

DIN EN 16923

ICS 67.060; 67.230

Einsprüche bis 2015-12-23

Entwurf**Lebensmittel –****Bestimmung von T-2-Toxin und HT-2-Toxin in Getreide und Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis mit LC-MS/MS nach SPE-Reinigung; Deutsche und Englische Fassung prEN 16923:2015****Foodstuffs –**

Determination of T-2 toxin and HT-2 toxin in cereals and cereal products for infants and young children by LC-MS/MS after SPE cleanup;
German and English version prEN 16923:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-10-23 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 54 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16923:2015) wurde vom Technischen Komitee TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) nach eingehenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 5 „Biotoxine“ erarbeitet worden.

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

Mykotoxine sind stark gesundheitsschädliche sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen. Lebensmittel, die unter feuchten Bedingungen angebaut, geerntet oder gelagert werden, können von Schimmelpilzen befallen werden, deren Stoffwechselprodukte dann in das Lebensmittel gelangen. Die Toxizität einiger Mykotoxine ist für den Menschen erheblich; deshalb ist ein sicherer Nachweis von besonderer Bedeutung für den gesundheitlichen Verbraucherschutz. In Deutschland gilt zur Verringerung der Mykotoxinbelastung die Mykotoxin-Höchstmengenverordnung. Sie enthält seit 2004 nicht nur Regelungen für Aflatoxine, sondern auch für Ochratoxin A, Fumonisine, Deoxynivalenol und Zearalenon. Seit 2001 werden die nationalen Bestimmungen durch EU-weit geltende Höchstgehaltregelungen für Kontaminanten in Lebensmitteln ergänzt. Höchstgehalte an Mykotoxinen in bestimmten Lebensmitteln werden außerdem noch durch verschiedene andere Verordnungen geregelt.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 16923 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die im Inhalt zitierten Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

Lebensmittel — Bestimmung von T-2-Toxin und HT-2-Toxin in Getreide und Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Getreidebasis mit LC-MS/MS nach SPE-Reinigung

Élément introductif — Élément central — Élément complémentaire

Foodstuffs — Determination of T-2 toxin and HT-2 toxin in cereals and cereal products for infants and young children by LC-MS/MS after SPE cleanup

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Kurzbeschreibung	5
4 Chemikalien.....	5
5 Geräte.....	7
6 Durchführung.....	9
7 Auswertung.....	10
8 Präzision	12
9 Untersuchungsbericht	13
Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme	14
Anhang B (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	18
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten.....	24
Literaturhinweise.....	26

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16923:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN 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.

Einleitung

Das Mykotoxin T-2-Toxin und sein Metabolit HT-2-Toxin gehören zur Gruppe der Trichothecene, die von einigen Arten der Schimmelpilzgattung *Fusarium* gebildet werden. Vor allem werden Getreidearten wie Mais, Weizen, Gerste, Hafer und Roggen befallen.

WARNUNG — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, die Verordnung (EU) Nr. 1907/2006 [3] sowie auch geeignete nationale Erklärungen, wie z. B. in [4], sollten berücksichtigt werden.

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

WARNUNG — Vom T-2-Toxin und seinem Metabolit HT-2-Toxin sind karzinogene Wirkungen bekannt.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes von T-2-Toxin und HT-2-Toxin durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) in Kopplung mit der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) nach Festphasenreinigung (SPE, en: solid phase extraction) [5] in Getreide und getreidebasierten Produkten, z. B. Haferflocken, fest, die für die Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern vorgesehen sind.

Das Verfahren wurde für HT-2-Toxin in Hafermehl bei Konzentrationen von 9,3 µg/kg und 28,1 µg/kg, in Haferflocken bei Konzentrationen von 16,5 µg/kg und 21,4 µg/kg und bei Frühstückscerealien (die Haferflocken enthalten) bei einer Konzentration von 8,1 µg/kg und für T-2-Toxin in Hafermehl bei Konzentrationen von 4,4 µg/kg und 8,3 µg/kg, in Haferflocken bei Konzentrationen von 4,9 µg/kg und 6,6 µg/kg und bei Frühstückscerealien (die Haferflocken enthalten) bei einer Konzentration von 3,5 µg/kg validiert.

Laborerfahrungen [6] haben gezeigt, dass das Verfahren auch für hochgradig aufquellende Materialien (auf trockenem Getreide basierendem Porridge und modifizierte Stärken) anwendbar ist, jedoch wurden diese in der Validierungsuntersuchung des Verfahrens nicht überprüft. Einzelheiten hierzu sind in 6.3 enthalten.

Das Verfahren kann ebenso bei Nebenprodukten von Hafer bei höheren Konzentrationen von T-2-Toxin und HT-2-Toxin angewendet werden. In diesem Fall müssen die Verdünnungsschritte berücksichtigt werden [6].

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 3696:1995, *Wasser für analytische Zwecke; Anforderungen und Prüfungen (ISO 3696:1987)*

3 Kurzbeschreibung

T-2-Toxin und HT-2-Toxin werden mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch durch manuelles Schütteln oder unter Verwendung eines Labormixers extrahiert. Der filtrierte und verdünnte Extrakt wird über eine Festphasensäule oder eine Passthrough-Säule gereinigt und konzentriert, siehe auch [6]. Der Gehalt wird durch HPLC in Kopplung mit der Tandem-Massenspektrometrie bestimmt.

4 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696:1995 verwendet. Die Lösemittel müssen, wenn nicht anders festgelegt, von geeignetem Reinheitsgrad für die HPLC-Analyse sein.

4.1 T-2-Toxin-Stammlösung, Massenkonzentration $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril

4.2 HT-2-Toxin-Stammlösung, $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril

4.3 Interne Standardlösung von [$^{13}\text{C}_{24}$]-T-2-Toxin, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril

Andere geeignete isotoopenmarkierte Standards von HT-2-Toxin als [$^{13}\text{C}_{24}$]-T-2-Toxin dürfen verwendet werden.

4.4 Interne Standardlösung von [$^{13}\text{C}_{22}$]-HT-2-Toxin, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril

Andere geeignete isotoopenmarkierte Standards von HT-2-Toxin als [$^{13}\text{C}_{22}$]-T-2-Toxin dürfen verwendet werden.

4.5 Gemischte Standardlösung, $\rho = 500 \text{ ng/ml}$

Jeweils $25 \mu\text{l}$ der T-2-Toxin- und HT-2-Toxin-Stammlösung (4.1 und 4.2) werden in einen 5-ml-Messkolben pipettiert und der Inhalt verdünnt, indem dieser mit Injektionslösung (4.10) bis zur Marke aufgefüllt wird.

Diese Lösung kann bei -18°C für 12 Monate aufbewahrt werden.

4.6 Interne gemischte Standardlösung, $\rho = 1\,000 \text{ ng/ml}$

$200 \mu\text{l}$ der internen Standardlösungen (4.3 und 4.4) werden in einem 5-ml-Messkolben mit Injektionslösung (4.10) verdünnt.

Diese Lösung kann bei -18°C für 12 Monate aufbewahrt werden.

4.7 Kalibrierlösungen

Für die Kalibrierung des Messsystems werden Kalibrierlösungen im Bereich von 5 ng/ml bis 100 ng/ml hergestellt.

Beispielsweise werden die folgenden Kalibrierlösungen nach Tabelle 1 hergestellt:

Tabelle 1 — Beispiele für geeignete Kalibrierlösungen

Kalibrierlösung	Massen-konzentration je Analyt ng/ml	Massen-konzentration je isotoopenmarkierten Analyt ng/ml	Gemischte Standardlösung (4.5) μl	Interne gemischte Standardlösung (4.6) μl	Injektions-lösung (4.10) μl
IS-Blank	0	50	–	50	950
1	5	50	10	50	940
2	10	50	20	50	930
3	20	50	40	50	910
4	40	50	80	50	870
5	60	50	120	50	830
6	80	50	160	50	790
7	100	50	200	50	750

4.8 Acetonitril, HPLC-Reinheitsgrad

4.9 Methanol, HPLC-Reinheitsgrad

4.10 Injektionslösung

20 Teile Acetonitril (4.8) werden mit 80 Teilen Wasser (20+80, v+v) gemischt.

4.11 Extraktionsgemisch

84 Teile Acetonitril (4.8) werden mit 16 Teilen Wasser (84+16, v+v) gemischt.

4.12 Elutionsmittel für die LC-MS/MS

Beispiele von für die LC-MS/MS-Systeme geeigneten Elutionsmitteln sind in Anhang B angegeben. Die Lösung wird durch einen Membranfilter (5.16) filtriert.

4.13 Stickstoff, Reinheit mindestens 99,9 %

4.14 Aktivkohle für die Säulenchromatographie (Partikelgröße: 63 µm bis 200 µm)

4.15 Aluminiumoxid (neutral, für die Flüssigchromatographie)

4.16 Fein gemahlene/pulverisierte Diatomeenerde (Diatomite, Kieselguhr), z. B. Celite® 545

4.17 Silanisierungsreagenz, z. B. Surfasil™¹⁾ (optional)

4.18 Cyclohexan, analysenrein (optional)

4.19 Herstellung der Silanisierungsreagenz (optional)

Beispielsweise werden 50 ml Surfasil™ (4.17) mit 950 ml Cyclohexan (4.18) versetzt.

4.20 Ameisensäure, HPLC-Reinheitsgrad

4.21 Ammoniaklösung, Stoffmengenkonzentration $c(\text{NH}_3) = 13,4 \text{ mol/l}$ oder Massenkonzentration $\rho(\text{NH}_3) = 250 \text{ g/l}$

4.22 Ammoniumacetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$), LC-MS/MS-Reinheitsgrad

4.23 Vor Verstopfung schützendes Material (Anti-Clogging-Material), z. B. gewaschener Seesand, Glasperlen oder Perlen aus Polyethylen, optional

5 Geräte

Übliche Laborglasgeräte und Ausrüstung und insbesondere Folgendes:

5.1 Laborwaage, Fehlergrenze: 0,01 g

5.2 Analysenwaage, Fehlergrenze: 0,1 mg

5.3 Ultraschallbad

5.4 Laborschüttler für Reagenzgläser

5.5 Manuelle Dosierer, Mikroliterspritzen oder Mikroliterpipetten, für 10 µl bis 5 ml

1) Surfasil™ ist die Herstellerbezeichnung eines geeigneten handelsüblichen Produktes, das von verschiedenen Lieferanten erhältlich ist. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

5.6 Dosierer, geeignet für 20 ml

5.7 250-ml-Erlenmeyerkolben mit Stopfen oder 250-ml-Zentrifugenröhrchen

5.8 Spritzenfilter (0,45 µm) oder Zentrifugenfilter (z. B. Durapore® PVDF (0,45 µm) oder Millipore Ultrafree-MC®²⁾, 0,5 ml) passend zu Zentrifuge für Eppendorfgefäße

5.9 Faltenfilter, 595-Filter

5.10 Laborzentrifuge

5.11 Leerkartuschen (6 ml) aus Polypropylen (PP) und dazugehörige Fritten aus Polyethylen (PE)

5.12 SPE-Vakuum-/Elutionsstation

5.13 Laborschüttler, z. B. Überkopfschüttler

5.14 Labormischer, z. B. Ultra Turrax®²⁾

5.15 Reagenzgläser, geeignet für ein Volumen von bis zu 10,0 ml

5.16 Silanisierte Reagenzgläser (optional)

Die zuvor gründlich gereinigten Reagenzgläser (5.15) werden bis zum Rand mit verdünntem Silanisierungsreagenz (4.19) gefüllt und 1 Minute stehen gelassen. Anschließend wird die Reagenzlösung ausgegossen, wobei diese für den mehrmaligen Gebrauch aufzufangen ist. Anschließend werden die Gläser mit Cyclohexan (4.18) und Acetonitril (4.8) oder Methanol (4.9) in dieser Reihenfolge gespült. Dabei dürfen die Spüllösungen mehrfach wiederverwendet werden. Abschließend werden die Gläser zweifach mit doppelt-destilliertem Wasser gespült und zum Trocknen angeordnet.

WARNUNG — Surfasil™²⁾ ist eine Lösung von Silylchlorid und reagiert daher mit Wasser unter der Bildung von Salzsäuredämpfen. Daher dürfen die Gläser nach der Derivatisierung nie direkt mit Wasser gespült werden.

Bei nachweislich geprüfter Eignung dürfen auch nicht silanisierte Gefäße, z. B. aus Polypropylen, verwendet werden.

5.17 Eindampfstation, z. B. TurboVap®LV³⁾ Zymark oder vergleichbares

5.18 Membranfilter für wässrige Lösungen (Porengröße 0,45 µm)

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

5.19.1 HPLC-Pumpe

2) Ultra Turrax® und Surfasil™ sind Herstellerbezeichnungen geeigneter handelsüblicher Produkte, die von verschiedenen Lieferanten erhältlich sind. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

3) TurboVap®LV Zymark ist die Herstellerbezeichnung eines geeigneten handelsüblichen Produktes, das von verschiedenen Lieferanten erhältlich ist. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

5.19.2 Injektionssystem

5.19.3 HPLC-Trennsäule, z.B. Octyldecylsilan (ODS), die eine Basislinienauftrennung der Peaks von T-2-Toxin und HT-2-Toxin zur Unterscheidung von allen anderen Signalen sicherstellt, 150 mm Länge, 2,00 mm Innendurchmesser, Partikelgröße 5 µm, geeignete Umkehrphasen-Vorsäule.

Säulen mit anderen Maßen dürfen auch verwendet werden.

5.19.4 Themostatisierbarer Säulenofen

5.19.5 Tandem-Massenspektrometer (MS/MS)

5.19.6 Datenauswertungssystem

6 Durchführung

6.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Für die Durchführung der Analyse wird eine gemahlene und homogenisierte Probe verwendet.

6.2 Vorbereitung der Festphasensäule

42 g Aktivkohle (4.14) werden mit 30 g neutralem Al_2O_3 (4.15) und 18 g *Celite 545* (4.16) in einem Glasgefäß (500 ml) (Mischungsverhältnis 7:5:3 Aktivkohle/neutrales Al_2O_3 /*Celite 545*; *m/m/m*) vermischt und in einem Schüttler (5.13) 1 h homogenisiert. Jeweils 0,5 g des homogenen Gemisches werden in 6-ml-Leerkartuschen mit drei PE-Fritten (2 Fritten unten, 1 Fritte oben zum Abdecken) gefüllt.

Alternativ dürfen auch kommerziell erhältliche SPE-Säulen eingesetzt werden. Aus diesem Grund muss das Reinigungsverfahren in Bezug auf die Wiederfindung überprüft werden und, falls erforderlich, optimiert werden.

6.3 Extraktion von T-2-Toxin und HT-2-Toxin

25,0 g der homogenisierten und fein gemahlenen Probe (6.1) werden in ein 250-ml-Becherglas/ Erlenmeyerkolben oder in ein 250-ml-Zentrifugenröhrchen (5.7) auf 0,1 g genau eingewogen und 100 ml Extraktionsgemisch (4.11) hinzugefügt und das Gefäß wird verschlossen. Das Gemisch wird in einem Schüttler (5.13) 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Alternativ wird für die Extraktion ein Labormischer (5.14) eingesetzt. In diesem Fall wird das Gemisch zunächst 3 min bei hoher Geschwindigkeit homogenisiert.

Nach der Extraktion werden ausreichend mehr als 10 ml Extrakt über ein Faltenfilter (5.9) in ein Glasgefäß filtriert. Diese Menge wird für 10 min bei Raumtemperatur bei $2\,500 \times g$ zentrifugiert. 10 ml der überstehenden Lösung des Zentrifugates werden entnommen.

Wenn stark aufquellende Nahrungsmittel-Matrices untersucht werden, wird der Wassergehalt im Extraktionsmedium auf bis zu 200 % erhöht oder alternativ die Masse der Probenmenge auf bis zu 50 % der beschriebenen Menge reduziert. Um ein Verstopfen des aufquellenden Materials zu verhindern, wird die Menge an Seesand (4.23) hinzugefügt, die gleich der Probenmasse ist.

Die Einstellungen von Volumen- und/oder Masse werden bei der abschließenden Berechnung berücksichtigt.

6.4 Reinigung mit Festphasenfiltration

Die vorbereitete Säule, die 0,5 g Aktivkohle/*Celite* (6.2) enthält, wird auf eine SPE-Station (5.12) aufgesetzt und zum Auffangen des Eluats ein Reagenzglas (5.15) untergestellt. 5,0 ml des Extraktes (6.3) werden über die SPE-Säule eluiert und das Eluat aufgefangen. Hierbei ist ein leichtes Vakuum anzulegen, sodass eine Elutionsgeschwindigkeit von 1 Tropfen bis 2 Tropfen je s erreicht wird. Die Kartusche wird erneut mit 5 ml Extraktionsmittelgemisch (4.11) gewaschen und das Eluat ebenfalls aufgefangen.

25 µl interne Mischstandardlösung (4.6) werden zu den vereinigten Eluaten gegeben und unter Stickstoff (4.13) unter Verwendung einer Eindampfstation (bei 45 °C für 30 min und einem Gasdruck von 10 psi) bis zur Trockene eingengt.

Der Rückstand wird mit 500 µl Injektionsgemisch (4.10) unter kräftigem Schütteln für 60 s (5.4) erneut gelöst und, falls erforderlich, wird ein Ultraschallbad (5.3) für 5 min bei Raumtemperatur eingesetzt. Um vorhandene Mikropartikel zu entfernen, sollte die Lösung durch Spritzenfilter (5.8) oder Zentrifugenfilter (0,45 µm, 0,5 ml) bei mindestens 10 000 g filtriert werden, damit die Injektionslösung erhalten wird.

Falls im Rahmen der Probenreinigung eine Unterbrechung erforderlich ist, dürfen die Probenextrakte (bis zur Trockene eingengt) bei 4 °C einige Tage und bei -18 °C etwa zwei Wochen ohne Analytverluste gelagert werden.

6.5 Bestimmung mit LC-MS/MS

Abhängig vom LC-MS/MS-System werden 10 µl bis 25 µl Injektionslösung nach 6.4 injiziert.

Durch Einmessen der Analyten und Optimierung der Trenn- und Detektionsparameter wird ein geeignetes Messsystem eingerichtet. Anhang A führt einige Beispielchromatogramme auf und Anhang B enthält einige geeignete Parameter.

Die eingesetzten Messsysteme müssen mit den folgenden Anforderungen in Tabelle 2 übereinstimmen:

Tabelle 2 — Voraussetzungen für Vorläuferionen und Produktionen

Analyt	Mindest-Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die Quantifizierungsspur	Mindest-Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die Bestätigungsspur
T-2-Toxin	50:1 bei 250 pg	30:1 bei 250 pg
HT-2-Toxin	10:1 bei 250 pg	5:1 bei 250 pg
[¹³ C ₂₄]-T-2-Toxin	50:1 bei 250 pg	30:1 bei 250 pg
[¹³ C ₂₂]-HT-2-Toxin	10:1 bei 250 pg	5:1 bei 250 pg

7 Auswertung

7.1 Allgemeines

Durch Vergleich der Retentionszeiten der Standardlösung mit denen der Probenmesslösung werden T-2-Toxin und HT-2-Toxin identifiziert.

Der Analyt wird auf der Grundlage von mindestens zwei Massenübergängen identifiziert. Zusätzlich müssen die Retentionszeiten (Peaks in beiden Massenspuren) und das Flächenverhältnis der beiden Peaks mit denen der Standardsubstanz übereinstimmen.

7.2 Berechnung

Bei der Quantifizierung von T-2-Toxin und HT-2-Toxin wird der entsprechende isotopenmarkierte Standard als Ionisierungskontrollstandard verwendet. Eine Mehrpunkt-Kalibrierung wird mit einer Standardlösung, z. B. nach 4.7, Tabelle 1, durchgeführt.

Für die lineare Regression wird das Peakflächenverhältnis von jedem Analyten gegen das entsprechende Konzentrationsverhältnis aufgetragen. Die Massenkonzentration jedes Toxins in der Injektionslösung wird aus der linearen Regression, in ng/ml, abgeleitet, siehe Formel (1).

$$\frac{A_a}{A_{IS}} = a_{Cal} \frac{\rho_a}{\rho_{IS}} + b_{Cal} \quad (1)$$

Dabei ist

- A_a die Peakfläche des Analyten in der Kalibrierlösung (4.7);
- A_{IS} die Peakfläche des Ionisierungskontrollstandards in der Kalibrierlösung (4.7);
- ρ_a die Massenkonzentrationen der Analyten in den Kalibrierlösungen (4.7), in ng/ml;
- ρ_{IS} die Konzentration des Ionisierungskontrollstandards in der Kalibrierlösung (4.7), in ng/ml, üblicherweise 50 ng/ml;
- a_{Cal} die Steigung der mit den Kalibrierlösungen (4.7) bestimmten Kalibrierung;
- b_{Cal} der mit den Kalibrierlösungen (4.7) bestimmte Achsenschnittpunkt der Kalibrierung.

Die Massenkonzentration des Analyten in der Probenmesslösung, ρ_a^S , in ng/ml, wird mit Formel (2) berechnet:

$$\rho_a^S = \frac{\frac{A_a^S}{A_{IS}^S} - b_{Cal}}{a_{Cal}} \rho_{IS}^S \quad (2)$$

Dabei ist

- A_a^S die Fläche (Response) des Signals des Analyten in der Probenmesslösung;
- A_{IS}^S die Fläche (Response) des Ionisierungskontrollstandards in der Probenmesslösung;
- ρ_{IS}^S die Massenkonzentration des Ionisierungskontrollstandards in der Probenmesslösung von 50 ng/ml.

Der Massenanteil des Analyten, w_a , in µg/kg, wird mit Formel (3) berechnet:

$$w_a = \frac{\rho_a^S \times V_{ex} \times V_{im}}{m_s \times V_{Aliquot}} \quad (3)$$

Dabei ist

- m_s die Masse der Einwaage, in g, hier 25 g;
- V_{ex} das Volumen der Extraktionslösung, in ml, hier 100 ml;
- V_{im} das zum erneuten Lösen der eingeeengten Probe verwendete Volumen des Injektionsgemisches, in ml, hier 0,5 ml;
- $V_{Aliquot}$ der aliquote Anteil des Probenextraktes, in ml, hier 5 ml.

8 Präzision

8.1 Allgemeines

Einzelheiten über einen Ringversuch [8] zur Präzision des Verfahrens sind in Anhang C zusammengefasst. Die aus diesem Ringversuch abgeleiteten Werte sind möglicherweise nicht auf andere als die in Anhang C angegebenen Konzentrationsbereiche und Matrices anwendbar.

8.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Ergebnissen, die ein einzelner Bearbeiter an identischem Untersuchungsmaterial mit denselben Geräten innerhalb der kürzest möglichen Zeitspanne erhält, wird die Wiederholgrenze r in Tabelle 3 und Tabelle 4 nicht häufiger als in 5 % der Fälle überschreiten.

8.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Ergebnissen, die von zwei Laboratorien für identisches Untersuchungsmaterial erhalten werden, wird die Vergleichgrenze R in Tabelle 3 und Tabelle 4 nicht häufiger als in 5 % der Fälle überschreiten.

Tabelle 3 — Mittelwerte, Wiederholgrenzen und Vergleichgrenzen für HT-2-Toxin

Probe	$\bar{x}$ µg/kg	r µg/kg	R µg/kg
Hafermehl	9,57 ± 1,04	4,38	6,00
Hafermehl	26,5 ± 3,38	5,18	16,2
Haferflocken	21,1 ± 3,40	7,91	17,1
Haferflocken	15,7 ± 2,60	9,17	14,2
Haferflocken enthaltende Frühstückscerealien	8,46 ± 1,02	5,42	6,65

Tabelle 4 — Mittelwerte, Wiederholgrenzen und Vergleichgrenzen für T-2-Toxin

Probe	$\bar{x}$ µg/kg	r µg/kg	R µg/kg
Hafermehl	4,21 ± 2,17	2,92	2,92
Hafermehl	7,92 ± 2,25	2,71	3,38
Haferflocken	6,09 ± 2,25	3,51	3,82
Haferflocken	4,58 ± 2,20	2,55	2,87
Haferflocken enthaltende Frühstückscerealien	3,40 ± 2,2	2,39	2,63

9 Untersuchungsbericht

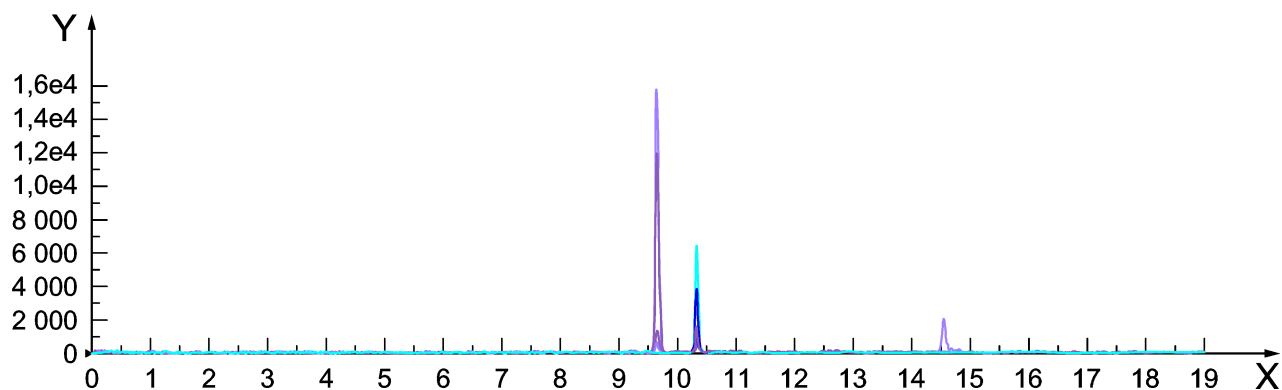
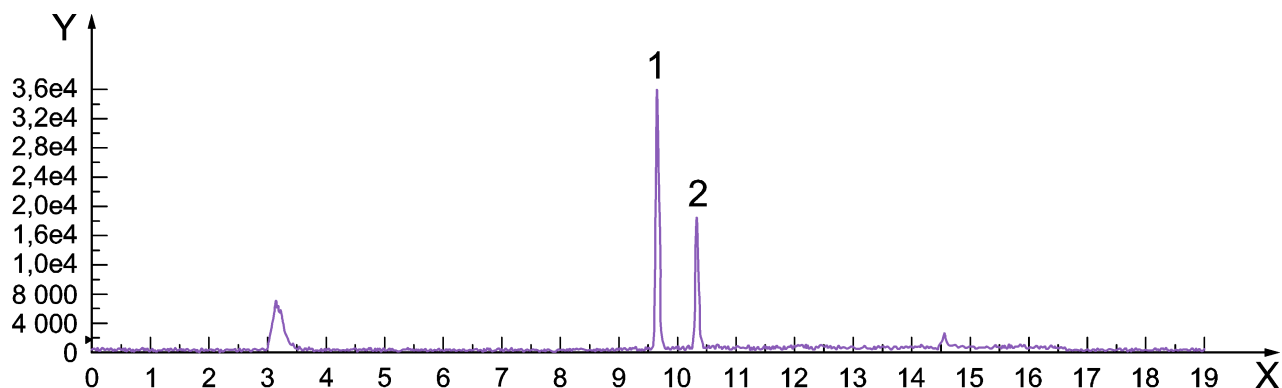
Der Untersuchungsbericht sollte ISO/IEC 17025 entsprechen und muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe (Art, Herkunft, Bezeichnung der Probe);
- b) einen Verweis auf diese Europäische Norm;
- c) das Datum der Probenahme und die Art des Probenahmeverfahrens (wenn bekannt);
- d) das Datum des Probeneinganges;
- e) das Datum der Untersuchung;
- f) die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- g) alle Besonderheiten, die während der Untersuchung festgestellt wurden;
- h) alle Arbeitsschritte, die nicht in diesem Verfahren festgelegt sind oder als wahlfrei angesehen wurden und die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben.

Anhang A (informativ)

Typische Chromatogramme

A.1 Beispielchromatogramme (API 4000™)



Legende

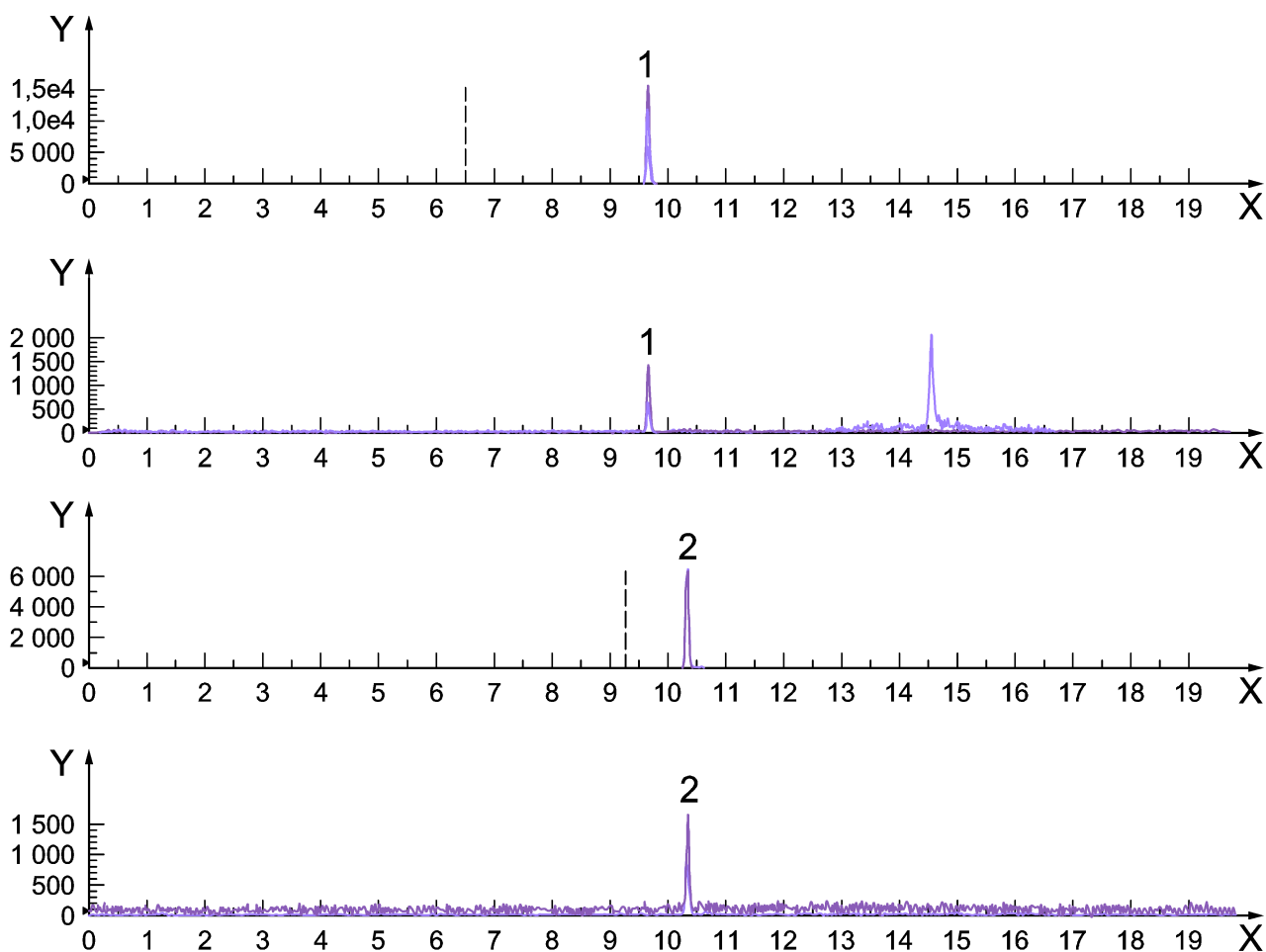
x: Zeit, in min

y: Intensität, in Zählimpulse je s

1: HT-2-Toxin bei 9,65 min

2: T-2-Toxin bei 10,34 min

Bild A.1— Totalionenchromatogramm und extrahiertes Ionenchromatogramm einer Standardlösung (20 ng/ml)



Legende

x: Zeit, in min

y: Intensität, in Zählimpulse je s

1: HT-2-Toxin bei etwa 9,65 min

2: T-2-Toxin bei etwa 10,34 min

Bild A.2 — Einzelreaktion-Ionenchromatogramm einer Standardlösung (20 ng/ml)