

DIN EN 17641



ICS 67.050

**Lebensmittel –
Multiverfahren für die Bestimmung von Aflatoxinen, Deoxynivalenol,
Fumonisin, Ochratoxin A, T-2-Toxin, HT-2-Toxin und Zearalenon mittels
LC-MS/MS;
Deutsche Fassung EN 17641:2022**

Foodstuffs –

Multimethod for the determination of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins, ochratoxin A,
T-2 toxin, HT-2 toxin and zearalenone by LC-MS/MS;

German version EN 17641:2022

Produits alimentaires –

Multiméthode de détermination de la teneur en aflatoxines, déoxynivalénol, fumonisines,
ochratoxine A, toxine T-2, toxine HT-2 et zéaralénone par CL-SM/SM;

Version allemande EN 17641:2022

Gesamtumfang 49 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17641:2022) 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).

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

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

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696*

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

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

Deutsche Fassung

Lebensmittel —
Multiverfahren für die Bestimmung von Aflatoxinen,
Deoxynivalenol, Fumonisin, Ochratoxin A, T-2-Toxin,
HT-2-Toxin und Zearalenon mittels LC-MS/MS

Foodstuffs —

Multimethod for the determination of aflatoxins,
deoxynivalenol, fumonisins, ochratoxin A, T-2 toxin,
HT-2 toxin and zearalenone by LC-MS/MS

Produits alimentaires —

Multiméthode de détermination de la teneur en
aflatoxines, déoxynivalénol, fumonisines, ochratoxine A,
toxine T-2, toxine HT-2 et zéaralénone par CL-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 24. Juli 2022 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien	7
6 Geräte und Ausrüstung	13
7 Durchführung	15
7.1 Vorbereitung der Laborprobe	15
7.2 Wiegen der Probeneinwaage	15
7.2.1 Getreide, Produkte auf Getreidebasis	15
7.2.2 Milchpulver, Nüsse, Gewürze, Trockenfrüchte	15
7.3 Aufstockung mit ISTD-Lösungen	15
7.4 Extraktion	16
7.4.1 Allgemeine Durchführung	16
7.4.2 Ohne IAC-Reinigung	17
7.4.3 Mit IAC-Reinigung	17
8 LC-MS/MS-Analyse	18
8.1 Betriebsbedingungen	18
8.2 Injektionsreihenfolge	18
8.3 Datenbearbeitung	19
9 Berechnungen	19
9.1 Identifizierung und Bestätigung	19
9.2 Kalibrierkurve und Messbereich	19
9.3 Berechnungen	20
10 Präzision	20
10.1 Allgemeines	20
10.2 Wiederholpräzision	21
10.3 Vergleichpräzision	21
11 Prüfbericht	25
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	26
Anhang B (informativ) Überblick über die Probenvorbereitung	36
Anhang C (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	37
C.1 Allgemeines	37
C.2 Beispiele für LC-Systemeinstellungen	37
C.2.1 LC-Bedingungen 1	37
C.2.2 LC-Bedingungen 2	38
C.2.3 LC-Bedingungen 3	39
C.2.4 LC-Bedingungen 4	39
C.2.5 LC-Bedingungen 5	40

C.3 Beispiele für MS-Systemeinstellungen 41

C.3.1 MS-Bedingungen 1 41

C.3.2 MS-Bedingungen 2 43

C.3.3 MS-Bedingungen 3 45

Literaturhinweise.....47

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17641:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis März 2023, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 2023 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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

Mykotoxine sind Metabolite von Schimmelpilzen, die in verschiedenen Lebensmitteln vorkommen können, wie z. B. Getreide, Nüsse, Gewürze, Früchte, Ölsaaten oder Kaffee. Mykotoxine können vor der Ernte in der Pflanze und sogar nach der Ernte gebildet werden, wenn die klimatischen Bedingungen für ein weiteres Pilzwachstum günstig sind. Milch kann auch mit Aflatoxin M₁, dem Hauptmetaboliten von Aflatoxin B₁ kontaminiert sein, wenn Kühe mit Aflatoxin-B₁-kontaminiertem Futtermittel gefüttert werden. Zum Schutz der Gesundheit der Verbraucher wurden Höchstkonzentrationen für Mykotoxine in Lebensmitteln festgelegt, die in einer breiten Palette von Lebensmittelgruppen enthalten sind, darunter auch solche, die für den Verzehr durch Säuglinge und Kleinkinder bestimmt sind.

WARNUNG 1 — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die aktuelle Version der Gefahrendruckverordnung, Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 [1], 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 — Es ist bekannt, dass Aflatoxine karzinogene Wirkungen haben und sowohl akut als auch chronisch toxisch sind. Die Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ und M₁ werden von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC, en.: International Agency for Cancer Research) als für Menschen krebserregend eingestuft (Gruppe 1). Fumonisin B₁, Fumonisin B₂ und Ochratoxin A wurden als für Menschen möglicherweise krebserregend (Gruppe 2B) und Zearalenon, Deoxynivalenol und T-2 als nicht klassifizierbar hinsichtlich ihrer Karzinogenität für den Menschen (Gruppe 3) eingestuft [2].

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren, das isotoopenmarkierte Standards verwendet für die quantitative Bestimmung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ und M₁ (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ und AFM₁), Ochratoxin A (OTA), Deoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZEN), T-2 und HT-2-Toxine (T-2 und HT-2) und Fumonisine B₁ und B₂ (FB₁ und FB₂) in Lebensmitteln durch Flüssigchromatographie (LC, en.: liquid chromatography), gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).

Für Aflatoxine (AF) und OTA in für Säuglinge und Kleinkinder bestimmter Nahrung (z. B. Zerealien für Kleinkinder, Pulver auf Milchbasis), in Gewürzen, in Trockenfrüchten und in Nüssen ist eine spezifische Immunaффinitätssäulen (IAC, en.: immunoaffinity column)-Reinigung erforderlich.

Das Verfahren wurde durch eine Ringversuchstudie zu verschiedenen Lebensmittelgruppen validiert: Getreide und Produkte auf Getreidebasis einschließlich Nahrung für Säuglinge und Kleinkinder, Nüsse, Gewürze, Trockenfrüchte und Milchpulver. Die Messbereiche der einzelnen Mykotoxine in diesen natürlich kontaminierten und/oder aufgestockten Lebensmittelproben waren:

— AFB ₁ :	0,085 7 µg/kg – 11,4 µg/kg;
— AFB ₂ :	0,079 2 µg/kg – 12,5 µg/kg;
— AFG ₁ :	0,062 8 µg/kg – 20,9 µg/kg;
— AFG ₂ :	0,052 0 µg/kg – 15,0 µg/kg;
— AFM ₁ :	0,034 2 µg/kg – 0,110 µg/kg;
— OTA:	0,448 µg/kg – 17,2 µg/kg;
— DON:	45,2 µg/kg – 743 µg/kg;
— ZEN:	9,57 µg/kg – 131 µg/kg;
— T-2:	10,3 µg/kg – 57,9 µg/kg;
— HT-2:	9,50 µg/kg – 81,8 µg/kg;
— FB ₁ :	31,1 µg/kg – 4 260 µg/kg;
— FB ₂ :	44,2 µg/kg – 1 300 µg/kg.

Die Messbereiche der Verfahren für jede Mykotoxin-/Matrix-Kombination sind in Tabelle 8 angegeben.

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

4 Kurzbeschreibung

Die Mykotoxine werden mit Wasser und angesäuertem Acetonitril aus der Probeneinwaage extrahiert und nach Zugabe von Magnesiumsulfat- und Natriumchloridsalzen wird eine Flüssig-Flüssig-Verteilung eingeleitet. Der entstehende Acetonitril-Überstand wird dann mit Hexan entfettet. Abhängig von der Mykotoxin-/Matrix-Kombination wird der Probenextrakt dann zwei verschiedenen Protokollen unterzogen (ein allgemeines Schema ist in Anhang B angegeben):

- *ohne IAC-Reinigung*: allgemeines Verfahren zur Bestimmung aller Mykotoxine in Getreide und Produkten auf Getreidebasis. Ein Aliquot des Acetonitril-Überstandes wird zur Trockne verdampft, dann in einer Methanol-Wasserlösung rekonstituiert und anschließend mittels LC-MS/MS analysiert;
- *mit IAC-Reinigung*: spezifisches Verfahren zur Bestimmung von AFs und OTA in für Säuglinge und Kleinkinder bestimmter Nahrung (z. B. Zerealien für Kleinkinder, Milchpulver) zum Zweck der Empfindlichkeit und in Gewürzen, Nüssen und Trockenfrüchten zur Vermeidung von Matrixeffekten im Massenspektrometer. Ein Aliquot des Acetonitril-Überstandes wird zunächst in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) verdünnt und die resultierende Mischung wird dann auf eine IAC aufgetragen, die für AF und OTA spezifische Antikörper enthält. Die IAC wird mit Wasser gewaschen und die Mykotoxine werden mit Methanol eluiert. Das Eluat wird zur Trockne verdampft, in einer Methanol-Wasserlösung rekonstituiert und anschließend mittels LC-MS/MS analysiert.

Die Quantifizierung erfolgt durch Isotopenverdünnungsanalyse unter Verwendung von ¹³C-isotopenmarkierten Mykotoxinen als interne Standards (ISTD).

5 Reagenzien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Lösemittel müssen, wenn nicht anders festgelegt, von LC-MS-Reinheitsgrad für die LC-MS-Analyse sein. Handelsübliche Lösungen mit gleichwertigen Eigenschaften wie die aufgeführten dürfen verwendet werden.

WARNUNG 4 — Verfahren zur Dekontamination von AF-haltigen Laborabfällen sind von der IARC entwickelt worden, siehe [3], [4].

5.1 Stickstoff-Druckgas, Reinheit von 99,99 % oder höher.

5.2 Wasser, HPLC-Reinheitsgrad.

5.3 Wasser, LC-MS-Reinheitsgrad.

5.4 Methanol (MeOH), Analysenrein.

5.5 Methanol (MeOH), LC-MS-Reinheit.

5.6 Acetonitril (MeCN), Analysenrein.

5.7 Ameisensäure, Analysenrein.

5.8 Ammoniumformiat, LC-MS-Reinheit.

5.9 Essigsäure, Analysenrein.

5.10 n-Hexan, Analysenrein.

5.11 Magnesiumsulfat (MgSO_4) wasserfrei, Analysenrein.

5.12 Natriumchlorid (NaCl), Analysenrein.

5.13 Trennsalzgemisch, MgSO_4 - NaCl (4 + 1, $m + m$).

4,0 g $\pm$ 0,01 g MgSO_4 (5.11) und 1,00 g $\pm$ 0,01 g NaCl (5.12) werden in ein 15-ml-Polypropylenröhrchen eingewogen.

Alternativ darf eine gebrauchsfertige Trennsalzgemisch aus kommerziellen Quellen geliefert werden.

5.14 Kaliumchlorid (KCl), Analysenrein.

5.15 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Analysenrein.

5.16 Dinatriumhydrogenorthophosphat (Na_2HPO_4), Analysenrein.

5.17 Natriumhydroxid (NaOH), Analysenrein.

5.18 Natriumhydroxid-Lösung (NaOH), Stoffmengenkonzentration $c = 0,1 \text{ mol/l}$.

0,4 g Natriumhydroxid (5.17) werden in 100 ml Wasser (5.2) gelöst.

5.19 Salzsäurelösung (HCl), Analysenrein, $w(\text{HCl}) = 37 \%$.

5.20 Verdünnte Salzsäure-Lösung, (HCl) $c = 0,1 \text{ mol/l}$.

8,4 ml Salzsäure-Lösung (5.19) werden in einen 1-l-Messkolben gegeben und der Kolben wird bis zur Markierung mit Wasser (5.2) aufgefüllt.

5.21 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), $\text{pH } 7,3 \pm 0,2$.

0,20 g KCl (5.14), 0,20 g KH_2PO_4 (5.15), 1,15 g Na_2HPO_4 (5.16) und 8,00 g NaCl (5.12) werden auf 0,01 g (en.: to the nearest) gewogen und in einen 1-l-Messkolben gefüllt. Die Bestandteile werden mit etwa 900 ml Wasser (5.2) gelöst.

Nach der Auflösung wird der pH-Wert auf $\text{pH } 7,3 \pm 0,2$ mit HCl -Lösung (5.20) oder NaOH -Lösung (5.18) eingestellt und bis zur Marke mit Wasser (5.2) aufgefüllt.

Alternativ darf eine PBS-Lösung mit gleichen Eigenschaften aus handelsüblichem PBS-Material hergestellt werden.

5.22 Extraktionslösung, Essigsäure (87 mmol/l) in Acetonitril.

500 ml Acetonitril (5.6) und 5 ml Eisessig (5.9) werden in einem 1-l-Messkolben gemischt. Es wird mit Acetonitril (5.6) bis zur Marke aufgefüllt und gut gemischt. Diese Lösung kann bei Lagerung bei Raumtemperatur 3 Monate verwendet werden.

5.23 Verdünnungslösung, Methanol-Wasser (15 + 85, $V + V$).

15 ml Methanol (5.4) werden mit 85 ml Wasser (5.2) in einem 100-ml-Messkolben gemischt. Diese Lösung kann bei Lagerung bei Raumtemperatur 3 Monate verwendet werden.

5.24 Mykotoxine analytischer Standard z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.

5.24.1 AFB1.

5.24.2 AFB2.

5.24.3 AFG1.

5.24.4 AFG2.

5.24.5 AFM1.

5.24.6 OTA.

5.24.7 DON.

5.24.8 ZEN.

5.24.9 T-2.

5.24.10 HT-2.

5.24.11 FB1.

5.24.12 FB2.

5.25 Mykotoxin-Standard-Stammlösungen.

Die einzelnen Standard-Stammlösungen werden entweder durch Auflösen von reiner Substanz in einem geeigneten Lösemittel oder aus getrockneten Filmen hergestellt und anschließend rekonstituiert entsprechend den Vorgaben im Zertifikat jeder einzelnen Standardsubstanz oder als gebrauchsfertige Lösungen (5.24) gekauft.

Die in diesem Dokument behandelten Mykotoxine lösen sich gut in Acetonitril, mit Ausnahme der Fumonisine, für die Acetonitril/Wasserlösung (50 + 50, $V + V$) für die Herstellung empfohlen wird.

5.26 Mykotoxin-Standardarbeitslösungen.

Die Standardarbeitslösungen werden wie nachstehend beschrieben durch Kombinieren der entsprechenden Volumina der einzelnen Standard-Stammlösungen (5.25) unter Verwendung der entsprechenden

Pipetten (6.1) und der genannten Lösemittel hergestellt. Diese Lösungen werden zur Erstellung der Kalibrierkurve (5.29) und zur Vorbereitung von positiven Kontrollproben (7.6)^{N1} verwendet.

5.26.1 AFS-Standardarbeitslösung 1, AFB1, AFB2, AFG1 und AFG2, jeweils in der Massenkonzentration $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.26.2 AFS-Standardarbeitslösung 2, AFB1, AFB2, AFG1 und AFG2, jeweils mit $\rho = 0,01 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.26.3 AFM1-Standardarbeitslösung 1, $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.26.4 AFM1-Standardarbeitslösung 2, $\rho = 0,01 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.26.5 [DON, T-2, HT-2, ZEN]-Standardarbeitslösung, in Acetonitril in den in Tabelle 1 angegebenen Massenkonzentrationen.

Tabelle 1 — [DON, T-2, HT-2, ZEN]-Standardarbeitslösung

Verbindung	Massenkonzentration $\mu\text{g/ml}$
DON	5,0
T-2	2,5
HT-2	2,5
ZEN	2,0

5.26.6 Fumonisine (FBs)-Standardarbeitslösung, FB1 und FB2, jeweils mit $\rho = 5,0 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril-Wasserlösung (50 + 50, V + V).

5.26.7 OTA-Standardarbeitslösung, $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Methanol-Wasserlösung (15 + 85, V + V).

5.27 ¹³C-isotopenmarkierte Mykotoxin-Analysestandards als zertifizierte Standardlösung.

5.27.1 ¹³C-isotopenmarkiertes AFB1 (¹³C-AFB1), z. B. (¹³C₁₇)-AFB1, $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.2 ¹³C-isotopenmarkiertes AFB2 (¹³C-AFB2), z. B. (¹³C₁₇)-AFB2, $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.3 ¹³C-isotopenmarkiertes AFG1 (¹³C-AFG1), z. B. (¹³C₁₇)-AFG1, $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.4 ¹³C-isotopenmarkiertes AFG2 (¹³C-AFG2), z. B. (¹³C₁₇)-AFG2, $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.5 ¹³C-isotopenmarkiertes AFM1 (¹³C-AFM1), z. B. (¹³C₁₇)-AFM1, $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.6 ¹³C-isotopenmarkiertes OTA (¹³C-OTA), z. B. (¹³C₂₀)-OTA, $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

^{N1} Nationale Fußnote: In der englischen Referenzfassung wird auf 7.6 verwiesen. Dieser war bei der Entwurfsumfrage noch vorhanden. Der Textteil wurde in 8.2 verschoben, wo er als Absatz 5 wiederzufinden ist. 7.6 entfiel damit.

5.27.7 ^{13}C -isotopenmarkiertes DON (^{13}C -DON), z. B. ($^{13}\text{C}_{15}$)-DON, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.8 ^{13}C -isotopenmarkiertes ZEN (^{13}C -ZEN), z. B. ($^{13}\text{C}_{18}$)-ZEN, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.9 ^{13}C -isotopenmarkiertes T-2 (^{13}C -T2), z. B. ($^{13}\text{C}_{24}$)-T-2, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.10 ^{13}C -isotopenmarkiertes HT-2 (^{13}C -HT-2), z. B. ($^{13}\text{C}_{22}$)-HT-2, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.11 ^{13}C -isotopenmarkiertes FB1 (^{13}C -FB1), z. B. ($^{13}\text{C}_{34}$)-FB1, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril-Wasserlösung (50 + 50, V + V).

5.27.12 ^{13}C -isotopenmarkiertes FB2 (^{13}C -FB2), z. B. ($^{13}\text{C}_{34}$)-FB2, $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril-Wasserlösung (50 + 50, V + V).

5.28 ISTD-Standardarbeitslösungen.

Die ISTD-Lösungen werden wie nachstehend beschrieben hergestellt, indem die entsprechenden Volumina der einzelnen isotopenmarkierten Mykotoxinlösungen (5.27) unter Verwendung der entsprechenden Pipetten (6.1) und des genannten Lösemittels kombiniert werden. Diese Lösungen werden verwendet, um die Kalibrierkurve (5.29) zu erstellen und um jede Probeneinwaage vor der Extraktion aufzustocken (7.3).

5.28.1 ^{13}C -AFs-Lösung, ^{13}C -AFB1, ^{13}C -AFB2, ^{13}C -AFG1, ^{13}C -AFG2, jeweils mit $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.28.2 ^{13}C -AFM1-Lösung, $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.28.3 ^{13}C -[DON, T-2, HT-2, ZEN]-Lösung, in Acetonitril in den in Tabelle 2 angegebenen Konzentrationen.

Tabelle 2 — ^{13}C -[DON, T-2, HT-2, ZEN]-ISTD-Lösung

Verbindung	Massenkonzentration $\mu\text{g/ml}$
^{13}C -DON	5,0
^{13}C -T-2	2,5
^{13}C -HT-2	2,5
^{13}C -ZEN	2,0

5.28.4 ^{13}C -FBs-Lösung, ^{13}C -FB1 und ^{13}C -FB2, jeweils mit $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril-Wasserlösung (50 + 50, V + V).

5.28.5 ^{13}C -OTA-Lösung, $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Methanol-Wasserlösung (15 + 85, V + V).

5.29 Standardlösungen für externe Kalibrierkurve.

Die Standardlösungen für die Kalibrierung werden in neun separaten 15-ml-Polypropylenröhrchen hergestellt, z. B. wie in Tabelle 3 beschrieben. Die Standardlösungen werden unter einem Stickstoffstrom bei 40 °C bis zur Trockne verdampft und dann weiter für die Kalibrierung vorbereitet, wie z. B. in Tabelle 4 angegeben.

Die Kalibrierlösungen Kal 0 bis Kal 8 werden für etwa 1 min im Ultraschall behandelt. Diese Lösungen werden in Glasfläschchen überführt und bei etwa –20 °C lichtgeschützt bis zu 3 Monate gelagert.

Die Massenkonzentration jedes Mykotoxins in jeder Kalibrierlösung ist in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 3 — Beispiel für ein Pipettierschema für die Vorbereitung der Kalibrierlösungen vor dem Verdampfungsschritt

Mykotoxin	Kal 0 µl	Kal 1 µl	Kal 2 µl	Kal 3 µl	Kal 4 µl	Kal 5 µl	Kal 6 µl	Kal 7 ^a µl	Kal 8 ^a µl
AFs (5.26.1)	0	—	—	—	20	40	160	320	640
AFs (5.26.2)	—	5	20	40	—	—	—	—	—
AFM1 (5.26.3)	0	—	—	—	20	40	160	320	640
AFM1 (5.26.4)	—	5	20	40	—	—	—	—	—
[DON, T-2, HT-2, ZEN] (5.26.5)	0	5	10	20	40	80	160	320	640
FBs (5.26.6)	0	5	10	20	40	80	160	320	640
¹³ C-AFs (5.28.1)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
¹³ C-AFM1 (5.28.2)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
¹³ C-[DON, T-2, HT-2, ZEN] (5.28.3)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
¹³ C-FBs (5.28.4)	20	20	20	20	20	20	20	20	20

^a Zur Quantifizierung stark kontaminierter Proben kann der Kalibrierbereich erweitert werden (9.2). Typischerweise können Kal 7 und Kal 8 wie in Tabelle 3 beschrieben vorbereitet werden, um den Bereich um den Faktor 2 (Kal 7) und um den Faktor 4 (Kal 8) zu erweitern.

ANMERKUNG Die Robustheit des Verfahrens wird nicht beeinträchtigt, solange die gleichen ISTD-Lösungen sowohl für die Herstellung der Kalibrierstandardlösungen als auch für die Aufstockung der Probeneinwaage verwendet werden (7.3).

Tabelle 4 — Beispiel für ein Pipettierschema für die Herstellung der Kalibrierlösungen nach dem Verdampfungsschritt

Verbindung	Kal 0 µl	Kal 1 µl	Kal 2 µl	Kal 3 µl	Kal 4 µl	Kal 5 µl	Kal 6 µl	Kal 7 ^a µl	Kal 8 ^a µl
OTA (5.26.7)	0	2,5	5	10	20	40	160	320	640
¹³ C-OTA (5.28.5)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
MeOH-H ₂ O (15 + 85, V + V) (5.23)	1 980	1 978	1 975	1 970	1 960	1 940	1 820	1 660	1 340

^a Zur Quantifizierung stark kontaminierter Proben kann der Kalibrierbereich erweitert werden (9.2). Typischerweise können Kal 7 und Kal 8 wie in Tabelle 3 beschrieben vorbereitet werden, um den Bereich um den Faktor 2 (Kal 7) und um den Faktor 4 (Kal 8) zu erweitern.

Verbindung	Kal 0	Kal 1	Kal 2	Kal 3	Kal 4	Kal 5	Kal 6	Kal 7 ^a	Kal 8 ^a
	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl

ANMERKUNG 1 Die Robustheit des Verfahrens wird nicht beeinträchtigt, solange die gleichen ISTD-Lösungen sowohl für die Herstellung der Kalibrierstandardlösungen als auch für die Aufstockung der Probeneinwaage verwendet werden (7.3).

ANMERKUNG 2 OTA-Lösungen werden nach dem Verdampfungsschritt hinzugefügt, um unvorhersehbare OTA-Verluste bei der Verdampfung zu vermeiden.

Tabelle 5 — Beispiel für Massenkonzentrationen von Mykotoxinen und ISTD in Kalibrierlösungen

Mykotoxin	Kal 0	Kal 1	Kal 2	Kal 3	Kal 4	Kal 5	Kal 6	Kal 7	Kal 8
	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
AF	0	0,025	0,1	0,2	1	2	8	16	32
AFM1	0	0,025	0,1	0,2	1	2	8	16	32
DON	0	12,5	25	50	100	200	400	800	1 600
T-2 und HT-2	0	6,25	12,5	25	50	100	200	400	800
ZEN	0	5	10	20	40	80	160	320	640
FBs	0	12,5	25	50	100	200	400	800	1 600
OTA	0	0,125	0,25	0,5	1	2	8	16	32
¹³ C-AFs	1	1	1	1	1	1	1	1	1
¹³ C-AFM1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
¹³ C-DON	50	50	50	50	50	50	50	50	50
¹³ C-T-2 und ¹³ C-HT-2	25	25	25	25	25	25	25	25	25
¹³ C-ZEN	20	20	20	20	20	20	20	20	20
¹³ C-FBs	100	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-OTA	1	1	1	1	1	1	1	1	1

6 Geräte und Ausrüstung

Glasgeräte und Ausrüstung (Messzylinder, Glastrichter, Bechergläser, Pipetten usw.) und insbesondere die Folgenden:

- 6.1 Pipetten**, geeignet für organische Lösemittel im Bereich von 1 µl bis 1 ml.
- 6.2 Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss**, 50 ml mit Kappe.
- 6.3 Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss**, 15 ml mit Kappe.
- 6.4 Mikrozentrifugenröhrchen aus Polypropylen**, 1,5 ml.
- 6.5 HPLC-Glasfläschchen**, 1,5 ml mit Schraubverschluss.