

DIN EN 17279

ICS 67.050

Einsprüche bis 2018-09-13

Entwurf**Lebensmittel –**
Multiverfahren mit LC-MS/MS zum Screening auf Ochratoxin A, Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, Zearalenon, T2-HT-2-Toxin und Fumonisin B1 und B2 in Lebensmitteln außer Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder; Deutsche und Englische Fassung prEN 17279:2018
Foodstuffs –

Multimethod for the screening of ochratoxin A, aflatoxin B1, deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin B1 and B2 in foodstuffs, excluding foods for infants and young children, by HPLC-MS/MS;

German and English version prEN 17279:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-07-13 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 63 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17279:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche/nationale 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.

In diesem Norm-Entwurf sind zahlreiche Angaben zur Einstellung verschiedener geeigneter Geräte enthalten, die sich in der Routine als erfolgreich gezeigt haben.

Diese Geräte sind üblicherweise nur mit englischen Beschriftungen bzw. Einstellungen erhältlich, und daher wurden viele gerätespezifische Angaben in dieser Norm auch in englischer Sprache angegeben.

**Lebensmittel — Multiverfahren mit LC-MS/MS zum Screening auf
Ochratoxin A, Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, Zearalenon, T2-HT-2-Toxin und
Fumonisin B1 und B2 in Lebensmitteln außer Lebensmittel für Säuglinge
und Kleinkinder**

Foodstuffs — Multimethod for the screening of ochratoxin A, aflatoxin B1, deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin B1 and B2 in foodstuffs, excluding foods for infants and young children, by HPLC-MS/MS

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Inhalt	2
Europäisches Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Chemikalien	6
6 Geräte und Ausrüstung	8
7 Durchführung	9
8 Berechnung	12
9 Prüfbericht	13
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	14
Anhang B (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	23
Anhang C (informativ) Entsprechende Paare an nativen und ¹³C-markierten Vorläufer- und Produkt—Ionen für eine Reihe an üblichen Übergängen	28
Literaturhinweise	31

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17279:2018) 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 wurde im Rahmen eines Mandats erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben.

Einleitung

Mykotoxine sind Metaboliten von Schimmelpilzen die in verschiedenen Lebensmitteln vorkommen können. Von den in dieser Norm behandelten Mykotoxine (Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, Fumonisin B1 und B2, Ochratoxin A, HT-2 und T-2 Toxine und Zearalenon) werden vor allem Getreide und Getreideerzeugnisse, Erdnüsse, Trockenobst und die entsprechenden Erzeugnisse befallen.

WARNUNG 1— Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, (EU) Nr. 1907/2006 [2] sowie geeignete nationale Mitteilungen 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.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm beschreibt ein Screeningverfahren für die Bestimmung von Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, Fumonisin B1 und B2, Ochratoxin A, HT-2 und T-2 Toxin und Zearalenon in Lebensmitteln mit Hochleistungsflüssigchromatographie (en: high performance liquid chromatography, HPLC) gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).

Das Ziel dieses Screeningverfahrens ist zu prüfen, ob das Lebensmittel den gesetzlichen Vorgaben entspricht oder ob ein vordefiniertes Level (die „Screening-Zielkonzentration“, en: screening target concentration, STC) überschritten ist oder nicht. Das Ergebnis dieses Screenings ist entweder „negativ“ oder „verdächtig“. „Negativ“ (Screen-negativ) bedeutet, dass die interessierenden Mykotoxine nicht nachgewiesen oder möglicherweise vorhanden sind aber unter der STC liegen. „Verdächtig“ (Screen-positiv) bedeutet, dass der „festgelegte cut-off-Wert“ überschritten ist und dass die Probe möglicherweise ein oder mehrere Mykotoxine in Gehalten über der STC enthält.

Zur vollständigen Identifizierung und exakten Quantifizierung ist ein weiteres Verfahren erforderlich, was nicht durch diese Norm abgedeckt ist, und zwar ein quantitatives Bestätigungsverfahren.

Dieses Verfahren ist für verschiedene Lebensmittelarten geeignet und wurde repräsentative Matrices aus vier Bereichen validiert:

- Hoher Stärke- und/oder Proteingehalt und niedriger Wasser- und Fettgehalt: Weizen, Getreidemischung, Weizenmehl und Cornflakes;
- hoher Fettgehalt: Erdnüsse;
- hoher Zucker- und niedriger Wassergehalt: Feigen;
- hoher Wassergehalt: Traubensaft.

Während der Validierung wurden für die folgenden Screening-Zielkonzentrationen die folgenden „cut-off“-Werte ermittelt:

- Aflatoxin B1: 2 µg/kg bis 5 µg/kg;
- Deoxynivalenol: 250 µg/kg bis 865 µg/kg;
- Fumonisin B1: 200 µg/kg bis 790 µg/kg;
- Fumonisin B2: 110 µg/kg bis 230 µg/kg;
- Ochratoxin A: 4 µg/kg bis 9 µg/kg;
- T-2 toxin: 25 µg/kg;
- HT-2 toxin: 25 µg/kg bis 50 µg/kg;
- Zearalenon: 30 µg/kg bis 100 µg/kg.

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 3696:1995, *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

Die Mykotoxine werden aus dem homogenisierten Probenmaterial nach Wasserzugabe durch Schütteln mit angesäuerten Acetonitril extrahiert. Nach einer Salz-induzierten Phasentrennung und Zentrifugieren wird der Acetonitrilextrakt mit Wasser verdünnt, ggf. gefiltert und mit Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) untersucht. Die relative Signalgröße (response) jedes Mykotoxins wird auf die jeweils korrespondierende isotoopenmarkierte Verbindung bezogen. Die isotoopenmarkierte Substanz wird in Höhe der Zielkonzentration (STC) zugegeben und gegen den festgelegten „cut-off“-Wert geprüft.

5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt werden nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696:1995 verwendet. Falls nicht anders festgelegt müssen Lösemittel für LC-Analytik geeignet sein.

- 5.1 **Wasser**, entionisiert.
- 5.2 **Wasser**, LC-MS Grad, doppelt destilliertes Wasser oder Wasser von Grad 1 nach EN ISO 3696:1995.
- 5.3 **Acetonitril**, p.a.
- 5.4 **Essigsäure**, Reinheit mehr als 98 % (w/w).
- 5.5 **Magnesiumsulfat (MgSO₄)** — wasserfrei, p.a.
- 5.6 **Aflatoxin B1 (AB1)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.7 **Deoxynivalenol (DON)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.8 **Fumonisin B1 (FB1)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.9 **Fumonisin B2 (FB2)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.10 **HT-2 Toxin (HT2)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.11 **Ochratoxin A (OTA)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.12 **T-2 Toxin (T2)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.13 **Zearalenon (ZEN)** z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.
- 5.14 **¹³C₁₇ Aflatoxin B1 (U-AB1)** z. B. Lösung $\rho = 0,5 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.15 $^{13}\text{C}_{15}$ Deoxynivalenol (U-DON) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.16 $^{13}\text{C}_{34}$ Fumonisin B1 (U-FB1) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril/Wasser.

5.17 $^{13}\text{C}_{34}$ Fumonisin B2 (U-FB2) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril/Wasser.

5.18 $^{13}\text{C}_{22}$ HT-2 Toxin (U-HT2) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.19 $^{13}\text{C}_{20}$ Ochratoxin A (U-OTA) z. B. Lösung $\rho = 10 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.20 $^{13}\text{C}_{24}$ T-2 Toxin (U-T2) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.21 $^{13}\text{C}_{18}$ Zearalenon (U-ZEN) z. B. Lösung $\rho = 25 \text{ mg/l}$, in Acetonitril.

5.22 Extraktionslösung, Acetonitril, mit 1 % Essigsäure.

1 Volumenteil Essigsäure (5.4) wird zu 99 Volumenteilen Acetonitril (5.3) gegeben und gemischt. Diese Lösung ist bei Lagerung bei Zimmertemperatur sechs Monate haltbar.

5.23 Gemischte Mykotoxin-Stammlösung.

Die einzelnen Lösungen werden entweder durch Lösen der ursprünglichen festen Standardsubstanzen in geeigneten Lösemitteln oder aus individuellen kommerziell erhältlichen Stammlösungen hergestellt. Die durch diese Norm abgedeckten Mykotoxine werden gut in Acetonitril gelöst — mit Ausnahme von Fumonisin, für die Acetonitril/Wasser (50 + 50, v + v) zur Herstellung der einzelnen Stammlösungen empfohlen wird.

Die Massenkonzentration der einzelnen Mykotoxine ρ , in ng/ml wird nach Gleichung (1) berechnet:

$$c = (20/D) \times w_{\text{STC}} \quad (1)$$

Dabei ist

D der Verdünnungsfaktor der Probe im Endextrakt (üblicherweise $D = 4$);

w_{STC} die Screening-Zielkonzentration (Massenanteil in der Probe, in $\mu\text{g/kg}$).

BEISPIEL Für ein Mykotoxin mit einer STC von $1\,000 \mu\text{g/kg}$ in der Probe beträgt die Massenkonzentration dieses Mykotoxins in der gemischten Mykotoxinstammlösung $5\,000 \text{ ng/ml}$.

Eine gemischte Mykotoxin Stammlösung wird durch Mischen geeigneter Volumina der individuellen Mykotoxinlösungen und Acetonitril/Wasser (80 + 20, v + v) mit geeigneten Pipetten (6.6) hergestellt. Diese Lösung ist bei 4°C aufbewahrt sechs Monate haltbar.

Diese gemischte Mykotoxinstammlösung darf für die Herstellung der positiven Kontrollproben (7.3) verwendet werden.

5.24 Gemischte interne Standard (ISTD) Zwischenlösung (Isotopen markierte Mykotoxine).

Isotopenmarkierte Mykotoxine sind üblicherweise als zertifizierte Standardlösungen erhältlich. Eine gemischte interne Standardlösung mit allen isotopenmarkierten Mykotoxinen wird in Acetonitril/Wasser (80 + 20, v + v) hergestellt und die Massenkonzentrationen nach Gleichung 1 berechnet.

BEISPIEL Für ein Mykotoxin mit einer STC von $10 \mu\text{g/kg}$ in der Probe beträgt die Massenkonzentration der entsprechenden isotopenmarkierten internen Standardlösung 50 ng/ml .

Diese Lösung ist im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt sechs Monate haltbar.

Diese Lösung wird als Kalibrierlösung verwendet und wird jedem Probenextrakt (7.3) zugegeben.

5.25 Gemischter Mykotoxin-Lösemittelstandardlösung.

Eine gemischte Mykotoxin Lösemittelstandardlösung wird durch Mischen von 1 Volumenteil der gemischten Mykotoxin Stammlösung (5.23) mit 1 Volumenteil der internen Standardlösung (5.24), 8 Volumenteilen Acetonitril mit 1 % Essigsäure (5.22), und 10 Volumenteilen Wasser (5.2) hergestellt. Üblicherweise wird vor jeder Analysenreihe eine Menge von 400 µl frisch hergestellt.

BEISPIEL Herstellung im Probenfläschchen:

160 µl	Acetonitril mit 1 % Essigsäure (5.22);
20 µl	gemischte Mykotoxin Stammlösung (5.23);
20 µl	gemischte interne Standardzwischenlösung (5.24);
200 µl	Wasser (5.2).

Die gemischte Mykotoxin-Lösemittelstandardlösung dient zur Prüfung der korrekten Messung der Mykotoxine und ihrer isotopisch markierten Verbindungen) (7.4.4).

6 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborglasgeräte und Ausrüstung, und insbesondere die Folgenden:

- 6.1 **Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss**, 50 ml mit Kappe.
- 6.2 **Analysenwaage**, Fehlergrenze: 0,01 mg.
- 6.3 **Laborwaage**, Fehlergrenze: 0,01 g.
- 6.4 **Mechanischer Vertikal- oder Horizontalschüttler oder Überkopfschüttler**, einstellbar
- 6.5 **Laborschüttler**.
- 6.6 **Pipetten**, einstellbar, z. B. 10 µl bis 100 µl und 100 µl bis 1000 µl, geeignet für organische Lösemittel (z. B. Mikroliterpipetten), gut kalibriert, mit geeigneten Spitzen.
- 6.7 **Zentrifuge**, geeignet für eine relative Zentrifugalkraft von 3 000 *g*.
- 6.8 **Probenfläschchen**, 1,5 ml bis 2 ml, aus Glas oder Polypropylen mit Schraubkappe.
- 6.9 **Spritzenfilter oder Zentrifugenfilter**, 0,20 µm bis 0,45 µm, aus Nynylon oder Polytetrafluorethylen (PTFE).
- 6.10 **Autosamplerfläschchen**, geeigneter Größe für den verwendeten Autosampler, z. B. Glas mit Einsätzen, Filterfläschchen (Polytetrafluorethylen (PTFE) 0,45 µm), mit Bördelkappe oder entsprechendem Verschluss.

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

6.11.1 LC-Pumpe, geeignet für einen Binärgradienten mit geeignetem Fluss für the Trennsäule mit ausreichender Genauigkeit.

6.11.2 Injektionssystem, geeignet zum Injizieren eines geeigneten Volumens an Injektionslösung mit ausreichender Genauigkeit und Kreuzkontamination unter 0,1 %.

6.11.3 LC-Säule, geeignet zum Zurückhalten des Zielmykotoxins, vorzugsweise mit einem Retentionsfaktor von mindestens zwei.

6.11.4 Säulenofen, geeignet für eine konstante Temperatur.

6.11.5 Tandem Massenspektrometer (MS/MS), geeignet zur Ionisierung der Mykotoxine (entweder in positive oder negative Ionen), mit „Selected Reaction Monitoring“ (SRM), und einem ausreichend großen dynamischen Bereich.

ANMERKUNG Geeignete Geräte für abwechselnde Messung von positiven und negativen Ionen (pos/neg switching) werden bevorzugt, da diese alle Zielanalyten in einem Lauf abdecken können.

6.11.6 Datenauswertesystem

7 Durchführung

7.1 Vorbereitung der Kontrollprobe

Innerhalb jeder Probenreihe wird eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt.

Die negative Kontrolle ist entweder eine Probe, die das betreffende Mykotoxin nicht enthält (nicht nachweisbar oder < 10 % des STC), oder, wenn nicht verfügbar, ein Reagenzienblindwert.

Die positive Kontrolle ist eine Probe, die die betreffenden Mykotoxine nicht enthält (nicht nachweisbar oder < 10 % des STC), und die mit diesen Mykotoxinen bis zur Höhe der STC aufgestockt wurde. Alternativ wird ein Referenzmaterial verwendet, das die betreffenden Mykotoxine in etwa der Höhe der STC enthält.

Für die Herstellung der positiven Kontrollprobe wird eine Probe, die die betreffenden Mycotoxine nicht enthält, durch Zugabe von 1,0 ml der gemischten Mykotoxin Lösung (5.23) aufgestockt.

7.2 Extraktion der Mykotoxine aus der Probe

Die Laborprobe wird fein vermahlen und homogenisiert.

Von der homogenisiert Untersuchungsprobe werden 5 g analysiert. Für Proben, für die ein Slurry hergestellt wurde, wird eine Menge an Slurry untersucht, die 5 g der ursprünglichen Probe entspricht.

Die Einwaage wird nach Tabelle 1 auf 0,01 g (6.3) in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen(6.1) eingewogen.

Nach Tabelle 1 wird Wasser (5.1) und angesäuertes Acetonitril (5.22) zu der Probe gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen und zum Mischen der Probe mit dem Lösemittel gründlich mit der Hand geschüttelt. Es ist sicherzustellen, dass trockene Proben in der Flüssigkeit suspendiert werden.

Tabelle 1 — Zusammensetzung

Probe	Einwaage	Wasserzusatz	Extraktions- lösemittel (5.22) ^d	MgSO ₄ (5.5) ^e
	g	ml	ml	g
Proben mit Feuchtegehalt von < 15 % ^a	5	10	10	5
Probenslurry 1 + 1 ^b	10	5	10	5
Probenslurry 1 + 1,5 ^b	12,5	2,5	10	5
Probenslurry 1 + 2 ^b	15	0	10	5
Probenslurry 1 + 3 ^b	20	0	10	7,5
Proben mit Feuchtegehalt von > 85 % ^c	5	5	10	5
^a z. B. trockene gemahlene Getreide. ^b x + y bedeutet: x g Probenaufschlämmung (Slurry) sind mit y ml Wasser versetzt. ^c die meisten frischen Obstsorten/Gemüsearten, Flüssigkeiten . ^d das Verhältnis an Wasser/Extraktionslösemittel ist 1 + 1, v + v, außer für den Slurry 1 + 3 (1 + 0,67, v + v). ^e Im Extraktionsröhrchen befinden sich 0,5 g Magnesiumsulfat je ml an Gesamtwasser (aus der Probe und zugesetzt).				

Die Röhrchen werden in einen mechanischen Schüttler (6.4) gestellt und 30 min geschüttelt.

Das Röhrchen wird geöffnet, die nach Tabelle 1 angegebene Menge an Magnesiumsulfat (5.5) hinzugefügt, das Röhrchen wird geschlossen und sogleich etwa 5 s geschüttelt, um Klumpenbildung mit dem Magnesiumsulfat zu vermeiden. Dann wird das Röhrchen etwa 30 s mit der Hand oder im mechanischen Schüttler (6.5) geschüttelt.

Die Röhrchen werden bei etwa 3 000 g (6.7) mindestens 5 min zum Absetzenlassen von festen Teilchen und zur Phasentrennung zentrifugiert.

NOTE Nach der Phasentrennung beträgt das Volumen der Acetonitrilphase (obere Schicht) etwa 10,7 ml und enthält etwa 17 % Wasser [5].

7.3 Messlösung

Mit geeigneten Pipetten werden 10 Volumenteile an Extrakt, 1 Volumenteil gemischte interne Standardlösung (5.24), und 9 Volumenteile Wasser (5.1) in ein Probenfläschchen (6.8 oder 6.10) gegeben und der Inhalt wird mit einem Schüttler mindestens 5 s gemischt.

ANMERKUNG 1 Es hat sich gezeigt, dass Volumina von 200 µl Extrakt, 20 µl interner Standardlösung (5.24), und 180 µl Wasser gute Ergebnisse erbringen.

Der resultierende Extrakt kann trübe sein. Trübe Extrakte können ohne nachteilige (adverse) Auswirkungen injiziert werden. Wenn Niederschläge beobachtet werden, müssen diese durch Zentrifugieren oder Filtrieren entfernt werden, entweder mit einem Filtrvial (6.10), Zentrifugenfilter, oder einem Spritzenfilter (6.9). Im letzten Fall kann sich das oben angegebene Volumen von 400 µl als zu klein erweisen.

ANMERKUNG 2 Die Zusammensetzung des resultierenden Extraktes ist sauer (Acetonitril/Wasser (etwa 1 + 1, v + v). Ein geringerer Anteil an organischem Lösemittel kann dazu führen, dass wenig wasserlösliche Mykotoxine wie Zearalenon nicht vollständig gelöst werden.

7.4 LC-MS/MS Analyse

7.4.1 Allgemeines

Das LC-MS system, Injektionsvolumen, die Zusammensetzung der mobilen Phase, Gradienteneinstellungen, die Acquisitionsbedingungen und Datenverarbeitungsparameter müssen so beschaffen sein, dass die betreffenden Mykotoxine mit $\leq 25\%$ des $[\text{cut-off value} \times w_{\text{STC}}]$, mit ausreichender Selektivität für eine annehmbar geringe Rate an falsch verdächtigen Ergebnissen nachgewiesen werden

Beispiele an LC-MS/MS-Einstellungen sind in Anhang B angegeben.

7.4.2 LC Bedingungen

Die LC-Bedingungen müssen für den Zweck geeignet sein, d.h. so dass die Anforderungen nach 7.4.1 und in 6.11.4 eingehalten werden, aber vorzugsweise auch zu kurzen chromatographischen Trennzeiten führen. Für letzteres ist die Verwendung relativ kurzer Säulen (z. B. 50 mm) vorteilhaft.

Das Injektionsvolumen ist ein Kompromiss zwischen der Peakform der früh eluierenden Mykotoxine und der Sensitivität. Wenn es die Sensitivität erlaubt, werden kleine Injektionsvolumina (z. B. 2 μl) empfohlen.

7.4.3 MS Bedingungen

Die Messung eines Übergangs ist ausreichend, hierbei wird der Übergang mit dem besten Signal/Rauschverhältnis ausgewählt. Es können auch mehrere Übergänge gemessen werden. Der am besten geeignete Übergang kann bei verschiedenen Geräten und LC-Eluenten (z. B. protonierte Moleküle oder Natrium/Ammoniumaddukte in ESI^+ , deprotonierte Moleküle oder Acetate/Formataddukte in ESI^-) unterschiedlich sein. Idealerweise werden positive und negative Ionen in einem Lauf detektiert, wenn die Geräte dafür geeignet sind und ausreichende Sensitivität mit demselben Eluent erreicht wird. Alternativ sind zwei Injektionen erforderlich, mit gleichen oder verschiedenen Eluenten.

Das Verfahren beruht auf der internen Kalibrierung jedes Mykotoxins gegen seinen isotopischen internen Standard im selben Extrakt. Hierfür müssen die entsprechenden Übergänge verwendet werden. Vorläufer—Ion und Produkt—Ion für die nativen und die isotopisch markierten Mykotoxine sind jeweils identisch (dasselbe Addukt, dasselbe Fragment, nur unterschiedlich bzgl. m/z aufgrund der Anzahl der ^{13}C -Atome).

In Anhang C sind die m/z -Werte der entsprechenden Paare der nativen und ^{13}C -markierten Vorläufer- und Produkt—Ionen angegeben für eine Anzahl an üblicherweise verwendeten Übergänge für the Mykotoxine in LC-MS/MS.

Desweiteren müssen die analytspezifischen MS Parameter einschließlich der Kollisionsenergie für die beiden Übergänge identisch sein.

7.4.4 Injektionsreihenfolge

Die Messreihe wird mit der Lösemittelinjektion begonnen (Extraktionslösung (5.22)/Wasser, 1 + 1 v + v) um die Kontaminationsfreiheit des Systems zu prüfen.

Dann wird die gemischte Mykotoxin-Lösemittelstandardlösung (5.25) injiziert, um den korrekten Nachweis aller Mykotoxine und ihrer Markierungen zu verifizieren, gefolgt von dem Lösemittel zur Prüfung eines Übertrages (carry over). Dann wird die Negativkontrolle, die Positivkontrolle und die Probenextrakte injiziert. Die Reihe wird mit einer weiteren Injektion der Positivkontrolle beendet.

Die Peakflächen der Mykotoxine und ihrer entsprechenden isotopisch markierten internen Standards in der gemischten Lösemittelstandardlösung (5.25) dürfen sich um nicht mehr als 20 % unterscheiden wenn die entsprechenden Übergänge bei den selben MS-Bedingungen verwendet werden.

7.4.5 Bestimmung der Mykotoxine in der Messlösung

Die Daten werden mit der geeigneten Auswertungssoftware verarbeitet. Für alle weiteren Berechnungen werden Peakflächen herangezogen. Die Zuordnung und Integration der Signale für die jeweils gemessenen Übergänge werden überprüft und ggf. angepasst bzw. korrigiert.

8 Berechnung

Die Signalgrößen der Mykotoxine in den Kontrollen und den Proben, RR_{Probe} , bezogen auf ihre isotopisch markierten internen Standards werden nach Gleichung (2) berechnet:

$$RR_{\text{Probe}} = \left(\frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{IS(STC)}}} \right) \quad (2)$$

Dabei ist

A_{Probe} die Peakfläche des Mykotoxins in der Probe;

$A_{\text{IS(STC)}}$ die Peakfläche des isotopisch markierten internen Standards bei der STC.

Die Probe ist negativ, wenn: $RR_{\text{Probe}} < \text{cut-off value der STC}$.

Die Probe ist verdächtig wenn: $RR_{\text{Probe}} \geq \text{cut-off value der STC}$.

Die Probenergebnisse können valide herangezogen werden wenn die Positivkontrollen verdächtig und die Negativkontrollen negativ sind.

Der cut-off value bei der STC wird nach Gleichung (3) berechnet:

$$\text{Cutoff value bei der STC} = RR_{\text{STC}} - t\text{Wert}_{0,05} \times SD_{\text{STC}} \quad (3)$$

Dabei ist

RR_{STC} der mittlere relative Signalgröße der Probe, die das Mykotoxin bei der STC enthält;

$t\text{-Wert}_{0,05}$ der einseitige t-Wert für einen Anteil von falsch negativen Ergebnissen von 5 % (1,7 für $n = 20$, siehe [3]);

SD_{STC} die durch den Ringversuch erhaltene Standardabweichung für die relative Signalgröße von Proben, die die Mykotoxine bei der STC enthalten.

Cut-off-Werte bei der STC und andere Gehalte sowie die relative Standardabweichung, (RSD_R in %), die während des Ringversuchs ermittelt wurden, sind in Anhang A angegeben.

9 Prüfbericht

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

- a) alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe (Art der Probe, Herkunft der Probe, Bezeichnung);
- b) eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- c) das Datum und Art des Probenahmeverfahrens (wenn bekannt);
- d) das Datum des Probeneingangs;
- 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 optional angesehen wurden und die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben.

Anhang A (informativ)

Präzisionsdaten

Das Verfahren wurde von RIKILT — Wageningen University & Research in Zusammenarbeit mit Eurofins|WEJ-Contaminants innerhalb des CEN-Mandates M/520 erarbeitet und 2016 in einem Ringversuch mit 14 Teilnehmern validiert, wobei Blindwerte, aufgestockte und natürlich kontaminierte Proben von Getreide, Getreideerzeugnissen, Feigen, Erdnüssen und Traubensaft untersucht wurden — unter Berücksichtigung der Verordnung (EU) Nr. 519/2014 [3], und der AOAC „Richtlinien für Ringversuche“ [6].

Die Daten, die in diesem Ringversuch erhalten wurden, sind in Tabelle A.1 bis Tabelle A.8 wiedergegeben.

Tabelle A.1 — Präzisionsdaten und cut-off-Werte für Aflatoxin B1 in verschiedenen Lebensmitteln

Parameters	Weizen		Getreide- mischung	Weizenmehl		Corn- flakes	Feigen			Erdnüsse			Traubensaft	
Massenanteil in µg/kg	nd ^a	2,0 ^b	5,1 ^a	nd ^a	2,0 ^b	3,0 ^a	nd ^a	2,0 ^b	0,5 ^a	nd ^a	2,0 ^b	4,9 ^a	nd ^a	2,0 ^b
Anzahl der teilnehmenden Laboratorien	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Anzahl der Laboratorien, die geeignete Ergebnisse geliefert haben	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse	26	26	26	26	26	26	26	26	18	26	22	24	26	26
Mittlerer <i>RR</i> für Aufstockungen bei der <i>STC</i> = 2 µg/kg		0,955			0,908			0,967			0,914			0,939
Mittlerer <i>RR</i> der Proben (Blind- oder kontaminiert)	0,000		2,55	0,007		1,45	0,012		0,247	0,000		2,11	0,004	
Relative Vergleichstandardabweichung <i>RSD_R</i>		25	20		18	26		27	34		24	17		16
<i>RR</i> cut-off Wert beim oben angegebenen Massenanteil		0,542	0,655		0,636	0,539		0,520	0,409		0,548	0,619		0,680
Prozentanteil der falsch negativen bei der <i>STC</i> (<i>RR</i> < cut-off Wert <i>STC</i>) ^c		3,8	0,0		0,0	0,0		3,8			4,5	0,0		3,8
Prozentanteil der falsch verdächtigen bei der <i>STC</i> (<i>RR</i> ≥ cut-off Wert <i>STC</i>) ^c	0,0			0,0			0,0		0,0	0,0			0,0	
^a nd = kein Peak nachgewiesen (< 0,3 µg/kg). Durch quantitative Untersuchung nicht aufgestockter Proben bestimmt. ^b Aufstocklevel bei der <i>STC</i> . ^c Für Getreide wurde der cut-off Wert für Weizen verwendet, für andere Matrices der entsprechende Matrix-cut-off-Wert. Falsch negativ = quantifizierter Wert ≥ <i>STC</i> , aber <i>RR</i> < cut-off-Wert; falsch verdächtig = quantifizierter Wert < <i>STC</i> , aber <i>RR</i> > cut-off Wert.														

Tabelle A.2 — Präzisionsdaten und cut-off-Werte für Deoxnivalenol

Parameters	Weizen		Getreide- mischung	Weizenmehl		Corn- flakes	Feigen			Erdnüsse			Traubensaft	
Massenanteil in µg/kg	nd ^a	250 ^b	865 ^a	nd ^a	250 ^b	588 ^a	nd ^a	250 ^b	nd ^a	nd ^a	250 ^b	nd ^a	nd ^a	250 ^b
Anzahl der teilnehmenden Laboratorien	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Anzahl der Laboratorien, die geeignete Ergebnisse geliefert haben	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse ^d	22	22	22	22	22	22	22	20	22	22	20	22	22	22
Mittlerer RR für Aufstockungen bei der STC = 250 µg/kg		0,897			1,022			0,955			0,850			0,925
Mittlerer RR der Proben (Blind- oder kontaminiert)	0,062		3,28	0,137		2,26	0,268		0,330	0,032		0,027	0,038	
Relative Vergleichstandardabweichung RSD_R		11	8		18	12		15			35			12
RR cut-off Wert beim oben angegebenen Massenanteil		0,737	0,819		0,718	0,757		0,712			0,348			0,741
Prozentanteil der falsch negativen bei der STC ($RR < \text{cut-off Wert STC}$) ^c		4,5	0,0		0,0	0,0		0,0			10			0,0
Prozentanteil der falsch verdächtigen bei der STC ($RR \geq \text{cut-off Wert STC}$) ^c	0,0			0,0			9,1		18	4,5		0,0	0,0	
^a nd = kein Peak nachgewiesen (< 20 µg/kg). Durch quantitative Untersuchung nicht aufgestockter Proben bestimmt. ^b Aufstocklevel bei der STC. ^c Für Getreide wurde der cut-off Wert für Weizen verwendet, für andere Matrices der entsprechende Matrix-cut-off-Wert. Falsch negativ = quantifizierter Wert $\geq$ STC, aber $RR < \text{cut-off-Wert}$; falsch verdächtig = quantifizierter Wert < STC, aber $RR > \text{cut-off Wert}$. ^d One laboratory performed three measurements using different instruments.														

Tabelle A.3 — Präzisionsdaten und cut-off-Werte für Fumonisin B1

Parameters	Weizen		Getreide- mischung	Weizenmehl		Corn- flakes	Feigen			Erdnüsse			Traubensaft	
Massenanteil in µg/kg	nd ^a	350 ^b	786 ^a	nd ^a	350 ^b	647 ^a	206 ^a	556 ^{b,d}	50 ^a	13 ^a	350 ^b	nd ^a	nd ^a	350 ^b
Anzahl der teilnehmenden Laboratorien	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Anzahl der Laboratorien, die geeignete Ergebnisse geliefert haben	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse	18	18	18	18	18	18	18	17	16	12	17	18	18	18
Mittlerer <i>RR</i> für Aufstockungen bei der <i>STC</i> = 350 µg/kg		0,539			0,649			d			0,608			0,784
Mittlerer <i>RR</i> der Proben (Blind- oder kontaminiert)	0,007		1,14	0,040		2,08	0,580	1,38	0,111	0,037		0,011	0,003	
Relative Vergleichstandardabweichung <i>RSD_R</i>		23	25		23	36	33	19	35	54	25			17
<i>RR</i> cut-off Wert beim oben angegebenen Massenanteil		0,326	0,289		0,399	0,444	0,435	0,593	0,317	< LOD	0,351			0,556
Prozentanteil der falsch negativen bei der <i>STC</i> (<i>RR</i> < cut-off Wert <i>STC</i>) ^c		0,0	0,0		0,0	5,6		5,9 ^d			5,9			5,6
Prozentanteil der falsch verdächtigen bei der <i>STC</i> (<i>RR</i> ≥ cut-off Wert <i>STC</i>) ^c	0,0			5,6			5,6 ^d		0,0	0,0			0,0	
^a nd = kein Peak nachgewiesen (< 7 µg/kg). Durch quantitative Untersuchung nicht aufgestockter Proben bestimmt.. ^b Aufstocklevel bei der <i>STC</i> . ^c Für Getreide wurde der cut-off Wert für Weizen verwendet, für andere Matrices der entsprechende Matrix-cut-off-Wert. Falsch negativ = quantifizierter Wert ≥ <i>STC</i> , aber <i>RR</i> < cut-off-Wert; falsch verdächtig = quantifizierter Wert < <i>STC</i> , aber <i>RR</i> > cut-off Wert. ^d Massenanteil, false negatives und false suspects at 556 µg/kg (incurred + <i>STC</i>) instead of <i>STC</i> .														