

DIN EN 17280



ICS 67.060

**Lebensmittel –
Bestimmung von Zearalenon und Trichothecenen einschließlich
Deoxynivalenol und den acetylierten Derivaten (3-Acetyl-Deoxynivalenol
und 15-Acetyl-Deoxynivalenol), Nivalenol sowie T-2- und HT-2-Toxin in
Getreide und Getreideerzeugnissen mit LC-MS/MS;
Deutsche Fassung EN 17280:2019**

Foodstuffs –

Determination of zearalenone and trichothecenes including deoxynivalenol and its acetylated derivatives (3-acetyl-deoxynivalenol and 15-acetyl-deoxynivalenol), nivalenol T-2 toxin and HT-2 toxin in cereals and cereal products by LC-MS/MS;
German version EN 17280:2019

Produits alimentaires –

Dosage de la zéaralénone et des trichothécènes y compris du déoxynivalénol (DON) et ses dérivés acétylés (3-acétyl-DON et 15-acétyl-DON), du nivalénol (NIV) et des toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et les produits céréaliers par CL-SM/SM;
Version allemande EN 17280:2019

Gesamtumfang 40 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17280:2019) 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).

In diesem Dokument 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.

Diese Norm enthält neben den gesetzlichen Einheiten auch die Einheit psi, die in Deutschland nicht zugelassen ist. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Anwendung dieser Einheit im nationalen amtlichen und geschäftlichen Verkehr aufgrund des Gesetzes über Einheiten im Messwesen und die Zeitbestimmung (EinhZeitG) nicht zulässig ist. Die Angabe dieser Einheit dient lediglich als Hilfe im amtlichen und geschäftlichen Verkehr (z. B. bei Einfuhr und Ausfuhr) mit solchen Staaten, die diese Einheit anwenden.

Umrechnung:

Einheit		
nicht zugelassen	zugelassen	Umrechnung
psi	Pa	1 psi = 6 894,757 Pa

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

ISO 5725 (all parts) siehe DIN ISO 5725 (alle Teile)

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen*

Deutsche Fassung

Lebensmittel —
Bestimmung von Zearalenon und Trichothecenen
einschließlich Deoxynivalenol und den acetylierten Derivaten
(3-Acetyl-Deoxynivalenol und 15-Acetyl-Deoxynivalenol),
Nivalenol sowie T-2- und HT-2-Toxin in Getreide und
Getreideerzeugnissen mit LC-MS/MS

Foodstuffs —

Determination of zearalenone and trichothecenes
including deoxynivalenol and its acetylated derivatives
(3-acetyl-deoxynivalenol and
15-acetyl-deoxynivalenol), nivalenol T-2 toxin and HT-2
toxin in cereals and cereal products by LC-MS/MS

Produits alimentaires —

Dosage de la zéaralénone et des trichothécènes y compris
du déoxynivalénol (DON) et ses dérivés acétylés
(3-acétyl-DON et 15-acétyl-DON), du nivalénol (NIV) et des
toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et les produits
céréaliers par CL-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	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich.....	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung.....	7
5 Reagenzien.....	7
6 Geräte und Ausrüstung.....	9
7 Durchführung.....	10
7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....	10
7.2 Extraktion.....	10
7.3 Reinigung durch Festphasenextraktion.....	10
7.4 Vorbereitung der Probenmesslösung.....	11
7.5 Aufstocken.....	11
7.6 Bestimmung mit LC-MS/MS	11
7.6.1 Allgemeines	11
7.6.2 Injektionsreihenfolge.....	11
7.7 Identifizierung.....	12
7.8 Kalibrierung	12
8 Berechnung.....	12
9 Präzision	13
9.1 Allgemeines	13
9.2 Wiederholpräzision.....	13
9.3 Vergleichpräzision	13
10 Prüfbericht.....	17
Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme	18
Anhang B (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	20
Anhang C (informativ) Zusätzliche Beispiele für die Trennung von 3-AcDON und 15-AcDON.....	24
Anhang D (informativ) Präzisionsdaten	27
Literaturhinweise.....	38

Bilder

Bild A.1 — Einzelionenchromatogramm einer mit 120 µg/kg NIV, 600 µg/kg DON, 75 µg/kg 3- und 15-AcDON, 25 µg/kg HT-2 und T-2, 50 µg/kg ZEN, und den jeweiligen ISTD aufgestockten Weizenprobe	18
Bild A.2 — Extrahiertes Ionenchromatogramm (Quantifier-Ionen) einer Mykotoxin-Standardlösung mit 1,87 µg/ml NIV, 9,37 µg/ml DON, 1,12 µg/ml 3- und 15-AcDON, 0,37 µg/ml HT-2 und T-2, 0,75 µg/ml ZEN, und den jeweiligen ISTD	19

Tabellen

Tabelle 1 — Beispiel geeigneter Kalibrierlösungen.....	9
Tabelle 2 — Validierungsdaten für Nivalenol.....	13
Tabelle 3 — Validierungsdaten für Deoxynivalenol	14
Tabelle 4 — Validierungsdaten für 3-Acetyl-Deoxynivalenol	14
Tabelle 5 — Validierungsdaten für 15-Acetyl-Deoxynivalenol.....	15
Tabelle 6 — Validierungsdaten für HT-2-Toxin.....	15
Tabelle 7 — Validierungsdaten für T-2-Toxin.....	16
Tabelle 8 — Validierungsdaten für Zearalenon.....	16
Tabelle B.1 — Gradient	20
Tabelle B.2 — Analytspezifische massenspektrometrische Bedingungen	21
Tabelle B.3 — Gradient	22
Tabelle B.4 — Analytspezifische massenspektrometrische Bedingungen	23
Tabelle C.1 — Gradient.....	24
Tabelle C.2 — Gradient.....	25
Tabelle C.3 — Gradient.....	26
Tabelle D.1 —Präzisionsdaten für Nivalenol in Weizen	27
Tabelle D.2 —Präzisionsdaten für Nivalenol in Weizenmehl	28
Tabelle D.3 —Präzisionsdaten für Nivalenol in Weizen crackern	28
Tabelle D.4 —Präzisionsdaten für Deoxynivalenol in Weizen	29
Tabelle D.5 —Präzisionsdaten für Deoxynivalenol in Weizenmehl.....	29
Tabelle D.6 —Präzisionsdaten für Deoxynivalenol in Weizen cracker.....	30
Tabelle D.7 —Präzisionsdaten für 3-Acetyl-Deoxynivalenol in Weizen	30
Tabelle D.8 —Präzisionsdaten für 3-Acetyl-Deoxynivalenol in Weizenmehl.....	31
Tabelle D.9 —Präzisionsdaten für 3-Acetyl-Deoxynivalenol in Weizen crackern	31
Tabelle D.10 —Präzisionsdaten für 15-Acetyl-Deoxynivalenol in Weizen.....	32
Tabelle D.11 —Präzisionsdaten für 15-Acetyl-Deoxynivalenol in Weizenmehl.....	32
Tabelle D.12 —Präzisionsdaten für 15-Acetyl-Deoxynivalenol in Weizen crackern.....	33
Tabelle D.13 —Präzisionsdaten für HT-2-Toxin in Weizen.....	33
Tabelle D.14 —Präzisionsdaten für HT-2-Toxin in Weizenmehl.....	34
Tabelle D.15 —Präzisionsdaten für HT-2-Toxin in Weizen crackern.....	34
Tabelle D.16 —Präzisionsdaten für T-2-Toxin in Weizen	35
Tabelle D.17 —Präzisionsdaten für T-2-Toxin in Weizenmehl.....	35
Tabelle D.18 —Präzisionsdaten für T-2-Toxin in Weizen cracker.....	36
Tabelle D.19 —Präzisionsdaten für Zearalenon in Weizen	36
Tabelle D.20 —Präzisionsdaten für Zearalenon in Weizenmehl.....	37
Tabelle D.21 — Präzisionsdaten für Zearalenon in Weizen crackern.....	37

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17280:2019) 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

Die Mykotoxine Nivalenol, Deoxynivalenol und seine Acetylderivate (3-Acetyl-Deoxynivalenol, 15-Acetyl-Deoxynivalenol), T-2-Toxin und sein Metabolit HT-2-Toxin sowie Zearalenon werden durch verschiedene *Fusarium*-Arten gebildet. Getreide wie Weizen, Mais, Gerste, Hafer, Roggen und wichtige daraus hergestellte Produkte sind häufig davon betroffen.

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 [3], 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. Dieses-Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit ihrer 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— Fusarientoxine (Zearalenon, Deoxynivalenol, T-2- und HT-2-Toxine) werden für eine Reihe von Tiererkrankungen wie Lungenödeme, Unfruchtbarkeit, Durchfall, Erbrechen, für verminderte Nahrungsaufnahme, Leukopenie, Immunsuppression, Irritationen der Haut und des Gastrointestinaltraktes, Blutungen usw., verantwortlich gemacht und wurden auch mit einigen Humanerkrankungen in Verbindung gebracht. IARC hat Zearalenon, Deoxynivalenol und T-2-Toxin bezogen auf die Karzinogenität für den Menschen (Gruppe 3) als nicht einstuftbar bewertet [4].

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren für die Bestimmung von Nivalenol (NIV), Deoxynivalenol (DON) und den Acetylderivaten (3-Acetyl-DON und 15-Acetyl-DON), HT-2- und T-2-Toxin (HT-2 und T-2) und Zearalenon (ZEN) in Getreide und Getreideerzeugnissen mit Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) nach Reinigung durch Festphasenextraktion (SPE) fest.

Das Verfahren wurde an Weizen, Weizenmehl und Weizen cracker validiert. Der Weizen und das Weizenmehl wurden aus einer Mischung von Weizen und mit Pilzen befallenen Weizenkörnern hergestellt. Die Weizen cracker wurden aus Weizenmehl und Wasser, das mit den entsprechenden Mykotoxinen angereichert war, gebacken.

NIV ist von 27,7 µg/kg bis 378 µg/kg validiert worden.

DON ist von 234 µg/kg bis 2 420 µg/kg validiert worden.

3-Acetyl-DON ist von 18,5 µg/kg bis 137 µg/kg validiert worden.

15-Acetyl-DON ist von 11,4 µg/kg bis 142 µg/kg validiert worden.

HT-2-Toxin ist von 6,6 µg/kg bis 134 µg/kg validiert worden.

T-2-Toxin ist von 2,1 µg/kg bis 37,6 µg/kg validiert worden.

ZEN ist von 31,6 µg/kg bis 230 µg/kg validiert worden.

Laborerfahrungen haben gezeigt, dass dieses Verfahren auch auf Gerste und Hafermehl und auf Roggen basierende Cracker anwendbar ist [5], dies wurde jedoch nicht im Ringversuch validiert.

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

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

4 Kurzbeschreibung

Trichothecene und Zearalenon werden aus dem homogenisierten Probenmaterial mit einer Mischung aus Acetonitril-Wasser extrahiert. Der Extrakt wird filtriert und bis zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit einer Mischung aus Methanol und Wasser gelöst und auf eine polymere Festphasen-Extraktionssäule aufgetragen. Die Mykotoxine werden gereinigt und auf der Säule konzentriert und dann mit Methanol eluiert. Isotopenmarkierte Mykotoxine werden dem Säuleneluat zugefügt, bevor dieses bis zur Trockne verdampft wird. Nach Lösen des Trocknungsrückstandes mit dem Injektionslösemittel werden die Mykotoxine mit Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) nachgewiesen.

5 Reagenzien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet.

5.1 Stickstoff oder ölfreie Druckluft.

5.2 Wasser, entionisiert.

5.3 Wasser, für HPLC.

5.4 Acetonitril, für HPLC.

5.5 Methanol, für HPLC.

5.6 Ammoniumacetat, für Massenspektrometrie, $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) \geq 99,0 \%$.

5.7 Extraktionsmischung.

84 Volumenteile Acetonitril (5.4) werden mit 16 Volumenteilen Wasser (5.2) gemischt.

5.8 Festphasen-Extraktions (SPE) Säulen, die 60 mg eines hydrophil/lipophil eingestellten Polymers enthalten, das sowohl polare als auch nichtpolare Bestandteile zurückhalten kann (Waters Oasis® HLB¹ ist geeignet).

5.9 Nivalenol (NIV), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.10 Deoxynivalenol (DON), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.11 3-Acetyl-DON (3-AcDON), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.12 15-Acetyl-DON (15-AcDON), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.13 HT-2-Toxin (HT-2), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.14 T-2-Toxin (T-2), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.15 Zearalenon (ZEN), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

1 Oasis HLB ist ein Beispiel für ein geeignetes Produkt, geliefert von Waters. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

5.16 Nivalenol isotopenmarkierter interner Standard (^{13}C -NIV), z. B. Nivalenol $^{13}\text{C}_{15}$ -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.17 Deoxynivalenol isotopenmarkierter interner Standard (^{13}C -DON), z. B. Deoxynivalenol $^{13}\text{C}_{15}$ -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.18 3-Acetyl-DON isotopenmarkierter interner Standard (^{13}C -3-AcDON), z. B. 3-Acetyl-DON $^{13}\text{C}_{17}$ -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.19 HT-2-Toxin isotopenmarkierter interner Standard (^{13}C -HT-2), z. B. HT-2-Toxin $^{13}\text{C}_{22}$ -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.20 T-2-Toxin isotopenmarkierter interner Standard (^{13}C -T-2), z. B. T-2-Toxin $^{13}\text{C}_{24}$ -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.21 Zearalenon isotopenmarkierter interner Standard (^{13}C -ZEN), z. B. Zearalenon $^{13}\text{C}_{18}$ -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.22 Gemischte Stammlösung.

Eine gemischte Mykotoxinstammlösung in Acetonitril (5.4) mit z. B. $12,5 \mu\text{g/ml}$ NIV (5.9); $62,5 \mu\text{g/ml}$ DON (5.10); $7,5 \mu\text{g/ml}$ 3-AcDON (5.11); $7,5 \mu\text{g/ml}$ 15-AcDON (5.12); $2,5 \mu\text{g/ml}$ HT-2 (5.13); $2,5 \mu\text{g/ml}$ T-2 (5.14); $5,0 \mu\text{g/ml}$ ZEN (5.15). Diese Lösung kann für die Aufstockungen (7.5) genutzt werden.

5.23 Gemischte Standardlösung.

Eine gemischte Mykotoxin-Arbeitslösung in Acetonitril (5.4) mit z. B. $1,25 \mu\text{g/ml}$ NIV (5.9); $6,25 \mu\text{g/ml}$ DON (5.10); $0,75 \mu\text{g/ml}$ 3-AcDON (5.11); $0,75 \mu\text{g/ml}$ 15-AcDON (5.12); $0,25 \mu\text{g/ml}$ HT-2 (5.13); $0,25 \mu\text{g/ml}$ T-2 (5.14) und $0,5 \mu\text{g/ml}$ ZEN (5.15) wird hergestellt. Diese Lösung wird für die Kalibrierung (5.25) eingesetzt.

5.24 Gemischte Lösung der internen Standards (ISTD)

Isotopenmarkierte Mykotoxine sind üblicherweise als zertifizierte Standardlösungen in Acetonitril erhältlich. Durch Mischen handelsüblicher einzelner ISTD-Lösungen wird eine gemischte ISTD-Lösung hergestellt, die z. B. $1,25 \mu\text{g/ml}$ ^{13}C -NIV (5.16); $6,25 \mu\text{g/ml}$ ^{13}C -DON (5.17); $0,75 \mu\text{g/ml}$ ^{13}C -3-AcDON (5.18); $0,25 \mu\text{g/ml}$ ^{13}C -HT-2 (5.19); $0,25 \mu\text{g/ml}$ ^{13}C -T-2 (5.20) und $0,5 \mu\text{g/ml}$ ^{13}C -ZEN (5.21) in Acetonitril (5.4) enthält.

5.25 Kalibrierlösungen.

Verschiedene Volumina der gemischten Standardlösung (5.23) und der gemischten ISTD-Lösung (5.24) werden in sechs Autosamplerfläschchen (6.11) z. B. nach Tabelle 1 gegeben, was sechs Kalibrierwerte innerhalb des Kalibrierbereiches ergibt. Der Inhalt wird in einer Eindampfstation (6.13) bei etwa 40°C unter einem Luft- oder Stickstoffstrom (5.1) zur Trockne eingedampft.

Der trockene Rückstand wird in $400 \mu\text{l}$ (V_1) HPLC-Injektionslösemittel (5.26) aufgenommen und mindestens 10 s gründlich gemischt.

Tabelle 1 — Beispiel geeigneter Kalibrierlösungen

Kalibrier- lösung	Gemischte Standard- lösung µl	Gemischte ISTD- Lösung µl	Massenkonzentration der Kalibrierlösungen						
			NIV µg/ml	DON µg/ml	3- AcDON µg/ml	15- AcDON µg/ml	HT-2 µg/ml	T-2 µg/ml	ZEN µg/ml
1	25	100	0,078	0,391	0,047	0,047	0,016	0,016	0,031
2	50	100	0,156	0,781	0,094	0,094	0,031	0,031	0,063
3	100	100	0,313	1,563	0,188	0,188	0,063	0,063	0,125
4	200	100	0,625	3,125	0,375	0,375	0,125	0,125	0,250
5	400	100	1,250	6,250	0,750	0,750	0,250	0,250	0,500
6	600	100	1,875	9,375	1,125	1,125	0,375	0,375	0,750
Massenkonzentration der isotoopenmarkierten Analyte (µg/ml) in allen Kalibrierlösungen									
			0,313	1,563	0,188	0,188	0,063	0,063	0,125

5.26 HPLC Injektionslösemittel.

Die Zusammensetzung des HPLC-Injektionslösemittels hängt von den angewendeten LC-Bedingungen ab. Beispiele von für die LC-MS/MS-Systeme geeigneter Eluenten sind in Anhang B angegeben.

6 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborgeräte und Ausrüstung und insbesondere die Folgenden:

6.1 Analysenwaage, Fehlergrenze: 0,01 mg.

6.2 Laborwaage, Fehlergrenze: 0,01 g.

6.3 Einstellbarer mechanischer vertikaler oder horizontaler Schüttler, mit geeigneten 100 ml-Kolben.

6.4 Papierfilter, Porengröße 20 µm bis 25 µm.

6.5 Erlenmeyerkolben, mit Schraubverschluss oder Glasstopfen.

6.6 Unterdruckeinheit, für die Festphasen-Extraktionssäulen.

6.7 Vollpipetten, 5 ml.

6.8 Mikroliterspritze(n) oder Mikroliter Pipette(n), 10 µl bis 1 000 µl.

6.9 Röhrchen, 10 ml mit Verschluss.

6.10 4 ml-Fläschchen, mit Verschluss.

6.11 Autosamplerfläschchen, mit Verschluss.

6.12 Einweg-Filtereinheit, mit 0,2 µm Porengröße, regenerierte Cellulose.

6.13 Verdampfungsvorrichtung.

6.14 LC-MS/MS-System, bestehend aus:

6.14.1 LC-Pumpe, geeignet, einen Binärgradienten mit den für die Analysensäule geeigneten Durchflussmengen mit ausreichender Genauigkeit zu liefern.

6.14.2 Injektionssystem, das ein geeignetes Volumen der Injektionslösung mit ausreichender Genauigkeit einspritzt.

6.14.3 LC-Säule, geeignet, die zu analysierenden Mykotoxine zurückzuhalten, vorzugsweise mit einem Retentionsfaktor von mindestens zwei. Die beiden Isomere 15-AcDON und 3-AcDON können nicht einzeln mit spezifischen Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Übergängen unterschieden werden. Daher müssen die LC-Säule und der Gradient geeignet sein, beide Substanzen zu trennen. Beispiele für geeignete LC-Säulen und Gradienten sind in Anhang B wiedergegeben.

6.14.4 Säulenofen, der eine konstante Temperatur aufrechterhalten kann.

6.14.5 Tandem-Massenspektrometer (MS/MS), geeignet zur Ionisierung der Mykotoxine (entweder in positive oder negative Ionen), mit „Selected Reaction Monitoring“ (SRM) bei MS/MS-Geräten oder „Parallel Reaction Monitoring“ (PRM) bei MS/hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS).

Jede Ionisationsquelle, die ausreichende Ergebnisse liefert, darf verwendet werden.

6.14.6 Datenauswertesystem.

7 Durchführung

7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Laborprobe wird gründlich gemahlen und homogenisiert.

7.2 Extraktion

10,0 g der Untersuchungsprobe (Einwaage) werden auf 0,1 g in einen 100 ml Erlenmeyerkolben (6.5) eingewogen, mit 50 ml (V_3) Extraktionsmischung (5.7) versetzt, 60 min kräftig mit dem Schüttler (6.3) geschüttelt und durch einen Papierfilter (6.4) filtriert.

5 ml (V_4) des filtrierten Extraktes werden in ein 10 ml Röhrchen (6.9) pipettiert und bei etwa 40 °C unter einem Luft- oder Stickstoffstrom (5.1) zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wird zunächst in 100 µl Methanol (5.5) gelöst und etwa 1 min geschüttelt. Dann werden 900 µl Wasser (5.3) zugegeben und es wird wiederum etwa 1 min geschüttelt.

7.3 Reinigung durch Festphasenextraktion

Die SPE-Säule (5.8) wird mit der Unterdruckeinheit (6.6) verbunden.

Die SPE-Säule (5.8) wird aktiviert und konditioniert, indem 2 ml Methanol (5.5) und anschließend 2 ml Wasser (5.3) durchlaufen.

Das gesamte Volumen (1 ml) des rekonstituierten Extraktes wird mit einer Geschwindigkeit von etwa einem Tropfen je Sekunde durch die Säule laufen gelassen, wobei das Eluat verworfen wird. Die Säule wird durch Anlegen eines leichten Luftstroms getrocknet.

Die Säule wird mit 1 ml Wasser (5.3) gewaschen und das Eluat verworfen. Die Säule wird getrocknet.