

DIN EN 16923



ICS 67.060; 67.230

EntwurfEinsprüche bis 2020-09-30
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 16923:2017-08**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 16923:2020****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 16923:2020

Produits alimentaires –

Dosage des toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et les produits céréaliers pour nourrissons et enfants en bas âge par CL-SM/SM après purification par SPE;
Version allemande et anglaise prEN 16923:2020

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-07-31 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe 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/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe 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 oder Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 57 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16923:2020) 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).

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

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)

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN 16923:2017-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der zweite Elutionsschritt bei der Festphasenextraktion in 7.4 wird genauer beschrieben;
- b) das Dokument wurde redaktionell überarbeitet.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725 (alle Teile), *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen*

<i>Titel de:</i>	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
<i>Titel en:</i>	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
<i>Titel fr:</i>	Produits alimentaires — Dosage des toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et les produits céréaliers pour nourrissons et enfants en bas âge par CL-SM/SM après purification par SPE

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Chemikalien	6
6 Geräte	8
7 Durchführung	9
7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	9
7.2 Vorbereitung der Festphasensäule	9
7.3 Extraktion von T-2-Toxin und HT-2-Toxin	10
7.4 Reinigung mit Festphasenfiltration	10
7.5 Bestimmung mit LC-MS/MS	10
7.6 Identifizierung	11
8 Auswertung	11
9 Präzision	12
9.1 Allgemeines	12
9.2 Wiederholpräzision	12
9.3 Vergleichpräzision	12
10 Prüfbericht	13
Anhang A (informativ) Beispielchromatogramme (API 4000™)	14
Anhang B (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	18
B.1 Systemeinstellungen für SCIEX API 4000™ und SCIEX API 4000™ QTrap	18
B.1.1 Einstellungen für die Chromatographie	18
B.1.2 Detektor-Parameter	18
B.2 Systemeinstellungen für SCIEX API 2000™	19
B.2.1 Einstellungen für die Chromatographie	19
B.2.2 Detektor-Parameter	20
B.3 Systemeinstellungen für SCIEX API 3000™	21
B.3.1 Einstellungen für die Chromatographie	21
B.3.2 Detektor-Parameter	22
B.4 Systemeinstellungen für Micromass Quattro LC	23
B.4.1 Einstellungen für die Chromatographie	23
B.4.2 Detektor-Parameter	23
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	25
Literaturhinweise	27

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16923:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik-Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 16923:2017 ersetzen.

Gegenüber der Ausgabe von 2017 wurden die folgenden Änderungen vorgenommen:

— Der zweite Elutionsschritt der Festphasenextraktion in 7.4 wird eindeutiger beschrieben.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone 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 1 — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, (EG) Nr. 1907/2006 [3], in ihrer letzten Fassung sowie geeignete nationale Erklärungen, wie z. B. in [4], sollten berücksichtigt werden.

WARNUNG 2 — 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 3 — Vom T-2-Toxin und seinem Metabolit HT-2-Toxin sind karzinogene Wirkungen bekannt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung von T-2-Toxin und HT-2-Toxin durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, en: high performance liquid chromatography) in Kopplung mit der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) nach Festphasenreinigung (SPE, en: solid phase extraction) [5] in Getreide und getreidebasierten Produkten, z. B. Haferflocken, 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 sowie 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 stark 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 7.3 enthalten.

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

Das Verfahren kann auch auf Getreide und Getreideerzeugnisse auf der Basis von Weizen, Gerste und Reis für Säuglinge und Kleinkinder angewendet werden. In diesem Falle ist es erforderlich, das Verfahren im Labor für jedes Material zu validieren (In-house-Validation). Zum Zeitpunkt des Ringversuches war ein Bereich von 10 µg/kg bis 100 µg/kg zur Validierung vorgesehen, und die Vorstudien haben gezeigt, dass das Verfahren diesen gesamten Bereich gut abdeckt, obwohl das Verfahren letztendlich nur für den Bereich von 3,5 µg/kg bis 28,1 µg/kg validiert wurde.

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:

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

4 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 [7]. Die Toxine werden durch HPLC in Kopplung mit Tandem-Massenspektrometrie bestimmt.

5 Chemikalien

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

5.1 Acetonitril, HPLC-Reinheitsgrad

5.2 Methanol, HPLC-Reinheitsgrad

5.3 Lösemittelgemisch

20 Teile Acetonitril (5.1) werden mit 80 Teilen Wasser (20 + 80, v + v) gemischt.

5.4 Extraktionsgemisch

84 Teile Acetonitril (5.1) werden mit 16 Teilen Wasser (84 + 16, v + v) gemischt.

5.5 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 (6.18) filtriert.

5.6 Stickstoff, Reinheit mindestens 99,9 %.

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

5.8 Aluminiumoxid (neutral, für die Flüssigchromatographie).

5.9 Fein gemahlene/pulverisierte Diatomeenerde (Diatomite, Kieselgur), z. B. Celite® 545.

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

5.11 Cyclohexan, analysenrein (optional).

5.12 Herstellung des verdünnten Silanisierungsreagenzes (optional).

Beispielsweise werden 50 ml eines Silanisierungsreagenzes (5.10) mit 950 ml Cyclohexan (5.11) versetzt.

5.13 Ameisensäure, HPLC-Reinheitsgrad.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Jeweils $25 \mu\text{l}$ der T-2-Toxin- und HT-2-Toxin-Stammlösung (5.17 und 5.18) werden in einen 5-ml-Messkolben pipettiert und mit Lösemittelgemisch (5.3) bis zur Marke aufgefüllt.

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

5.22 Gemischte interne Standardlösung, $\rho = 1\,000 \text{ ng/ml}$

$200 \mu\text{l}$ der internen Standardlösungen (5.19 und 5.20) werden in einem 5-ml-Messkolben mit Lösemittelgemisch (5.3) verdünnt.

Diese Lösung kann 6 Monate bei -18°C aufbewahrt werden.

5.23 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 isoto­pen-markiertem Analyt ng/ml	Gemischte Standard-lösung (5.21) μl	Gemischte interne Standard-lösung (5.22) μl	Lösemittel-gemisch (5.3) 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

Kalibrier- lösung	Massen- konzentration je Analyt ng/ml	Massen- konzentration je isotopen- markiertem Analyt ng/ml	Gemischte Standard- lösung (5.21) µl	Gemischte interne Standard- lösung (5.22) µl	Lösemittel- gemisch (5.3) µl
5	60	50	120	50	830
6	80	50	160	50	790
7	100	50	200	50	750

6 Geräte

Übliche Laborgeräte und insbesondere Folgendes:

6.1 Laborwaage, Fehlergrenze: 0,01 g.

6.2 Analysenwaage, Fehlergrenze: 0,1 mg.

6.3 Ultraschallbad.

6.4 Laborschüttler für Reagenzgläser.

6.5 Manuelle Dispenser, Mikroliterspritzen oder Mikroliterpipetten, für 10 µl bis 5 ml.

6.6 Dispenser, geeignet für 20 ml.

6.7 250-ml-Erlenmeyerkolben mit Stopfen oder 250-ml-Zentrifugenröhrchen.

6.8 Spritzenfilter (0,45 µm) oder Zentrifugenfilter (z. B. Durapore® PVDF (0,45 µm) oder Millipore Ultrafree-MC®, 0,5 ml) passend zur Zentrifuge für Reaktionsgefäße, z. B. Eppendorfgefäße².

6.9 Faltenfilter, Porengröße 4 µm bis 7 µm, Durchmesser 100 mm.

6.10 Laborzentrifuge.

6.11 Leerkartuschen (6 ml) aus Polypropylen (PP) und dazugehörige Fritten aus Polyethylen (PE) oder handelsübliche SPE-Säulen, z. B. CHROMABOND® Carbon/Alox/Celite®², 6 ml, 500 mg.

6.12 SPE-Vakuum-/Elutionsstation.

6.13 Laborschüttler, z. B. Überkopfschüttler.

6.14 Labormixer, z. B. Ultra Turrax®².

² Durapore® PVDF, Millipore Ultrafree-MC®, Ultra Turrax®, TurboVap®LV Zymark und Surfasil sind Herstellerbezeichnungen handelsüblicher Produkte, die von verschiedenen Lieferanten erhältlich sind. Eppendorfgefäß ist ein Beispiel für ein handelsübliches Produkt, das von Eppendorf erhältlich ist. CHROMABOND® ist die Herstellerbezeichnung für ein handelsübliches Produkt, das von Machery-Nagel erhältlich ist. 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.

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

6.16 Silanisierte Reagenzgläser (optional).

Die zuvor gründlich gereinigten Reagenzgläser (6.15) werden bis zum Rand mit verdünntem Silanisierungsreagenz (5.12) gefüllt und 1 min stehen gelassen. Anschließend wird die Reagenzlösung ausgegossen, wobei diese für den mehrmaligen Gebrauch aufzufangen ist. Anschließend werden die Gläser mit Cyclohexan (5.11) und Acetonitril (5.1) oder Methanol (5.2) in dieser Reihenfolge gespült. Dabei dürfen die Spüllösungen mehrfach wiederverwendet werden. Abschließend werden die Gläser zweifach mit doppelt destilliertem Wasser gespült und trocknen gelassen.

WARNUNG — Surfasil™ ist eine Silylchlorid-Lösung, die unmittelbar mit Wasser unter der Bildung von Salzsäuredämpfen reagiert. Daher dürfen die Gläser nach der Derivatisierung nie direkt mit Wasser gespült werden.

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

6.17 Eindampfstation, z. B. TurboVap® LV Zymark² oder vergleichbar.

6.18 Membranfilter für wässrige Lösungen (Porengröße 0,45 µm).

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

6.19.1 HPLC-Pumpe.

6.19.2 Injektionssystem.

6.19.3 HPLC-Trennsäule, z. B. Octadecylsilan (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.

6.19.4 Thermostatisierbarer Säulenofen.

6.19.5 Tandem-Massenspektrometer (MS/MS).

6.19.6 Datenauswertungssystem.

7 Durchführung

7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Probe wird vor der Untersuchung auf eine Partikelgröße von unter 1 mm gemahlen und homogenisiert.

7.2 Vorbereitung der Festphasensäule

42 g Aktivkohle (5.7) werden mit 30 g neutralem Al₂O₃ (5.8) und 18 g Celite 545 (5.9) in einem Glasgefäß (500 ml) gemischt (Mischungsverhältnis 7 : 5 : 3 Aktivkohle/neutrales Al₂O₃/Celite 545; *m/m/m*) und in einem Schüttler (6.13) 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 handelsübliche SPE-Säulen eingesetzt werden. Aus diesem Grund muss das Reinigungsverfahren bezüglich der Wiederfindung überprüft und, falls erforderlich, optimiert werden [7].

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

25,0 g der homogenisierten und fein gemahlenen Probe (7.1) werden in ein 250-ml-Becherglas/Erlenmeyerkolben oder in ein 250-ml-Zentrifugenröhrchen (6.7) auf 0,1 g eingewogen und 100 ml Extraktionsgemisch (5.4) hinzugefügt und das Gefäß wird verschlossen. Das Gemisch wird mit der Hand oder in einem Schüttler (6.13) 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Alternativ wird für die Extraktion ein Labormixer (6.14) eingesetzt. In diesem Fall wird das Gemisch 3 min bei hoher Geschwindigkeit homogenisiert.

Nach der Extraktion werden etwas mehr als 10 ml Extrakt über ein Faltenfilter (6.9) in ein Glasgefäß filtriert. Diese Menge wird 10 min bei Raumtemperatur bei $2\,500 \times g$ zentrifugiert. 10 ml der überstehenden Lösung des Zentrifugates werden entnommen.

Wenn stark quellende Lebensmittel-Matrices untersucht werden, wird der Wassergehalt im Extraktionsmedium auf bis zu 200 % erhöht oder alternativ die Probeneinwaage auf bis zu 50 % der beschriebenen Menge reduziert. Um ein Verklumpen des aufquellenden Materials zu verhindern, wird eine der Probenmasse entsprechende Menge an z. B. Seesand (5.16) hinzugefügt.

Änderungen bezüglich Volumen und/oder Masse werden bei der abschließenden Berechnung berücksichtigt.

7.4 Reinigung mit Festphasenfiltration

Die vorbereitete Säule, die 0,5 g Aktivkohle/ Al_2O_3 /Celite (7.2) enthält, wird auf eine SPE-Station (6.12) aufgesetzt und zum Auffangen des Eluats wird ein Reagenzglas (6.15) untergestellt. 5,0 ml Extrakt (7.3) werden auf die SPE-Säule gegeben und das Eluat wird aufgefangen. Hierbei wird ein leichtes Vakuum angelegt, sodass eine Elutionsgeschwindigkeit von 1 Tropfen bis 2 Tropfen je s erreicht wird. Die Kartusche wird zweimal mit 5 ml Extraktionsgemisch (5.4) gewaschen und die Eluate werden in demselben Reagenzglas aufgefangen.

25 µl gemischte interne Standardlösung (5.22) werden zu den vereinigten Eluaten gegeben und unter Stickstoff (5.6) unter Verwendung einer Eindampfstation (30 min bei 45 °C und einem Gasdruck von 10 psi) bis zur Trockene eingengt.

Der Rückstand wird mit 500 µl Lösemittelgemisch (5.3) unter kräftigem Schütteln für 60 s (6.4) erneut gelöst, falls erforderlich, 5 min im Ultraschallbad (6.3) bei Raumtemperatur. Um vorhandene Mikropartikel zu entfernen, sollte die Lösung durch Spritzenfilter (6.8) oder Zentrifugenfilter (0,45 µm, 0,5 ml) bei mindestens 10 000 g filtriert werden, was die Injektionslösung ergibt.

Falls erforderlich darf die Probenreinigung unterbrochen werden und die Probenextrakte (bis zur Trockene eingengt) bei 4 °C einige Tage und bei –18 °C etwa zwei Wochen ohne Analytverluste gelagert werden.

Wenn der Rückstandsgehalt den Kalibrierbereich übersteigt, sollte der Rückstand in mehr als 500 µl Lösemittelgemisch gelöst werden.

7.5 Bestimmung mit LC-MS/MS

Je nach LC-MS/MS-System werden 10 µl bis 25 µl Injektionslösung nach 7.4 injiziert.

Durch Einmessen der Analyten und Optimierung der Trenn- und Detektionsparameter wird ein geeignetes Messsystem eingerichtet. Anhang A führt einige Beispielchromatogramme in Bild A.1 bis Bild A.4 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 Produkt-Ionen

Analyt	Mindest-Signal-Rausch-Verhältnis für die Quantifizierungsspur	Mindest-Signal-Rausch-Verhältnis für die Bestätigungsspur
T-2-Toxin	50 : 1 bei 250 pg ^a	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
^a 250 pg ist die berechnete absolute Masse des Analyten, die direkt auf die Säule injiziert wird. Das Signal ist die Peakhöhe und das Rauschen ist das Basislinienrauschen wie im extrahierten Ionenchromatogramm beobachtet.		

7.6 Identifizierung

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

8 Auswertung

Bei der Quantifizierung von T-2-Toxin und HT-2-Toxin wird der entsprechende isotonenmarkierte Standard als interner Standard verwendet. Eine Mehrpunkt-Kalibrierung wird mit einer Standardlösung, z. B. nach 5.23, Tabelle 1, durchgeführt.

Für die lineare Regression wird das Peakflächenverhältnis jedes Analyten gegen das entsprechende Konzentrationsverhältnis aufgetragen. Die Massenkonzentration jedes Toxins in der Injektionslösung wird aus der linearen Regression, in ng/ml, abgeleitet, siehe Gleichung (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 (5.23);
- A_{IS} die Peakfläche des internen Standards in der Kalibrierlösung (5.23);
- a_{Cal} die Steigung der mit den Kalibrierlösungen (5.23) bestimmten Kalibriergerade;
- ρ_a die Massenkonzentrationen der Analyte in den Kalibrierlösungen (5.23), in ng/ml;
- ρ_{IS} die Konzentration des internen Standards in der Kalibrierlösung (5.23), in ng/ml, üblicherweise 50 ng/ml;
- b_{Cal} der mit den Kalibrierlösungen (5.23) bestimmte Achsenschnittpunkt der Kalibriergerade.

Die Massenkonzentration des Analyten in der Probenmesslösung ρ_a^s , in ng/ml, wird mit Gleichung (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 Analyten in der Probenmesslösung;

A_{IS}^s die Fläche (Response) des internen Standards in der Probenmesslösung;

ρ_{IS}^s die Massenkonzentration des internen Standards in der Probenmesslösung von 50 ng/ml.

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

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

Dabei ist

V_{ex} das Volumen der Extraktionslösung, in ml, hier 100 ml;

V_{im} das zum erneuten Lösen der eingeeengten Probe verwendete Volumen des Lösemittelgemisches, in ml, hier 0,5 ml;

m_s die Masse der Einwaage, in g, hier 25 g;

$V_{Aliquot}$ der aliquote Anteil des Probenextraktes, in ml, hier 5 ml.

9 Präzision

9.1 Allgemeines

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

9.2 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.

9.3 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 — Präzisionsdaten 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 — Präzisionsdaten 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 ± 2,20	2,39	2,63

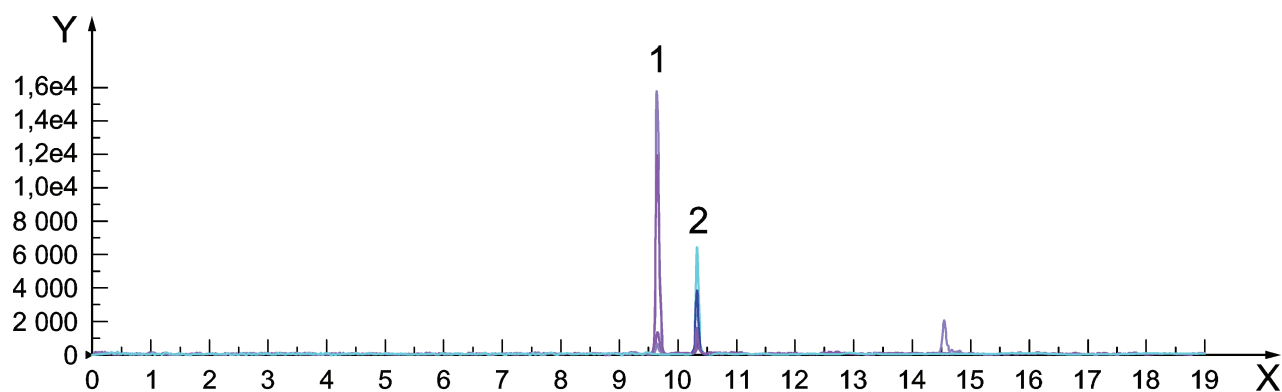
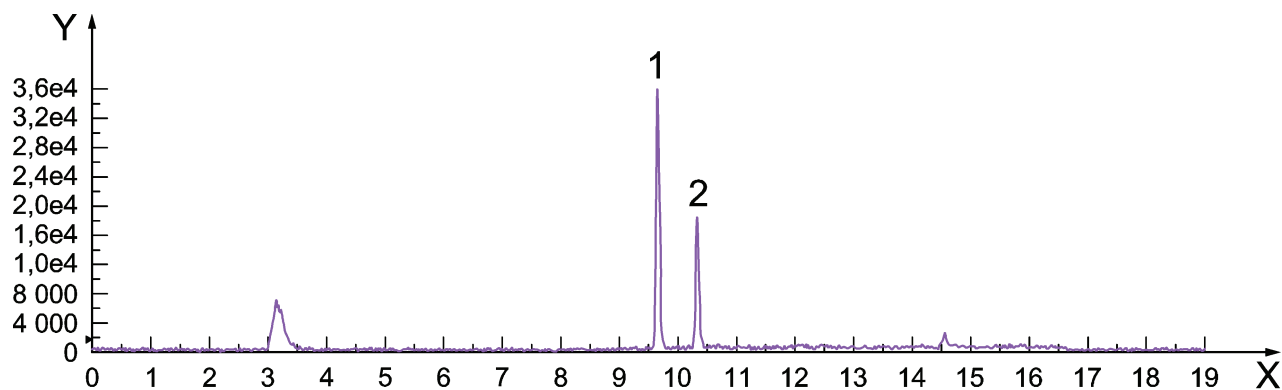
10 Prüfbericht

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

- alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe (Art, Herkunft, Bezeichnung der Probe);
- eine Verweisung auf dieses Dokument;
- das Datum der Probenahme und die Art des Probenahmeverfahrens (wenn bekannt);
- das Datum des Probeneinganges;
- das Datum der Untersuchung;
- die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- alle Besonderheiten, die während der Untersuchung festgestellt wurden;
- alle Arbeitsschritte, die nicht in diesem Verfahren festgelegt sind oder als wahlfrei angesehen wurden und die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben.

Anhang A
(informativ)

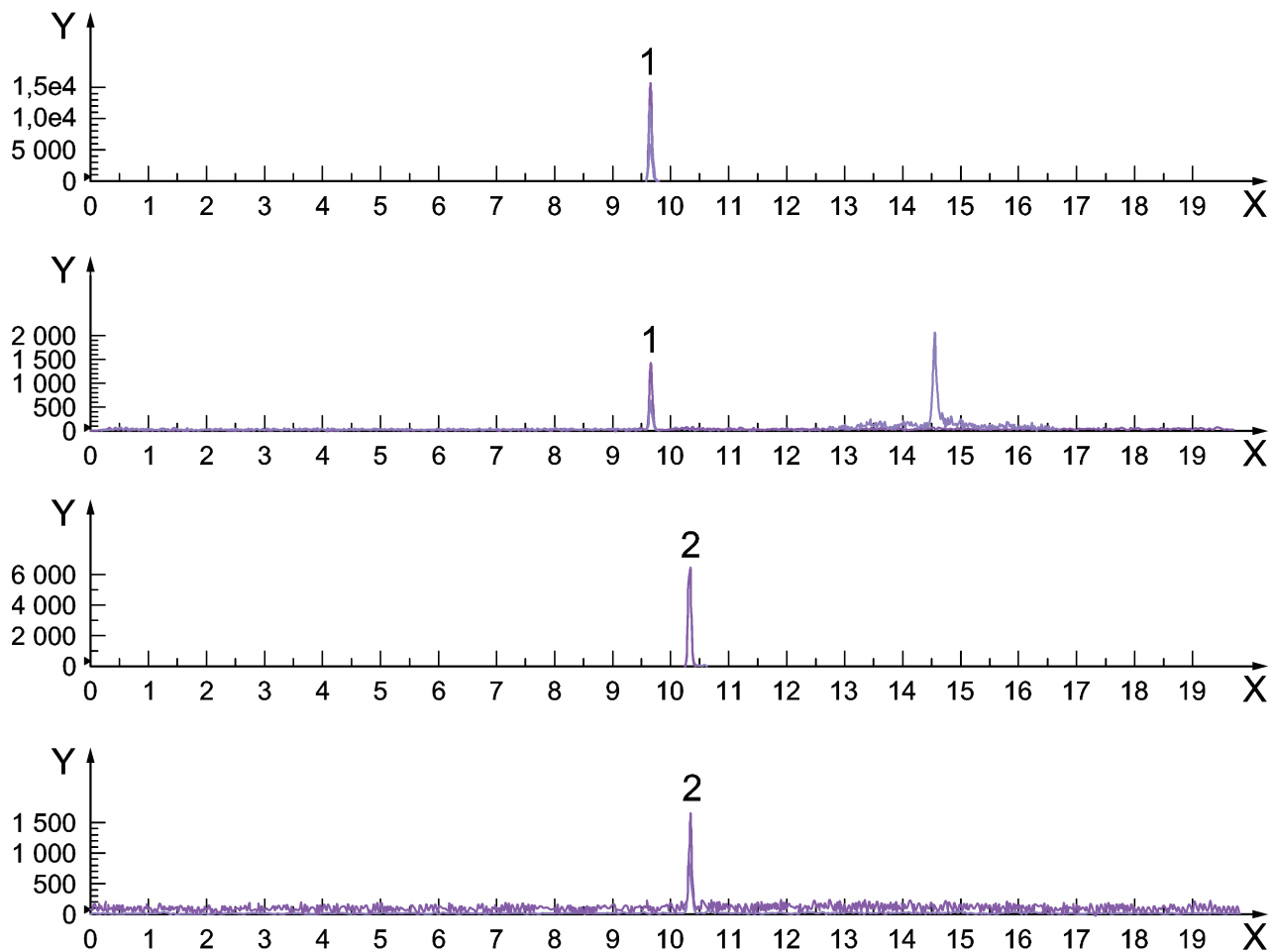
Beispielchromatogramme (API 4000™)



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

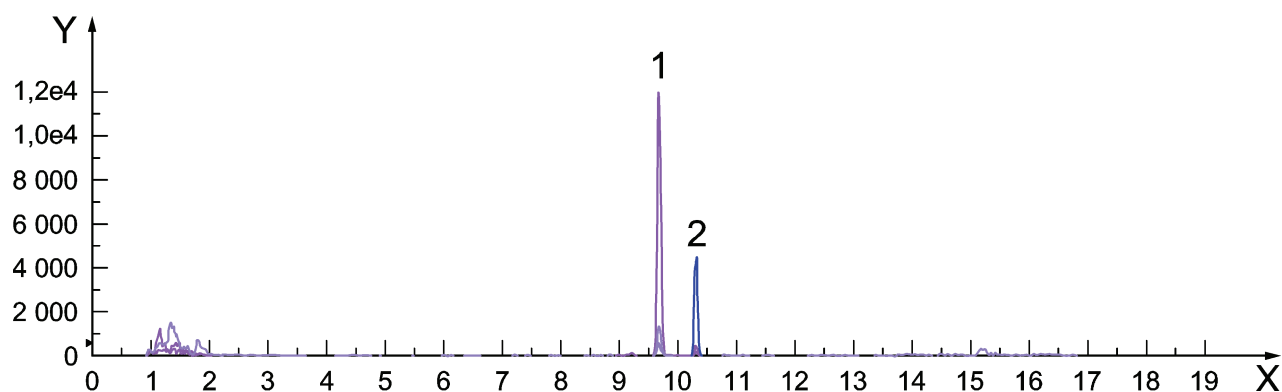
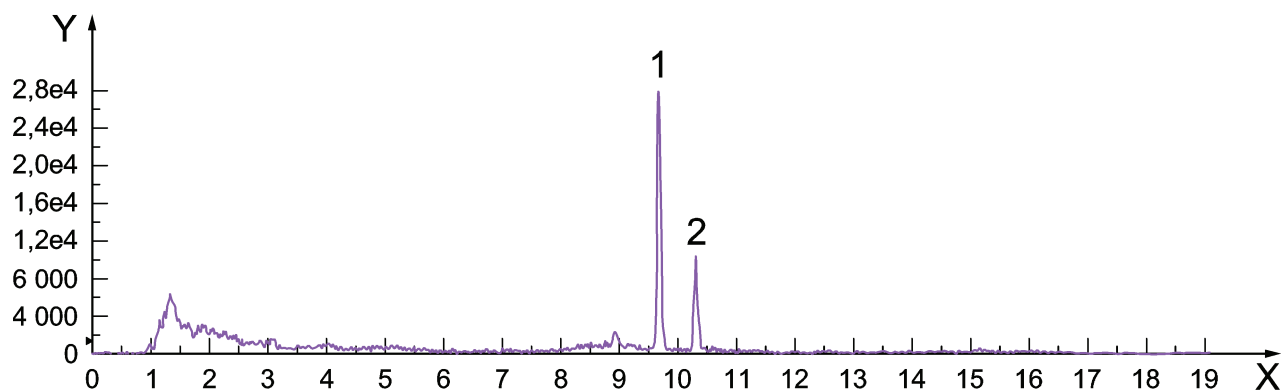
Bild A.1 — Totalionenchromatogramm und extrahiertes Ionenchromatogramm einer Standardlösung (20 ng/ml)



Legende

- X Zeit, in min
Y Intensität, in Zählimpulse je s
1 HT-2-Toxin bei 9,65 min
2 T-2-Toxin bei 10,34 min

Bild A.2 — Einzelionen-Reaktionschromatogramm einer Standardlösung (20 ng/ml)



Legende

- X Zeit, in min
Y Intensität, in Zählimpulse je s
1 HT-2-Toxin bei etwa 9,6 min, Massenanteil etwa 9,6 µg/kg
2 T-2-Toxin bei etwa 10,3 min, Massenanteil etwa 4,2 µg/kg

Bild A.3 — Totalionenchromatogramm und extrahiertes Ionenchromatogramm einer Hafermehlprobe