

DIN EN 16877

ICS 65.120; 71.040.50

Einsprüche bis 2015-08-05

Entwurf

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von T-2- und HT-2-Toxinen, Deoxynivalenol und Zearalenon
in Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln mittels LC-MS;
Deutsche und Englische Fassung prEN 16877:2015**

Animal feeding stuffs –
Methods of sampling and analysis –
Determination of T-2 and HT-2 toxins, Deoxynivalenol and Zearalenone, in feed materials
and compound feed by LC-MS;
German and English version prEN 16877:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-06-05 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses
Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 62 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16877:2015) wurde von der Arbeitsgruppe 5 „Natürliche Toxine“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) des Technischen Komitees CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird, unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“, (Spiegelausschuss zu CEN/TC 327) im DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 16877:2015 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 5725-5	siehe	DIN ISO 5725-5

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die 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*

Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Bestimmung von T-2- und HT-2-Toxinen, Deoxynivalenol und Zearalenon in Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln mittels LC-MS

Élément introductif — Élément central — Élément complémentaire

Animal feeding stuffs — Methods of sampling and analysis — Determination of T-2 and HT-2 toxins, Deoxynivalenol and Zearalenone, in feed materials and compound feed by LC-MS

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien	4
5 Geräte	7
6 Durchführung	8
6.1 Probenvorbereitung	8
6.2 Extraktion	9
6.3 Probenmesslösung	10
6.4 Aufstockverfahren	10
7 Messungen	10
7.1 Allgemeines	10
7.2 LC-Bedingungen	10
7.3 MS-Bedingungen	10
7.4 Chargenabfolge	11
7.5 Identifizierung des Peaks	11
7.6 Bestimmung von DON, HT2, T2 und ZON in Kalibrier- oder/und Probenmesslösungen	11
7.7 Kalibrierung	11
8 Bestimmung des Massenanteils	12
9 Präzision	13
9.1 Ringversuch	13
9.2 Wiederholpräzision	13
9.2.1 HT-2-Toxin	13
9.2.2 T-2-Toxin	13
9.2.3 DON	13
9.2.4 ZON	13
9.3 Vergleichpräzision	14
9.3.1 HT-2-Toxin	14
9.3.2 T-2-Toxin	14
9.3.3 DON	14
9.3.4 ZON	14
10 Untersuchungsbericht	14
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	15
Anhang B (informativ) Beispiele	20
B.1 Beispiel 1	20
B.2 Beispiel 2	21
B.3 Beispiel 3	23
Anhang C (informativ) Beispiel-Chromatogramme	25
Literaturhinweise	30

Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16877:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

1 Anwendungsbereich

Dieses Analysenverfahren ist für die Bestimmung von HT-2-Toxin (HT2) im geprüften Bereich von 22 µg/kg bis 178 µg/kg, von T-2-Toxin (T2) im geprüften Bereich von 7 µg/kg bis 50 µg/kg, von Deoxynivalenol (DON) im geprüften Bereich von 88 µg/kg bis 559 µg/kg und von Zearalenon (ZON) im geprüften Bereich von 14 µg/kg bis 430 µg/kg in Getreide und in Mischfuttermitteln auf Getreidebasis anwendbar. Die tatsächlichen Arbeitsbereiche dürfen über die geprüften Bereiche hinausgehen. Es liegt in der Verantwortung des Laboratoriums nachzuweisen, dass die Bestimmungsgrenze (LOQ, en: limit of quantitation) für die HT-2- und T-2-Toxine ≤ 10 µg/kg, für DON ≤ 100 µg/kg und für ZON ≤ 20 µg/kg ist.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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 Kurzbeschreibung

Zwei Gramm des fein gemahlenden und homogenen Untersuchungsmaterials werden in Wasser suspendiert. Nach der Zugabe von 16,0 ml Ethylacetat wird die Probe 30 min umgerührt. Anschließend wird zur Unterstützung der Phasentrennung Natriumsulfat hinzugefügt und nach 10 min bis 20 min wird die Probe zentrifugiert, um Feststoffteilchen am Boden des Extraktionsröhrchens zu pelletieren. Für eine mögliche Lagerung wird die organische Phase in ein sauberes Probenfläschchen überführt. 500 µl der organischen Phase, ein Äquivalent von einem Sechzehntel eines Gramms des Untersuchungsmaterials, werden mit stabilen isotonenmarkierten Analoga des Analyten gemischt und in deaktivierten Probenfläschchen aus Glas bis zur Trockne eingedampft. Nach der Rekonstitution des Trockenextraktes mit 250 µl des Modifizierungsmittels der organischen mobilen Phase, der Zugabe von 250 µl Wasser und dem gründlichen Durchmischen der Lösung werden die Analyten quantitativ mit einem System der Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) bestimmt.

4 Reagenzien

4.1 Wasser (deionisiert)

4.2 Wasser (LC-MS-Reinheit, zweifach destilliertes Wasser oder Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696)

4.3 Methanol (LC-MS-Reinheit)

WARNUNG — Methanol ist gefährlich und die Handhabung muss in einem Laborabzug erfolgen. Eine geeignete Schutzausrüstung (Laborkittel, Schutzbrille, Handschuhe) muss getragen werden.

4.4 Methanol (zur Analyse (p.a.))

WARNUNG — Methanol ist gefährlich und die Handhabung muss in einem Laborabzug erfolgen. Eine geeignete Schutzausrüstung (Laborkittel, Schutzbrille, Handschuhe) muss getragen werden.

4.5 Ethylacetat (zur Analyse (p.a.))

WARNUNG — Ethylacetat ist gefährlich und die Handhabung muss in einem Laborabzug erfolgen. Eine geeignete Schutzausrüstung (Laborkittel, Schutzbrille, Handschuhe) muss getragen werden.

4.6 Ameisensäure (98%ig bis 100%ig, LC-MS-Reinheit)

WARNUNG — Ameisensäure ist gefährlich und die Handhabung muss in einem Laborabzug erfolgen. Eine geeignete Schutzausrüstung (Laborkittel, Schutzbrille, Handschuhe) muss getragen werden.

4.7 Acetonitril (LC-MS-Reinheit)

WARNUNG — Acetonitril ist gefährlich und die Handhabung muss in einem Laborabzug erfolgen. Eine geeignete Schutzausrüstung (Laborkittel, Schutzbrille, Handschuhe) muss getragen werden.

4.8 Natriumsulfat

wasserfrei, granuliert

4.9 Deoxynivalenol (DON)

WARNUNG — Deoxynivalenol ist hochgiftig. Während der gesamten Untersuchung müssen Handschuhe und eine Schutzbrille getragen werden und sämtliche Schritte zur Vorbereitung von Standard- und Probenlösungen müssen in einem Laborabzug durchgeführt werden.

4.10 HT-2-Toxin (HT2)

WARNUNG — HT-2-Toxin ist hochgiftig. Während der gesamten Untersuchung müssen Handschuhe und eine Schutzbrille getragen werden und sämtliche Schritte zur Vorbereitung von Standard- und Probenlösungen müssen in einem Laborabzug durchgeführt werden.

4.11 T-2-Toxin (T2)

WARNUNG — T-2-Toxin ist hochgiftig. Während der gesamten Untersuchung müssen Handschuhe und eine Schutzbrille getragen werden und sämtliche Schritte zur Vorbereitung von Standard- und Probenlösungen müssen in einem Laborabzug durchgeführt werden.

4.12 Zearalenon (ZON)

WARNUNG — Zearalenon ist hochgiftig. Während der gesamten Untersuchung müssen Handschuhe und eine Schutzbrille getragen werden und sämtliche Schritte zur Vorbereitung von Standard- und Probenlösungen müssen in einem Laborabzug durchgeführt werden.

4.13 $^{13}\text{C}_{15}$ -Deoxynivalenol ($^{13}\text{C}_{15}$ -DON)

WARNUNG — $^{13}\text{C}_{15}$ -Deoxynivalenol ist hochgiftig. Während der gesamten Untersuchung müssen Handschuhe und eine Schutzbrille getragen werden und sämtliche Schritte zur Vorbereitung von Standard- und Probenlösungen müssen in einem Laborabzug durchgeführt werden.

4.14 $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin ($^{13}\text{C}_{22}$ -HT2)

WARNUNG — $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin ist hochgiftig. Während der gesamten Untersuchung müssen Handschuhe und eine Schutzbrille getragen werden und sämtliche Schritte zur Vorbereitung von Standard- und Probenlösungen müssen in einem Laborabzug durchgeführt werden.

4.15 $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin ($^{13}\text{C}_{24}$ -T2)

WARNUNG — $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin ist hochgiftig. Während der gesamten Untersuchung müssen Handschuhe und eine Schutzbrille getragen werden und sämtliche Schritte zur Vorbereitung von Standard- und Probenlösungen müssen in einem Laborabzug durchgeführt werden.

4.16 $^{13}\text{C}_{18}$ -Zearalenon ($^{13}\text{C}_{18}$ -ZON)

WARNUNG — $^{13}\text{C}_{18}$ -Zearalenon ist hochgiftig. Während der gesamten Untersuchung müssen Handschuhe und eine Schutzbrille getragen werden und sämtliche Schritte zur Vorbereitung von Standard- und Probenlösungen müssen in einem Laborabzug durchgeführt werden.

4.17 Multitoxin-Stammlösung

Ein Gemisch, das Deoxynivalenol (4.9), HT-2-Toxin (4.10), T-2-Toxin (4.11) und Zearalenon (4.12) in reinem Acetonitril (4.7) in den entsprechenden Konzentrationen enthält.

Bei der Herstellung dieser Lösung sind die zertifizierten Reinheiten der Mykotoxin-Referenzmaterialien für den korrekten Nachweis erforderlich. In jedem Fall müssen die Reinheiten ≥ 95 % sein.

ANMERKUNG 1 3,2 µg/ml DON, 0,5 µg/ml HT-2-Toxin, 0,3 µg/ml T-2-Toxin und 0,3 µg/ml ZON in reinem Acetonitril haben sich als geeignet erwiesen. Diese Lösung ist bei Aufbewahrung im Dunkeln bei 2 °C bis 8 °C für drei Monate stabil.

ANMERKUNG 2 Eine neue Stammlösung wird mit der alten Stammlösung verglichen, indem von jeder 25 µl in einzelne deaktivierte Probenfläschchen aus Glas (5.6) gegeben und nach der Beschreibung in „Probenmesslösung“ (6.3) weiter verfahren wird.

ANMERKUNG 3 Falls 6.4 „Aufstockverfahren“ durchgeführt wird, sind mindestens 6 ml der Stammlösung erforderlich.

4.18 Multitoxin-Arbeitslösung

Multitoxin-Stammlösung (4.17) wird mit Methanol (4.3) so verdünnt, dass die sich ergebende Konzentration in der Arbeitslösung für den Kalibrierbereich der verschiedenen Bestandteile anwendbar ist. Es wird nur ein für die vollständige Kalibrierung ausreichendes Volumen hergestellt.

ANMERKUNG Die Zugabe von 188 µl Multitoxin-Stammlösung in einen 3-ml-Messkolben und das Auffüllen mit Methanol bis zur Marke wird eine Lösung ergeben, die 0,2 µg/ml DON, 0,031 µg/ml HT-2-Toxin, 0,019 µg/ml T-2-Toxin und 0,019 µg/ml ZON in Methanol/Acetonitril (94/6, v/v) enthält.

4.19 Interne Multi-Standard-Stammlösung (Multi-ISTD-Stammlösung)

Ein Gemisch, das $^{13}\text{C}_{15}$ -DON (4.13), $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin (4.14), $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin (4.15) und $^{13}\text{C}_{18}$ -ZON (4.16) in reinem Acetonitril (4.7) in den gleichen Konzentrationen wie die jeweiligen natürlichen Bestandteile in der Multitoxin-Stammlösung (4.17) enthält.

ANMERKUNG Diese Lösung ist bei Aufbewahrung im Dunkeln bei 2 °C bis 8 °C für drei Monate stabil.

4.20 Kalibrierung

In sechs deaktivierte Probenfläschchen aus Glas (5.6) werden unterschiedliche Volumina der Multitoxin-Arbeitslösung (4.18) gegeben, sodass sich sechs äquidistante Kalibrierebenen über den Kalibrierbereich ergeben. Nach den Beschreibungen in 6.3 „Probenmesslösung“ wird weiter verfahren.

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

Sobald sich gezeigt hat, dass sie linear ist, darf die Anzahl der Ebenen den örtlichen Erfordernissen und Anforderungen angepasst werden.

Tabelle 1 — Kalibrierlösungen

Volumen der Multitoxin-Arbeitslösung (4.18.) [µl]	Gesamtmasse des Analyten je Probenfläschchen [ng]			
	DON	HT-2	T-2	ZON
25	5	0,78	0,48	0,48
180	36	5,6	3,4	3,4
335	67	10	6,4	6,4
490	98	15	9,3	9,3
645	129	20	12	12
800	160	25	15	15

4.21 Material zur Qualitätskontrolle

Ein geeignetes Material mit natürlicher Kontamination oder Anreicherung der untersuchten Mykotoxine, das ausreichend stabil ist.

5 Geräte

5.1 Mühle

Einzelne Mühle oder Mehrfachmühlen, die geeignet sind, die Untersuchungsmaterialien auf eine Partikelgröße < 500 µm zu zerkleinern.

5.2 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.

5.3 Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubkappen, 50 ml

5.4 Messkolben

3 ml, 5 ml und 10 ml

5.5 Pipettierer

Einstellbar auf 10 µl bis 100 µl und einstellbar auf 100 µl bis 1 000 µl, genau kalibriert.

5.6 Deaktivierte Probenfläschchen aus Glas

Fläschchen aus silanisiertem Glas, z. B. 4 ml, 45 mm × 14,7 mm.

5.7 Fläschchen für Autosampler für Flüssigkeiten (ALS, en: auto liquid sampler, Probenehmer für Flüssigkeiten)

Mit einer geeigneten Größe für den angewendeten Autosampler für Flüssigkeiten.

5.8 Schüttelmaschine (Rüttler) oder Ultraschallgerät (en: sonicator)

5.9 Verdampfer

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

5.10 Zentrifuge

Zur Erzeugung einer relativen Zentrifugalkraft (RCF, en: relative centrifugal force) von 3 000 *g* geeignet.

5.11 Spritzenfilter

Kleines Innenvolumen, Nylon, Porengröße: 0,2 µm Nylon

5.12 LC-MS

5.12.1 System zur Lösemittelzugabe

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

5.12.2 Autosampler für Flüssigkeiten (ALS)

Geeignet zur Injektion eines geeigneten Volumens der Injektionslösung mit ausreichender Genauigkeit, Kreuzkontamination unter 0,1 %.

5.12.3 Analytische Säule

Zur Trennung der vier Analyten mit der folgenden Leistung geeignet:

Peak-Asymmetriefaktor bei 10 % Höhe: $0,9 < A_s < 1,4$; scheinbarer Mindestretentionsfaktor für jeden der vier Analyten: $k \geq 2$; Mindestanzahl der Platten für jeden der vier Analyten: $N \geq 1\,200$; Mindestresolution zwischen zwei angrenzenden Analytpeaks: $R_s \geq 4$.

5.12.4 Massenspektrometer

Ein Messgerät, das in der Lage ist, den Modus des selektiven Reaktionsmonitorings (SRM, en: selected reaction monitoring) mit einem ausreichend breiten dynamischen Bereich durchzuführen. Jede Ionisationsquelle, die ein ausreichendes Feld bietet, darf eingesetzt werden.

5.13 Waage

Waage mit einer Ablesbarkeit $d = 0,001\text{ g}$ oder besser.

6 Durchführung

6.1 Probenvorbereitung

Es ist wichtig, dass das Laboratorium eine Laborprobe erhält, die tatsächlich repräsentativ ist und während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden ist. Die Laborproben sollten nach der europäischen Gesetzgebung [1] [2] entnommen und vorbereitet werden, sofern anwendbar. Die Laborprobe sollte mit einer Mühle (5.1) und einem Mischer (5.2) oder unter Anwendung eines anderen Prozesses, der nachweislich zu einer vollständigen 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 Anteils von dem vorhergehenden Schritt nach der ausreichenden Homogenisierung. Dieser aliquote Anteil wird dann bis zu nächsten kleineren Partikelgröße zerkleinert, bis eine Teilprobe von etwa 50 g mit der endgültigen Partikelgröße erhalten wird. Es ist von entscheidender Bedeutung, dass die Prüfmenge (Einwaage) aus einer Teilprobe entnommen wird, die ausreichend homogen mit einer Partikelgröße von $\leq 500 \mu\text{m}$ ist. Es sollte besonders darauf geachtet werden, dass die Probe während dieser Verfahrensweise nicht überhitzt wird.

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

6.2 Extraktion

Einige der vorstehend beschriebenen Arbeitsschritte sind für die Genauigkeit der Ergebnisse kritischer 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, Ethylacetats und Natriumsulfats im gleichen Verhältnis erhöht werden, beispielsweise Maßstabsübertragung mit dem Faktor 2: 4 g Prüfmenge, 16 ml Wasser, 32 ml Ethylacetat, 16 g Natriumsulfat. Auf keinen Fall darf eine Maßstabsübertragung als Ersatz für eine ordnungsgemäße Probenvorbereitung (6.1) angesehen werden.

- Für die Prüfmenge werden 1,9 g bis 2,1 g der homogenen Probe in ein konisches Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubkappe (5.3) eingewogen, die Masse wird auf die zweite Dezimalstelle gerundet und aufgezeichnet (die Genauigkeit dieser Masse ist für die Genauigkeit des Endergebnisses kritisch).
- 7,2 ml bis 8,8 ml deionisiertes Wasser (4.1) werden hinzugefügt.
- Die Lösung wird gründlich verwirbelt bis die Prüfmenge vollständig suspendiert ist. Zur Vermeidung von Auswirkungen infolge enzymatischer Aktivitäten darf diese Suspension nicht länger als 15 min stehengelassen werden.
- 16,0 ml Ethylacetat (4.5) werden hinzugefügt (die Genauigkeit dieses Volumens ist für die Genauigkeit des Endergebnisses kritisch!).
- In einem Ultraschallgerät oder durch kräftiges Schütteln (5.8) wird für 27 min bis 33 min extrahiert.
- Zwischen 7,2 g und 8,8 g Natriumsulfat (4.8) werden hinzugefügt.
- Sofort wird für 5 s kräftig geschüttelt.
- Die Lösung wird für 10 min bis 20 min stehengelassen.
- Für mindestens 1 min wird die Lösung mit einer RCF von 3 000 g zentrifugiert (5.10), um das Absetzen der Feststoffteilchen und die Phasentrennung zu unterstützen.
- Falls für mögliche Wiederholungen gewünscht: Für die Aufbewahrung von bis zu 7 Tagen im Dunkeln bei 2 °C bis 10 °C wird der Extrakt (die organische Schicht) in ein sauberes Glasfläschchen überführt.
- 500 µl des Extraktes (organische Schicht) wird in ein deaktiviertes Glasfläschchen (5.6) zur weiteren Bearbeitung überführt (die Genauigkeit dieses Volumens ist für die Genauigkeit des Endergebnisses kritisch!).

6.3 Probenmesslösung

- 25 µl Multi-ISTD-Stammlösung (4.19) werden zum aliquoten Anteil des Extraktes und/oder der Kalibrierlösungen (4.20) hinzugefügt (die Genauigkeit dieses Volumens ist für die Genauigkeit des Endergebnisses kritisch).
- Der aliquote Anteil des Extraktes und/oder der Kalibrierlösungen wird in einem Verdampfer (5.9) unter einem sanften, trockenen Stickstoffstrom bei 60 °C bis zur Trockne eingedampft.
- Für die Rekonstitution werden 250 µl des Modifizierungsmittels der organischen mobilen Phase zum Trockenrückstand hinzugefügt.
- Die Lösung wird für mindestens 10 s gründlich verwirbelt.
- 250 µl deionisiertes Wasser (4.1) werden zum rekonstituierten Extrakt hinzugefügt.
- Die Lösung wird für mindestens 5 s gründlich verwirbelt.
- Die Probenmesslösung wird in ein ALS-Fläschchen (5.7) überführt; falls die Lösung trüb ist, darf sie durch ein Spritzenfilter (5.11) filtriert werden.

ANMERKUNG Unter der Voraussetzung, dass geeignete Filtereinsätze (In-line-Filter) oder Vorsäulen angewendet werden, hat sich gezeigt, dass sogar sehr trübe Proben ohne negative Auswirkungen auf die Lebensdauer der Säule und des LC-Systems injiziert werden können.

6.4 Aufstockverfahren

Wenn die Wiederfindung bestimmt werden muss, wird das Folgende in doppelter Ausführung durchgeführt:

Zu dreimal je 2 g eines Materials, das kein DON, HT2, T2 und ZON enthält, werden drei verschiedene Volumina der Multitoxin-Stammlösung (4.17) hinzugefügt, sodass sich 3 Kontaminationskonzentrationen über den Kalibrierbereich ergeben. Die Lösungen werden gleichmäßig über das Material verteilt, zur weiteren Verteilung der Aufstocklösung wird durchgemischt, und die Lösung wird für mindestens 5 h bis höchstens 18 h stehengelassen. Bei 6.2 „Extraktion“, zweiter Arbeitsschritt, wird fortgesetzt.

ANMERKUNG Die Zugabe von 360 µl, 980 µl und 1 600 µl Multitoxin-Stammlösung (4.17) mit den in den Bemerkungen beschriebenen Konzentrationen hat sich als geeignet erwiesen.

7 Messungen

7.1 Allgemeines

Das LC-MS-System muss die in 5.12 angegebenen Anforderungen erfüllen.

7.2 LC-Bedingungen

Eine analytische Säule, die mobile Phase, die Gradienteneinstellungen und das Injektionsvolumen werden in Übereinstimmung mit den Anforderungen in 5.12.3 ausgewählt (für Beispiele siehe Anhang B).

7.3 MS-Bedingungen

Eine Ionenquelle mit einem für die vier Analyten ausreichendem Ionisationsfeld sowie die Einstellungen der Ionenquelle werden so ausgewählt, dass ein stabiles Spray erreicht wird.

Für jeden Analyten wird ein geeignetes Vorläuferion (Addukte des Moleküls mit einem Proton, Natrium, Ammoniak usw. im positiven Modus, oder Deprotonierung usw. im negativen Modus) ausgewählt. Falls mehr

als ein ausgewähltes Vorläuferion je Analyt nachweisbar ist, ist das stärkste ein guter Ausgangspunkt. Es muss aber zur Kenntnis genommen werden, dass durch die Auswahl des Vorläuferions die Wiederholpräzision und somit die Nachweisgrenze (LOD, en: limit of detection) und die Bestimmungsgrenze (LOQ, en: limit of quantitation) beeinflusst wird.

Für den SRM werden zwei Produktionen im MS/MS-Spektrum für jedes ausgewählte Vorläuferion von jedem Analyten ausgewählt. Die SRM-Übergänge werden mit diesen Vorläuferion-/Produktion-Kombinationen eingerichtet (für SRM-Beispiele siehe Anhang B).

Die ausgewählten MS-Einstellungen müssen so sein, dass für ein nach Abschnitt 6 vorbereitetes relevantes Einzelfuttermittel mit einer Kontamination von etwa 90 µg/kg DON, 10 µg/kg HT-2-Toxin, 10 µg/kg T-2-Toxin und 10 µg/kg ZON, Signal-Rausch-Verhältnisse (Peak-zu-Peak) größer als 10 ermittelt werden (siehe Anhang C).

7.4 Chargenabfolge

Für den Nachweis, dass das System nicht kontaminiert ist, wird eine Charge von Messungen immer mit einem Blindproben-(Reagenzienblindwert-)Versuch begonnen. Anschließend werden die Kalibrierlösungen nochmals gefolgt von einer Blindprobe zur Überprüfung in Bezug auf eine mögliche Verschleppung injiziert. Danach werden die Probenmesslösungen injiziert. Am Ende der Charge werden die Kalibrierlösungen erneut für einen zweiten Versuch injiziert.

7.5 Identifizierung des Peaks

Der Peak eines Analyten in der Probenmesslösung wird durch Auftragen der extrahierten Ionenströme des Analyten und seines entsprechenden markierten Analogs identifiziert und anschließend A) wird die Retentionszeit des Analyten mit der Retentionszeit des entsprechenden markierten Analogs verglichen (die Differenz muss kleiner als die 0,25-fache Halbwertsbreite des Peaks (FWHM) sein), und B) wird das Verhältnis der beiden gemessenen Übergänge des Analyten mit denen einer Kalibrierlösung der vergleichbaren Signalintensität verglichen.

Für Beispiele von Chromatogrammen siehe Anhang C.

7.6 Bestimmung von DON, HT2, T2 und ZON in Kalibrier- oder/und Probenmesslösungen

Aliquote Anteile der Kalibrier- und Probenmesslösungen (6.3) werden unter identischen Bedingungen auf die Säule injiziert. Für jede Injektion wird das Verhältnis der Peakflächen des Analyten dividiert durch die Peakfläche des entsprechenden markierten Analogs berechnet. Diese Verhältnisse der Peakflächen werden in sämtlichen anschließenden Berechnungen eingesetzt. Zur Bestimmung der Peakfläche wird der extrahierte Ionenstrom des Übergangs mit den geringsten Interferenzen (bestes Signal-Rausch-Verhältnis) integriert. Falls die beiden Übergänge eines gegebenen Analyten gleich gut geeignet sind, wird die Summe der beiden integriert.

7.7 Kalibrierung

Die Verhältnisse der Peakflächen aller gemessenen Kalibrierlösungen werden gegen die entsprechenden Gesamtmassen in der Kalibrierlösung von DON, HT2, T2 und ZON getrennt aufgetragen. Die (arithmetischen) Mittel der multiplen Injektionen dürfen nicht angewendet werden. Mit der gewichteten Kleinste-Quadrate-Regression (Least Square Regression) über sämtliche Daten wird die Steigung und der mögliche Achsenschnittpunkt von jeder der vier Kalibrierfunktionen (DON, HT2, T2 und ZON) abgeschätzt. Die Signifikanz des Achsenschnittpunktes wird überprüft (95%iges Vertrauensniveau) und die Linearität wird geprüft (beispielsweise mittels einer grafischen Darstellung von Residuen gegen die angepassten Werte, mit dem Anpassungstest (Lack-of-Fit-Test) (95%iges Vertrauensniveau) sowie dem Anpassungstest nach Mandel (95%iges Vertrauensniveau)). Wird eine Nicht-Linearität angegeben, wird die Ursache identifiziert, und falls erforderlich, die Analysen erneut durchgeführt.

8 Bestimmung des Massenanteils

Zur Berechnung der Massenfraktionen ($w_{An,S}$) eines spezifischen Analyten in der Prüfmenge wird die folgende Modell-Gleichung angewendet:

$$w_{An,S} = \left(\frac{\bar{R}}{\beta_1} - \frac{\beta_0}{\beta_1} \right) \times \frac{m_{ISTD,S}}{m_{ISTD,C}} \times \frac{V_{EtOAc}}{V_{Aliq} \times m_S} \quad (1)$$

Dabei ist

- $w_{An,S}$ der Massenanteil des Analyten in der Prüfmenge;
- $\bar{R}$ der Mittelwert der Verhältnisse der Peakflächen der Wiederholungsinjektionen;
- β_1 die Steigung, abgeschätzt mit der gewichteten Kleinste-Quadrate-Regression aus den Kalibrierdaten (7.7);
- β_0 der Achsenschnittpunkt, abgeschätzt mit der gewichteten Kleinste-Quadrate-Regression aus den Kalibrierdaten (wird null, falls nicht signifikant (siehe 7.7));
- $m_{ISTD,S}$ die Masse des markierten Analogs in der Probenmesslösung;
- $m_{ISTD,C}$ die Masse des markierten Analogs in der Kalibrierlösung;
- V_{Aliq} das aus dem Rohextrakt entnommene Volumen des aliquoten Anteils;
- V_{EtOAc} das für die Extraktion verwendete Volumen des Ethylacetats;
- m_S Masse der Prüfmenge.

Unter der Annahme, dass die Probenmess- und Kalibrierlösungen völlig gleich behandelt sind (gleiches Volumen der Multi-ISTD-Stammlösung zugegeben, $m_{ISTD,D} = m_{ISTD,C}$) wird die Modell-Gleichung reduziert auf:

$$w_{An,S} = \left(\frac{\bar{R}}{\beta_1} - \frac{\beta_0}{\beta_1} \right) \times 1 \times \frac{V_{EtOAc}}{V_{Aliq} \times m_S} \quad (2)$$

Der Term in Klammern ist die Gesamtmasse des Analyten ($m_{An,S}$) in der Probenmesslösung, die durch die Anwendung der Kalibrierfunktion ermittelt wird. Eine derartige reduzierte Modell-Gleichung darf wie folgt angegeben werden:

$$w_{An,S} = m_{An,S} \times \frac{V_{EtOAc}}{V_{Aliq} \times m_S} \quad (3)$$

Bei einer Prüfmenge von 2,0 g, 16,0 ml Ethylacetat und einem aliquoten Anteil des Extraktes von 0,5 ml ist der zweite Term gleich 16 und die Gleichung (3) darf wie folgt angegeben werden:

$$w_{An,S} = m_{An,S} \times 16 \quad (4)$$

Infolge der Anwendung der Verhältnisse der Peakflächen haben die Gesamtvolumina der Probenmess- oder Kalibrierlösungen und die injizierten Volumina keinen direkten Einfluss auf das Ergebnis und erscheinen nicht in der Modell-Gleichung.

Falls gefordert, darf in diesen Fällen der bestimmte Massenanteil $m_{An,S}$ in Bezug auf die Wiederfindung entsprechend der folgenden Gleichung korrigiert werden:

$$w_{An,S,corr} = \frac{w_{An,S}}{rec} \quad (5)$$

Dabei ist rec = die Wiederfindung. Bei T-2-Toxin und Zearalenon hat die Wiederfindung gezeigt, dass sie nicht von 1 abweicht, während bei HT-2-Toxin die mittlere Wiederfindung über den Untersuchungsbereich gleich 0,93 und bei Deoxynivalenol 0,91 ist (siehe Anhang A).

9 Präzision

9.1 Ringversuch

Einzelheiten eines Ringversuchs in Bezug auf die Präzision dieses Verfahren sind in [3] dargestellt. Die aus diesem Ringversuch abgeleiteten Werte sind möglicherweise nicht auf andere Konzentrationsbereiche und/oder Matrices als die angegebenen anwendbar.

9.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei voneinander unabhängigen einzelnen Untersuchungsergebnissen, die durch denselben Bearbeiter an identischen Untersuchungsmaterialien mit denselben Geräten in kurzen Zeitabständen gewonnen wurden, die in nicht mehr als 5 % der Fälle die Wiederholgrenze r überschreiten wird. Nachstehend sind die funktionalen Zusammenhänge zwischen dem gemessenen Massenanteil $w_{An,S}$ für die vier Analyten und der Standardabweichung der Wiederholpräzision s_r aufgelistet. Daraus kann die Wiederholgrenze r wie folgt berechnet werden:

$$r = 2,8 \times s_r \quad (6)$$

Für weitere Informationen siehe die Tabellen in Anhang A.

9.2.1 HT-2-Toxin

$$s_r = 0,11 w_{An,S}$$

9.2.2 T-2-Toxin

$$s_r = 0,04 w_{An,S} + 1,2$$

9.2.3 DON

$$s_r = 0,05 w_{An,S} + 3,8$$

9.2.4 ZON

$$s_r = 0,05 w_{An,S} + 1$$

9.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die an identischen Untersuchungsmaterialien in zwei Laboratorien gewonnen wurden, die in nicht mehr als 5 % der Fälle die Vergleichsgrenze R überschreiten wird. Nachstehend sind die funktionalen Zusammenhänge zwischen dem gemessenen Massenanteil $w_{An,S}$ für die vier Analyten und der Standardabweichung der Wiederholpräzision s_R aufgelistet. Daraus kann die Wiederholgrenze R wie folgt berechnet werden:

$$r = 2,8 \times s_R \quad (7)$$

Für weitere Informationen siehe die Tabellen in Anhang A.

9.3.1 HT-2-Toxin

$$s_R = 0,22 w_{An,S}$$

9.3.2 T-2-Toxin

$$s_R = 0,08 w_{An,S} + 2,8$$

9.3.3 DON

$$s_R = 0,10 w_{An,S} + 8,7$$

9.3.4 ZON

$$s_R = 0,1 w_{An,S} + 4,3$$

10 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- alle erforderlichen Angaben zur vollständigen Identifizierung der Probe;
- eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- das Datum des Probeneingangs;
- die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden; falls gefordert, müssen die Werte der Wiederfindungen zusammen mit den Untersuchungsergebnissen angegeben werden und ob die Untersuchungsergebnisse mit diesen Werten der Wiederfindungen korrigiert wurden.

Anhang A (informativ)

Präzisionsdaten

Die folgenden Daten wurden in einem Ringversuch [3] nach den AOAC „Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis“ (Richtlinien für die Durchführung von Ringversuchen zur Validierung von Kennwerten eines Analysenverfahrens) [4] erhalten. Um die Notwendigkeit des Ausschlusses von einzelnen „Ausreißer“-Ergebnissen zu vermeiden, wurden robuste statistische Verfahren nach ISO 5725-5 [5] angewendet. Die funktionalen Zusammenhänge zwischen der Standardabweichung der Wiederholpräzision/Vergleichpräzision und dem gemessenen Wert wurden nach ISO 5725-2 [6] berechnet. Die Angaben in den Kopfzeilen der nachstehenden Tabellen beziehen sich wie folgt auf die im Ringversuch [3] verwendeten Materialien:

Mischfuttermittel 1 ist EFL1

Mischfuttermittel 2 ist IRMMFEED

Mischfuttermittel 3 ist EFL3

Getreidemischung 1 ist EFL2

Getreidemischung 2 ist IRMMCER

Tabelle A.1 — Präzisionsdaten für HT-2-Toxin

Probe	Mischfutter- mittel 1	Mischfutter- mittel 2	Mischfutter- mittel 3	Getreide- mischung 1	Getreide- mischung 2
Jahr des Ringversuchs	2011	2011	2011	2011	2011
Anzahl der Laboratorien	21	21	21	21	21
Anzahl der nach der Eliminierung der Ausreißer verbliebenen Laboratorien	16	16	16	16	15
Anzahl der Ausreißer (Laboratorien)	5	5	5	5	6
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	16	16	16	16	15
Mittelwert $\bar{x}$ ^a , µg/kg	38,0	22,0	177,6	49,1	53,1
Standardabweichung der Wiederhol- präzision s_r , µg/kg	3,4	3,3	13,5	3,4	8,1
Relative Standardabweichung der Wiederholpräzision RSD_r , %	9	15	8	7	15
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_r und $\bar{x}$	$s_r = 0,11 \bar{x}$				
Wiederholgrenze r^b , µg/kg	10	9	38	10	23
Standardabweichung der Vergleich- präzision s_R , µg/kg	6,2	6,3	23,2	12	12,4
Relative Standardabweichung der Vergleichpräzision RSD_R , %	16	29	13	25	24
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_R und $\bar{x}$	$s_R = 0,22 \bar{x}$				
Horwitz-Verhältnis	0,7	1,3	0,6	1,1	1,1
Vergleichgrenze R^c , µg/kg	17	18	65	34	35
Richtigkeit, %	n.a ^d	n.a ^d	89	96 ^e	n.a ^d
^a Die Mittelwerte wurden in Bezug auf die Wiederfindung nicht korrigiert. ^b $r = 2,8 \times s_r$ ^c $R = 2,8 \times s_R$ ^d nicht anwendbar ^e Nicht signifikant von 100 % abweichend.					

Tabelle A.2 — Präzisionsdaten für T-2-Toxin

Probe	Mischfutter- mittel 1	Mischfutter- mittel 2	Mischfutter- mittel 3	Getreide- mischung 1	Getreide- mischung 2
Jahr des Ringversuchs	2011	2011	2011	2011	2011
Anzahl der Laboratorien	21	21	21	21	21
Anzahl der nach der Eliminierung der Ausreißer verbliebenen Laboratorien	16	16	16	16	15
Anzahl der Ausreißer (Laboratorien)	5	5	5	5	6
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	16	16	16	16	15
Mittelwert $\bar{x}$ ^a , µg/kg	12,1	3,5	50,3	17,7	7,0
Standardabweichung der Wiederhol- präzision s_r , µg/kg	1,7	1,2	3,1	1,6	1,8
Relative Standardabweichung der Wiederholpräzision RSD_r , %	14	35	6	9	27
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_r und $\bar{x}$	$s_r = 0,04 \bar{x} + 1,2$				
Wiederholgrenze r ^b , µg/kg	5	3	9	5	5
Standardabweichung der Vergleich- präzision s_R , µg/kg	3,9	3,1	6,5	4,4	3,1
Relative Standardabweichung der Vergleichpräzision RSD_R , %	32	88	13	25	44
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_R und $\bar{x}$	$s_R = 0,08 \bar{x} + 2,8$				
Horwitz-Verhältnis	1,5	4	0,6	1,1	2
Vergleichgrenze R ^c , µg/kg	11	9	18	12	9
Richtigkeit, %	n.a ^d	n.a ^d	96 ^e	100 ^e	n.a ^d
^a Die Mittelwerte wurden in Bezug auf die Wiederfindung nicht korrigiert. ^b $r = 2,8 \times s_r$ ^c $R = 2,8 \times s_R$ ^d nicht anwendbar ^e Nicht signifikant von 100 % abweichend.					