

DIN EN 17521

ICS 67.050

**Lebensmittel –
Bestimmung von Alternariatoxinen in Tomaten, Weizen und
Sonnenblumenkernen mit SPE clean-up und HPLC-MS/MS;
Deutsche Fassung EN 17521:2021**

Foodstuffs –

Determination of Alternaria toxins in tomato, wheat and sunflower seeds by SPE clean-up and HPLC-MS/MS;

German version EN 17521:2021

Produits alimentaires –

Détermination de la teneur en toxines d'Alternaria dans la tomate, le blé et les graines de tournesol purification par SPE et CLHP-SM/SM;

Version allemande EN 17521:2021

Gesamtumfang 41 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17521:2021) 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:

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

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696*

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

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

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

* 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 Alternariatoxinen in Tomaten, Weizen und
Sonnenblumenkernen mit SPE clean-up und HPLC-MS/MS

Foodstuffs —

Determination of Alternaria toxins in tomato, wheat
and sunflower seeds by SPE clean-up and HPLC-MS/MS

Produits alimentaires —

Détermination de la teneur en toxines d'Alternaria dans
la tomate, le blé et les graines de tournesol purification
par SPE et CLHP-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 21. Juni 2021 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	6
5 Reagenzien	6
6 Geräte und Ausrüstung	10
7 Durchführung	11
8 Berechnung	15
9 Präzision	15
10 Prüfbericht	18
Anhang A (informativ) Beispielchromatogramme	19
Anhang B (informativ) Beispielbedingungen für geeignete HPLC-MS/MS-Systeme	23
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	28
Literaturhinweise	39

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17521:2021) 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 Februar 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Februar 2022 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 Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

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

Die Spezies *Alternaria*, unter denen *A. alternata* die am weitesten verbreitete ist, bilden mehr als 70 Sekundärmetabolite, von denen jedoch nur wenige ihrer Struktur nach als Mykotoxine identifiziert und dokumentiert wurden [1]. Bei *Alternaria*-Pilzen handelt es sich um häufige Pflanzenschadorganismen an Getreide, Ölsaaten, Obst und Gemüse und anderen Lebensmitteln, und das Auftreten von *Alternaria*-Toxinen bei diesen Erzeugnissen wurde umfassend dokumentiert [1]. Diese Toxine kontaminieren nicht nur Ernten, sondern können Lebensmittel auch bei Kühlschranktemperaturen verderben.

Von diesen *Alternaria*-Toxinen sind Altenuen (ALT), Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME), Tentoxin (TEN) und Tenuazonsäure (TEA) von größtem Belang. ALT, AOH und AME sind Dibenzo- α -Pyrone, TEN ist ein zyklisches Tetrapeptid und TEA ein Derivat der Tetramsäure. ALT und TEA weisen *in vitro* sowie in Tierversuchen eine akute Toxizität auf. AME und AOH sind nicht sehr akut toxisch, wurden jedoch als Auslöser von genotoxischen und mutagenen Wirkungen beschrieben [1 - 3].

Im Allgemeinen treten diese Toxine bei Tomatenerzeugnissen, Getreide und Ölsaaten (z. B. Sonnenblumenkernen) auf, weshalb diese in diesem Dokument schwerpunktmäßig behandelt werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung von fünf *Alternaria*-Toxinen an Weizen, Tomatenmark und Sonnenblumenkernen durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC, en: high-performance liquid chromatography) in Verbindung mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) fest.

Das Verfahren wurde mit natürlich kontaminierten als auch dotierten Weizen-, Tomatenmark- und Sonnenblumenkernproben validiert.

Die Validierungsstufe für Altenuen (ALT) lagen im Bereich von 2,18 µg/kg bis 13,8 µg/kg.

Die Validierungsstufe für Alternariol (AOH) lagen im Bereich von 1,82 µg/kg bis 46,7 µg/kg.

Die Validierungsstufe für Alternariolmonomethylether (AME) lagen im Bereich von 1,29 µg/kg bis 47,2 µg/kg.

Die Validierungsstufe für Tentoxin (TEN) lagen im Bereich von 5,29 µg/kg bis 218 µg/kg.

Die Validierungsstufe für Tenuazonsäure (TEA) lagen im Bereich von 41,8 µg/kg bis 1 618 µg/kg.

Mit diesem Verfahren sind Bestimmungsgrenzen von 1 µg/kg für ALT (ausgenommen bei Weizen und Sonnenblumenkernen – 1,4 µg/kg bzw. 1,2 µg/kg), AOH und AME, von 5 µg/kg für TEN und von 10 µg/kg für TEA oder niedriger erreichbar.

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 [4], sowie geeignete nationale Mitteilungen, 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 — Einige *Alternaria*-Toxine weisen genotoxische und mutagene Wirkungen auf.

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, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (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

Eine Prüfmenge der Probe, die mit den isotopenmarkierten internen Standards dotiert ist, wird mit einem Gemisch aus Methanol, Wasser und Essigsäure extrahiert. Das Gemisch aus Probe und Extraktionsmittel wird zentrifugiert und ein Aliquot des Überstands wird aufgefangen. Der Extrakt wird mit einem gleichen Volumen 1 %iger (φ) wässriger Essigsäurelösung verdünnt und an einem Adsorbens zur polymerischen Festphasen-Extraktion (SPE, en: solid-phase extraction) aufkonzentriert. Der Extrakt wird von der SPE-Säule mit einer Lösung aus Methanol und Essigsäureethylester eluiert. Dann wird das Eluat verdampft, rekonstituiert, durch einen Spritzenfilter aus Polytetrafluorethylen (PTFE) gefiltert und anschließend per HPLC-MS/MS analysiert.

5 Reagenzien

Sofern keine anderslautenden Festlegungen bestehen, werden nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Die Lösungen müssen, sofern nicht anders festgelegt, von geeigneter Qualität für die LC-MS-Analyse sein. Handelsübliche Lösungen mit gleichwertigen Eigenschaften wie die aufgeführten dürfen verwendet werden.

5.1 Stickstoff-Druckgas, Reinheit von $\varphi = 99,99\%$ oder besser.

5.2 Wasser (H₂O), HPLC-Qualität.

5.3 Wasser (H₂O), LC-MS-Qualität.

5.4 Methanol (CH₃OH), analysenrein.

5.5 Methanol (CH₃OH), LC-MS-Qualität.

5.6 Essigsäureethylester (CH₃COOC₂H₅), analysenrein oder höher.

5.7 Ammoniumhydroxid (NH₄OH), LC-MS-Qualität, Massenanteil $w(\text{NH}_4\text{OH}) = 25\%$.

5.8 Ammoniumhydroxid (NH₄OH), $w(\text{NH}_4\text{OH}) = 2,3\%$.

1 ml Ammoniumhydroxid 25 % (5.7) wird in einen mit ungefähr 5 ml Wasser (5.3) gefüllten 10-ml-Messkolben gegeben und bis zur Marke mit Wasser (5.3) aufgefüllt.

5.9 Essigsäure (CH₃COOH), $w \geq 99,7\%$.

5.10 Ammoniumacetat (CH₃COONH₄), LC-MS-Qualität.

5.11 Ammoniumacetat-Lösung (CH₃COONH₄), Stoffmengenkonzentration $c = 1\text{ mol/l}$.

77,08 g Ammoniumacetat (5.10) werden in 1 l Wasser (5.3) gelöst.

5.12 Extraktionsgemisch, Gemisch aus Methanol + Wasser + Essigsäure (85 + 14 + 1, $V + V + V$).

850 ml Methanol (5.4) werden mit 140 ml Wasser (5.2) und 10 ml Essigsäure (5.9) gemischt.

5.13 Wässrige Essigsäurelösung, Essigsäure + Wasser (1 + 99, $V + V$), $\varphi = 1\%$.

10 ml Essigsäure (5.9) werden mit 990 ml Wasser (5.2) gemischt und gut homogenisiert.

5.14 Elutionslösung, Methanol + Essigsäureethylester (75 + 25, $V + V$).

750 ml Methanol (5.4) werden mit 250 ml Essigsäureethylester (5.6) gemischt und gut homogenisiert.

5.15 Mobile HPLC-Phase A, 5 mmol/l Ammoniumacetatpuffer mit einem pH-Wert von ungefähr 8,0.

5 ml Ammoniumacetat-Lösung (5.11) und ungefähr 200 µl Ammoniumhydroxid 2,3 % (5.8) werden mit 900 ml Wasser (5.3) gemischt. Das Volumen wird mit Wasser (5.3) auf 1 l aufgefüllt und das Gemisch wird gut homogenisiert.

Der pH-Wert der mobilen Phase A wird überprüft. Der pH-Wert muss zwischen 7,95 und 8,05 liegen. Mit Ammoniumhydroxid 2,3 % (5.8) wird der pH-Wert auf diesen Bereich eingestellt.

5.16 Mobile HPLC-Phase B, Methanol (5.5).

5.17 Standards der *Alternaria*-Toxine, z. B. kristallin, als Film oder als Referenzmaterial.

5.17.1 Altenuen, Reinheit mindestens $w = 96 \%$.

5.17.2 Alternariol, Reinheit mindestens $w = 96 \%$.

5.17.3 Alternariolmonomethylether, Reinheit mindestens $w = 96 \%$.

5.17.4 Tentoxin, Reinheit mindestens $w = 96 \%$.

5.17.5 Tenuazonsäure, Reinheit mindestens $w = 96 \%$.

Labore können sich um eine höhere Reinheit bemühen, sofern diese auf dem Markt erhältlich ist.

5.18 Isotopenmarkierte interne Standards, z. B. kristallin oder als Standardlösung.

5.18.1 Isotopenmarkierter interner Standard von Altenuen (ALT-ISTD), z. B. ALT-(Methoxy- d_3 , Methyl- d_3) (ALT- d_6).

5.18.2 Isotopenmarkierter interner Standard von Alternariol (AOH-ISTD), z. B. AOH-(Methyl- d_3) (AOH- d_3).

5.18.3 Isotopenmarkierter interner Standard von Alternariolmonomethylether, (AME-ISTD), z. B. AME-(1-Methyl- d_3) (AME- d_3).

5.18.4 Isotopenmarkierter interner Standard von Tentoxin (TEN-ISTD), z. B. TEN- d_3 .

5.18.5 Isotopenmarkierter interner Standard von Tenuazonsäure (TEA-ISTD), z. B. TEA-(Acetyl- $^{13}C_2$) (TEA- $^{13}C_2$), Gemisch aus Diastereomeren in Methanol.

Labore können sich um isotopenmarkierte interne Standards mit höherem Deuterierungsgrad oder ^{13}C -Anreicherung bemühen.

WARNUNG — Zu jeder Zeit sollten Schutzkleidung, Handschuhe und Schutzbrillen getragen werden und alle Phasen der Standard- und Probenvorbereitung sollten unter einem Abzug ausgeführt werden.

5.19 Stammlösungen von ALT, AOH, AME, TEN und TEA, z. B. mit einer Massenkonzentration $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$.

Bei kristallinen Pulvern werden z. B. 5 mg ALT (5.17.1), AOH (5.17.2), AME (5.17.3), TEN (5.17.4) und TEA (5.17.5) auf 0,1 mg in einzelne 50-ml-Messkolben eingewogen und diese bis zur Marke mit Methanol (5.5) aufgefüllt. Das Gemisch wird kräftig homogenisiert.

Bei getrockneten Filmen wird der Standard im Fläschchen nach dem Zertifikat des einzelnen Standards rekonstituiert.

Die Stammlösungen sind für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq -18\text{ °C}$ gelagert werden.

ANMERKUNG Zur photometrischen Verifizierung der Konzentration gravimetrisch hergestellter Standards stehen molare Extinktionskoeffizienten in der Literatur für AOH [5], AME [5], ALT [6], TEN [7] und TEA [8] zur Verfügung.

5.20 Standardlösung 1.

Eine methanolhaltige Standardlösung, die ALT (5.17.1), AOH (5.17.2), AME (5.17.3) in einer Konzentration von 500 ng/ml, TEN (5.17.4) in einer Konzentration von 2 500 ng/ml und TEA (5.17.5) in einer Konzentration von 5 000 ng/ml enthält, wird hergestellt.

Hierzu werden z. B. 25 µl der Stammlösung von ALT, AOH und AME (5.19) in einen 5-ml-Messkolben überführt. In denselben 5-ml-Messkolben werden z. B. 125 µl der Stammlösung von TEN (5.19) und 250 µl der Stammlösung von TEA (5.19) überführt. Mit Methanol (5.5) wird bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird kräftig homogenisiert. Die Standardlösung 1 ist für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq -18\text{ °C}$ gelagert wird.

ANMERKUNG Die exakten zu verwendenden Volumen für die Herstellung der Standardlösung 1 (5.20) werden aus der exakten Konzentration der Stammlösungen (5.19) abgeleitet.

5.21 Standardlösung 2.

Eine methanolhaltige Standardlösung, die ALT (5.17.1), AOH (5.17.2), AME (5.17.3) in einer Konzentration von 100 ng/ml, TEN (5.17.4) in einer Konzentration von 500 ng/ml und TEA (5.17.5) in einer Konzentration von 1 000 ng/ml enthält, wird hergestellt. Die Standardlösung 2 wird durch Verdünnung der Standardlösung 1 (5.20) hergestellt.

1 000 µl der Standardlösung 1 (5.20) werden in einen 5-ml-Messkolben überführt. Mit Methanol (5.5) wird bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird kräftig homogenisiert. Die Standardlösung 2 ist für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq -18\text{ °C}$ gelagert wird.

5.22 Stammlösungen von ALT-ISTD, AOH-ISTD, AME-ISTD, TEN-ISTD und TEA-ISTD, z. B. mit einer Massenkonzentration $\rho = 750\text{ µg/ml}$.

Die Stammlösungen werden hergestellt, indem z. B. je 1,12 mg kristallines Pulver von ALT-ISTD (5.18.1), AOH-ISTD (5.18.2), AME-ISTD (5.18.3), TEN-ISTD (5.18.4) und TEA-ISTD (5.18.5) in einzelnen Fläschchen mit 1 500 µl Methanol (5.5) gelöst werden. Die Lösungen werden kräftig homogenisiert. Die Stammlösungen sind für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq -18\text{ °C}$ gelagert werden. TEA-ISTD ist gegebenenfalls bereits als methanolhaltige Lösung mit ungefähr derselben Konzentration erhältlich.

5.23 Interne Standardlösung 1.

Eine methanolhaltige Standardmischung wird hergestellt, die AOH-ISTD (5.18.2), AME-ISTD (5.18.3) und TEN-ISTD (5.18.4) in einer Konzentration von 5 µg/ml, ALT-ISTD (5.18.1) in einer Konzentration von 10 µg/ml und TEA-ISTD (5.18.5) in einer Konzentration von 25 µg/ml enthält.

Zu diesem Zweck werden z. B. 33 µl der Stammlösungen von AOH-ISTD, AME-ISTD und TEN-ISTD (5.22) in einen 5-ml-Messkolben überführt. Es werden z. B. 67 µl der Stammlösung von ALT-ISTD (5.22) und 167 µl der Stammlösung von TEA-ISTD (5.22) in denselben 5-ml-Messkolben überführt. Mit Methanol (5.5) wird bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird kräftig homogenisiert. Die interne Standardlösung 1 ist für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq -18\text{ °C}$ gelagert wird.

5.24 Interne Standardlösung 2.

Eine methanolhaltige Standardmischung wird hergestellt, die AOH-ISTD (5.18.2), AME-ISTD (5.18.3) und TEN-ISTD (5.18.4) in einer Konzentration von 500 ng/ml, ALT-ISTD (5.18.1) in einer Konzentration von

1 000 ng/ml und TEA-ISTD (5.18.5) in einer Konzentration von 2 500 ng/ml enthält. Die interne Standardlösung 2 wird durch Verdünnung der internen Standardlösung 1 (5.23) hergestellt.

1 000 µl der internen Standardlösung 1 (5.23) werden in einen 10-ml-Messkolben überführt. Mit Methanol (5.5) wird bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird kräftig homogenisiert. Die interne Standardlösung 2 ist für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq -18\text{ °C}$ gelagert wird.

5.25 Polysorbat 20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$) (Tween®20¹), analysenrein.

5.26 Polysorbat-20-Lösung ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ -Lösung), $\varphi = 2\%$ in Wasser.

2 ml Polysorbat 20 (5.25) werden mit der Pipette in einen 100-ml-Messkolben gegeben und bis zur Marke mit Wasser (5.2) aufgefüllt. Die Lösung wird gut homogenisiert. Diese Lösung kann drei Monate verwendet werden, sofern sie bei ungefähr 4 °C gelagert wird.

5.27 Kalibrierlösungen.

Verschiedene Volumen der Standardlösung (5.20 bzw. 5.21) und die interne Standardlösung 2 (5.24) werden in fünf HPLC-Fläschchen (6.18) gegeben, z. B. wie in Tabelle 1 aufgeführt. Die in Tabelle 1 festgelegten Volumen an Methanol (5.5) werden hinzugegeben und alles wird vorsichtig gemischt. 600 µl der mobilen HPLC-Phase A (5.15) werden hinzugegeben, das Fläschchen wird verschlossen und der Inhalt ungefähr 20 s gemischt (6.15).

Ein sechstes Fläschchen (Blindprobe) ohne Standardlösungen und ohne interne Standardlösung wird vorbereitet und als instrumentelle Blindprobe verwendet.

Tabelle 1 — Herstellung der Kalibrierlösungen

					ALT	AOH	AME	TEN	TEA
Kalibrier- lösung	Standard- lösung 1 (5.20)	Standard- lösung 2 (5.21)	Interne Standard- lösung 2 (5.24)	Methanol (5.5)	Entsprechende Konzentration				
	µl	µl	µl	µl	µg/kg				
1	—	10	50	340	1	1	1	5	10
2	—	50	50	300	5	5	5	25	50
3	—	100	50	250	10	10	10	50	100
4	50	—	50	300	25	25	25	125	250
5	200	—	50	150	100	100	100	500	1 000
Blind- probe	—	—	—	400	—	—	—	—	—

¹ Tween®20 ist der Handelsname eines nichtionischen Detergens vom Typ Polysorbat 20, das von verschiedenen Lieferanten bezogen werden kann. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

6 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborglasgeräte und -ausrüstung und insbesondere Folgendes.

6.1 pH-Messgerät.

6.2 Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (PP), (50 ml) mit Messskala.

6.3 Laborwaage, Fehlergrenze: 0,01 g.

6.4 Analysenwaage, Fehlergrenze: 0,01 mg.

6.5 Einstellbarer mechanischer Vertikal- oder Horizontalschüttler.

6.6 Hochgeschwindigkeitsrührer (z. B. Ultra-turrax^{®2}).

6.7 Zentrifuge, mit Temperaturregelung und in der Lage, eine relative Zentrifugalkraft von ungefähr 3 200 g zu erzeugen.

6.8 Vollpipetten mit Graduierung, Nennvolumen von 10 ml.

6.9 Kolbenhubpipetten, z. B. Nennvolumen von 10 µl, 20 µl, 100 µl, 250 µl und 1 000 µl, mit entsprechenden Spitzen.

6.10 SPE-Säule, mit einem hydrophil modifizierten Styrolpolymer, mit einem Reservoirvolumen von 6 ml, 200 mg Adsorbensmasse und einer Korngröße von 100 µm oder kleiner.

ANMERKUNG Es hat sich erwiesen, dass Phenomenex Strata-XL² mit einem Reservoirvolumen von 6 ml, 200 mg Adsorbensmasse und einer Korngröße von 100 µm diese Spezifikationen erfüllen.

6.11 Reservoirs aus Polypropylen (ungefähr 25 ml), passend zu den SPE-Säulen (6.10).

6.12 Spritzenfilter aus Polytetrafluorethylen (PTFE), mit einer Porengröße von 0,2 µm und einem Durchmesser von z. B. 13 mm oder 15 mm.

6.13 Spritze mit Kanüle, 1 ml.

6.14 Vakuumverteiler, für die Aufreinigung von SPE, mit Hähnen.

6.15 Mixer, mit hoher Scherrate.

6.16 Probenverdichter, mit Temperaturregelung und Gasversorgung.

6.17 Aufnahmeröhrchen aus Glas, für die Eluierung und Verdampfung der Probe.

6.18 HPLC-Fläschchen aus silanisiertem Glas, Nennvolumen von etwa 1,5 ml und Bördekappen oder gleichwertig.

6.19 Bechergläser, Nennvolumen von 250 ml.

² Ultra-turrax und Strata-XL sind Beispiele für im Handel erhältliche geeignete Produkte. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

6.20 Messkolben, Nennvolumen von 5 ml, 10 ml, 50 ml, 100 ml und 1 l.

6.21 HPLC-MS/MS-System, mit den folgenden Komponenten:

6.21.1 HPLC-Pumpe, geeignet für die Aufrechterhaltung eines binären Gradienten bei Fließgeschwindigkeiten geeignet für die verwendete analytische Säule und mit ausreichender Genauigkeit.

6.21.2 Degaser, optional, zum Entgasen der mobilen HPLC-Phasen.

6.21.3 Injektionssystem, geeignet für die Injektion eines geeigneten Volumens an Probelösung mit ausreichender Genauigkeit.

6.21.4 HPLC-Umkehrphasensäule.

Eine geeignete Säule und angemessene HPLC-Bedingungen, die eine ausreichende Retentionskapazität des ersten eluierenden Analyten sicherstellen. Annehmbare Chromatogramme, wie in Anhang A dargestellt, können erreicht werden, indem eine Säule mit einem Kapazitätsfaktor von mindestens 3 ($k' \geq 3,0$) und für jeden der Analyten eine Mindestanzahl von 2 000 Böden ($N \geq 2\,000$) verwendet werden.

Beispiele geeigneter Säulen und Analysebedingungen sind in Anhang A und Anhang B angegeben.

6.21.5 Vorsäule, empfohlen, mit dem gleichen Material für die stationäre Phase wie die analytische Säule (6.21.4).

6.21.6 Säulenofen, geeignet zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur.

6.21.7 Drei-Phasen-Massenspektrometer.

Triple-Quadrupol-Geräte oder Geräte mit Ionenfalle oder linearer Quadrupol-Ionenfalle, ausgestattet mit einer Elektrosprayionisations-(ESI-)Schnittstelle und betrieben im Modus MRM (en: multiple reaction monitoring). Es kann gegebenenfalls jeder Ionisationsmodus (in der Regel negativ oder positiv) verwendet werden, mit dem eine ausreichende Ausbeute erreicht wird.

6.21.8 Computergestütztes System zur Gerätesteuerung und Datenauswertung.

7 Durchführung

7.1 Allgemeines

Sofern nicht anders festgelegt, müssen alle Reagenzien, Proben und Geräte, die in 7.2 bis 7.5 verwendet werden, Raumtemperatur haben, bevor irgendeine Handhabung stattfindet.

7.2 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Feste Laborproben müssen fein gemahlen und homogenisiert werden. Es muss darauf geachtet werden, die Probe während des Prozesses nicht zu überhitzen. Bei fetthaltigen Proben ist unter Umständen Kryovermahlen erforderlich.

Halbfeste Proben müssen gründlich homogenisiert werden, indem sie ungefähr 10 min kräftig geschüttelt werden.

ANMERKUNG Wenn Aufschlämmungen verwendet werden, ist es wichtig, die vorgeschriebene Extraktionsmischung zu erreichen. Ein zu niedriger Gehalt an organischem Lösemittel kann die Extraktionsfähigkeit derjenigen *Alternaria*-Toxine, die eine geringere Wasserlöslichkeit aufweisen, einschränken.