

DIN EN 17194

ICS 65.120

Einsprüche bis 2018-01-24

Entwurf

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Multimethode für Mycotoxine in Einzelfuttermitteln und
Mischfuttermitteln mittels LC-MS/MS;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17194:2017**

Animal feeding stuffs –

Methods of sampling and analysis –

Determination of Deoxynivalenol, Aflatoxin B1, Fumonisin B1&B2, T-2 & HT-2 toxins,
Zearalenone and Ochratoxin A in feed materials and compound feed by LC-MS/MS;
German and English version prEN 17194:2017

Aliments des animaux –

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –

Multiméthode pour la détermination par CL-SM/SM, des mycotoxines présentes dans les
matières premières pour aliments et les aliments composés pour animaux;
Version allemande et anglaise prEN 17194:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-11-24 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, 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 70 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17194:2017) wurde von der Arbeitsgruppe 3 „Futterzusatzstoffe und Pharmazeutika“ (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“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

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

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

EN ISO 3696:1995	siehe	DIN ISO 3696:1991-06
ISO 1042	siehe	DIN EN ISO 1042
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 5725-5	siehe	DIN ISO 5725-5

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 1042, *Laborgeräte aus Glas — Meßkolben*

DIN ISO 3696:1991-06, *Wasser für analytische Zwecke; Anforderungen und Prüfungen; Identisch mit ISO 3696:1987*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für 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 — Multimethode für Mycotoxine in Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln mittels LC-MS/MS

Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse — Multiméthode pour la détermination par CL-SM/SM, des mycotoxines présentes dans les matières premières pour aliments et les aliments composés pour animaux

Animal feeding stuffs — Methods of sampling and analysis — Determination of Deoxynivalenol, Aflatoxin B1, Fumonisin B1&B2, T-2 & HT-2 toxins, Zearalenone and Ochratoxin A in feed materials and compound feed by LC-MS/MS

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.8l

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen.....	5
3 Begriffe.....	5
4 Kurzbeschreibung.....	5
5 Reagenzien.....	6
6 Geräte	8
7 Durchführung	9
7.1 Probenvorbereitung.....	9
7.2 Extraktion	10
7.3 Probenmesslösung.....	10
7.4 Aufstockverfahren	11
8 Messungen	11
8.1 Allgemeines	11
8.2 LC-Bedingungen	11
8.3 MS-Bedingungen.....	11
8.4 Chargenabfolge	12
8.5 Identifizierung des Peaks.....	12
8.6 Bestimmung von Mykotoxinen in Kalibrier- und Testlösungen.....	12
8.7 Kalibrierung.....	13
9 Bestimmung des Massenanteils.....	13
10 Präzision.....	14
10.1 Ringversuch.....	14
10.2 Wiederholpräzision.....	14
10.2.1 DON.....	14
10.2.2 AfB1	14
10.2.3 FB1	15
10.2.4 FB2	15
10.2.5 T-2-Toxin.....	15
10.2.6 HT-2-Toxin.....	15
10.2.7 ZON	15
10.2.8 OTA	15
10.3 Vergleichpräzision.....	15
10.3.1 DON.....	15
10.3.2 AfB1	15
10.3.3 FB1	15
10.3.4 FB2	15
10.3.5 T-2-Toxin.....	15
10.3.6 HT-2-Toxin.....	16
10.3.7 ZON	16
10.3.8 OTA	16
11 Untersuchungsbericht.....	16
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	17

Anhang B (informativ) Beispiele	27
B.1 Beispiel 1	27
B.1.1 Allgemeines	27
B.1.2 LC-Bedingungen	27
B.1.3 MS-Bedingungen	28
B.2 Beispiel 2	30
B.2.1 Allgemeines	30
B.2.2 LC-Bedingungen	30
B.2.3 MS-Bedingungen	31
Anhang C (informativ) Beispiel-Chromatogramme	34
Literaturhinweise	36

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17194:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrags erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

WARNUNG — Das in dieser Norm beschriebene Verfahren erfordert den Einsatz gesundheitsgefährdender Reagenzien. Diese Norm beansprucht nicht, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, vor ihrer Anwendung geeignete Maßnahmen für die Sicherheit und den Gesundheitsschutz des Personals zu ergreifen und dafür Sorge zu tragen, dass behördliche und gesetzliche Regelungen eingehalten werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Europäische Normanalyseverfahren ist gültig für die Bestimmung von Deoxynivalenol (DON) im untersuchten Bereich von 96,2 µg/kg bis 3 269 µg/kg, Aflatoxin B1 (AfB1) im untersuchten Bereich von 2,62 µg/kg bis 444 µg/kg, Fumonisin B1 (FB1) im untersuchten Bereich von 693 µg/kg bis 7 529 µg/kg, Fumonisin B2 (FB2) im untersuchten Bereich von 203 µg/kg bis 2 465 µg/kg, T-2-Toxin im untersuchten Bereich von 7,47 µg/kg bis 360 µg/kg und HT-2-Toxin im untersuchten Bereich von 13,9 µg/kg bis 1 758 µg/kg, Zearalenon (ZON) im untersuchten Bereich von 34,3 µg/kg bis 593 µg/kg und Ochratoxin A (OTA) im untersuchten Bereich von 10,8 µg/kg bis 228 µg/kg in Getreide und Getreidemischfuttermittel durch Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Die tatsächlichen Arbeitsbereiche dürfen über die geprüften Bereiche hinausgehen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente 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 Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696:1987)*

3 Begriffe

Es werden keine Begriffe in diesem Dokument angegeben.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

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

4 Kurzbeschreibung

Eine Untersuchungseinheit fein gemahlenen und homogenen Materials wird durch Schütteln mit einem Gemisch aus Acetonitril und wässriger Methansäurelösung extrahiert. Der Extrakt wird zentrifugiert, und ein Aliquot des überstehenden Extrakts wird in eine deaktiviertes Glasfläschchen überführt, mit einer entsprechenden Menge stabiler Isotopen-markierter Analoga gemischt und bis zur Trockenheit verdampft. Die rekonstituierte Probe wird gefiltert und quantitativ mit einem System der Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) bestimmt. Laboratorien, die dieses Verfahren anwenden, müssen die folgenden Quantifizierungsgrenzen (en: limits of quantitation, LOQs) nachweisen, um in der Lage zu sein, dieses Verfahren über den gesamten Validierungsbereich anzuwenden. DON ≤ 100 µg/kg, für AfB1 ≤ 2 µg/kg, für FB1&FB2 ≤ 500 µg/kg (FB1 ≤ 375 µg/kg und FB2 ≤ 125 µg/kg), für T-2 und HT-2-Toxin ist ≤ 10 µg/kg, für ZON ≤ 20 µg/kg und für OTA ≤ 10 µg/kg,

ANMERKUNG Die in dieser Untersuchung erfassten Leistungskennzahlen kamen aus Laboratorien, die die Fähigkeit zur Einhaltung oben genannter LOQs nachgewiesen haben. Bewerber, die dies nicht nachweisen konnten, wurden ausgeschlossen, um sicherzustellen, dass die Validierungsdaten über den vorgegebenen Konzentrationsbereich erfasst werden könnten.

5 Reagenzien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696:1995 verwendet. Kommerziell erhältliche Lösungen mit gleichwertigen Eigenschaften, wie die aufgeführten, dürfen verwendet werden.

WARNUNG — Lösemittelabfälle sind nach geltenden Umweltvorschriften zu entsorgen. Dekontaminationsverfahren für Laborabfälle wurden vom Internationalen Krebsforschungszentrum (en: International Agency for Research on Cancer, IARC) aufgestellt, siehe [1, 2].

5.1 Wasser (deionisiert).

5.2 Wasser, LC-MS-Reinheit oder von vergleichbarem Reinheitsgrad (z. B. Widerstand von 18,2 MΩcm bzw. Leitfähigkeit 55 nS/cm bei 20 °C).

5.3 Methanol, LC-MS-Reinheitsgrad.

5.4 Methansäure (FA), 98–100 %.

5.5 Acetonitril (ACN), LC-Reinheitsgrad.

5.6 Extraktionslösemittel, bestehend aus 20 Teilen Wasser (5.1), 79 Teilen Acetonitril (5.5) und 1 Teil Methansäure (5.4) (v/v/v).

5.7 20 %ige Essigsäurelösung, zur Reinigung von Glasgeräten.

5.8 Aflatoxin B1 (AfB1), Reinheit ≥ 95 %.

5.9 Deoxynivalenol (DON), Reinheit ≥ 95 %.

5.10 Fumonisin B1 (FB1), Reinheit ≥ 95 %.

5.11 Fumonisin B2 (FB2), Reinheit ≥ 95 %.

5.12 HT-2-Toxin (HT-2), Reinheit ≥ 95 %.

5.13 T-2-Toxin (T-2), Reinheit ≥ 95 %.

5.14 Zearalenon (ZON), Reinheit ≥ 95 %.

5.15 Ochratoxin A (OTA), Reinheit ≥ 95 %.

5.16 $^{13}\text{C}_{17}$ -Aflatoxin B1 ($^{13}\text{C}_{15}$ -AfB1).

5.17 $^{13}\text{C}_{15}$ -Deoxynivalenol ($^{13}\text{C}_{15}$ -DON).

5.18 $^{13}\text{C}_{34}$ -Fumonisin B1 ($^{13}\text{C}_{34}$ -FB1).

5.19 $^{13}\text{C}_{34}$ -Fumonisin B2 ($^{13}\text{C}_{34}$ -FB2).

5.20 $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin ($^{13}\text{C}_{22}$ -HT2).

5.21 $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin ($^{13}\text{C}_{24}$ -T2).

5.22 $^{13}\text{C}_{18}$ -Zearalenon ($^{13}\text{C}_{18}$ -ZON).

5.23 $^{13}\text{C}_{20}$ -Ochratoxin A ($^{13}\text{C}_{18}$ -OTA).

5.24 Standard-Stammlösung:

Eine Mischung, die Deoxynivalenol (5.9), Aflatoxin B1 (5.8), Fumonisin B1 (5.10) und Fumonisin B2 (5.11), T-2-Toxin (5.13) und HT-2-Toxin (5.12), Zearalenon (5.14) und Ochratoxin A (5.15) in Acetonitril/Wasser (80/20) mit 0,1 % Methansäure (FA) in relevanten Konzentrationen enthält. Bei der Herstellung dieser Lösung sind die zertifizierten Reinheiten der Mykotoxin-Referenzmaterialien für den korrekten Nachweis erforderlich.

ANMERKUNG 1 6,0 µg/ml DON, 0,040 µg/ml AfB1, 13,5 µg/ml FB1, 4,5 µg/ml FB2, 0,48 µg/ml T-2, 0,6 µg/ml HT-2, 0,9 µg/ml ZON und 0,45 µg/ml OTA in ACN/H₂O/FA (80/20/0,1, v/v) hat sich als geeignet erwiesen. Diese Lösung ist im Dunkeln bei –20 °C bis zu einem halben Jahr lang oder im Dunkeln bei 2 °C–8 °C mindestens drei Monate lang stabil.

Eine neue Stammlösung wird mit einer alten Stammlösung verglichen, indem von jeder 25 µl in einzelne deaktivierte Probenfläschchen aus Glas (6.9) gegeben und weiter nach der Beschreibung in „Probenmesslösung“ (7.3) verfahren wird.

ANMERKUNG 2 Falls 7.4 „Aufstockverfahren“ durchgeführt wird, sind mindestens 4 ml der Stammlösung erforderlich.

5.25 Standardarbeitslösung:

Die Standard-Stammlösung (5.24) wird in einem mit Säure gewaschenen Messkolben aus Braunglas mit Acetonitril/Wasser (80/20) mit 0,1 % Methansäure (FA) aufgelöst, sodass die sich ergebende Konzentration in der Arbeitslösung für den Kalibrierungsbereich der verschiedenen Bestandteile anwendbar ist. Eine ausreichende Menge wird für nur eine vollständige Kalibrierung hergestellt und frisch hergestellt verwendet. Diese Lösung ist bei Lagerung im Dunkeln und bei 20 °C eine Woche lang haltbar.

ANMERKUNG Werden 200 µl der Multimykotoxin-Standard-Stammlösung nach Vorgaben in 5.24, ANMERKUNG 1 zu einem 3 ml-Messkolben hinzugefügt und wird bis zur Markierung mit ACN/H₂O/FA (80/20/0,1, V/V) ergänzt, ergibt dies eine Lösung, die 0,4 µg/ml DON, 0,002 7 µg/ml AfB1, 0,9 µg/ml FB1, 0,3 µg/ml FB2, 0,032 µg/ml T-2, 0,04 µg/ml HT-2, 0,06 µg/ml ZON und 0,03 µg/ml OTA in ACN/H₂O/FA (80/20/0,1, v/v) enthält. Alternativ können 333,3 µl der Multimykotoxin-Standard-Stammlösung in einem 5 ml-Messkolben gelöst werden. Werden 200 µl oder Multimykotoxin-Standard-Stammlösung pipettiert und 2 800 µl der oben genannten Lösung hinzugefügt, werden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

5.26 Interne Multi-Standardlösung (IStd), 3,6 µg/ml $^{13}\text{C}_{15}$ -DON (5.17), 0,02 µg/ml $^{13}\text{C}_{17}$ -AfB1 (5.16), 3,75 µg/ml $^{13}\text{C}_{34}$ -FB1 (5.18), 1,25 µg/ml $^{13}\text{C}_{34}$ -FB2 (5.19), 0,5 µg/ml $^{13}\text{C}_{24}$ -T-2-Toxin (5.21), 0,5 µg/ml $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2-Toxin (5.20), 1,0 µg/ml $^{13}\text{C}_{18}$ -ZON (5.22) und 0,4 µg/ml $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA (5.23) in Acetonitril/Wasser (80/20) mit 0,1 % Methansäure (FA) hat sich als geeignet erwiesen. Diese Lösung ist im Dunkeln bei –20 °C bis zu einem halben Jahr lang oder bei 2 °C – 8 °C mindestens drei Monate lang stabil.

5.27 Kalibrierungen:

Verschiedene Mengen der Standardarbeitslösung (5.25) werden in fünf deaktivierte Glasfläschchen (6.9) gefüllt, sodass fünf abstandsgleiche Kalibrierungsniveaus über dem Kalibrierungsbereich erhalten werden. Das Herstellungsverfahren wird wie in 7.3 beschrieben fortgesetzt.

Die Lösungen sollten vor Licht geschützt werden und können im Gefrierschrank bei etwa –20 °C gelagert werden. Sie sind bis zu einer Woche lang stabil.

ANMERKUNG Die nachstehende Tabelle 1 stellt Beispiel-Kalibrierebenen dar, die die in der vorstehenden ANMERKUNG beschriebene Lösung verwenden.

Sobald sich gezeigt hat, dass sich eine Linearität eingestellt hat, darf die Anzahl der Ebenen an die örtlichen Erfordernisse und Anforderungen angepasst werden.

Die genauen Konzentrationen der Standard-Stammlösung (5.24), die Standard-Arbeitslösung (5.25) und die Kalibrierungs-Standardlösungen müssen von der Konzentration der Referenz-Standardmaterialien (5.8 – 5.15) abgeleitet werden, wobei die Reinheit und die Ungenauigkeit nach Angaben im Zertifikat sowie die verwendeten Volumina berücksichtigt werden müssen.

Tabelle 1 — Kalibrierlösungen

Kalibrierungs- probe	Volumen einer Standard- arbeits- lösung [µl]	Gesamtmasse des Analyten je Probenfläschchen [ng]							
		DON	AfB1	FB1	FB2	T-2	HT-2	ZON	OTA
Cal 1	20	8,0	0,053	18,0	6,0	0,64	0,8	1,2	0,6
Cal 2	230	92,0	0,613	207,0	69,0	7,36	9,2	13,8	6,9
Cal 3	440	176,0	1,173	396,0	132,0	14,08	17,6	26,4	13,2
Cal 4	650	260,0	1,733	585,0	195,0	20,8	26,0	39,0	19,5
Cal 5	860	344,0	2,293	774,0	258,0	27,52	34,4	51,6	25,8

5.28 Material zur Qualitätskontrolle:

Geeignetes, ausreichend stabiles Material, das eine natürliche Kontamination oder Anreicherung der untersuchten Mykotoxine aufweist.

6 Geräte

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

6.2 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.

6.3 Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (PP) mit Schraubverschluss, 50 ml mit Deckel.

6.4 Waage, mit einer Ablesbarkeit von 0,001 g oder besser.

6.5 Einstellbarer vertikaler oder horizontaler Laborschüttler.

6.6 Zentrifuge, zur Erzeugung einer relativen Zentrifugalkraft (en: relative centrifugal force, rcf) von 2 300 g geeignet.

6.7 Pipettierer, einstellbar auf 10 bis 100 µl und einstellbar auf 100 bis 1 000 µl, ordnungsgemäß kalibriert, mit geeigneten Spitzen.

6.8 Messkolben, braunes, deaktiviertes (mit Säure gewaschenes oder silanisiertes) Glas oder PP, 3 ml (optional), 5 ml und 10 ml.

6.9 Deaktivierte Glasfläschchen (säuregewaschen oder silanisiert) oder PP-Fläschchen, von passender Größe für den verwendeten Autosampler für Flüssigkeiten (ALS) (normalerweise etwa 1,5 ml Fassungsvermögen).

Um Glasgeräte mit Säure zu waschen, werden diese mit 20 %iger Essigsäure (5.7) gefüllt und über Nacht (16 h bis 24 h) unter einem Abzug stehen gelassen. Die Säure wird entfernt und Glasgeräte mit Leitungswasser, dann mit deionisiertem Wasser und zuletzt mit hochreinem Wasser gespült, um einen pH von 5 – 7 zu erreichen. Normalerweise sind 3 × Spülen pro Schritt ausreichend. In einem Ofen bei 60 °C – 70 °C trocknen.

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

6.11 Spritzenfilter, kleines Innenvolumen, Nylon, Porengröße: 0,2 µm.

6.12 1 ml-Spritze mit Nadel.

6.13 Vortex-Mischer, optional.

6.14 LC-MS/MS:

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

6.14.2 Entgaser, optional, zum Entgasen von mobilen LC-Phasen.

6.14.3 Autosampler für Flüssigkeiten, geeignet zur Injektion eines geeigneten Volumens der Injektionslösung mit ausreichender Genauigkeit, Kreuzkontamination unter 0,1 %.

6.14.4 Säulenofen, optional, Betriebstemperaturbereich mindestens bis zu 40 °C ± 1 °C.

6.14.5 Analytische Säule, zur Trennung der Analyten mit der folgenden Leistung geeignet:

Peak-Asymmetriefaktor bei 10 % Höhe: $0,9 < A_s < 1,4$; Mindestretentionsfaktor für den ersten eluierenden Analyt: $k' \geq 2$; Mindestanzahl der Platten für jeden der acht Analyten: $N \geq 1\,200$, wobei $N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$; minimale Auflösung zwischen zwei benachbarten Peaks: $R_s \geq 1,7$.

6.14.6 Vorsäule, optional, mit dem gleichen stationären Phasenmaterial wie die analytische Säule und mit entsprechenden Dimensionen.

6.14.7 Massenspektrometer, das in der Lage ist, eine ausgewählte Reaktionsüberwachung mit einem ausreichend breiten Dynamikbereich durchzuführen. Jede Ionisationsquelle, die ein ausreichendes Feld bietet, darf eingesetzt werden.

7 Durchführung

7.1 Probenvorbereitung

Es ist wichtig, dass das Labor eine repräsentative Laborprobe erhält, die während des Transports bzw. der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde. Die Laborproben sollten nach der Europäischen Gesetzgebung [3, 4] oder, in allen anderen Fällen, nach EN ISO 6498 entnommen und vorbereitet werden. Die Laborprobe sollte mit einer Mühle (5.1) und einem Mischer (6.2) oder unter Anwendung eines anderen Prozesses, der nachweislich zu einer ausreichenden 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 von dem vorhergehenden Schritt nach der ausreichenden Homogenisierung. Dieser Aliquot wird dann bis zur nächstkleineren Partikelgröße zerkleinert, bis eine Teilprobe von etwa 50 g mit der endgültigen Partikelgröße erhalten wird. Es ist von entscheidender Bedeutung, dass die Prüfmenge

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.

7.2 Extraktion

Einige der nachstehend beschriebenen Arbeitsschritte sind für die Genauigkeit der Ergebnisse entscheidender als andere. Diese Schritte sind als solche gekennzeichnet und sollten mit der notwendigen Aufmerksamkeit durchgeführt werden. Eine Maßstabsübertragung (Scaleup) der Größe der Prüfmenge gilt als annehmbar, sofern eine derartige Notwendigkeit angenommen wird. In diesem Fall müssen die Mengen des zugefügten Wassers, des Acetonitrils und der Methansäure im gleichen Verhältnis erhöht werden, z. B. Maßstabsübertragung mit dem Faktor 2: 10 g Prüfmenge, 50 ml Extraktionslösemittel (5.6). Auf keinen Fall darf eine Maßstabsübertragung als Ersatz für eine ordnungsgemäße Probenvorbereitung angesehen werden.

Trockene Proben: 4,8 bis 5,2 g der homogenen Prüfmenge werden in ein Röhrchen aus Polypropylen mit Schraubkappe (6.3) abgewogen, das Gewicht auf die zweite Dezimalstelle gerundet und notiert. Die Genauigkeit dieses Gewichts ist für die Genauigkeit des Endergebnisses entscheidend!

25,0 ml Lösung aus Acetonitril/Wasser/Methansäure (79/20/1, v/v) (5.6) werden hinzugefügt (die Genauigkeit dieses Volumens ist für die Genauigkeit des Endergebnisses entscheidend!), gründlich verwirbelt oder von Hand gemischt, bis die Prüfmenge vollständig suspendiert ist, dann wird 30 min in einem Schüttler (6.5) geschüttelt, sodass eine gründliche Durchmischung der Probe sicherstellt ist.

Die Probe wird bei 3 000 g mindestens 3 min lang (oder 5 min bei 2 300 g) zentrifugiert, um das Absinken von Feststoffteilchen zu unterstützen.

Falls für mögliche Wiederholungen gewünscht: Der Extrakt wird für die Aufbewahrung von bis zu 7 d im Dunkeln bei 2 °C bis 8 °C in ein sauberes Polypropylenfläschchen überführt.

500 µl Aliquot des Rohextrakts werden entnommen und zur weiteren Verarbeitung in ein deaktiviertes Glasfläschchen (6.9) überführt. Die Genauigkeit dieses Volumens ist für die Genauigkeit des Endergebnisses entscheidend!

Schlamm: Die Schlammmenge wird auf 5 g der Futterprobe eingestellt, z. B. für 1:1 Schlammgewicht 10 g, für 1:2 Schlammgewicht 15 g (entsprechend 5 g Futterprobe) der homogenisierten Prüfmenge in ein Röhrchen aus Polypropylen mit Schraubkappe (6.3) oder einen anderen, geeigneten Behälter eingewogen. Diese Masse sollte auf 2 Dezimalstellen genau aufgezeichnet werden. Falls mehr als 5 ml Wasser im Schlammteil enthalten sind, ist darauf zu achten, die Menge der Lösemittel hochzuskalieren, bis das endgültige Verhältnis der Extraktionslösemittel-Zusammensetzung ACN/H₂O/FA von 79/20/1 (v/v) erreicht ist.

Zum Schlamm wird eine geeignete Menge Methansäure (5.4) hinzugefügt, 5 s lang verwirbelt oder von Hand gemischt und dann eine geeignete Menge Acetonitril (5.5) hinzugefügt und 10 s lang gründlich verwirbelt oder von Hand gemischt und dann 30 min lang in einem Schüttler geschüttelt (6.5).

Ab diesem Punkt wird das Verfahren für trockene Proben befolgt.

7.3 Probenmesslösung

25 µl der etikettierten IStd-Lösung (5.26) werden zum Aliquot und/oder den Kalibrierlösungen hinzugefügt und unter einem sanften Stickstoffstrom bei 50 °C bis zur Trockenheit verdampft.

ANMERKUNG 1 Um die Wahrscheinlichkeit der Kreuzkontamination zu verringern, kann die etikettierte IStd-Lösung in das Fläschchen gefüllt werden, bevor das Aliquot aus Extrakt/Kalibrierlösung hinzugefügt wird.

ANMERKUNG 2 Wurden die Lösungen bis zu 20 min länger als für die vollständige Verdampfung unbedingt erforderlich unter einem sanften Stickstoffstrom gelassen, zeigte dies keine negativen Auswirkungen auf die Endergebnisse.

Für die Rekonstitution das Fläschchen auf Raumtemperatur abkühlen lassen und 250 µl der mobilen LC-Phase B (z. B. siehe Anhang A) zu den trockenen Rückständen hinzugeben.

Das Fläschchen (mit Kappe) wird verschlossen und gründlich mindestens 15 s lang verwirbelt, um sicherzustellen, dass auch der obere Teil des Fläschchens gründlich mit dem Lösemittel gespült wird.

250 µl der mobilen LC-Phase A (z. B. siehe Anhang A) werden zum rekonstituierten Extrakt hinzugeben.

Die Lösung wird mindestens 5 s lang gründlich verwirbelt.

Die Probenmesslösung wird zur Analyse in ein ALS-Fläschchen (6.9) überführt; falls die Lösung trüb ist, sollte sie durch ein Spritzenfilter (6.11) filtriert werden.

7.4 Aufstockverfahren

Wenn die Wiederfindung bestimmt werden muss, wird das Folgende als Doppelbestimmung durchgeführt:

Nur zur Bestimmung der Wiederfindung wird die Probengröße auf 2 g reduziert, um die Menge der verwendeten Standardlösung zu verringern.

Zu drei 2 g-Portionen eines Materials, das idealerweise frei von Analyten ist (falls keine Blindprobe identifiziert werden kann, wird eine Probe mit so wenig Kontamination wie möglich verwendet) werden drei verschiedene Volumina der Multi-Mykotoxin-Standardlösung (5.24) hinzugegeben, so dass 3 Kontaminationsniveaus über den Kalibrierungsbereich erhalten werden. Die Lösungen werden gleichmäßig über die Materialien verteilt, gemischt, um die Aufstockung weiter zu verteilen, und die Behälter werden über Nacht unter einem verdunkelten Abzug (etwa 17 – 24 h), in einem Luftstrom mit Raumtemperatur, damit das Lösemittel verdampfen kann, stehen gelassen. Im Fall von konischen Zentrifugierröhrchen (Falcon-Röhrchen) können diese entweder vertikal (z. B. in einem Gestell) aufgestellt oder horizontal auf einer sauberen Oberfläche abgelegt werden. Beide wurden auf die ausreichende Verdampfung des Aufstockungslösungs-Lösemittels geprüft. Weiter mit 7.2 „Extraktion“, jedoch ist darauf zu achten, 10 ml des Extraktionslösemittels (5.6) zu verwenden, um das Verhältnis von Probe zu Lösemittel konstant zu halten. Die wiedergefundenen Konzentrationen werden aus der Gleichung der Kalibrierung (0) berechnet.

ANMERKUNG Die Zugabe von 180 µl, 590 µl und 1 000 µl der Multitoxin-Standard-Stammlösung (5.24) mit den in der ANMERKUNG beschriebenen Konzentrationen ist geeignet. In der Verfahren-Validierungsstudie wurden Mengen von 250 µl und 1 000 µl verwendet und haben sich als geeignet erwiesen.

8 Messungen

8.1 Allgemeines

Das LC-MS-System muss die Anforderungen aus 6.14 und den Unterabschnitten erfüllen.

8.2 LC-Bedingungen

Eine Kombination aus analytischer Säule, mobiler Phase, Gradienteneinstellungen und Einspritzmenge sollte derart sein, dass es den Erhalt einer annehmbaren Separation, wie in 6.14.5 beschrieben, und verlässliche Ergebnisse bei den erforderlichen Niveaus ermöglicht (zu Beispielen siehe Anhang B).

8.3 MS-Bedingungen

Eine Ionenquelle mit einem für die acht 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, dann ist die Wahl des stärksten ein guter Ausgangspunkt. Es muss aber beachtet werden, dass durch die Auswahl des Vorläuferions die Wiederholpräzision und somit die Nachweisgrenze (en: limit of detection, LOD) und die Bestimmungsgrenze (en: limit of quantitation, LOQ) beeinflusst wird.

Für das selektive Reaktionsmonitoring (en: selected reaction monitoring, SRM) werden zwei Produkt-Ionen im MS/MS-Spektrum für jedes gewählte Vorläuferion von jedem Analyten ausgewählt. Die SRM-Übergänge werden mit diesen Vorläufer-/Produkt-Ion-Kombinationen eingerichtet (für SRM-Beispiele siehe Anhang A).

Die gewählten MS-Einstellungen müssen derart sein, dass für eine Futtermischung mit einer Kontamination von etwa 100 µg/kg DON, 2 µg/kg AfB1, 375 µg/kg FB1, 125 µg/kg FB2, 10 µg/kg T-2, 10 µg/kg HT-2, 20 µg/kg ZON und 10 µg/kg OTA, die nach Abschnitt 7 hergestellt wurde, zur Quantifizierung von Übergängen maximale Signal-Rausch-Verhältnisse von über 10 erreicht werden.

8.4 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, 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.

8.5 Identifizierung des Peaks

Der Peak des Analyts wird in der Probelösung bestimmt, indem die extrahierten Ionenströme des Analyts und seines entsprechenden markierten Analogs geplottet werden; danach wird:

- a) die Retentionszeit des Analyts mit der Retentionszeit des entsprechenden markierten Analogs verglichen (die Differenz muss kleiner als die 0,25-fache Peakbreite bei halbem Maximum (FWHM) sein), und
- b) das Verhältnis der zwei gemessenen Übergänge des Analyts für das Prüfmuster mit dem einer Kalibrierlösung von vergleichbarer Signalstärke verglichen.

8.6 Bestimmung von Mykotoxinen in Kalibrier- und Testlösungen

ANMERKUNG Bevor mit den Messungen begonnen wird, muss dem Gerät ausreichend Zeit zum Ausgleich von Temperatur und Durchfluss gegeben werden.

Aliquote der Kalibrier und Probenmesslösungen (7.3) werden unter identischen Bedingungen auf die Säule injiziert. Für jede Injektion wird das Verhältnis der Peakfläche 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.

Es ist zu beachten, dass die IS-Peaks immer sichtbar sein sollten (Bereiche dürfen je nach Matrix variieren), andernfalls zeigt das Fehlen des IS-Peaks von irgendeinem Analyt eine Störung eines Geräts oder ein betriebliches Problem an, und die Ursache sollte ergründet werden.

Falls eines oder mehrere der Verhältnisse in einem Prüfmuster größer als das Verhältnis für das entsprechende Analyt in der höchsten Kalibrierlösung ist (d. h. es überschreitet den Kalibrierbereich), sollte der Probenextrakt entsprechend verdünnt und erneut analysiert werden.

Beispielsweise werden für 5-fache Verdünnung 100 µl Extrakt anstelle von 500 µl nach Beschreibung in 7.2 verwendet und 7.3 befolgt. Für die 10-fache Verdünnung werden 50 µl Extrakt anstelle der 500 µl nach Beschreibung in 7.2 verwendet und 7.3 befolgt. In jedem Fall ist daran zu denken, das aus dem Rohextrakt (Valiq) entnommene Volumen des Aliquots in den Berechnungen zu berücksichtigen – Gleichung (3) aus Abschnitt 9 verwenden.

8.7 Kalibrierung

Die Verhältnisse der Peakflächen(y-Achse) aller gemessenen Kalibrierlösungen (5.27) werden gegen die entsprechenden Gesamtmassen in der Kalibrierlösung (x-Achse) von jedem Analyt getrennt aufgetragen. Die (arithmetischen) Mittel der multiplen Injektionen sind nicht anzuwenden! Mit der gewichteten Kleinste-Quadrate-Regression über sämtliche Daten wird die Steigung und der mögliche Achsenschnittpunkt von jeder der acht Kalibrierfunktionen (DON, AfB1, FB1, FB2, T-2, HT-2, ZON, OTA) abgeschätzt. Die Signifikanz des Achsenschnittpunktes wird überprüft (95 %iges Vertrauensniveau) und die Linearität wird geprüft (beispielsweise mittels einer graphischen 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.

9 Bestimmung des Massenanteils

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

$$w_{An,S} = \left(\frac{\bar{R}}{a_1} - \frac{b_0}{a_1} \right) \cdot \frac{m_{IStd,S}}{m_{IStd,C}} \cdot \frac{V_{extr}}{V_{aliq} \cdot m_S} \quad (1)$$

Dabei ist

- $w_{An,S}$ der Massenanteil des Analyten in der Prüfmenge [ng/g = µg/kg];
- $\bar{R}$ der Mittelwert der Verhältnisse der Peakflächen der Wiederholungsinjektionen;
- a_1 die Steigung, abgeschätzt mit der gewichteten Kleinste-Quadrate-Regression aus den Kalibrierdaten (8.7) [Flächenverhältnis/ng];
- b_0 der Achsenschnittpunkt, abgeschätzt mit der gewichteten Kleinste-Quadrate-Regression aus den Kalibrierdaten (wird null, falls nicht signifikant (siehe 8.7)) [Flächenverhältnis];
- $m_{IStd,S}$ die Masse des markierten Analogs in der Probenmesslösung [ng];
- $m_{IStd,C}$ die Masse des markierten Analogs in der Kalibrierlösung [ng];
- V_{aliq} das aus dem Rohextrakt entnommene Volumen des Aliquots ml];
- V_{extr} das Gesamtvolumen des verwendeten Extraktionslösemittels in [ml];
- m_S die Masse der Prüfmenge [g].

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

$$w_{An,S} = \left(\frac{\bar{R}}{a_1} - \frac{b_0}{a_1} \right) \cdot 1 \cdot \frac{V_{extr}}{V_{aliq} \cdot m_S} \quad (2)$$

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

$$w_{An,S} = m_{An,S} \cdot \frac{V_{extr}}{V_{aliqu} \cdot m_S} \quad (3)$$

Bei einer Prüfmenge von 5,0 g, 25 ml des Extraktionslösemittels und einem Aliquoten des Extraktes von 0,5 ml (wiederhergestellt auf 0,5 ml) wird der zweite Ausdruck gleich 10 und die Gleichung (3) darf wie folgt angegeben werden:

$$w_{An,S} = m_{An,S} \cdot 10 [\mu\text{g/kg}] \quad (4)$$

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 Modellgleichung.

Falls gefordert, darf in diesen Fällen der bestimmte Massenanteil $w_{An,S}$ in Bezug auf die Wiederfindung entsprechend der Gleichung (5) korrigiert werden:

$$w_{An,S,corr} = \frac{w_{An,S}}{rec} \cdot 100 \quad (5)$$

Dabei ist

rec die Wiederfindung.

10 Präzision

10.1 Ringversuch

Einzelheiten von einem Ringversuch zur Präzision des Verfahrens sind in [5] dargestellt. Die aus diesem Ringversuch abgeleiteten Werte sind nicht unbedingt auf andere als die angegebenen Konzentrationsbereiche und/oder Matrices anwendbar.

10.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die durch denselben Bearbeiter an identischen Untersuchungsmaterialien mit denselben Geräten innerhalb des kürzesten Zeitabstandes gewonnen wurde, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Wiederholgrenze r überschreiten. Nachstehend sind die funktionalen Zusammenhänge zwischen dem gemessenen Massenanteil $w_{An,S}$ für die acht Analyten und der Wiederholstandardabweichung s_r aufgelistet. Daraus kann die Wiederholgrenze r wie folgt berechnet werden:

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

Die Verdünnung von Proben kann die Wiederholpräzision beeinträchtigen. Für weitere Informationen siehe die Tabellen in Anhang A.

10.2.1 DON

$$s_r = 0,040 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.2.2 Afb1

$$s_r = 0,065 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.2.3 FB1

$$s_r = 0,059 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.2.4 FB2

$$s_r = 0,049 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.2.5 T-2-Toxin

$$s_r = 0,053 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.2.6 HT-2-Toxin

$$s_r = 0,081 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

Die funktionale Beziehung ist für Massenanteile bis zu etwa 1 000 $\mu\text{g/kg}$ gültig.

10.2.7 ZON

$$s_r = 0,059 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.2.8 OTA

$$s_r = 0,055 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.3 Vergleichpräzision

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

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

Für weitere Informationen siehe die Tabellen in Anhang A.

10.3.1 DON

$$s_R = 0,126 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.3.2 AfB1

$$s_R = 0,115 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.3.3 FB1

$$s_R = 0,169 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.3.4 FB2

$$s_R = 0,165 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.3.5 T-2-Toxin

$$s_R = 0,127 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.3.6 HT-2-Toxin

$$s_R = 0,172 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.3.7 ZON

$$s_R = 0,118 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

10.3.8 OTA

$$s_R = 0,101 w_{An,S} [\mu\text{g/kg}]$$

11 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) alle erforderlichen Angaben zur vollständigen Identifizierung der Probe;
- b) eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- c) das Datum des Probeneingangs;
- d) die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben worden sind; 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 [5] nach den AOAC-Richtlinien für die Durchführung von Ringversuchen [6] zur Validierung von Kennwerten eines Analysenverfahrens erhalten. Um die Notwendigkeit des Ausschlusses von einzelnen „Ausreißer“-Ergebnissen zu vermeiden, wurden robuste statistische Verfahren nach ISO 5725-5 [7] angewendet. Die funktionalen Zusammenhänge zwischen der Wiederholpräzision/Vergleichstandardabweichung und dem gemessenen Wert wurden nach ISO 5725-2 [8] berechnet. Die Angaben in den Kopfzeilen der nachstehenden Tabellen beziehen sich wie folgt auf die im Ringversuch [5] verwendeten Materialien:

- Die Materialien 1 bis 6 waren Gemische verschiedener, natürlich kontaminierter, kommerzieller Futtermischungen und natürlich kontaminierte Getreide, die in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt waren.
- Für die Aufstockversuche wurde Nahezu-Blindprobenmaterial (Material 7) verwendet, das aus handelsüblichen Futtermischungen und Getreide bestand, in denen sehr geringe Kontaminationsniveaus gefunden wurden.
- Material 7 wurde während Homogenitätsprüfungen analysiert (10 zufällig ausgewählte Einheiten, zwei unabhängige Analysen pro Einheit). Für die Durchführung von Wiederfindungsversuchen wurden robuste Mittelwerte dieser Analyseergebnisse berücksichtigt. Niedrig aufgestockte Proben ergaben Niveaus zwischen Cal 1 und Cal 2 der Kalibrierkurve. Hoch aufgestockte Proben ergaben Niveaus zwischen Cal 4 und Cal 5 der Kalibrierkurve.

Vor der Hauptuntersuchung wurde ein Vorversuch mit einem einzelnen Material organisiert, das mit Konzentrationen in der Nähe der geforderten LOQ kontaminiert war. Dies wurde unternommen, um die Fähigkeiten der Bewerberlaboratorien nachzuweisen. Es wurden gemeinsame Kalibriersubstanzen bereitgestellt; allerdings war die Übermittlung von Ergebnissen optional. Zwanzig von anfangs 38 Bewerber-Laboratorien übermittelten quantitative Ergebnisse. Zwei Sätze von Vorversuchsergebnissen wurden als nicht konform markiert, da alle Ergebnisse in einem Satz eine systematische Abweichung um einen konstanten Faktor zeigten. Im Fall von HT-2 waren die von 4 Laboratorien genannten Ergebnisse signifikant höher (mindestens 2×) als der Zielwert. Dies wies auf die Möglichkeit der Überwachung verschiedener Vorläuferionenaddukte für native und markierte Analoge hin. Diese 4 Ergebnisse wurden im Vorversuch als nicht konform markiert und aus dem Vorversuchssatz entfernt. Die Statistik aus dem Vorversuch wird in Tabelle A.1 unten dargestellt. Ergebnisse, die als „geringer als“ angegeben wurden, wurden ebenfalls als nicht konform betrachtet. Wiederholungen wurden nicht gefordert; daher war in diesem Fall die Bestimmung der Wiederholpräzision nicht möglich; es werden nur Vergleichpräzisionsdaten bereitgestellt. Für die Hauptuntersuchung nahmen weitere Laboratorien teil, die nicht Teil der Vorversuchsgruppe waren, die aber nachwiesen, dass sie in der Lage waren, nah an der geforderten LOQ zu messen.

Tabelle A.1 — Präzisionsdaten für acht Analyte auf in der Vorversuchsprobe gefundenen Niveaus

Analyt	DON	AfB1	T-2	HT-2	FB1	FB2	ZON	OTA
Anzahl der Laboratorien	22	22	22	22	22	22	22	22
Anzahl der Laboratorien, die als nicht konform oder nicht angegeben betrachtet wurden	2	2	2	9	2	2	2	2
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	20	20	20	13	20	20	20	20
Mittelwert $\bar{x}$, µg/kg	474,5	2,62	12,6	20,6	1 211,2	388,8	50,8	10,8
Vergleichstandardabweichung s_R , µg/kg	47,0	0,53	2,1	7,0	197,9	36,6	8,5	1,4
Relative Vergleichstandardabweichung, RSD_R , %	9,9	20,1	16,5	33,8	16,3	9,4	16,7	12,8
Vergleichgrenze R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/kg	131,5	1,48	5,8	19,5	554,1	102,4	23,7	3,9
HorRat	0,6	0,9	0,8	1,5	1,1	0,5	0,8	0,6

Material 7 (Nahezu-Blindprobe) war nicht für die Bewertung der Präzisionsparameter vorgesehen. Allerdings ließ es die Feststellung zu, ob der genannte Mykotoxingehalt im Material durchgängig $< LOQ$ war bzw. außerhalb oder in der Nähe des unteren Endes des vorgesehenen Arbeitsbereichs lag. Die Ergebnisse unterstützen auf zufriedenstellende Art, dass das Verfahren auch zur Messung des interessierenden Arbeitsbereichs anwendbar ist. Insbesondere enthielt das Material DON und T-2-Toxin in Konzentrationen unter dem geforderten Bereich, die nicht quantifiziert werden konnten. Die aus quantitativen Ergebnissen berechnete Präzision für diese Materialien findet sich in Tabelle A.2.

Tabelle A.2 — Präzisionsdaten für 3 Analyte bei Niveaus in der Nähe der LOQ in einer Nahezu-Blindprobe

Analyt	DON	T-2	HT-2
Anzahl der Laboratorien	28	28	28
Anzahl der Laboratorien, die als nicht konform angesehen werden	11	8	10
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	17	20	18
Geforderte LOQ nach CEN-Mandat, µg/kg	100	10	10
Mittelwert, $\bar{x}$, µg/kg	96,2	7,47	13,9
Vergleichstandardabweichung s_R , µg/kg	34,2	3,00	3,7
Relative Vergleichstandardabweichung, RSD_R , %	35,5	40,1	26,7
Vergleichgrenze R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/kg	95,7	8,39	10,4
HorRat	1,6	1,8	1,2

Tabelle A.3 — Präzisionsdaten für DON

Probe	Material 1	Material 2	Material 3	Material 4	Material 5	Material 6	Niedrig aufge- stockt	Hoch aufge- stockt
Jahr des Ringversuchs	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015	2015
Anzahl der Laboratorien	28	28	28	28	28	28	28	28
Anzahl der Laboratorien, die als nicht konform angesehen werden	6	5	5	5	6	5	5	5
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	22	23	23	23	22	23	23	23
Mittelwert, $\bar{x}$ ^a , µg/kg	195,7	2 663,6	3 269,4	1 972,0	562,4	2 259,6	810,9	2 920,2
Wiederholstandardabweichung s_r , µg/kg	13,5	106,0	129,1	82,1	23,2	148,8	43,7	108,4
Relative Wiederholstandardabweichung RSD_r , %	6,9	4,0	4,0	4,2	4,1	6,6	5,4	3,7
Wiederholgrenze r [$r = 2,8 \times s_r$], µg/kg	38,0	298,8	363,9	231,6	65,5	419,6	123,2	305,8
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_r und $\bar{x}$	$s_r = 0,040 \bar{x}$							
Vergleichstandardabweichung s_R , µg/kg	52,4	347,1	418,5	285,7	68,0	275,8	117,9	331,1
Relative Vergleichstandardabweichung, RSD_R , %	26,8	13,0	12,8	14,5	12,1	12,2	14,5	11,3
Vergleichgrenze R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/kg	147,8	978,8	1 180,0	805,5	191,9	777,7	332,5	933,7
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_R und $\bar{x}$	$s_R = 0,126 \bar{x}$							
Wiederfindung, %	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	96 ^b	94 ^b
HorRat-Wert	1,3	0,9	1,0	1,0	0,7	0,9	0,9	0,8
^a Mittelwerte wurden in Bezug auf die Wiederfindung nicht korrigiert ^b nicht signifikant von 100 % abweichend n. a. nicht anwendbar								