürfen über die geprüften Bereiche hinausgehen. Es liegt in der Verantwortung des Laboratoriums nachzuweisen, dass die Bestimmungsgrenze (LOQ, en: limit of quantitation) für HT-2- und T-2-Toxine ≤ 10 µg/kg, für DON ≤ 100 µg/kg und für ZON ≤ 20 µg/kg ist.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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 3696:1995, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696:1987)*

3 Kurzbeschreibung

Fein gemahlenes und homogenes Untersuchungsmaterial wird in Wasser suspendiert. Nach Zugabe von Ethylacetat wird die Probe umgerührt. Anschließend wird zur Unterstützung der Phasentrennung Natriumsulfat hinzugefügt und mit zeitlicher Verzögerung wird die Probe zentrifugiert, um Feststoffteilchen am Boden des Extraktionsröhrchens zu pelletieren. Für eine mögliche Lagerung wird die organische Phase in ein sauberes Probenfläschchen überführt. Ein Aliquot der organischen Phase wird mit stabilen isotonenmarkierten Analoga des Analyten gemischt und in deaktivierten Probenfläschchen aus Glas bis zur Trockne eingedampft. Nach der Rekonstitution des Trockenextraktes mit Modifizierungsmittel der organischen mobilen Phase und Wasser und dem gründlichen Durchmischen der Lösung werden die Analyten quantitativ mit einem System der Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) bestimmt.

4 Reagenzien

WARNUNG — Das in dieser Norm beschriebene Verfahren erfordert den Einsatz gesundheitsgefährdender Reagenzien. Diese Norm beansprucht nicht, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, vor ihrer Anwendung geeignete Maßnahmen für die Sicherheit und den Gesundheitsschutz des Personals zu ergreifen, und dafür Sorge zu tragen, dass behördliche und gesetzliche Regelungen eingehalten werden.

4.1 Wasser (deionisiert).

4.2 Wasser (LC-MS-Reinheit, zweifach destilliertes Wasser oder Wasser der Qualität 1, wie in EN ISO 3696:1995 festgelegt).

4.3 Methanol (LC-MS-Reinheit).

4.4 Methanol (zur Analyse (p.a.)).

4.5 Ethylacetat (zur Analyse (p.a.)).

4.6 Ameisensäure (98%ig bis 100%ig, LC-MS-Reinheit).

4.7 Acetonitril (LC-MS-Reinheit).

4.8 Natriumsulfat, wasserfrei, granuliert.

4.9 Deoxynivalenol (DON).

4.10 HT-2-Toxin (HT2).

4.11 T-2-Toxin (T2).

4.12 Zearalenon (ZON).

4.13 $^{13}\text{C}_{15}$ -Deoxynivalenol ($^{13}\text{C}_{15}$ -DON).

4.14 $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin ($^{13}\text{C}_{22}$ -HT2).

4.15 $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin ($^{13}\text{C}_{24}$ -T2).

4.16 $^{13}\text{C}_{18}$ -Zearalenon ($^{13}\text{C}_{18}$ -ZON).

4.17 Multitoxin-Stammlösung

Ein Gemisch, das Deoxynivalenol (4.9), HT-2-Toxin (4.10), T-2-Toxin (4.11) und Zearalenon (4.12) in reinem Acetonitril (4.7) in den entsprechenden Konzentrationen enthält.

Bei der Herstellung dieser Lösung sind die zertifizierten Reinheiten der Mykotoxin-Referenzmaterialien für den korrekten Nachweis erforderlich. In jedem Fall müssen die Reinheiten ≥ 95 % sein.

ANMERKUNG 1 3,2 µg/ml DON, 0,5 µg/ml HT-2-Toxin, 0,3 µg/ml T-2-Toxin und 0,3 µg/ml ZON in reinem Acetonitril sind im Ringversuch verwendet worden. Diese Lösung ist bei Aufbewahrung im Dunkeln bei 2 °C bis 8 °C für drei Monate stabil.

Um eine neue Stammlösung mit einer alten Stammlösung zu vergleichen, werden von jeder 25 µl in einzelne deaktivierte Probenfläschchen aus Glas (5.6) gegeben und es wird nach der Beschreibung in „Probenmesslösung“ (6.3) weiter verfahren.

ANMERKUNG 2 Falls 6.4 „Aufstockverfahren“ durchgeführt wird, sind mindestens 6 ml der Stammlösung erforderlich.

4.18 Multitoxin-Arbeitslösung

Multitoxin-Stammlösung (4.17) wird mit Methanol (4.3) so verdünnt, dass die sich ergebende Konzentration in der Arbeitslösung für den Kalibrierbereich der verschiedenen Bestandteile anwendbar ist. Es wird nur ein für eine vollständige Kalibrierung ausreichendes Volumen hergestellt.

ANMERKUNG Die Zugabe von 188 µl Multitoxin-Stammlösung, wie in 4.17 Anmerkung 1 beschrieben, in einen 3-ml-Messkolben und das Auffüllen mit Methanol bis zur Marke wird eine Lösung ergeben, die 0,2 µg/ml DON, 0,031 µg/ml HT-2-Toxin, 0,019 µg/ml T-2-Toxin und 0,019 µg/ml ZON in Methanol/Acetonitril (94/6, v/v) enthält.

4.19 Interne Multi-Standard-Stammlösung (Multi-ISTD-Stammlösung)

Ein Gemisch, das $^{13}\text{C}_{15}$ -DON (4.13), $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin (4.14), $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin (4.15) und $^{13}\text{C}_{18}$ -ZON (4.16) in reinem Acetonitril (4.7) in den gleichen Konzentrationen wie die jeweiligen natürlichen Bestandteile in der Multitoxin-Stammlösung (4.17) enthält.

ANMERKUNG Diese Lösung ist bei Aufbewahrung im Dunkeln bei 2 °C bis 8 °C für drei Monate stabil.

4.20 Kalibrierung

In sechs deaktivierte Probenfläschchen aus Glas (5.6) werden unterschiedliche Volumina der Multitoxin-Arbeitslösung (4.18) gegeben, sodass sich sechs äquidistante Kalibrierebenen über den Kalibrierbereich ergeben. Nach den Beschreibungen in 6.3 „Probenmesslösung“ wird weiter verfahren.

Die nachstehende Tabelle 1 stellt Beispiel-Kalibrierebenen dar, die die in der vorstehenden Anmerkung zu 4.18 beschriebene Lösung verwenden.

Sobald sich gezeigt hat, dass sich eine Linearität eingestellt hat, darf die Anzahl der Ebenen an die örtlichen Erfordernisse und Anforderungen angepasst werden.

Tabelle 1 — Beispiel-Kalibrierlösungen

Volumen der Multitoxin-Arbeitslösung (4.18) [µl]	Gesamtmasse des Analyten je Probenfläschchen [ng]			
	DON	HT-2	T-2	ZON
25	5	0,78	0,48	0,48
180	36	5,6	3,4	3,4
335	67	10	6,4	6,4
490	98	15	9,3	9,3
645	129	20	12	12
800	160	25	15	15

4.21 Material zur Qualitätskontrolle

Geeignetes ausreichend stabiles Material, das eine natürliche Kontamination oder Anreicherung der untersuchten Mykotoxine aufweist.

5 Geräte

5.1 Mühle

Einzelne Mühle oder Mehrfachmühlen, die geeignet sind, die Untersuchungsmaterialien auf eine Partikelgröße < 500 µm zu zerkleinern.

5.2 Mischer, geeignet zur ausreichenden Homogenisierung des zerkleinerten Materials.

ANMERKUNG Ein Taumelmischer mit einer dreidimensionalen Umschichtung, entweder durch bewegliche Schaufeln oder Lamellen oder durch eine Überkopf-Bewegung, hat sich als geeignet erwiesen.

5.3 Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen, 50 ml mit Schraubkappen.

5.4 Messkolben: 3 ml, 5 ml und 10 ml.

5.5 Pipettierer: einstellbar auf 10 µl bis 100 µl und einstellbar auf 100 µl bis 1 000 µl.

5.6 Deaktivierte Probenfläschchen aus Glas: Fläschchen aus silanisiertem Glas, Mindestvolumen 1,5 ml.

5.7 Fläschchen für Autosampler für Flüssigkeiten (ALS, en: auto liquid sampler, Probenehmer für Flüssigkeiten), mit einer geeigneten Größe für den angewendeten Autosampler für Flüssigkeiten.

5.8 Schüttelmaschine (Rüttler) oder Ultraschallgerät (en: sonicator).

5.9 Verdampfer, geeignet zum Aufrechterhalten einer stabilen Temperatur im Bereich von 30 °C bis 60 °C mit einem konstanten Durchfluss von trockenem Stickstoff.

5.10 Zentrifuge, zur Erzeugung einer relativen Zentrifugalkraft (RCF, en: relative centrifugal force) von 3 000 *g* geeignet.

5.11 Spritzenfilter, kleines Innenvolumen, Nylon, Porengröße: 0,2 µm Nylon.

5.12 LC-MS:

5.12.1 System zur Lösemittelzugabe, geeignet zur Lieferung eines binären Gradienten bei Durchflussraten, die für die angewendete analytische Säule (Trennsäule) mit ausreichender Genauigkeit geeignet sind.

5.12.2 Autosampler für Flüssigkeiten (ALS), geeignet zur Injektion eines geeigneten Volumens der Injektionslösung mit ausreichender Genauigkeit, Kreuzkontamination unter 0,1 %.

5.12.3 Analytische Säule, zur Trennung der vier Analyten mit der folgenden Leistung geeignet:

Peak-Asymmetriefaktor bei 10 % Höhe: $0,9 < A_s < 1,4$; scheinbarer Mindestretentionsfaktor für jeden der vier Analyten: $k \geq 2$; Mindestanzahl der Platten für jeden der vier Analyten: $N \geq 1\,200$; Mindestresolution zwischen zwei angrenzenden Analytpeaks: $R_s \geq 4$.

5.12.4 Massenspektrometer:

Ein Messgerät, das in der Lage ist, den Modus des selektiven Reaktionsmonitorings (SRM, en: selected reaction monitoring) mit einem ausreichend breiten dynamischen Bereich durchzuführen. Jede Ionisationsquelle, die ein ausreichendes Feld bietet, darf eingesetzt werden.

5.13 Waage, mit einer Ablesbarkeit $d = 0,001\text{ g}$ oder besser.

6 Durchführung

6.1 Probenvorbereitung

Die Laborproben sollten sofern anwendbar nach der Europäischen Gesetzgebung ([1], [2]) oder, in allen anderen Fällen, nach EN ISO 6498 entnommen und vorbereitet werden. Die Laborprobe sollte mit einer Mühle (5.1) und einem Mischer (5.2) oder unter Anwendung eines anderen Prozesses, der nachweislich zu einer vollständigen Homogenisierung führt, fein gemahlen und gründlich gemischt werden, bevor eine Prüfmenge für die Analyse entnommen wird.

Die empfohlene Vorgehensweise ist, die Laborprobe in mehreren Arbeitsschritten zu zerkleinern. Begonnen wird mit der Gesamtheit der Laborprobe, jeder Arbeitsschritt besteht in der Entnahme eines repräsentativen Aliquoten von dem vorhergehenden Schritt nach der ausreichenden Homogenisierung. Dieser Aliquot wird dann bis zur nächstkleineren Partikelgröße zerkleinert, bis eine Teilprobe von etwa 50 g mit der endgültigen Partikelgröße erhalten wird. Es ist von entscheidender Bedeutung, dass die Prüfmenge (Einwaage) aus einer Teilprobe entnommen wird, die ausreichend homogen mit einer Partikelgröße von $\leq 500\text{ }\mu\text{m}$ ist. Es sollte besonders darauf geachtet werden, dass die Probe während dieser Verfahrensweise nicht überhitzt wird.