

DIN EN 17279



ICS 67.050

**Lebensmittel –
Multiverfahren mit LC-MS/MS zum Screening auf Aflatoxin B1,
Deoxynivalenol, Fumonisin B1 und B2, Ochratoxin A, T2-Toxin, HT-2-Toxin
und Zearalenon in Lebensmitteln außer Lebensmittel für Säuglinge und
Kleinkinder;
Deutsche Fassung EN 17279:2019**

Foodstuffs –

Multimethod for the screening of aflatoxin B1, deoxynivalenol, fumonisin B1 and B2, ochratoxin A, T-2 toxin, HT-2 toxin and zearalenone in foodstuffs, excluding foods for infants and young children, by LC-MS/MS;
German version EN 17279:2019

Produits alimentaires –

Multiméthode de dépistage de l'aflatoxine B1, du déoxynivalénol, de la fumonisine B1 et B2, de l'ochratoxine A, de la toxine T-2, de la toxine HT-2 et de la zéaralénone dans les produits alimentaires, à l'exception des aliments pour nourrissons et jeunes enfants, par CLHP-SM/SM;
Version allemande EN 17279:2019

Gesamtumfang 33 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17279:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

In dieser Norm sind zahlreiche Angaben zur Einstellung verschiedener geeigneter Geräte enthalten, die sich in der Routine als erfolgreich gezeigt haben.

Diese Geräte sind üblicherweise nur mit englischen Beschriftungen bzw. Einstellungen erhältlich, und daher wurden viele gerätespezifische Angaben in dieser Norm auch in englischer Sprache angegeben.

Deutsche Fassung

Lebensmittel —
Multiverfahren mit LC-MS/MS zum Screening auf
Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, Fumonisin B1 und B2,
Ochratoxin A, T2-Toxin, HT-2-Toxin und Zearalenon
in Lebensmitteln außer Lebensmittel für Säuglinge und
Kleinkinder

Foodstuffs —

Multimethod for the screening of aflatoxin B1,
deoxynivalenol, fumonisin B1 and B2, ochratoxin A,
T-2 toxin, HT-2 toxin and zearalenone in foodstuffs,
excluding foods for infants and young children, by
LC-MS/MS

Produits alimentaires —

Multiméthode de dépistage de l'aflatoxine B1,
du déoxynivalénol, de la fumonisine B1 et B2,
de l'ochratoxine A, de la toxine T-2, de la toxine HT-2 et
de la zéaralénone dans les produits alimentaires,
à l'exception des aliments pour nourrissons et jeunes
enfants, par CLHP-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 5. August 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
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Chemikalien	6
6 Geräte und Ausrüstung	8
7 Durchführung	9
7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	9
7.2 Extraktion	9
7.3 Herstellung der Probenmesslösung	10
7.4 Vorbereitung der Kontrollprobe	11
7.5 LC-MS/MS-Analyse	11
7.5.1 Allgemeines	11
7.5.2 LC-Bedingungen	11
7.5.3 MS-Bedingungen	11
7.5.4 Injektionsreihenfolge	12
7.5.5 Bestimmung der Mykotoxine in den Messlösungen	12
8 Berechnung	12
8.1 Berechnung der relativen Signale	12
8.2 Bewertung der Proben	12
9 Prüfbericht	13
Anhang A (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	14
A.1 Systemeinstellungen Beispiel 1	14
A.1.1 LC-Bedingungen	14
A.1.2 MS-Bedingungen	15
A.1.3 LC-MS/MS-Bedingungen	16
A.2 Systemeinstellungen Beispiel 2	17
A.2.1 LC-Bedingungen	17
A.2.2 MS-Bedingungen	17
A.2.3 LC-MS/MS-Bedingungen	18
Anhang B (informativ) Entsprechende Paare an nativen und ¹³ C-markierten Vorläufer- und Produkt-Ionen für eine Reihe an üblichen Übergängen	19
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	22
Literaturhinweise	31

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17279:2019) 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 April 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis April 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 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 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

Mykotoxine sind Metabolite von Schimmelpilzen, die in verschiedenen Lebensmitteln vorkommen können. Von den in dieser Norm behandelten Mykotoxinen (Aflatoxin B₁, Deoxynivalenol, Fumonisin B₁ und B₂, Ochratoxin A, HT-2- und T-2-Toxine und Zearalenon) werden vor allem Getreide und Getreideerzeugnisse, Erdnüsse, Trockenobst und die entsprechenden Erzeugnisse befallen.

WARNUNG 1— Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, (EU) Nr. 1907/2006 [2] sowie geeignete nationale Mitteilungen sollten berücksichtigt werden.

WARNUNG 2— Bei der Anwendung dieser Europäischen Norm ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Diese Norm erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung festzulegen, welche einschränkenden Vorschriften gelten.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Screeningverfahren für die Bestimmung von Aflatoxin B₁, Deoxynivalenol, Fumonisin B₁ und B₂, Ochratoxin A, T-2- und HT-2-Toxin sowie Zearalenon in Lebensmitteln mit Hochleistungsflüssigchromatographie (en: high performance liquid chromatography, HPLC) gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) fest.

Das Ziel dieses Screeningverfahrens ist zu prüfen, ob eine vordefinierte Konzentration (die „Screening-Zielkonzentration“, en: screening target concentration, *STC*) überschritten ist oder nicht. Das Ergebnis dieses Screenings ist entweder „negativ“ oder „verdächtig“. „Negativ“ (screen-negativ) bedeutet, dass die interessierenden Mykotoxine nicht nachgewiesen wurden oder möglicherweise vorhanden sind aber unter der *STC* liegen. „Verdächtig“ (screen-positiv) bedeutet, dass der „festgelegte Cut-off-Wert“ überschritten ist und dass die Probe möglicherweise ein oder mehrere Mykotoxine in Konzentrationen über der *STC* enthält.

Zur vollständigen Identifizierung und exakten Quantifizierung ist ein quantitatives Bestätigungsverfahren erforderlich, was nicht durch diese Norm abgedeckt ist.

Dieses Verfahren ist für verschiedene Lebensmittelarten geeignet und wurde für repräsentative Matrices aus vier Bereichen validiert (siehe detaillierte Informationen in Anhang C):

- hoher Stärke- und/oder Proteingehalt und niedriger Wasser- und Fettgehalt: Weizen, Getreidemischung, Weizenmehl und Cornflakes;
- hoher Fettgehalt: Erdnüsse;
- hoher Zucker- und niedriger Wassergehalt: getrocknete Feigen;
- hoher Wassergehalt: Traubensaft.

Während der Validierung wurden für die folgenden Screening-Zielkonzentrationen die folgenden „Cut-off“-Werte ermittelt:

- Aflatoxin B₁: 2 µg/kg bis 5 µg/kg;
- Deoxynivalenol: 250 µg/kg bis 865 µg/kg;
- Fumonisin B₁: 200 µg/kg bis 790 µg/kg;
- Fumonisin B₂: 110 µg/kg bis 230 µg/kg;
- Ochratoxin A: 4 µg/kg bis 9 µg/kg;
- T-2-Toxin: 25 µg/kg;
- HT-2-Toxin: 25 µg/kg bis 50 µg/kg;
- Zearalenon: 30 µg/kg bis 100 µg/kg.

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:

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

4 Kurzbeschreibung

Die Mykotoxine werden aus dem homogenisierten Probenmaterial nach Wasserzugabe durch Schütteln mit angesäuertem Acetonitril extrahiert. Nach einer Salz-induzierten Phasentrennung und Zentrifugieren wird der Acetonitrilextrakt mit Wasser verdünnt, ggf. gefiltert und mit HPLC-MS/MS analysiert. Die relative Signalgröße (en: response) jedes Mykotoxins bezogen auf die jeweils korrespondierende isotoopenmarkierte Verbindung, die dem Endextrakt in Höhe der Zielkonzentration (*STC*) zugegeben wird, wird gegen den festgelegten „Cut-off“-Wert geprüft.

5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt werden nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Falls nicht anders festgelegt, müssen Lösemittel für LC-Analytik geeignet sein.

- 5.1 **Wasser**, entionisiert.
- 5.2 **Wasser**, LC-MS-Grad, doppelt destilliertes Wasser oder Wasser von Grad 1 nach EN ISO 3696.
- 5.3 **Acetonitril**, pro analysi (p.a.).
- 5.4 **Essigsäure**, Reinheit mehr als 98 % (m/m).
- 5.5 **Magnesiumsulfat (MgSO₄)** — wasserfrei, p.a.
- 5.6 **Aflatoxin B₁ (AB1)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.7 **Deoxynivalenol (DON)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.8 **Fumonisin B₁ (FB1)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.9 **Fumonisin B₂ (FB2)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.10 **HT-2-Toxin (HT-2)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.11 **Ochratoxin A (OTA)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.12 **T-2-Toxin (T-2)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.13 **Zearalenon (ZEA)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.14 **¹³C Aflatoxin B₁ (¹³C-AB1)** z. B. Lösung $\rho = 0,5 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.15 ^{13}C Deoxynivalenol (^{13}C -DON) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.16 ^{13}C Fumonisin B₁ (^{13}C -FB1) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril/Wasser.

5.17 ^{13}C Fumonisin B₂ (^{13}C -FB2) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril/Wasser.

5.18 ^{13}C HT-2-Toxin (^{13}C -HT2) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.19 ^{13}C Ochratoxin A (^{13}C -OTA) z. B. Lösung $\rho = 10 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.20 ^{13}C T-2-Toxin (^{13}C -T2) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.21 ^{13}C Zearalenon (^{13}C -ZEA) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.22 Extraktionslösung, Acetonitril, mit 1 % Essigsäure.

1 Volumenteil Essigsäure (5.4) wird zu 99 Volumenteilen Acetonitril (5.3) gegeben und gemischt. Diese Lösung kann bei Lagerung bei Zimmertemperatur sechs Monate verwendet werden.

5.23 Einzelne Stammlösungen.

Die einzelnen Lösungen werden entweder durch Lösen der ursprünglichen festen Standardsubstanzen in geeigneten Lösemitteln oder aus individuellen kommerziell erhältlichen Stammlösungen hergestellt. Die durch diese Europäische Norm abgedeckten Mykotoxine lösen sich gut in Acetonitril — mit Ausnahme von Fumonisin, für die eine Acetonitril/Wasser-Mischung (50 + 50, v + v) zur Herstellung der einzelnen Stammlösungen empfohlen wird.

Die Massenkonzentration der einzelnen Mykotoxine ρ , in ng/ml wird nach Gleichung (1) berechnet:

$$\rho = 20 \times D \times STC \quad (1)$$

Dabei ist

D der Verdünnungsfaktor der Probe pro g im Endextrakt pro ml (üblicherweise $D = 0,25$), in g/ml;

STC die Screening-Zielkonzentration (Massenanteil) in der Probe, in $\mu\text{g/kg}$.

BEISPIEL Für ein Mykotoxin mit einer STC von $1\,000 \mu\text{g/kg}$ in der Probe beträgt die Massenkonzentration dieses Mykotoxins in der gemischten Mykotoxinstammlösung $5\,000 \text{ ng/ml}$.

5.24 Gemischte Stammlösung.

Eine gemischte Stammlösung mit allen einzelnen Mykotoxinen wird unter Verwendung geeigneter Pipetten (6.6) in einer Mischung aus Acetonitril/Wasser (80 + 20, v + v) hergestellt und die jeweiligen Massenkonzentrationen nach Gleichung (1) berechnet. Diese Lösung kann im Dunklen, bei 4°C aufbewahrt sechs Monate verwendet werden.

Diese gemischte Stammlösung darf für die Herstellung der positiven Kontrollproben (7.4) verwendet werden.

5.25 Gemischte interne (ISTD) Standardlösung (isotopenmarkierte Mykotoxine).

Isotopenmarkierte Mykotoxine sind üblicherweise als zertifizierte Standardlösungen erhältlich. Eine gemischte ISTD-Lösung mit allen isotopenmarkierten Mykotoxinen wird in einer Mischung aus Acetonitril/Wasser (80 + 20, v + v) hergestellt und die jeweiligen Massenkonzentrationen nach Gleichung (1) berechnet.

BEISPIEL Für ein Mykotoxin mit einer *STC* von 10 µg/kg in der Probe beträgt die Massenkonzentration des isotopenmarkierten Standards in der gemischten ISTD-Lösung 50 ng/ml.

Diese Lösung kann im Dunkeln, bei 4 °C aufbewahrt, sechs Monate verwendet werden.

Diese Lösung wird als interne Kalibrierlösung verwendet und wird der gemischten Standardlösung (5.26) und jedem Probenextrakt (7.3) zugegeben.

5.26 Gemischte Standardlösung.

Eine gemischte Standardlösung wird durch Mischen von 1 Volumenteil der gemischten Mykotoxin-Stammlösung (5.24) mit 1 Volumenteil der gemischten ISTD-Lösung (5.25), 8 Volumenteilen Extraktionslösung (5.22), und 10 Volumenteilen Wasser (5.2) hergestellt. Üblicherweise wird vor jeder Analysenreihe eine Menge von 400 µl frisch hergestellt.

BEISPIEL Herstellung im Probenfläschchen:

20 µl	gemischte Stammlösung (5.24);
20 µl	gemischte ISTD-Lösung (5.25);
160 µl	Extraktionslösung (5.22);
200 µl	Wasser (5.2).

Die gemischte Standardlösung dient zur Prüfung der korrekten Messung der Mykotoxine und ihrer isotopenmarkierten Verbindungen) (7.5.4).

6 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborglasgeräte und Ausrüstung, und insbesondere die Folgenden:

6.1 Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss, 50 ml mit Kappe.

6.2 Analysenwaage, Fehlergrenze: 0,01 mg.

6.3 Laborwaage, Fehlergrenze: 0,01 g.

6.4 Mechanischer Vertikal- oder Horizontalschüttler oder Überkopfschüttler, einstellbar

6.5 Laborschüttler.

6.6 Pipetten, einstellbar, z. B. 10 µl bis 100 µl und 100 µl bis 1 000 µl, geeignet für organische Lösemittel (z. B. Mikroliterpipetten), mit geeigneten Spitzen.

6.7 Zentrifuge, geeignet für eine relative Zentrifugalkraft von 3 000 *g*.

6.8 Probenfläschchen, 1,5 ml bis 2 ml, aus Glas oder Polypropylen mit Schraubkappe.

6.9 Spritzenfilter oder Zentrifugenfilter, 0,20 µm bis 0,45 µm, aus Nylon oder Polytetrafluorethylen (PTFE).