

DIN EN 17194



ICS 65.120

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Deoxynivalenol, Aflatoxin B1, Fumonisin B1 und B2, T-2-
und HT-2-Toxine, Zearalenon und Ochratoxin A in Einzelfuttermitteln und
Mischfuttermitteln mittels LC-MS/MS;
Deutsche Fassung EN 17194:2019**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of Deoxynivalenol, Aflatoxin B1, Fumonisin B1 & B2, T-2 & HT-2 toxins,
Zearalenone and Ochratoxin A in feed materials and compound feed by LC-MS/MS;
German version EN 17194:2019

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Détermination du déoxynivalénol, de l'aflatoxine B1, de la fumonisine B1 et B2, des toxines
T-2 et HT-2, de la zéaralénone et de l'ochratoxine A dans les matières premières pour
aliments et les aliments composés pour animaux par CL-SM/SM;
Version allemande EN 17194:2019

Gesamtumfang 37 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17194:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

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

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

EN ISO 3696:1995	siehe	DIN ISO 3696:1991-06
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 5725-5	siehe	DIN ISO 5725-5

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696:1991-06, *Wasser für analytische Zwecke; Anforderungen und Prüfungen; Identisch mit ISO 3696:1987*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für 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 Deoxynivalenol, Aflatoxin B1, Fumonisin B1
und B2, T-2- und HT-2-Toxine, Zearalenon und Ochratoxin A
in Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln mittels
LC-MS/MS**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling
and analysis —
Determination of Deoxynivalenol, Aflatoxin B1,
Fumonisin B1 & B2, T-2 & HT-2 toxins, Zearalenone and
Ochratoxin A in feed materials and compound feed by
LC-MS/MS

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et
d'analyse —
Détermination du déoxynivalénol, de l'aflatoxine B1, de
la fumonisine B1 et B2, des toxines T-2 et HT-2, de la
zéaralénone et de l'ochratoxine A dans les matières
premières pour aliments et les aliments composés pour
animaux par CL-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 9. September 2019 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
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen.....	4
3 Begriffe.....	4
4 Kurzbeschreibung.....	4
5 Reagenzien.....	5
6 Geräte	7
7 Durchführung	9
7.1 Probenvorbereitung.....	9
7.2 Extraktion	9
7.3 Probenmesslösung.....	10
7.4 Aufstockverfahren	10
8 Messungen	11
8.1 Allgemeines	11
8.2 LC-Bedingungen	11
8.3 MS-Bedingungen.....	11
8.4 Chargenabfolge	11
8.5 Identifizierung des Peaks.....	11
8.6 Bestimmung von Mykotoxinen in Kalibrier- und Probenmesslösungen.....	12
8.7 Kalibrierung.....	12
9 Bestimmung des Massenanteils.....	13
10 Präzision.....	14
10.1 Ringversuch.....	14
10.2 Wiederholpräzision.....	14
10.3 Vergleichpräzision.....	15
11 Prüfbericht.....	16
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	17
Anhang B (informativ) Beispiele	27
B.1 Allgemeines	27
B.2 Beispiel 1	27
B.3 Beispiel 2	30
Anhang C (informativ) Beispiel Chromatogramme	33
Literaturhinweise	35

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17194:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2020 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 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 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.

1 Anwendungsbereich

Das Analyseverfahren dieses Dokumentes ist gültig für die Bestimmung von

- Deoxynivalenol (DON) im untersuchten Bereich von 100 µg/kg bis 3 300 µg/kg,
- Aflatoxin B1 (AfB1) im untersuchten Bereich von 2,5 µg/kg bis 440 µg/kg,
- Fumonisin B1 (FB1) im untersuchten Bereich von 690 µg/kg bis 7 500 µg/kg,
- Fumonisin B2 (FB2) im untersuchten Bereich von 200 µg/kg bis 2 500 µg/kg,
- T-2-Toxin im untersuchten Bereich von 7,5 µg/kg bis 360 µg/kg,
- HT-2-Toxin im untersuchten Bereich von 14 µg/kg bis 1 800 µg/kg,
- Zearalenon (ZEN) im untersuchten Bereich von 30 µg/kg bis 600 µg/kg und
- Ochratoxin A (OTA) im untersuchten Bereich von 10 µg/kg bis 230 µg/kg

in Getreide und Getreidemischfuttermittel durch Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Die tatsächlichen Arbeitsbereiche könnten über die geprüften Bereiche hinausgehen.

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 3696:1995, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696:1987)*

EN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung (ISO 6498)*

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

4 Kurzbeschreibung

Eine Prüfmenge von fein gemahlenem und homogenem Material wird durch Schütteln mit einem Gemisch aus Acetonitril und wässriger Ameisensäurelösung extrahiert. Der Extrakt wird zentrifugiert, und ein Aliquot des überstehenden Extrakts wird in ein deaktiviertes Glasfläschchen überführt, mit einer entsprechenden Menge stabiler Isotopen-markierter Analoga gemischt und bis zur Trockne verdampft. Die rekonstituierte Probe wird gefiltert und quantitativ mit einem System der Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) bestimmt. Laboratorien, die dieses Verfahren anwenden, müssen die folgenden Quantifizierungsgrenzen (en: limits of quantitation, LOQs) nachweisen, um in der Lage zu sein, dieses Verfahren über den gesamten Validierungsbereich anzuwenden: für DON ≤ 100 µg/kg,

für AFB1 $\leq 2 \mu\text{g/kg}$, für FB1 und FB2 $\leq 500 \mu\text{g/kg}$ (FB1 $\leq 375 \mu\text{g/kg}$ und FB2 $\leq 125 \mu\text{g/kg}$), für T-2- und HT-2-Toxin $\leq 10 \mu\text{g/kg}$, für ZEN $\leq 20 \mu\text{g/kg}$ und für OTA $\leq 10 \mu\text{g/kg}$.

ANMERKUNG Die in dieser Untersuchung erfassten Leistungskennzahlen kamen aus Laboratorien, die die Fähigkeit zur Einhaltung oben genannter LOQs nachgewiesen haben. Bewerber, die dies nicht nachweisen konnten, wurden ausgeschlossen, um sicherzustellen, dass die Validierungsdaten über den vorgegebenen Konzentrationsbereich erfasst werden können.

5 Reagenzien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696:1995 verwendet. Kommerziell erhältliche Lösungen mit Eigenschaften, die hinsichtlich der aufgeführten gleichwertig sind, dürfen verwendet werden.

WARNUNG — Es gelten Umweltverordnungen und Vorschriften für die Entsorgung von Lösemittelabfällen. Dekontaminationsverfahren für Laborabfälle wurden vom Internationalen Krebsforschungszentrum (en: International Agency for Research on Cancer, IARC) aufgestellt, siehe [1, 2].

5.1 Wasser (deionisiert).

5.2 Wasser, LC-MS-Reinheit oder von vergleichbarem Reinheitsgrad (z. B. Widerstand von 18,2 MΩcm bzw. Leitfähigkeit 55 nS/cm bei 20 °C).

5.3 Methanol, LC-MS-Reinheitsgrad.

5.4 Ameisensäure (FA), 98–100 %.

5.5 Acetonitril (ACN), LC-Reinheitsgrad.

5.6 Extraktionslösemittel, bestehend aus 20 Teilen Wasser (5.1), 79 Teilen Acetonitril (5.5) und 1 Teil Ameisensäure (5.4) (V/V/V).

5.7 20%ige Essigsäurelösung, zur Reinigung von Glasgeräten.

5.8 Aflatoxin B1 (Afb1), Reinheit $\geq 95 \%$.

5.9 Deoxynivalenol (DON), Reinheit $\geq 95 \%$.

5.10 Fumonisin B1 (FB1), Reinheit $\geq 95 \%$.

5.11 Fumonisin B2 (FB2), Reinheit $\geq 95 \%$.

5.12 HT-2-Toxin (HT-2), Reinheit $\geq 95 \%$.

5.13 T-2-Toxin (T-2), Reinheit $\geq 95 \%$.

5.14 Zearalenon (ZEN), Reinheit $\geq 95 \%$.

5.15 Ochratoxin A (OTA), Reinheit $\geq 95 \%$.

5.16 $^{13}\text{C}_{17}$ -Aflatoxin B1 ($^{13}\text{C}_{17}$ -Afb1).

5.17 $^{13}\text{C}_{15}$ -Deoxynivalenol ($^{13}\text{C}_{15}$ -DON).

5.18 $^{13}\text{C}_{34}$ -Fumonisin B1 ($^{13}\text{C}_{34}$ -FB1).

5.19 $^{13}\text{C}_{34}$ -Fumonisin B2 ($^{13}\text{C}_{34}$ -FB2).

5.20 $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin ($^{13}\text{C}_{22}$ -HT2).

5.21 $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin ($^{13}\text{C}_{24}$ -T2).

5.22 $^{13}\text{C}_{18}$ -Zearalenon ($^{13}\text{C}_{18}$ -ZEN).

5.23 $^{13}\text{C}_{20}$ -Ochratoxin A ($^{13}\text{C}_{20}$ -OTA).

5.24 Standard-Stammlösung

Eine Mischung, die Deoxynivalenol (5.9), Aflatoxin B1 (5.8), Fumonisin B1 (5.10) und Fumonisin B2 (5.11), T-2-Toxin (5.13) und HT-2-Toxin (5.12), Zearalenon (5.14) und Ochratoxin A (5.15) in Acetonitril/Wasser (80/20) mit 0,1 % Ameisensäure (FA) in relevanten Konzentrationen enthält. Bei der Herstellung dieser Lösung sind die zertifizierten Reinheiten der Mykotoxin-Referenzmaterialien für den korrekten Nachweis erforderlich.

ANMERKUNG 1 6,0 µg/ml DON, 0,040 µg/ml AfB1, 13,5 µg/ml FB1, 4,5 µg/ml FB2, 0,48 µg/ml T-2, 0,6 µg/ml HT-2, 0,9 µg/ml ZEN und 0,45 µg/ml OTA in ACN/H₂O/FA (80/20/0,1, V/V) hat sich als geeignet erwiesen. Diese Lösung ist im Dunkeln bei –20 °C bis zu einem halben Jahr lang oder im Dunkeln bei 2 °C bis 8 °C mindestens drei Monate lang stabil.

Eine neue Stammlösung wird mit einer alten Stammlösung verglichen, indem von jeder 25 µl in einzelne deaktivierte Glasfläschchen (6.9) gegeben und weiter nach der Beschreibung in 7.3 verfahren wird.

ANMERKUNG 2 Falls 7.4 durchgeführt wird, sind mindestens 4 ml der Stammlösung erforderlich.

5.25 Standardarbeitslösung

Die Standard-Stammlösung (5.24) wird in einem mit Säure gewaschenen Messkolben aus Braunglas mit Acetonitril/Wasser (80/20) mit 0,1 % Ameisensäure (FA) aufgelöst, sodass die sich ergebende Konzentration in der Arbeitslösung für den Kalibrierungsbereich der verschiedenen Bestandteile anwendbar ist. Eine ausreichende Menge wird für nur eine vollständige Kalibrierung hergestellt und frisch hergestellt verwendet. Diese Lösung ist bei Lagerung im Dunkeln und bei –20 °C eine Woche lang haltbar.

ANMERKUNG Werden 200 µl der Multimykotoxin-Standard-Stammlösung nach Vorgaben in 5.24, ANMERKUNG 1 zu einem 3-ml-Messkolben hinzugefügt und wird bis zur Markierung mit ACN/H₂O/FA (80/20/0,1, V/V) ergänzt, ergibt dies eine Lösung, die 0,4 µg/ml DON, 0,002 7 µg/ml AfB1, 0,9 µg/ml FB1, 0,3 µg/ml FB2, 0,032 µg/ml T-2, 0,04 µg/ml HT-2, 0,06 µg/ml ZEN und 0,03 µg/ml OTA in ACN/H₂O/FA (80/20/0,1, V/V) enthält. Alternativ können 333,3 µl der Multimykotoxin-Standard-Stammlösung in einem 5-ml-Messkolben gelöst werden. Werden 200 µl der Multimykotoxin-Standard-Stammlösung pipettiert und 2 800 µl der oben genannten Lösung hinzugefügt, werden ebenfalls vergleichbare Ergebnisse erzielt.

5.26 Interne Multi-Standardlösung (IStd), 3,6 µg/ml $^{13}\text{C}_{15}$ -DON (5.17), 0,02 µg/ml $^{13}\text{C}_{17}$ -AfB1 (5.16), 3,75 µg/ml $^{13}\text{C}_{34}$ -FB1 (5.18), 1,25 µg/ml $^{13}\text{C}_{34}$ -FB2 (5.19), 0,5 µg/ml $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin (5.21), 0,5 µg/ml $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin (5.20), 1,0 µg/ml $^{13}\text{C}_{18}$ -ZEN (5.22) und 0,4 µg/ml $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA (5.23) in Acetonitril/Wasser (80/20) mit 0,1 % Ameisensäure (FA) hat sich als geeignet erwiesen. Diese Lösung ist im Dunkeln bei –20 °C bis zu einem halben Jahr lang oder bei 2 °C bis 8 °C mindestens drei Monate lang stabil.

5.27 Kalibrierungen

Verschiedene Mengen der Standardarbeitslösung (5.25) werden in fünf deaktivierte Glasfläschchen (6.9) gefüllt, sodass fünf abstandsgleiche Kalibrierungsniveaus über dem Kalibrierungsbereich erhalten werden. Das Herstellungsverfahren wird wie in 7.3 beschrieben fortgesetzt.

Die Lösungen sollten vor Licht geschützt werden und können im Gefrierschrank bei etwa $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Sie sind bis zu einer Woche stabil.

ANMERKUNG Die nachstehende Tabelle 1 stellt Beispiel-Kalibrierebenen dar, die die in den vorstehenden Anmerkungen beschriebenen Lösungen verwenden.

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

Die genauen Konzentrationen der Standard-Stammlösung (5.24), der Standard-Arbeitslösung (5.25) und der Kalibrierungs-Standardlösungen müssen von der Konzentration der Referenz-Standardmaterialien (5.8 bis 5.15) abgeleitet werden, wobei die auf dem Zertifikat angegebene Reinheit und Ungenauigkeit sowie die verwendeten Volumina berücksichtigt werden müssen.

Tabelle 1 — Kalibrierlösungen

Kalibrierungsprobe	Volumen einer Standardarbeitslösung [μl]	Gesamtmasse des Analyten je Probenfläschchen [ng]							
		DON	AfB1	FB1	FB2	T-2	HT-2	ZEN	OTA
Cal 1	20	8,0	0,053	18,0	6,0	0,64	0,8	1,2	0,6
Cal 2	230	92,0	0,613	207,0	69,0	7,36	9,2	13,8	6,9
Cal 3	440	176,0	1,173	396,0	132,0	14,08	17,6	26,4	13,2
Cal 4	650	260,0	1,733	585,0	195,0	20,8	26,0	39,0	19,5
Cal 5	860	344,0	2,293	774,0	258,0	27,52	34,4	51,6	25,8

5.28 Material zur Qualitätskontrolle

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

6 Geräte

6.1 Mühle, einzelne Mühle oder Mehrfachmühlen, die geeignet sind, die Untersuchungsmaterialien auf eine Partikelgröße $< 500\text{ }\mu\text{m}$ zu zerkleinern.

6.2 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.

6.3 Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (PP) mit Schraubverschluss, 50 ml mit Deckel.

6.4 Waage, mit einer Ablesbarkeit von 0,001 g oder besser.

6.5 Einstellbarer vertikaler oder horizontaler Laborschüttler.

6.6 Zentrifuge, zur Erzeugung einer relativen Zentrifugalkraft (en: relative centrifugal force, rcf) von 2 300 g geeignet.

6.7 Pipettierer, einstellbar auf 10 μl bis 100 μl und einstellbar auf 100 μl bis 1 000 μl, ordnungsgemäß kalibriert, mit geeigneten Spitzen.

6.8 Messkolben, braunes, deaktiviertes (mit Säure gewaschenes oder silanisiertes) Glas oder PP, 3 ml (optional), 5 ml und 10 ml.

6.9 Deaktivierte Glasfläschchen (säuregewaschen oder silanisiert) oder PP-Fläschchen, von passender Größe für den verwendeten Autosampler für Flüssigkeiten (ALS) (normalerweise etwa 1,5 ml Fassungsvermögen).

Um Glasgeräte mit Säure zu waschen, werden diese mit 20%iger Essigsäure (5.7) gefüllt und über Nacht (etwa 16 h bis 24 h) unter einem Abzug stehen gelassen. Die Säure wird entfernt und Glasgeräte werden mit Leitungswasser, dann mit deionisiertem Wasser und zuletzt mit hochreinem Wasser gespült, um einen pH von 5 bis 7 zu erreichen. Normalerweise ist es ausreichend, jeden Spülschritt dreimal durchzuführen. In einem Ofen bei 60 °C bis 70 °C trocknen.

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

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

6.12 1-ml-Spritze mit Nadel.

6.13 Vortex-Mischer, optional.

6.14 LC-MS/MS:

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

6.14.2 Entgaser, optional, zum Entgasen von mobilen LC-Phasen.

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

6.14.4 Säulenofen, optional, geeignet für Temperaturen im Bereich bis mindestens 40 °C ± 1 °C.

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

- Peak-Asymmetriefaktor bei 10 % Höhe: $0,9 < A_s < 1,4$;
- Mindestretentionsfaktor für den ersten eluierenden Analyt: $k' \geq 1$;
- Mindestanzahl der Platten für jeden der acht Analyten: $N \geq 1\,200$, dabei ist

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2;$$

- Mindestauflösung zwischen zwei benachbarten Peaks: $R_s \geq 1,7$.

6.14.6 Vorsäule, optional, mit dem gleichen stationären Phasenmaterial wie die analytische Säule und mit entsprechenden Dimensionen.

6.14.7 Massenspektrometer, das in der Lage ist, eine ausgewählte Reaktionsüberwachung mit einem ausreichend breiten Dynamikbereich durchzuführen. Jede Ionisationsquelle, die ein ausreichendes Feld bietet, darf eingesetzt werden.

7 Durchführung

7.1 Probenvorbereitung

Es ist wichtig, dass das Labor eine repräsentative Laborprobe erhält, die während des Transports bzw. der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde. Die Laborproben müssen nach EN ISO 6498 entnommen und vorbereitet werden, es sei denn, es gilt die Europäische Gesetzgebung [3]. Die Laborprobe muss mit einer Mühle (5.1) und einem Mischer (6.2) oder unter Anwendung eines anderen Prozesses, der nachweislich zu einer ausreichenden 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 aus einer Teilprobe entnommen wird, die ausreichend homogen mit einer Partikelgröße von $\leq 500 \mu\text{m}$ ist. Es muss darauf geachtet werden, dass die Probe im Verlauf dieses Prozesses nicht überhitzt wird.

In allen Fällen sollte alles Raumtemperatur aufweisen, bevor irgendeine Art der Bearbeitung stattfindet.

7.2 Extraktion

7.2.1 Einleitung

Einige der nachstehend beschriebenen Arbeitsschritte sind für die Genauigkeit der Ergebnisse entscheidender als andere. Diese Schritte sind als solche gekennzeichnet und sollten mit der notwendigen Aufmerksamkeit durchgeführt werden. Eine Maßstabsübertragung (Scale-up) der Größe der Prüfmenge gilt als annehmbar, sofern eine derartige Notwendigkeit angenommen wird. In diesem Fall müssen die Mengen des zugefügten Wassers, des Acetonitrils und der Ameisensäure im gleichen Verhältnis erhöht werden, z. B. Maßstabsübertragung mit einem Faktor 2: 10 g Prüfmenge, 50 ml Extraktionslösemittel (5.6). Unabhängig von der Probengröße muss die Probenvorbereitung den Anforderungen in EN ISO 6498 entsprechen.

7.2.2 Trockene Proben

4,8 g bis 5,2 g der homogenen Prüfmenge werden in ein Röhrchen aus Polypropylen mit Schraubkappe (6.3) abgewogen, das Gewicht auf die zweite Dezimalstelle gerundet und notiert. Die Genauigkeit dieses Gewichts ist für die Genauigkeit des Endergebnisses entscheidend.

25,0 ml Lösung aus Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (79/20/1, V/V) (5.6) werden hinzugefügt. Die Genauigkeit dieses Volumens ist für die Genauigkeit des Endergebnisses entscheidend. Es wird gründlich verwirbelt oder von Hand gemischt, bis die Prüfmenge vollständig suspendiert ist, dann wird 30 min in einem Schüttler (6.5) geschüttelt, sodass eine gründliche Durchmischung der Probe sichergestellt ist.

Die Probe wird bei 3 000 g mindestens 3 min (oder 5 min bei 2 300 g) zentrifugiert, um das Absinken von Feststoffteilchen zu unterstützen.

Falls für mögliche Wiederholungen gewünscht: Der Extrakt wird in ein sauberes Polypropylenfläschchen überführt für die Aufbewahrung von bis zu 7 Tagen im Dunkeln bei 2 °C bis 8 °C.

500 µl Aliquot des Rohextrakts werden entnommen und zur weiteren Verarbeitung in ein deaktiviertes Glasfläschchen (6.9) überführt. Die Genauigkeit dieses Volumens ist für die Genauigkeit des Endergebnisses entscheidend.

7.2.3 Schlamm

Die Schlammmenge wird auf 5 g der Futterprobe eingestellt, z. B. für 1:1 Schlamm werden 10 g, für 1:2 Schlamm werden 15 g (entsprechend 5 g Futterprobe) der homogenisierten Prüfmenge in ein Röhrchen aus Polypropylen mit Schraubkappe (6.3) oder einen anderen geeigneten Behälter eingewogen. Diese Masse muss auf 2 Dezimalstellen aufgezeichnet werden. Falls mehr als 5 ml Wasser im Schlammteil enthalten sind, ist darauf zu achten, die Menge der Lösemittel hochzuskalieren, bis das endgültige Verhältnis der Extraktionslösemittel-Zusammensetzung Acetonitril/Wasser/Ameisensäure von 79/20/1 (V/V) erreicht ist.

Zum Schlamm wird eine geeignete Menge Ameisensäure (5.4) hinzugefügt, 5 s verwirbelt oder von Hand gemischt und dann eine geeignete Menge Acetonitril (5.5) hinzugefügt und 10 s gründlich verwirbelt oder von Hand gemischt und dann 30 min in einem Schüttler (6.5) geschüttelt.

Ab diesem Punkt wird das Verfahren für trockene Proben befolgt.

7.3 Probenmesslösung

25 µl der markierten IStd-Lösung (5.26) werden zum Aliquot des Extrakts und/oder den Kalibrierlösungen hinzugefügt und unter einem sanften Stickstoffstrom bei 50 °C bis zur Trockne verdampft.

ANMERKUNG 1 Um die Wahrscheinlichkeit der Kreuzkontamination zu verringern, kann die etikettierte IStd-Lösung in das Fläschchen gefüllt werden, bevor das Aliquot aus Extrakt/Kalibrierlösung hinzugefügt wird.

ANMERKUNG 2 Wurden die Lösungen bis zu 20 min länger als für die vollständige Verdampfung gerade so notwendig unter einem sanften Stickstoffstrom gelassen, zeigte dies keine negativen Auswirkungen auf die Endergebnisse.

Für die Rekonstitution wird das Fläschchen auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und 250 µl der mobilen LC-Phase B (z. B. siehe Anhang B) zu den trockenen Rückständen hinzugegeben.

Das Fläschchen (mit einer Kappe) wird verschlossen und gründlich mindestens 15 s verwirbelt, um sicherzustellen, dass auch der obere Teil des Fläschchens gründlich mit dem Lösemittel gespült wird.

250 µl der mobilen LC-Phase A (z. B. siehe Anhang B) werden zum rekonstituierten Extrakt hinzugegeben.

Die Lösung wird mindestens 5 s gründlich verwirbelt.

Die Probenmesslösung wird zur Analyse in ein ALS-Fläschchen (6.9) überführt; falls die Lösung trüb ist, muss sie durch ein Spritzenfilter (6.11) filtriert werden.

7.4 Aufstockverfahren

Wenn die Wiederfindung bestimmt werden muss, wird das Folgende als Doppelbestimmung durchgeführt:

Nur zur Bestimmung der Wiederfindung wird die Probengröße auf 2 g reduziert, um die Menge der verwendeten Standardlösung zu verringern.

Zu drei 2-g-Portionen eines Materials, das idealerweise frei von Analyten ist (falls keine Blindprobe identifiziert werden kann, wird eine Probe mit so wenig Kontamination wie möglich verwendet), werden drei verschiedene Volumina der Multi-Mykotoxin-Standardlösung (5.24) hinzugegeben, so dass drei Kontaminationsniveaus über den Kalibrierungsbereich erhalten werden. Die Lösungen werden gleichmäßig über die Materialien verteilt, gemischt, um die Aufstockung weiter zu verteilen, und die Behälter werden über Nacht (etwa 17 h bis 24 h) unter einem verdunkelten Abzug in einem Luftstrom mit Raumtemperatur, damit das Lösemittel verdampfen kann, stehen gelassen. Im Fall von Zentrifugierröhrchen können diese entweder vertikal (z. B. in einem Gestell) aufgestellt oder horizontal auf einer sauberen Oberfläche abgelegt werden. Beide wurden auf die ausreichende Verdampfung des Aufstockungslösungs-Lösemittels geprüft. Es wird mit 7.2 fortgefahren, jedoch ist darauf zu achten, 10 ml des Extraktionslösemittels (5.6) zu verwenden, um das Verhältnis von Probe zu Lösemittel konstant zu halten. Die wiedergefundenen Konzentrationen werden aus der Gleichung der Kalibrierung (1) berechnet.