

DIN EN 16924

ICS 67.200.10

Einsprüche bis 2015-12-23

Entwurf**Lebensmittel –****Bestimmung von Zearalenon in pflanzlichen Speiseölen mit LC-FLD oder LC-MS/MS;****Deutsche und Englische Fassung prEN 16924:2015**

Foodstuffs –

Determination of zearalenone in edible vegetable oils by LC-FLD or LC-MS/MS;

German and English version prEN 16924:2015

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 61 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16924:2015) 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 16924 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 Zearalenon in pflanzlichen Speiseölen mit LC-FLD oder LC-MS/MS

Élément introductif — Élément central — Élément complémentaire

Foodstuffs — Determination of zearalenone in edible vegetable oils by LC-FLD or LC-MS/MS

ICS:

Deskriptoren

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

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Kurzbeschreibung	5
4 Chemikalien.....	5
5 Geräte und Ausrüstung.....	9
6 Durchführung.....	11
7 Auswertung.....	13
8 Präzision	15
9 Untersuchungsbericht.....	16
Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme	17
Anhang B (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	24
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten.....	28
Literaturhinweise.....	31

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16924:2015) 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 Zearalenon ist ein Resorcylsäure-Derivat, das von einigen Arten der Schimmelpilzgattung *Fusarium*, vor allem von *Fusarium roseum* var. *graminearum* gebildet wird. Vor allem werden Getreidearten wie Mais und Weizen befallen, so dass Zearalenon auch in den aus ihnen hergestellten Ölen nachgewiesen werden kann.

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 — Von Zearalenon sind starke östrogene Wirkungen bekannt.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm beschreibt ein Verfahren für die Bestimmung des Zearalenongehalts in pflanzlichen Speiseölen, insbesondere in Maiskeimöl, mit einem der beiden folgenden Verfahren: Hochleistungsflüssigchromatographie mit Fluoreszenzdetektion (LC-FLD) oder Hochleistungsflüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) nach basischer Extraktion des verdünnten Öles.

Das Verfahren wurde für Zearalenon in natürlich kontaminiertem Maiskeimöl bei Konzentrationen von 61,2 µg/kg bis 515 µg/kg validiert [5].

Laboruntersuchungen [6] haben gezeigt, dass das Verfahren auch für weitere pflanzliche Öle, wie z. B. Weizenkeimöl (n = 4), Sonnenblumenöl (n = 5), Kürbiskernöl (n = 1), Sojaöl (n = 5), Hanfsamenöl (n = 5), Rapsöl (n = 11) sowie Pflanzenölmischungen (n = 3), die Maiskeimöle enthalten, anwendbar ist. Jedoch können Proben gelegentlich zu Interferenzen in den FLD-Chromatogrammen führen. In diesem Fall wird die Detektion mit MS/MS empfohlen.

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

Nach dem Verdünnen des Speiseöles mit dem Verdünnungslösemittel wird Zearalenon durch Schütteln mit einem alkalischen Gemisch aus Methanol und Ammoniumhydrogencarbonat extrahiert.

Bei der Bestimmung mit LC-FLD wird ein Aliquot des zentrifugierten methanolisch-alkalischen Extraktes bis zur Trockne eingengt, anschließend wird der Rückstand in angesäuertem LC-Elutionsmittel aufgenommen und der Zearalenongehalt wird mit LC-FLD bestimmt.

Bei der Bestimmung mit LC-MS/MS wird ein Aliquot des zentrifugierten methanolisch-alkalischen Extraktes direkt für die Analyse verwendet.

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 LC-Analyse sein.

4.1 Methanol, analysenrein (p. a.) für die Extraktion

4.2 Verdünnungslösemittel (n-Hexan oder alternativ n-Heptan), analysenrein (p. a.)

n-Heptan darf anstelle von n-Hexan verwendet werden, jedoch wurde lediglich n-Hexan im Ringversuch eingesetzt.

4.3 Acetonitril, LC-Reinheitsgrad

4.4 Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)

4.5 Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung, Massenkonzentration $\rho = 10 \text{ g/l}$

1 g Ammoniumhydrogencarbonat (4.4) wird in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und der Kolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird analysentäglich frisch hergestellt.

4.6 Alkalische Methanol-Extraktionslösung

9 Volumenteile Methanol (4.1) werden mit 1 Volumenteil Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (4.5) gemischt. Die alkalische Methanol-Extraktionslösung wird analysentäglich frisch hergestellt.

4.7 Zearalenon, CAS-Nr. 17924-92-4, z. B. kristallin, als ein Film oder als zertifizierte Standardlösung mit $100 \mu\text{g/ml}$

4.8 Zearalenon-Stammlösung, Massenkonzentration $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$

10 mg kristallines Zearalenon (4.7) werden auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und der Kolben wird mit Acetonitril (4.3) bis zur Marke aufgefüllt. Alternativ wird der gesamte Inhalt des Standardfläschchens, das Zearalenon als einen Film enthält, mit Acetonitril quantitativ in einen 100-ml-Messkolben überführt. Die Stammlösung ist für mindestens 4 Wochen bis 12 Wochen stabil, wenn sie bei $< -18^\circ\text{C}$ tiefgefroren ist [7].

Dieser Arbeitsschritt kann entfallen, sofern die zertifizierte Standardlösung verwendet wird. Die zertifizierte Standardlösung dient dann als Stammlösung.

4.9 Zearalenon-Standardlösung, Massenkonzentration $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$, und Bestimmung der Konzentration

1 ml Stammlösung (4.8) wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und der Kolben wird mit Acetonitril (4.3) bis zur Marke aufgefüllt. Die genaue Konzentration von Zearalenon in dieser Standardlösung wird spektralphotometrisch bestimmt.

Dazu wird die Absorptionskurve der Standardlösung zwischen 190 nm und 350 nm gegen Acetonitril aufgezeichnet. Zur Überprüfung der Konzentration der Zearalenon-Stammlösung wird die Massenkonzentration von Zearalenon in der Standardlösung ρ_{st} in $\mu\text{g/ml}$, nach Formel (1) berechnet:

$$\rho_{\text{st}} = \frac{E_{\text{max}} \cdot M \cdot 100}{\delta \cdot \varepsilon} \quad (1)$$

Dabei ist

E_{max} der aus der Absorptionskurve (hier: 274 nm) bestimmte maximale Extinktionswert;

ε der molare Extinktionskoeffizient in Acetonitril: $1\,262,3 \text{ m}^2/\text{mol}$;

M die Molekülmasse von Zearalenon = $318,4 \text{ g/mol}$;

δ die Schichtdicke der Küvette, in cm.

4.10 Chemikalien, mobile Phasen und Kalibrierlösungen für die LC-FLD-Analyse

4.10.1 Eisessig für LC-FLD, Volumenanteil φ (CH_3COOH) etwa 99 %

4.10.2 Mobile Phase A für LC-FLD: Acetonitril/Wasser/Eisessig (47+52+1, v+v+v)

47 Volumina Acetonitril (4.3) werden mit 52 Volumenteile Wasser und 1 Volumen Eisessig (4.10.1) gemischt.

Für die Stabilität der chromatographischen Trennung ist es notwendig, die mobile Phase anzusäuern.

4.10.3 Mobile Phase B für LC-FLD: Acetonitril (100 %) (4.3)

4.10.4 Zearalenon-Kalibrierlösungen für LC-FLD

Aus der Zearalenon-Standardlösung (4.9) wird eine Kalibrierreihe erstellt. Hierfür werden nach dem Pipettierschema in Tabelle 1 die entsprechenden Volumina der Standardlösung in Messkolben pipettiert, das Lösemittel wird mit Stickstoff bei etwa 40 °C bis zu Trockene eingengt und der Rückstand wird bei Raumtemperatur in der mobilen Phase A (4.10.2) mit einem Laborschüttler (5.4) oder einem Ultraschallbad (5.3) gelöst. Anschließend wird der Kolben bis zur Marke aufgefüllt. Der Kalibrierbereich muss an den gewünschten Arbeitsbereich angepasst werden. Die Kalibrierlösungen können in einem Kühlschrank bei 4 °C etwa 1 Monat aufbewahrt werden.

Tabelle 1 — Beispiele für geeignete Kalibrierlösungen für LC-FLD

Kalibrierlösung	Volumen des Messkolbens ml	Volumen der Standardlösung (4.9) µl	Massenkonzentration der Kalibrierlösung ng/ml
1	10	25	25
2	10	50	50
3	10	100	100
4	10	150	150
5	10	200	200
6	10	250	250

4.11 Chemikalien, mobile Phasen und zusätzliche Vergleichssubstanzen sowie Standardlösungen für die LC-MS/MS-Analyse

4.11.1 Methanol, LC-Reinheitsgrad

4.11.2 Ammoniumhydrogencarbonat (NH₄HCO₃), für LC-MS, Molekülmasse: 79 g/mol

4.11.3 Mobile Phase A für LC-MS/MS: 1 mmol/l NH₄HCO₃ in Wasser/Methanol (95+5, v+v)

79 mg Ammoniumhydrogencarbonat (4.11.2) werden in 950 ml Wasser gelöst und mit 50 ml Methanol (4.11.1) gemischt.

4.11.4 Mobile Phase B für LC-MS/MS: 1 mmol/l NH₄HCO₃ in Wasser/Methanol (5+95, v+v)

79 mg Ammoniumhydrogencarbonat (4.11.2) werden in 50 ml Wasser gelöst und mit 950 ml Methanol (4.11.1) gemischt.

4.11.5 Zearalenon-Arbeitslösung für die Kalibrierung, $\rho = 200$ ng/ml

0,5 ml der Standardlösung (4.9) werden in einen 25-ml-Messkolben überführt und der Kolben wird bis zur Marke mit Methanol (4.11.1) aufgefüllt.

4.11.6 Interner Zearalanon-Standard (ISTD 1), CAS-Nr. 5975-78-0 für LC-MS/MS, z. B. kristallin oder als zertifizierte Standardlösung mit 10 µg/ml

4.11.7 Isotopenmarkierter interner Zearalenon-Standard (ISTD 2), für LC-MS/MS, als optionaler Standard, z. B. Zearalenon ^{13}C -markiert (vollständig)

4.11.8 Zearalanon-Stammlösung (ISTD 1), $\rho = 100$ µg/ml

10 mg Zearalanon (ISTD 1) (4.11.6) werden auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und der Kolben wird mit Acetonitril (4.3) bis zur Marke aufgefüllt. Alternativ wird der gesamte Inhalt des Standardfläschchens, das Zearalanon (ISTD 1) als einen Film enthält, mit Acetonitril (4.3) quantitativ in einen 100-ml-Messkolben überführt.

Die ISTD 1-Stammlösung ist tiefgekühlt bei < -18 °C mindestens 4 Wochen bis 12 Wochen stabil [7].

4.11.9 Interne Zearalanon-Standardlösung (ISTD 1), $\rho = 10$ µg/ml

1 ml Zearalanon-Stammlösung (4.11.8) wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und der Kolben wird mit Methanol (4.11.1) bis zur Marke aufgefüllt.

4.11.10 Arbeitslösung des internen Zearalanon-Standards (ISTD 1) für die Kalibrierung, $\rho = 200$ ng/ml

0,5 ml der internen Zearalanon-Standardlösung (ISTD 1) (4.11.9) werden in einen 25-ml-Messkolben überführt und der Kolben wird bis zur Marke mit Methanol (4.11.1) aufgefüllt.

Jedoch ist es auch möglich, isotopenmarkiertes Zearalanon wie in ISTD 2 (4.11.7) anstelle Zearalenon ISTD 1 zu verwenden, das in den meisten Fällen ausreicht.

4.11.11 Kalibrierlösungen mit Zearalenon und Zearalanon (ISTD 1) für LC-MS/MS

Aus den Zearalenon-Arbeitslösungen (4.11.5) und Zearalanon (ISTD 1) (4.11.10) wird eine Kalibrierreihe erstellt. Hierzu werden die entsprechenden Volumina der Arbeitslösungen in ein LC-Fläschchen pipettiert, das Lösemittel wird mit Stickstoff bei etwa 40 °C bis zu Trockene eingengt und der Rückstand wird in der alkalischen Methanol-Extraktionslösung (4.6) gelöst.

Die Massenkonzentration der ISTD und der Kalibrierbereich müssen an den gewünschten Arbeitsbereich angepasst werden. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte, kann die Kalibrierung entsprechend den Angaben in Tabelle 2 durchgeführt werden. Die Kalibrierlösungen können in einem Kühlschrank bei 4 °C etwa 1 Monat aufbewahrt werden.

Tabelle 2 — Beispiele für geeignete Kalibrierlösungen für LC-MS/MS

Kalibrierlösung	Volumen der Arbeitslösungen (200 ng/ml)		Endvolumen ml	Massenkonzentration der Kalibrierlösung ng/ml	
	Zearalenon (4.11.5) µl	ISTD 1 Zearalanon (4.11.10) µl		Zearalenon	ISTD 1 Zearalanon
1	25	100	1	5	20
2	50	100	1	10	20
3	100	100	1	20	20
4	150	100	1	30	20
5	200	100	1	40	20
6	250	100	1	50	20

Um die möglichen gegenseitigen Interferenzen von Zearalenon und Zearalanon (ISTD 1) bei den ausgewählten Messbedingungen zu überprüfen, werden ein Kalibrierstandard nur mit der höchsten Konzentration von Zearalenon und ein Kalibrierstandard nur mit Zearalanon hergestellt.

5 Geräte und Ausrüstung

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 2 ml

5.6 Dosierer, geeignet für 20 ml

5.7 Lösemittelverdampfer mit Heizmodul

5.8 Zentrifuge, geeignet für 3 000 g¹⁾

5.10 Mikrozentrifuge, geeignet für 14 000 g

5.10 Zentrifugenröhrchen, 50 ml, hergestellt aus Polypropylen mit Schraubkappe

5.11 LC-Fläschchen

¹⁾ $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$

5.12 UV-Spektrometer mit Quarzküvette

5.13 LC-FLD-System bestehend aus:

5.13.1 LC-System, einschließlich

5.13.2 LC-Pumpe, geeignet für die Gradientenelution

5.13.3 Injektionssystem

5.13.4 Säulenofen

5.13.5 Fluoreszenzdetektor, mit variablen Wellenlängen

5.13.6 Datenauswertungssystem

5.13.7 LC-Trennsäule, z. B. LiChroCART® 250-4 gefüllt mit LiChrospher®²⁾ 100 RP-18, 250 mm × 4 mm, Partikelgröße 5 µm und entsprechende Vorsäule

5.14 LC-MS/MS-System bestehend aus:

5.14.1 LC-System, einschließlich

5.14.2 LC-Pumpe, geeignet für die Gradientenelution

5.14.3 Injektionssystem

5.14.4 Säulenofen

5.14.5 Datenauswertungssystem

5.14.6 LC-Trennsäule, geeignet für die Chromatographie unter alkalischen Bedingungen, z. B. XBridge®²⁾C18 oder Shield RP18, 100 mm × 3 mm, Partikelgröße 3,5 µm, oder Gemini®²⁾ C18, 150 mm × 3 mm, Partikelgröße 5 µm und entsprechende Vorsäule

5.14.7 Tandem-Massenspektrometer (MS/MS)

Interface: Elektrosprayionisation (ESI, en: electrospray ionization)

Ionenmodus: Multiples Reaktionsmonitoring (en: multiple reaction monitoring, MRM)

²⁾ LiChroCART® 250-4 gefüllt mit LiChrospher® sind Herstellerbezeichnungen der von Merck gelieferten Produkte. XBridge® ist ein Herstellername eines von Waters gelieferten Produktes. Gemini® ist ein Herstellername eines von Phenomenex gelieferten Produktes. 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 Durchführung

6.1 Extraktion von Zearalenon aus der Probe

6.1.1 Allgemeines

2 g Probe werden in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (5.10) auf 0,01 g eingewogen und mit 2,0 ml Verdünnungslösemittel (4.2) und 20 ml alkalischer Methanol-Extraktionslösung (4.6) versetzt.

Wird die Probe mit LC-MS/MS gemessen, werden 40 µl interne Zearalanon-Standardlösung (ISTD 1) (4.11.9) zur Probe hinzugegeben (entspricht einem Massenanteil von 200 µg/kg Zearalanon in der Probe).

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate werden vor der Verdünnung 40 µl Zearalenon-Standardlösung (4.9) zur Probe hinzugefügt (entspricht einem Massenanteil von 200 µg/kg Zearalenon in der Probe) und die Lösung wird bei Raumtemperatur etwa 5 min stehengelassen.

Das Gemisch wird etwa 20 min mit einem Laborschüttler (5.4) extrahiert und zur Phasentrennung wird 10 min bei etwa 3 000 g zentrifugiert.

6.1.2 Vorbereitung für LC-FLD

5,0 ml des klaren, alkalischen Methanol-Überstandes des Extraktes werden bei 40 °C bis zur Trockne eingengt und in 1,0 ml mobiler Phase A (4.10.2) aufgenommen.

Der Rückstand wird in einem Ultraschallbad gelöst. Falls erforderlich, wird die Probenlösung nochmals in einer Mikrozentrifuge (5.9) 2 min bei 14 000 g zentrifugiert und in ein LC-Fläschchen überführt.

6.1.3 Vorbereitung für LC-MS/MS

Ein Aliquot des klaren, alkalischen Methanol-Überstandes wird in ein LC-Fläschchen überführt.

Werden weitere Verdünnungen des Extraktes hergestellt, um beispielsweise die Verwendung von isotonen-markiertem Zearalenon, wie z. B. ISTD 2 (4.11.7), zur Berücksichtigung des Matrixeffektes zu ermöglichen, muss der Methanolgehalt im verdünnten Extrakt noch 90 % betragen.

6.2 LC-FLD-Analyse

Eine geeignete Menge der Probenmesslösung wird in das LC-FLD-System injiziert.

Bei Verwendung der unter 5.14.7 festgelegten Trennsäule werden die folgenden Parameter und das Gradientenprogramm nach Tabelle 3 empfohlen:

Durchflussrate:	0,9 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl bis 50 µl
Säulentemperatur:	30 °C
Anregungswellenlänge:	274 nm
Emissionswellenlänge:	446 nm
Gradient:	siehe Tabelle 3

Tabelle 3 — Beispiel eines Gradientenprogramms

Zeit min	Prozentualer Anteil der mobilen Phase A (4.10.2) %	Prozentualer Anteil der mobilen Phase B (4.10.3) %
0	100	0
17	100	0
20	20	80
27	20	80
30	100	0
40	100	0

Die in Tabelle 3 aufgeführten LC-Parameter werden als Richtwerte angesehen. Abhängig von der verwendeten Trennsäule (RP-18-Säulenpackung, verschiedene Säulenmaße) sollte das Elutionsmittelverhältnis und/oder der Durchfluss so angepasst werden, dass die beste Trennung zwischen dem Analyten und den anderen Extraktbestandteilen der Matrix erreicht wird. Beispielchromatogramme sind in Anhang A dargestellt.

Falls Schwierigkeiten (z. B. chromatographische Interferenzen) während der Analyse auftreten, wird empfohlen, die LC-MS/MS für den Nachweis- und Bestätigungsschritt anzuwenden.

6.3 LC-MS/MS-Analyse

Eine geeignete Menge der Probenmesslösung wird in das LC-MS/MS-System injiziert.

Die Parameter für die Trennung und den Nachweis für die Bestimmung der Analyten müssen für jedes Messsystem optimiert werden. Geeignete Beispielsysteme sind in Anhang B angegeben.

Bei Verwendung der unter 5.15.6 festgelegten Trennsäule und der in 4.11 festgelegten mobilen Phasen hat sich gezeigt, dass die folgenden Parameter für die LC geeignet sind:

Durchfluss: 0,5 ml/min
Ofentemperatur: 35 °C
Injektionsvolumen: 5 µl
Gradient: siehe Tabelle 4

Tabelle 4 — Beispiel eines Gradientenprogramms

Zeit (min)	Prozentualer Anteil der mobilen Phase A (4.11.3) %	Prozentualer Anteil der mobilen Phase B (4.11.4) %
0	70	30
10	20	80
13	5	95
18	5	95
19	70	30
25	70	30

Zearalenon und Zearalanon (ISTD 1) können sowohl mit positiver Ionisierung als auch mit negativer Ionisierung gemessen werden. Die besten Messbedingungen für die Quantifizierung und Qualifizierung müssen deshalb abhängig von der jeweiligen Konfiguration des Gerätes bestimmt werden. Der Massenübergang mit dem größten Signal-Rausch-Verhältnis muss als Quantifier ausgewählt werden.

Die messtechnischen und chromatographischen Bedingungen müssen so ausgewählt werden, dass das Zearalanon (ISTD 1) kein störendes Signal bei Zearalenon erzeugt.

Beispielchromatogramme sind in Anhang A (erfasst mit den Geräteeinstellungen nach B.2) dargestellt.

7 Auswertung

7.1 Allgemeines

Zearalenon wird durch Vergleich der Retentionszeiten der Kalibrierlösungen mit denen der Probenmesslösung identifiziert.

Eine Mehrpunkt-Kalibrierung wird mit den Kalibrierlösungen, z. B. nach 4.10.4, Tabelle 1, und 4.11.11, Tabelle 2, durchgeführt.

7.2 Berechnung mit externem Standard (FLD-Messung)

Der Massenanteil, w , von Zearalenon in der Probe, angegeben in $\mu\text{g}/\text{kg}$, wird nach externem Standard nach Formel (2) berechnet:

$$w = \frac{\rho \cdot V_e \cdot V_{\text{final}}}{m_s \cdot V_c} \quad (2)$$

Dabei ist

ρ die mit der linearen Regression berechnete Massenkonzentration von Zearalenon in der Injektionslösung, in ng/ml ;

V_e das Extraktionsvolumen, in ml (hier: 20,0 ml);

V_{final} das Volumen, auf das der Rückstand nach dem Einengen aufgefüllt wird, in ml (hier: 1,0 ml);

m_s die Masse der Einwaage, in g (hier: 2,0 g);

V_c das Volumen des eingeeengten Extraktes, in ml (hier: 5,0 ml).

7.3 Berechnung mit externem Standard (LC-MS/MS-Messung)

Der Massenanteil, w , von Zearalenon in der Probe, angegeben in $\mu\text{g/kg}$, wird nach externem Standard nach Formel (3) berechnet:

$$w = \frac{\rho \cdot V_e}{m_s} \quad (3)$$

Dabei ist

ρ die mit der linearen Regression berechnete Massenkonzentration von Zearalenon in der Injektionslösung, in ng/ml ;

V_e das Extraktionsvolumen, in ml (hier: 20,0 ml);

m_s die Masse der Einwaage, in g (hier: 2,0 g);

7.4 Berechnung mit dem internen Zearalanon-Standard (ISTD 1)

Eine Mehrpunkt-Kalibrierung wird mit den Kalibrierlösungen, z. B. nach 4.11.11, Tabelle 2, durchgeführt.

Für die lineare Regression wird das Peakflächenverhältnis des Analyten gegen das entsprechende Konzentrationsverhältnis aufgetragen. Die Massenkonzentration von Zearalenon in der Injektionslösung wird aus der linearen Regression, in ng/ml , abgeleitet, siehe Formel (4).

$$\frac{A_a}{A_{\text{ISTD}}} = a_{\text{Cal}} \frac{\rho_a}{\rho_{\text{ISTD}}} + b_{\text{Cal}} \quad (4)$$

Dabei ist

A_a die Peakfläche des Analyten in der Kalibrierlösung (4.11.11);

A_{ISTD} die Peakfläche des internen Standards in der Kalibrierlösung (4.11.11);

ρ_a die Massenkonzentrationen des Analyten in den Kalibrierlösungen (4.11.11), in ng/ml ;

ρ_{ISTD} die Massenkonzentration des internen Standards in der Kalibrierlösung (4.11.11), in ng/ml ;

a_{Cal} die Steigung der mit den Kalibrierlösungen (4.11.11) bestimmten Kalibrierung;

b_{Cal} der mit den Kalibrierlösungen (4.11.11) bestimmte Achsenschnittpunkt der Kalibrierung.

Die Massenkonzentration des Analyten in der Probenmesslösung ρ_a^s , in ng/ml , wird mit Formel (5) berechnet:

$$\rho_a^s = \frac{\frac{A_a^s}{A_{\text{ISTD}}^s} - b_{\text{Cal}}}{a_{\text{Cal}}} \rho_{\text{ISTD}}^s \quad (5)$$

Dabei ist

A_a^s die Peakfläche des Analyten in der Probenmesslösung;

- b_{Cal} der mit den Kalibrierlösungen (4.11.11) bestimmte Achsenschnittpunkt der Kalibrierung;
 A_{ISTD}^s die Peakfläche des internen Standards in der Probenmesslösung;
 a_{Cal} der Anstieg der mit den Kalibrierlösungen (4.11.11) bestimmten Kalibrierung;
 ρ_{ISTD}^s die Massenkonzentration des internen Standards in der Probenmesslösung, in ng/ml.

Der Massenanteil des Analyten w_a , in µg/kg, wird mit Formel (6) berechnet:

$$w_a = \frac{\rho_a^s \times V_{\text{ex}}}{m_s} \quad (6)$$

Dabei ist

- ρ_a^s die Massenkonzentration des Analyten in der Probenmesslösung, in ng/ml.
 V_{ex} das Volumen der Extraktionslösung, in ml (hier 20,0 ml);
 m_s die Masse der Einwaage, in g (hier 2,0 g).

8 Präzision

8.1 Allgemeines

Einzelheiten über den Ringversuch zur Präzision des Verfahrens sind in Anhang C zusammengefasst. Die aus diesem Ringversuch abgeleiteten Werte sind möglicherweise nicht auf andere Konzentrationsbereiche und andere Matrices anwendbar, als in Anhang C angegeben.

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 nicht häufiger als in 5 % der Fälle überschreiten.

Die mit LC-FLD detektierten Werte für Maiskeimöl sind:

$$\bar{x} = 60,7 \text{ µg/kg} \quad r = 7,8 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 217 \text{ µg/kg} \quad r = 21,9 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 495 \text{ µg/kg} \quad r = 54,1 \text{ µg/kg}$$

Die mit LC-MS/MS detektierten Werte für Maiskeimöl sind:

$$\bar{x} = 65,3 \text{ µg/kg} \quad r = 7,5 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 222 \text{ µg/kg} \quad r = 39,4 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 540 \text{ µg/kg} \quad r = 86,4 \text{ µg/kg}$$

Die kombinierten Werte für Maiskeimöl (LC-FLD und LC-MS/MS) sind:

$$\bar{x} = 61,2 \text{ µg/kg} \quad r = 7,8 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 216 \text{ µg/kg} \quad r = 30,0 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 515 \text{ µg/kg} \quad r = 70,3 \text{ µg/kg}$$

8.3 Vergleichpräzision

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

Die mit LC-FLD detektierten Werte für Maiskeimöl sind:

$$\bar{x} = 60,7 \text{ µg/kg} \quad R = 20,3 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 217 \text{ µg/kg} \quad R = 106 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 495 \text{ µg/kg} \quad R = 105 \text{ µg/kg}$$

Die mit LC-MS/MS detektierten Werte für Maiskeimöl sind:

$$\bar{x} = 65,3 \text{ µg/kg} \quad R = 31,9 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 222 \text{ µg/kg} \quad R = 64,1 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 540 \text{ µg/kg} \quad R = 162 \text{ µg/kg}$$

Die kombinierten Werte für Maiskeimöl (LC-FLD und LC-MS/MS) sind:

$$\bar{x} = 61,2 \text{ µg/kg} \quad R = 18,2 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 216 \text{ µg/kg} \quad R = 81,3 \text{ µg/kg}$$

$$\bar{x} = 515 \text{ µg/kg} \quad R = 145 \text{ µg/kg}$$

9 Untersuchungsbericht

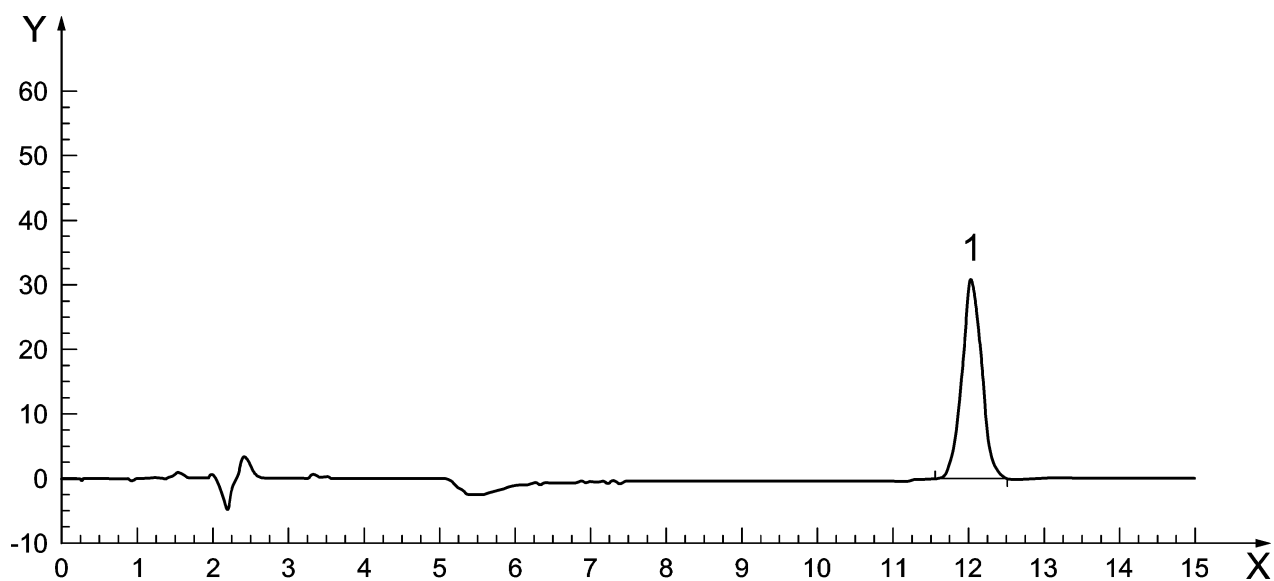
Der Untersuchungsbericht sollte ISO/IEC 17025 entsprechen und muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- 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 für das LC-FLD-Verfahren



Legende

- x Zeit, in Minuten
- y Signal, in Millivolt
- 1 Zearalenon bei $t = 12,052$ min

Bild A.1 — Zearalenon-Standardlösung mit einer Massenkonzentration von 100 ng/ml