

DIN EN 16923

ICS 67.060; 67.230

Ersatz für
DIN EN 16923:2017-08

**Lebensmittel –
Bestimmung von T-2-Toxin und HT-2-Toxin in Getreide und Säuglings- und
Kleinkindernahrung auf Getreidebasis mit HPLC-MS/MS nach
SPE-Reinigung;
Deutsche Fassung EN 16923:2022**

Foodstuffs –

Determination of T-2 toxin and HT-2 toxin in cereals and cereal products for infants and
young children by SPE clean up and HPLC-MS/MS;
German version EN 16923:2022

Produits alimentaires –

Dosage des toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et les produits céréaliers pour nourrissons et
enfants en bas âge par purification par SPE et CLHP-SM/SM;
Version allemande EN 16923:2022

Gesamtumfang 30 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16923:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-03 AA „Biotoxine“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

EN ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696*
ISO 5725 (all parts)	siehe	DIN ISO 5725 (alle Teile)

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN 16923:2017-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der zweite Elutionsschritt bei der Festphasenextraktion in 7.4 wird genauer beschrieben;
- b) das Dokument wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN 16923: 2017-08

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725 (alle Teile), *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

* Die Internationale Norm ISO 3696:1987 wurde 1995 von CEN als EN ISO 3696:1995 übernommen. Davor war ISO 3696:1987 bereits als DIN ISO 3696:1991-06 in das Deutsche Normenwerk aufgenommen worden. Für EN ISO 3696:1995 erfolgte eine Anerkennungsnotiz, die Nummer DIN ISO 3696 wurde beibehalten.

Deutsche Fassung

Lebensmittel —
Bestimmung von T-2-Toxin und HT-2-Toxin in Getreide und
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis mit
HPLC-MS/MS nach SPE-Reinigung

Foodstuffs —

Determination of T-2 toxin and HT-2 toxin in cereals
and cereal products for infants and young children by
SPE clean up and HPLC-MS/MS

Produits alimentaires —

Dosage des toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et les
produits céréaliers pour nourrissons et enfants en bas
âge par purification par SPE et CLHP-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 9. Oktober 2022 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	5
5 Chemikalien	6
6 Geräte	8
7 Durchführung	10
7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	10
7.2 Vorbereitung der Festphasensäule	10
7.3 Extraktion von T-2-Toxin und HT-2-Toxin	10
7.4 Reinigung mit Festphasenfiltration	10
7.5 Bestimmung mit LC-MS/MS	11
7.6 Identifizierung	11
8 Auswertung	11
9 Präzision	13
9.1 Allgemeines	13
9.2 Wiederholpräzision	13
9.3 Vergleichpräzision	13
10 Prüfbericht	14
Anhang A (informativ) Beispielchromatogramme (API 4000™)	15
Anhang B (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	19
B.1 Systemeinstellungen für SCIEX API 4000™ und SCIEX API 4000™ QTrap	19
B.1.1 Einstellungen für die Chromatographie	19
B.1.2 Detektor-Parameter	20
B.2 Systemeinstellungen für SCIEX API 2000™	21
B.2.1 Einstellungen für die Chromatographie	21
B.2.2 Detektor-Parameter	21
B.3 Systemeinstellungen für SCIEX API 3000™	22
B.3.1 Einstellungen für die Chromatographie	22
B.3.2 Detektor-Parameter	23
B.4 Systemeinstellungen für Micromass Quattro LC	24
B.4.1 Einstellungen für die Chromatographie	24
B.4.2 Detektor-Parameter	24
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	26
Literaturhinweise	28

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 16923:2022) 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 Mai 2023, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2023 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 ersetzt EN 16923:2017.

Im Vergleich zur vorherigen Ausgabe wurden folgende technische Änderungen vorgenommen:

— der zweite Elutionsschritt der Festphasenextraktion in 7.4 wird genauer beschrieben.

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

Das Mykotoxin T-2-Toxin und sein Metabolit HT-2-Toxin gehören zur Gruppe der Trichothecene, die von einigen Arten der Schimmelpilzgattung *Fusarium* gebildet werden. Vor allem werden Getreidearten wie Mais, Weizen, Gerste, Hafer und Roggen befallen.

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 [3], sowie geeignete nationale Mitteilungen, wie z. B. in [4], 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 — T-2-Toxin und sein Metabolit HT-2-Toxin sind bekannt dafür karzinogene Wirkungen zu haben.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung von T-2-Toxin und HT-2-Toxin durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, en: high performance liquid chromatography) in Kopplung mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) nach Festphasenreinigung (SPE, en: solid phase extraction) [5] in Getreide und getreidebasierten Produkten, z. B. Haferflocken, die für die Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern vorgesehen sind.

Das Verfahren wurde für HT-2-Toxin in Hafermehl bei Konzentrationen von 9,3 µg/kg und 28,1 µg/kg, in Haferflocken bei Konzentrationen von 16,5 µg/kg und 21,4 µg/kg und bei Frühstückscerealien (die Haferflocken enthalten) bei einer Konzentration von 8,1 µg/kg sowie für T-2-Toxin in Hafermehl bei Konzentrationen von 4,4 µg/kg und 8,3 µg/kg, in Haferflocken bei Konzentrationen von 4,9 µg/kg und 6,6 µg/kg und bei Frühstückscerealien (die Haferflocken enthalten) bei einer Konzentration von 3,5 µg/kg validiert.

Laborerfahrungen [6] haben gezeigt, dass das Verfahren auch für stark aufquellende Materialien (auf trockenem Getreide basierendem Porridge und modifizierte Stärken) anwendbar ist, jedoch wurden diese in der Validierungsuntersuchung des Verfahrens nicht überprüft. Einzelheiten hierzu sind in 7.3 enthalten.

Das Verfahren kann ebenso bei Hafer-Nebenprodukten bei höheren Konzentrationen von T-2-Toxin und HT-2-Toxin angewendet werden. In diesem Fall ist es erforderlich die Verdünnungsschritte zu berücksichtigen [6].

Das Verfahren kann auch auf Getreide und Getreideerzeugnisse auf der Basis von z. B. Weizen, Gerste und Reis für Säuglinge und Kleinkinder angewendet werden. In diesem Falle ist es erforderlich, das Verfahren im Labor für jedes Material zu validieren (In-house-Validation). Zum Zeitpunkt des Ringversuches war ein Bereich von 10 µg/kg bis 100 µg/kg zur Validierung vorgesehen, und die Vorstudien haben gezeigt, dass das Verfahren diesen gesamten Bereich gut abdeckt, obwohl das Verfahren letztendlich nur für den Bereich von 3,5 µg/kg bis 28,1 µg/kg validiert wurde.

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

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

4 Kurzbeschreibung

T-2-Toxin und HT-2-Toxin werden mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch durch manuelles Schütteln oder unter Verwendung eines Labormixers extrahiert. Der filtrierte und verdünnte Extrakt wird über eine Festphasensäule oder eine Passthrough-Säule gereinigt und konzentriert, siehe auch [7]. Die Toxine werden durch HPLC in Kopplung mit Tandem-Massenspektrometrie bestimmt.

5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit 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.

5.1 Acetonitril, HPLC-Reinheitsgrad.

5.2 Methanol, HPLC-Reinheitsgrad.

5.3 Lösemittelgemisch.

20 Teile Acetonitril (5.1) werden mit 80 Teilen Wasser (20 + 80, v + v) gemischt.

5.4 Extraktionsgemisch.

84 Teile Acetonitril (5.1) werden mit 16 Teilen Wasser (84 + 16, v + v) gemischt.

5.5 Elutionsmittel für die LC-MS/MS.

Beispiele von für die LC-MS/MS-Systeme geeigneten Elutionsmitteln sind in Anhang B angegeben. Die Lösung wird durch einen Membranfilter (6.18) filtriert.

5.6 Stickstoff, Reinheit mindestens 99,9 %.

5.7 Aktivkohle für die Säulenchromatographie (Partikelgröße: 63 µm bis 200 µm).

5.8 Aluminiumoxid (neutral, für die Flüssigchromatographie).

5.9 Fein gemahlene/pulverisierte Diatomeenerde (Diatomite, Kieselgur), z. B. Celite® 545¹.

5.10 Silanisierungsreagenz, z. B. Surfasil™² (optional).

5.11 Cyclohexan, analysenrein (optional).

5.12 Herstellung des verdünnten Silanisierungsreagenzes (optional).

Beispielsweise werden 50 ml eines Silanisierungsreagenzes (5.10) mit 950 ml Cyclohexan (5.11) versetzt.

5.13 Ameisensäure, HPLC-Reinheitsgrad.

5.14 Ammoniaklösung, Stoffmengenkonzentration $c(\text{NH}_3) = 13,4 \text{ mol/l}$ oder Massenkonzentration $\rho(\text{NH}_3) = 250 \text{ g/l}$.

1 Celite® 545 ist die Herstellerbezeichnung eines handelsüblichen Produktes, das von verschiedenen Lieferanten erhältlich ist. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

2 Surfasil™ ist die Herstellerbezeichnung eines handelsüblichen Produktes, das von verschiedenen Lieferanten erhältlich ist. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

5.15 Ammoniumacetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$), LC-MS/MS-Reinheitsgrad.

5.16 Vor Verstopfung schützendes Material (Anti-Clogging-Material), z. B. gewaschener Seesand, Glasperlen oder Perlen aus Polyethylen (optional).

5.17 T-2-Toxin-Stammlösung, Massenkonzentration $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

T-2-Toxin, z. B. kristallin oder als Film, mit einer Reinheit von über 98 % bezogen auf den Massenanteil, oder als zertifizierte Standardlösung.

5.18 HT-2-Toxin-Stammlösung, $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

HT-2-Toxin, z. B. kristallin oder als Film, mit einer Reinheit von über 98 % bezogen auf den Massenanteil, oder als zertifizierte Standardlösung.

5.19 Interne Standardlösung von $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

T-2-Toxin-Stammlösung, Massenkonzentration $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril, unter Berücksichtigung der zertifizierten Reinheit und/oder Konzentration.

Andere geeignete isotoopenmarkierte Standards von T-2-Toxin als $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin dürfen verwendet werden.

5.20 Interne Standardlösung von $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

HT-2-Toxin-Stammlösung, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril, unter Berücksichtigung der zertifizierten Reinheit und/oder Konzentration.

Andere geeignete isotoopenmarkierte Standards von HT-2-Toxin als $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin dürfen verwendet werden.

5.21 Gemischte Standardlösung, $\rho = 500 \text{ ng/ml}$.

Jeweils 25 μl der T-2-Toxin- und HT-2-Toxin-Stammlösung (5.17 und 5.18) werden in einen 5-ml-Messkolben pipettiert und mit Lösemittelgemisch (5.3) bis zur Marke aufgefüllt.

Diese Lösung kann 12 Monate bei -18°C aufbewahrt werden.

5.22 Gemischte interne Standardlösung, $\rho = 1\,000 \text{ ng/ml}$

200 μl der internen Standardlösung von $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin (5.19) und 200 μl der internen Standardlösung von $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin (5.20) werden in einem 5-ml-Messkolben mit Lösemittelgemisch (5.3) verdünnt.

Diese Lösung kann 6 Monate bei -18°C aufbewahrt werden.

5.23 Kalibrierlösungen

Für die Kalibrierung des Messsystems werden Kalibrierlösungen im Bereich von 5 ng/ml bis 100 ng/ml hergestellt.

Beispielsweise werden die folgenden Kalibrierlösungen nach Tabelle 1 hergestellt: