

DIN EN 17280

ICS 67.060

Einsprüche bis 2018-09-13

Entwurf**Lebensmittel –**

**Bestimmung von Zearalenon und Trichothecen einschließlich Deoxynivalenol (DON) und den acetylierten Derivaten (3-Acetyl-DON und 15-Acetyl-DON), Nivalenol und T-2- und HT-2-Toxin in Getreide und Getreideerzeugnissen mit LC-MS/MS;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17280:2018**

Foodstuffs –

Determination zearalenone and trichothecenes including deoxynivalenol (DON) and its acetylated derivatives (3-acetyl-DON and 15-acetyl-DON), nivalenol (NIV) and T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products by LCMS/MS;
German and English version prEN 17280:2018

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 79 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17280:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

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

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.

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

ISO 5725 (all parts) siehe DIN ISO 5725 (alle Teile)

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen*

**Lebensmittel — Bestimmung von Zearalenon und Trichothecen
einschließlich Deoxynivalenol (DON) und den acetylierten Derivaten (3-
Acetyl-DON und 15-Acetyl-DON), Nivalenol (NIV), T-2- und HT-2-Toxin in
Getreide und Getreideerzeugnissen mit LC-MS/MS**

Foodstuffs — Determination of zearalenone and trichothecenes including deoxynivalenol (DON) and its acetylated derivatives (3-acetyl-DON and 15-acetyl-DON), nivalenol (NIV) and T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products by LC-MS/MS

ICS:

Deskriptoren

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

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich.....	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Chemikalien.....	6
6 Geräte und Ausrüstung.....	8
7 Durchführung.....	9
7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	9
7.2 Extraktion der Mykotoxine aus der Probe	9
7.3 Reinigung durch Festphasenextraktion.....	9
7.4 Vorbereitung der Probenmesslösung.....	10
7.5 Aufstocken.....	10
7.6 Bestimmung mit LC-MS/MS	10
7.6.1 Allgemeines	10
7.6.2 Chargenzusammensetzung und Analysensequenz	10
7.7 Identifizierung.....	11
7.8 Kalibrierung	11
8 Berechnung.....	11
9 Präzision	12
9.1 Allgemeines	12
9.2 Wiederholpräzision.....	12
9.3 Vergleichpräzision	12
10 Prüfbericht.....	16
Anhang A (informativ) Typische Chromatogramme	17
A.1 Beispielchromatogramm (API SCIEX 5000™).....	17
A.2 Beispielchromatogramm (Thermo Q-Exactive™)	18
Anhang B (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	19
B.1 Einstellungen für API SCIEX 5000™	19
B.1.1 Einstellungen für die Chromatographie.....	19
B.1.2 Detektorparameter.....	19
B.2 Systemeinstellungen für Thermo Q-Exactive™	21
B.2.1 Einstellungen für die Chromatographie.....	21
B.2.2 Detektorparameter.....	21
Anhang C (informativ) Zusätzliche Beispiele für die Trennung von 3-AcDON und 15-AcDON.....	23
C.1 Einstellungen für Accucore™ C18 (Thermo Scientific).....	23
C.2 Einstellungen für Kinetex® C18 (Phenomenex).....	23
C.3 Einstellungen für Kinetex® PFP (Phenomenex).....	24
Anhang D (informativ) Präzisionsdaten	25
Literaturhinweise.....	36

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17280:2018) 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 unter einem Normungsauftrag erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben.

Einleitung

Die Mykotoxine Nivalenol, Deoxynivalenol und seine Acetylderivate (3-Acetyl-Deoxynivalenol, 15-Acetyl-Deoxynivalenol), T-2-Toxin und sein Metabolit HT-2-Toxin sowie Zearalenon werden durch verschiedene *Fusarium*-Arten gebildet. Getreide wie Mais, Weizen, Gerste, Hafer, Roggen und wichtige daraus hergestellte Produkte sind häufig davon betroffen.

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 [3] 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.

WARNUNG 3— *Fusarium* toxinine (Zearalenon, Deoxynivalenol, T-2- und HT-2-Toxine) werden für eine Reihe von Tiererkrankungen wie Lungenödeme, Unfruchtbarkeit, Durchfall, Erbrechen, für verminderte Nahrungsaufnahme, Leukopenie, Immunsuppression, Irritationen der Haut und des Gastrointestinaltraktes, Blutungen usw., verantwortlich gemacht und wurden auch mit einigen Humanerkrankungen in Verbindung gebracht. IARC hat Zearalenon, Deoxynivalenol und T-2-Toxin bezogen auf die Karzinogenität für den Menschen (Gruppe 3) als nicht einstufbar bewertet [4].

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren für die Bestimmung von Nivalenol (NIV), Deoxynivalenol (DON) und den Acetylderivaten (3-Acetyl-DON und 15-Acetyl-DON), HT-2- und T-2-Toxin (HT-2, T-2) und Zearalenon (ZEA) in Getreide und Getreideerzeugnissen mit Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) nach Reinigung durch Festphasenextraktion (SPE).

Das Verfahren wurde an kontaminierten und aufgestockten Proben (Weizen, Weizenmehl und Weizen-cracker) validiert.

NIV ist von 27,7 µg/kg bis 377,8 µg/kg validiert worden.

DON ist von 233,9 µg/kg bis 2 420,0 µg/kg validiert worden.

3-Acetyl-DON ist von 18,5 µg/kg bis 136,5 µg/kg validiert worden.

15-Acetyl-DON ist von 11,4 µg/kg bis 141,8 µg/kg validiert worden.

HT-2-Toxin ist von 6,6 µg/kg bis 133,8 µg/kg validiert worden.

T-2-Toxin ist von 2,1 µg/kg bis 37,6 µg/kg validiert worden.

ZEA ist von 31,6 µg/kg bis 229,7 µg/kg validiert worden.

Laborerfahrungen haben gezeigt, dass dieses Verfahren auch auf Gerste und Hafermehl und Reiscracker anwendbar ist [5], dies wurde jedoch nicht im Ringversuch validiert.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696)*

3 Begriffe

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

Trichothecene und Zearalenon werden aus den Lebensmitteln mit einer Mischung aus Acetonitril-Wasser extrahiert. Der Extrakt wird filtriert und bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird mit einer Mischung aus Methanol und Wasser gelöst und auf eine polymere Festphasen-Extraktionssäule aufgetragen. Die Mykotoxine werden gereinigt und auf der Säule aufkonzentriert und dann mit Methanol eluiert. Isotopisch markierte Mykotoxine werden dem Säuleneluat zugefügt, bevor dieses bis zur Trockne eingeeengt wird. Nach Lösen des Trocknungsrückstandes mit dem Injektionslösemittel werden die Mykotoxine mit Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) quantifiziert.

5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet.

5.1 Stickstoff oder ölfreie Druckluft.

5.2 Wasser, entionisiert.

5.3 Wasser, für HPLC.

5.4 Acetonitril, für HPLC.

5.5 Methanol, für HPLC.

5.6 Ammoniumacetat, für Massenspektrometrie, $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) \geq 99,0 \%$.

5.7 Extraktionsmischung.

84 Volumenteile Acetonitril (5.4) werden mit 16 Volumenteilen Wasser (5.2) gemischt.

5.8 Festphasen-Extraktions (SPE) Säulen, die 60 mg eines hydrophil/lipophil eingestellten Polymers enthalten, das sowohl polare als auch nichtpolare Bestandteile zurückhalten kann (Wassers Oasis® HLB ist geeignet¹⁾).

5.9 Nivalenol (NIV), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.10 Deoxynivalenol (DON), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.11 3-Acetyl-DON (3-AcDON), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.12 15-Acetyl-DON (15-AcDON), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.13 HT-2-Toxin (HT-2), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.14 T-2-Toxin (T-2), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

5.15 Zearalenon (ZEA), z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.

¹⁾ Dies ist ein Beispiel für ein geeignetes Produkt, das im Handel erhältlich ist. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

5.16 Nivalenol isotopisch markierter interner Standard ($^{13}\text{C}_{15}\text{NIV}$), z. B. Nivalenol ^{13}C -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.17 Deoxynivalenol isotopisch markierter interner Standard ($^{13}\text{C}_{15}\text{DON}$), z. B. Deoxynivalenol ^{13}C -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.18 3-Acetyl-DON isotopisch markierter interner Standard ($^{13}\text{C}_{17}\text{3-AcDON}$), z. B. 3-Acetyl-DON ^{13}C -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.19 HT-2-Toxin isotopisch markierter interner Standard ($^{13}\text{C}_{22}\text{HT-2}$), z. B. HT-2-Toxin ^{13}C -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.20 T-2-Toxin isotopisch markierter interner Standard ($^{13}\text{C}_{24}\text{T-2}$), z. B. T-2-Toxin ^{13}C -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.21 ZEA isotopisch markierter interner Standard ($^{13}\text{C}_{18}\text{ZEA}$), z. B. Zearalenon ^{13}C -markiert (vollständig) $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$, in Acetonitril.

5.22 Gemischte Mykotoxin-Stammlösung.

Eine gemischte Mykotoxinstammlösung in Acetonitril (5.4) mit NIV (5.9), DON (5.10), 3-AcDON (5.11), 15-AcDON (5.12), HT-2 (5.13), T-2 (5.14) und ZEA (5.15) wird für die Aufstockungen (7.5) hergestellt.

5.23 Gemischte Mykotoxin-Arbeitslösung.

Eine gemischte Mykotoxin-Arbeitslösung in Acetonitril (5.4) mit $1,25 \mu\text{g/ml}$ NIV (5.9), $6,25 \mu\text{g/ml}$ DON (5.10), $0,75 \mu\text{g/ml}$ 3-AcDON (5.11), $0,75 \mu\text{g/ml}$ 15-AcDON (5.12), $0,25 \mu\text{g/ml}$ HT-2 (5.13), $0,25 \mu\text{g/ml}$ T-2 (5.14) und $0,5 \mu\text{g/ml}$ ZEA (5.15) wird hergestellt und für die Kalibrierung (5.25) benutzt.

5.24 Gemischte Interner Standard (ISTD) Arbeitslösung.

Isotopisch markierte Mykotoxine sind üblicherweise als zertifizierte Standardlösungen in Acetonitril erhältlich. Durch Mischen handelsüblicher einzelner ISTD-Lösungen wird eine gemischte ISTD-Arbeitslösung hergestellt, die $1,25 \mu\text{g/ml}$ $^{13}\text{C}_{15}\text{NIV}$ (5.16), $6,25 \mu\text{g/ml}$ $^{13}\text{C}_{15}\text{DON}$ (5.17), $0,75 \mu\text{g/ml}$ $^{13}\text{C}_{17}\text{3-AcDON}$ (5.18), $0,25 \mu\text{g/ml}$ $^{13}\text{C}_{22}\text{HT-2}$ (5.19), $0,25 \mu\text{g/ml}$ $^{13}\text{C}_{24}\text{T-2}$ (5.20) und $0,5 \mu\text{g/ml}$ $^{13}\text{C}_{18}\text{ZEA}$ (5.21) in Acetonitril (5.4) enthält.

5.25 Kalibrierlösungen.

Verschiedene Volumina der gemischten Mykotoxin-Arbeitslösung (5.23) werden in sechs Autosamplerfläschchen (6.11) nach Tabelle 1 gegeben, was sechs Kalibrierwerte innerhalb des Kalibrierbereiches ergibt. Hierbei wird nach 7.4 vorgegangen.

Tabelle 1 — Beispiel geeigneter Kalibrierlösungen

		Massenkonzentration der Kalibrierlösungen (µg/ml)						
Kalibrier- lösung	Gemischte Mykotoxin Arbeits- lösung	NIV	DON	3-AcDON	15-AcDON	HT-2	T-2	ZEA
	µl	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
1	25	0,078	0,391	0,047	0,047	0,016	0,016	0,031
2	50	0,156	0,781	0,094	0,094	0,031	0,031	0,063
3	100	0,313	1,563	0,188	0,188	0,063	0,063	0,125
4	200	0,625	3,125	0,375	0,375	0,125	0,125	0,250
5	400	1,250	6,250	0,750	0,750	0,250	0,250	0,500
6	600	1,875	9,375	1,125	1,125	0,375	0,375	0,750
		Massenkonzentration der isotopisch markierten Analyte (µg/ml) in allen Kalibrierlösungen						
		0,316	1,563	0,188	0,188	0,063	0,063	0,125

Sobald sich eine Linearität gezeigt hat, kann die Konzentration an die lokalen Bedürfnisse und Anforderungen angepasst werden.

5.26 HPLC Injektionslösemittel.

Die Zusammensetzung des HPLC-Injektionslösemittels hängt von den angewendeten LC-Bedingungen ab (siehe 7.1). Beispiele von für die LC-MS/MS-Systeme geeigneter Eluenten sind in Anhang B angegeben.

6 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborgeräte und Ausrüstung und insbesondere die Folgenden:

6.1 Analysenwaage, Fehlergrenze: 0,01 mg.

6.2 Laborwaage, Fehlergrenze: 0,01 g.

6.3 Einstellbarer mechanischer vertikaler oder horizontaler Schüttler, für Lösemittelextraktion mit geeigneten 100 ml-Kolben.

6.4 Filterpapier, Porengröße 20 µm bis 25 µm.

6.5 Erlenmeyerkolben, mit Schraubverschluss oder Glasstopfen.

6.6 Unterdruck-Einheit, für die Festphasen-Extraktionssäulen.

6.7 Vollpipetten, 5 ml.

6.8 Kalibrierte Mikroliterspritze(n) oder Mikroliter Pipette(n), 10 µl bis 1 000 µl.

6.9 Glasröhrchen, 10 ml mit Verschluss.

6.10 4 ml-Fläschchen, mit Verschluss.

6.11 Autosamplerfläschchen, mit Verschluss.

6.12 Einweg-Filtereinheit, mit 0,2 µm Porengröße, regenerierte Cellulose.

6.13 Verdampfungseinrichtung.

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

6.14.1 LC-Pumpe, geeignet, einen Binärgradienten mit den für die Analysensäule geeigneten Durchflussmengen mit ausreichender Genauigkeit zu liefern.

6.14.2 Injektionssystem, das ein geeignetes Volumen der Injektionslösung mit ausreichender Genauigkeit einspritzt und für eine Kreuzkontamination unter 0,1 %.

6.14.3 LC-Säule, geeignet, die sieben Analyten aufzutrennen, und die es ermöglicht, die Mykotoxine, die im positiven Ionenmodus detektiert werden, von denen, die im negativen Ionenmodus detektiert werden, mit Basislinienauftrennung zu beobachten. Die kleinstmöglich annehmbare Retentionszeit für die Analyten muss mindestens zweimal so groß sein wie die Retentionszeit, die dem Totvolumen der Säule entspricht.

6.14.4 Säulenofen, der eine konstante Temperatur aufrechterhalten kann.

6.14.5 Tandem-Massenspektrometer (MS/MS), geeignet zur Ionisierung der Mykotoxine (entweder in positive oder negative Ionen), mit „Selected Reaction Monitoring“ (SRM) bei MS/MS-Geräten oder „Parallel Reaction Monitoring“ (PRM) bei MS/hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS).

Jede Ionisationsquelle, die ausreichende Ergebnisse liefert, darf verwendet werden.

7 Durchführung

7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Laborprobe wird gründlich gemahlen und homogenisiert.

7.2 Extraktion der Mykotoxine aus der Probe

10,0 g der Untersuchungsprobe (Einwaage) werden auf 0,1 g (6.2) in einen 100 ml Erlenmeyerkolben (6.5) eingewogen, mit 50 ml Extraktionsmischung (5.7) versetzt, 60 min heftig mit dem Schüttler (6.3) geschüttelt und durch ein Filterpapier (6.4) filtriert.

Ein 5 ml-Anteil des filtrierten Extraktes werden in ein 10 ml Glassröhrchen (6.9) pipettiert (6.7) und bei etwa 40 °C unter einem Luft- oder Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft (5.1).

Der Rückstand wird zunächst in 100 µl Methanol (5.5) gelöst und etwa 1 min geschüttelt. Dann werden 900 µl Wasser (5.3) zugegeben (6.8) und es wird wiederum etwa 1 min geschüttelt.

7.3 Reinigung durch Festphasenextraktion

Die SPE-Säule (5.8) wird auf die Unterdruckeinheit (6.6) gesteckt.

Die SPE-Säule (5.8) wird aktiviert und konditioniert, indem 2 ml Methanol (5.5) und anschließend 2 ml Wasser (5.3) durchlaufen gelassen werden.

Das gesamte Volumen (1 ml) des rekonstituierten Extraktes wird mit einer Geschwindigkeit von etwa einem Tropfen je Sekunde durch die Säule laufen gelassen, wobei das Eluat verworfen wird. Die Säule wird getrocknet.

Die Säule wird mit 1 ml Wasser (5.3) gewaschen und das Eluat verworfen. Die Säule wird getrocknet.

Die Mykotoxine werden mit 1 ml Methanol (5.5) eluiert. Das Eluat wird in einem 4 ml Fläschchen (6.10) aufgefangen. Um das Eluat vollständig aus der Säule zu entfernen wird Luft durch die Säule gedrückt.

7.4 Vorbereitung der Probenmesslösung

100 µl der gemischten ISTD-Arbeitslösung (5.24) werden zum SPE-Eluat und/oder zu den entsprechenden Volumina der gemischten Mykotoxin Arbeitslösungen (5.23) nach Tabelle 1 gegeben.

Das SPE Eluat und/or die gemischte Mykotoxin-Arbeitslösung werden in einer Eindampfstation (6.13) bei etwa 40 °C unter einem Luft- oder Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft (5.1).

Der Rückstand wird in 400 µl HPLC-Injektionslösemittel (5.26) gelöst und mindestens 10 s gründlich gemischt.

Die Lösung wird durch einen Spritzen- oder Zentrifugenfilter (6.12) filtriert.

Die Lösung wird in Autosamplerfläschchen (6.11) überführt.

7.5 Aufstocken

Für die Wiederfindung wird die Probe mit gemischten Mykotoxin-Stammlösungen (5.22) aufgestockt. Der Aufstockwert muss innerhalb des Kalibrierbereiches liegen und muss vorzugsweise der mittleren Konzentration der Kalibriergerade entsprechen. Es muss darauf geachtet werden, dass nicht mehr als 1 ml Aufstocklösung zugefügt wird. Die Lösungen werden gleichmäßig auf das Probenmaterial aufgebracht. Die Aufstocklösung wird bei Raumtemperatur verdampfen gelassen.

7.6 Bestimmung mit LC-MS/MS

7.6.1 Allgemeines

Die analytischen Parameter (Auswahl des Ionisationsmodus, Auswahl der Massen von Vorläufer- und Produkt-Ionen, Optimierung von Kegelspannungen und Kollisionsenergien) werden durch Infusion und Injektion von Standardlösungen der Analyten optimiert.

Die Zusammenstellung der analytischen Säule, Zusammensetzung der mobilen Phase, Gradienteneinstellungen und Injektionsvolumen muss so beschaffen sein, dass ermöglicht wird, eine akzeptable Trennung und zuverlässige Ergebnisse auf den erforderlichen Niveaus zu erhalten, wobei die Selektivität für eine akzeptabel niedrige Anzahl an falsch vermuteten Ergebnissen ausreichen muss.

Anhang A zeigt einige Beispielchromatogramme und Anhang B listet einige geeignete Parameter auf.

Einige zusätzliche Beispiele für LC-Säulen und relevante Arbeitsbedingungen, die die Trennung von 3-AcDON und 15-AcDON ermöglichen, sind in Anhang C angegeben.

7.6.2 Chargenzusammensetzung und Analysensequenz

Um die Kontaminationsfreiheit des Systems zu zeigen, wird eine Messreihe stets mit dem LC-Injektionslösemittel (5.26) gestartet. Dann wird die höchste Kalibrierlösung, gefolgt von einem Reagenzienblindwert injiziert, um mögliche Überlagerungen zu prüfen.

Anschließend werden die Prüflösungen injiziert. Am Ende der Charge wird die Kalibrierungsreihe neu eingespritzt. Bei größeren Probenchargen wird die Kalibrierlösung Nr. 3 nach jeweils etwa 10 Proben eingespritzt.

7.7 Identifizierung

Jedes einzelne Mykotoxin wird durch Vergleich der Retentionszeiten der Kalibrierlösungen mit denen der Probenmesslösung identifiziert. Die Analyten werden anhand von mindestens zwei Massenübergängen identifiziert. Das Peakflächenverhältnis der beiden Peaks muss dem der Vergleichssubstanz entsprechen.

7.8 Kalibrierung

Für jede Injektion wird das Verhältnis der Peakflächen jedes Analyten zu den Peakflächen des entsprechenden markierten Analogons berechnet. Diese Peakflächenverhältnisse werden in allen folgenden Berechnungen verwendet.

Die Peakfläche von 15-AcDON wird durch die Peakfläche von $^{13}\text{C}_{17}$ 3-AcDON geteilt.

Für jeden der sieben Analyten (NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, HT-2, T-2, und ZEA) wird eine Kalibriergerade erstellt, indem die berechneten Peakflächenverhältnisse jedes Analyten in den Kalibrierlösungen gegen die entsprechende Menge (μg) des auf die Säule injizierten Analyten aufgetragen werden. Die Steigung und der mögliche Achsenabschnitt für jede der sieben Kalibriergeraden werden mit linearer Regression abgeschätzt.

8 Berechnung

Der Massenanteil jedes Mycotoxins, w , in Mikrogramm je Kilogramm Probe wird nach Gleichung (1) berechnet:

$$w = \left(\frac{R}{a} - \frac{b}{a} \right) \times \frac{V_1}{V_2} - \frac{1}{m_{\text{SPE}}} \quad (1)$$

Dabei ist

- R das Peakflächenverhältnis des betreffenden Analyten und des entsprechenden internen Standards in der Probenmesslösung;
- a die Steigung der linearen Funktion aus den Kalibrierdaten (7.8);
- b der Schnittpunkt der linearen Funktion aus den Kalibrierdaten (7.8);
- V_1 das Volumen des gelösten Extraktes nach der Reinigung (hier: 0,4 ml);
- V_2 das Volumen des gelösten Extraktes, der ins LC-System injiziert wird;
- m_{SPE} die Masse die der durch die SPE-Säule gereinigten Probe entspricht (hier: 1 g).

Die Masse, die der gereinigten Probe entspricht (m_{SPE}), wird nach Gleichung (2) berechnet:

$$m_{\text{SPE}} = \frac{m \times V_4}{V_3} \quad (2)$$

Dabei ist

- m die Masse der extrahierten Einwaage (hier: 10 g);
- V_3 das Volumen des Extraktionslösemittels (hier: 50 ml);
- V_4 das Volumen des filtrierten Extraktes, der dann vor der Reinigung eingengt wird (hier: 5 ml).

9 Präzision

9.1 Allgemeines

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

9.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Ergebnissen, die ein einzelner Bearbeiter an identischem Untersuchungsmaterial mit denselben Geräten innerhalb der kürzesten möglichen Zeitspanne erhält, überschreitet die Wiederholgrenze r in Tabelle 2 bis Tabelle 8 nicht häufiger als in 5 % der Fälle.

9.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Ergebnissen, die zwei Laboratorien für identisches Untersuchungsmaterial erhalten, überschreitet die Vergleichsgrenze R in Tabelle 2 bis Tabelle 8 nicht häufiger als in 5 % der Fälle.

Tabelle 2 — Validierungsdaten für Nivalenol

Probe	$\bar{x}$	r	R
	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Weizen	194,1	31,76	91,81
Weizen	87,12	81,12	85,02
Weizen	186,9	57,12	21,06
Weizen	377,8	151,2	268,6
Weizenmehl	116,0	19,79	59,80
Weizenmehl	52,89	50,46	49,26
Weizenmehl	107,7	12,63	28,41
Weizenmehl	214,8	21,26	58,50
Weizen cracker	70,71	16,39	40,33
Weizen cracker	27,69	11,62	24,65
Weizen cracker	64,87	11,27	53,26
Weizen cracker	123,8	20,14	75,89

Tabelle 3 — Validierungsdaten für Deoxynivalenol

Probe	$\bar{x}$	r	R
	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Weizen	1212	124,8	322,5
Weizen	635,4	53,91	263,0
Weizen	1201	355,7	366,4
Weizen	2420	146,1	435,3
Weizenmehl	692,5	97,12	188,3
Weizenmehl	351,0	65,68	313,9
Weizenmehl	613,0	64,50	244,7
Weizenmehl	1234	114,2	354,4
Weizen cracker	448,7	34,98	235,4
Weizen cracker	233,9	92,80	158,2
Weizen cracker	487,6	68,32	204,5
Weizen cracker	1004	374,1	389,1

Tabelle 4 — Validierungsdaten für 3-Acetyl—Deoxynivalenol

Probe	$\bar{x}$	r	R
	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Weizen	136,5	21,74	30,56
Weizen	49,10	4,074	37,27
Weizen	83,68	21,99	18,40
Weizen	67,68	12,14	14,64
Weizenmehl	67,01	16,07	75,53
Weizenmehl	30,22	5,800	27,09
Weizenmehl	58,95	16,57	52,23
Weizenmehl	96,22	14,32	26,37
Weizen cracker	44,96	7,433	38,08
Weizen cracker	18,47	8,603	13,24
Weizen cracker	26,22	4,924	14,89
Weizen cracker	49,96	16,21	28,30

Tabelle 5 — Validierungsdaten für 15-Acetyl—Deoxynivalenol

Probe	$\bar{x}$	r	R
	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Weizen	141,84	33,87	138,28
Weizen	35,64	5,788	44,38
Weizen	41,48	10,75	28,79
Weizen	30,14	6,023	32,26
Weizenmehl	68,25	11,40	59,06
Weizenmehl	12,87	3,744	12,22
Weizenmehl	24,38	9,390	28,63
Weizenmehl	28,64	7,720	29,14
Weizen cracker	46,24	11,14	47,57
Weizen cracker	11,41	8,049	14,36
Weizen cracker	16,42	4,751	15,53
Weizen cracker	32,34	5,374	30,35

Tabelle 6 — Validierungsdaten für HT-2-Toxin

Probe	$\bar{x}$	r	R
	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Weizen	46,40	9,544	42,51
Weizen	17,33	3,209	12,53
Weizen	36,29	31,25	35,92
Weizen	133,8	38,34	100,7
Weizenmehl	21,60	3,660	5,981
Weizenmehl	6,63	4,813	7,110
Weizenmehl	14,18	3,530	11,64
Weizenmehl	32,97	8,489	24,71
Weizen cracker	10,73	1,427	7,924
Weizen cracker	7,988	3,133	6,835
Weizen cracker	19,59	8,357	11,30
Weizen cracker	38,02	11,22	32,62

Tabelle 7 — Validierungsdaten für T-2-Toxin

Probe	$\bar{x}$	r	R
	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Weizen	45,89	15,55	35,82
Weizen	27,50	8,670	24,92
Weizen	47,79	44,93	55,16
Weizen	18,01	5,930	17,72
Weizenmehl	20,85	3,691	20,58
Weizenmehl	11,53	2,347	10,51
Weizenmehl	26,85	4,770	6,392
Weizenmehl	37,57	7,590	38,14
Weizen cracker	11,05	2,162	9,664
Weizen cracker	4,530	1,544	4,796
Weizen cracker	8,091	2,350	8,806
Weizen cracker	15,88	2,181	13,43

Tabelle 8 — Validierungsdaten für Zearalenon

Probe	$\bar{x}$	r	R
	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Weizen	95,12	17,22	57,20
Weizen	59,85	22,63	53,86
Weizen	125,1	45,08	75,59
Weizen	229,7	71,35	133,9
Weizenmehl	62,03	22,64	30,61
Weizenmehl	42,49	15,59	25,70
Weizenmehl	86,38	56,80	64,77
Weizenmehl	171,7	39,91	75,00
Weizen cracker	47,13	9,734	40,38
Weizen cracker	31,62	15,18	20,63
Weizen cracker	58,26	25,55	39,59
Weizen cracker	120,5	24,73	128,4

10 Prüfbericht

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

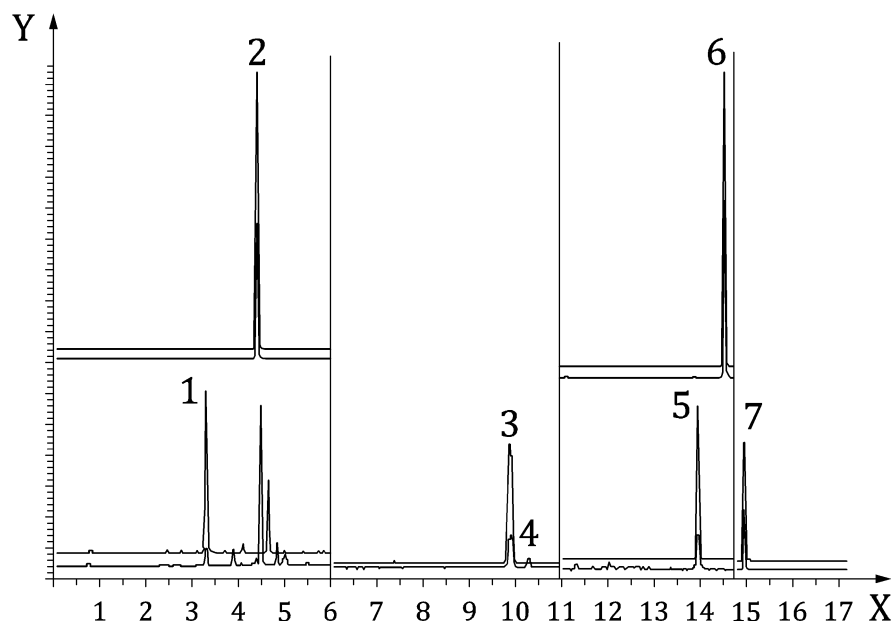
- a) alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe (Art der Probe, Herkunft der Probe, Bezeichnung);
- b) eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- c) das Datum und Art des Probenahmeverfahrens (wenn bekannt);
- d) das Datum des Probeneingangs;
- e) das Datum der Untersuchung;
- f) 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)

Typische Chromatogramme

A.1 Beispielchromatogramm (API SCIEX 5000™)

Bild A.1 wurde mit den in B.1 angegebenen Einstellungen erhalten.



Legende

X Zeit, in Minuten

Y relative Intensität, %

1 Nivalenol (obere Linie) und ^{13}C -Nivalenol (untere Linie) bei $t = 3,22$ min

2 Deoxynivalenol (obere Linie) und ^{13}C -Deoxynivalenol (untere Linie) bei $t = 4,33$ min

3 3-Acetyl-Deoxynivalenol (obere Linie) und ^{13}C -3-Acetyldeoxynivalenol (untere Linie) bei $t = 10,01$ min

4 15-Acetyl-Deoxynivalenol bei $t = 10,30$ min

5 HT-2-Toxin (obere Linie) und ^{13}C -HT-2-Toxin (untere Linie) bei $t = 14,01$ min

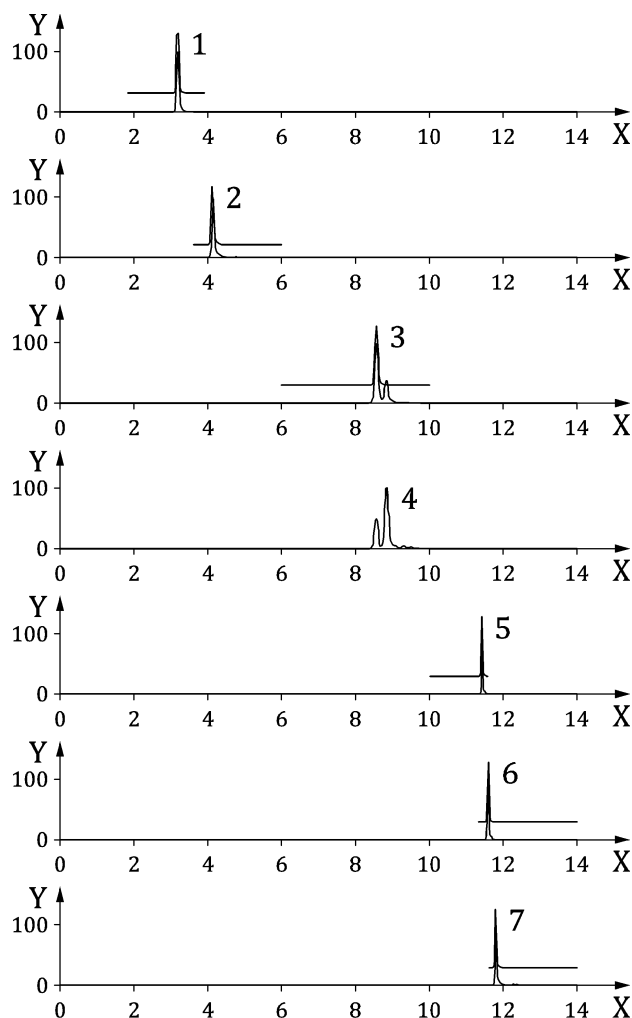
6 T-2-Toxin (obere Linie) und ^{13}C -T-2-Toxin (untere Linie) bei $t = 14,64$ min

7 Zearalenon (obere Linie) und ^{13}C -Zearalenon (untere Linie) bei $t = 14,91$ min

Bild A.1 — Einzelionenchromatogramm einer mit 120 µg/kg NIV, 600 µg/kg DON, 75 µg/kg 3- und 15-AcDON, 25 µg/kg HT-2 und T-2, 50 µg/kg ZEA, und den jeweiligen ^{13}C -ISTD aufgestockten Weizenprobe

A.2 Beispielchromatogramm (Thermo Q-Exactive™)

Bild A.2 wurde mit den in B.2 angegebenen Einstellungen erhalten.



Legende

X Zeit, in Minuten

Y relative Intensität, in %

1 Nivalenol (untere Linie) und ^{13}C -Nivalenol (obere Linie) bei $t = 3,19$ min

2 Deoxynivalenol (untere Linie) und ^{13}C -Deoxynivalenol (obere Linie) bei $t = 4,11$ min

3 3-Acetyl-Deoxynivalenol (untere Linie) und ^{13}C -3-Acetyldeoxynivalenol (obere Linie) bei $t = 8,55$ min

4 15-Acetyl-Deoxynivalenol bei $t = 8,82$ min

5 HT-2-Toxin (untere Linie) und ^{13}C -HT-2-Toxin (obere Linie) bei $t = 11,41$ min

6 T-2-Toxin (untere Linie) und ^{13}C -T-2-Toxin (obere Linie) bei $t = 11,58$ min

7 Zearalenon (untere Linie) und ^{13}C -Zearalenon obere Linie) bei $t = 11,78$ min

Bild A.2 — Extrahiertes Ionenchromatogramm (Quantifier-Ionen) einer Mycotoxin-Standardlösung mit $1,87 \mu\text{g/ml}$ NIV, $9,37 \mu\text{g/ml}$ DON, $1,12 \mu\text{g/ml}$ 3- und 15-AcDON, $0,37 \mu\text{g/ml}$ HT-2 und T-2, $0,75 \mu\text{g/ml}$ ZEA, und den jeweiligen ^{13}C -ISTD

Anhang B (informativ)

Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme

B.1 Einstellungen für API SCIEX 5000™

B.1.1 Einstellungen für die Chromatographie

Diese und die in B.2.1 angegebenen Einstellungen können als Richtwerte betrachtet werden. Die genauen chromatographischen Bedingungen hängen jeweils von der Laborausstattung bzw. dem Gerät ab und dürfen daher leicht abweichen. Durch Messen von Standardlösungen muss sichergestellt werden, dass das Analysensystem geeignet ist.

Trennsäule:	Cortex® C18 (100 mm × 2,10 mm, 1,6 µm Teilchengröße) (Waters), mit entsprechender Vorsäule
Injektionsvolumen:	10 µl
Säulentemperatur:	40 °C
Fluss:	0,3 ml/min
Eluent A:	Wasser mit 5 mmol/l Ammoniumacetat (5.6)
Eluent B:	Methanol (5.5) mit 5 mmol/l Ammoniumacetat (5.6)

Tabelle B.1 — Gradient

Zeit min	Eluent A %	Eluent B %
0,0	99	1
4,0	80	20
9,0	80	20
15,0	20	80
17,0	20	80
18,0	0	100
21,0	0	100
22,0	99	1
30,0	99	1

B.1.2 Detektorparameter

Die folgenden Detektoreinstellungen (und die in B.2.2) können als Richtwerte betrachtet werden. Die genauen Messbedingungen hängen jeweils vom Gerät ab und dürfen daher leicht abweichen. Durch Messen von Standardlösungen muss sichergestellt werden, dass das Analysensystem geeignet ist.

Quellenparameter und allgemeine massenspektrometrische Spezifikationen (siehe auch Tabelle B.2):

Ionisation:	Electrospray-Ionisation (ESI)
Temperatur:	450 °C
Curtain gas:	15,0 psi

Kollisionsgas: 5 psi
Ionensprayspannung:
negativer Modus -4 500 V
positiver Modus 5 500 V
Ionenquellengas 1: 60 psi
Ionenquellengas 2: 40 psi
Auflösung Q1: unit
Auflösung Q3: unit

Tabelle B.2 — Analytspezifische massenspektrometrische Bedingungen

Analyt	Polarität	Quasi Molekül-Ion	Vorläufer-Ion (m/z)	Produkt-Ion (m/z)	DP ^a	EP ^b	CE ^c	CXP ^d
NIV	neg	(M+AcO) ⁻	371,2	281,3	-60	-10	-21	-10
				59,1*			-42	-7
¹³ C-NIV	neg	(M+AcO) ⁻	386,1	296,0	-60	-10	-21	-10
				59,0			-42	-7
DON	neg	(M+AcO) ⁻	355,2	265,2	-60	-13	-22	-20
				59,0			-40	-20
¹³ C-DON	neg	(M+AcO) ⁻	370,2	310,3	-60	-13	-22	-20
				59,0			-40	-20
3/15AcDON	neg	(M+AcO) ⁻	397,2	307,1	-60	-10	-20	-5
				59,0			-40	-5
¹³ C-3AcDON	neg	(M+AcO) ⁻	414,2	323,2	-60	-10	-20	-5
				59,0			-40	-5
HT-2	pos	(M+NH ₄) ⁺	442,0	263,2	20	5	17	4
				215,0			17	3
¹³ C-HT-2	pos	(M+NH ₄) ⁺	463,9	278,1	20	5	17	4
				229,2			17	3
T-2	pos	[M+NH ₄] ⁺	484,3	215,2	45	7	30	3
				185,3			30	3
¹³ C-T2	pos	(M+NH ₄) ⁺	508,0	229,0	45	7	30	3
				198,3			30	3
ZEA	neg	(M-H) ⁻	317,0	175,1	-70	-7	-30	-3
				130,9			-40	-2
¹³ C-ZEA	neg	(M-H) ⁻	335,0	185,1	-70	-7	-30	-3
				140,0			-40	-2
^a DP: Declustering potential. ^b EP: Entrance potential. ^c CE: Collision energy. ^d CXP: Collision cell exit potential.								

B.2 Systemeinstellungen für Thermo Q-Exactive™

B.2.1 Einstellungen für die Chromatographie

Trennsäule:	Poroshell HPH-C18 (100 mm × 2,10 mm, 2,7 µm Teilchengröße) (Agilent), mit entsprechender Vorsäule
Injektionsvolumen:	10 µl
Säulentemperatur:	35 °C
Fluss:	0,300 ml/min
Eluent A:	Wasser mit 5 mmol/l Ammoniumacetat (5.6)
Eluent B:	Methanol (5.5) mit 5 mmol/l Ammoniumacetat (5.6)

Tabelle B.3 — Gradient

Zeit min	Eluent A %	Eluent B %
0,0	99	1
4,0	77	23
9,0	77	23
18,0	0	100
21,0	0	100
22,0	99	1
26,0	99	1

B.2.2 Detektorparameter

Quellenparameter und allgemeine massenspektrometrische Spezifikationen (siehe auch Tabelle B.4):

Ionisation:	Heated Electrospray ionization (HESI-II)
Spray voltage (+)	3 900 V
Kapillartemperatur	400 °C
Sheath gas	17 arbitrary units
Auxiliary gas	8 arbitrary units
Probe heater temperature	450 °C
Auflösung	17 500 FWHM
Maximale Injektionszeit	80 ms
Automatic gain control target	3×10^6
Isolation window	1,2 m/z
Massentoleranz für Peakintegration	3 ppm

Tabelle B.4 — Analytspezifische massenspektrometrische Bedingungen

Analyt	Polarität	Quasi-Molekül-Ion	Vorläufer-Ion (m/z)	NCE	Produkt-Ionen (m/z)
NIV	pos	(M+H) ⁺	313,13	27	175,075 5*
					137,059 8
¹³ C-NIV	pos	(M+H) ⁺	328,18	27	186,112 4*
					145,086 8
DON	pos	(M+H) ⁺	297,13	27	203,106 1*
					231,101 0
¹³ C-DON	pos	(M+H) ⁺	312,18	27	216,150 2*
					245,148 4
3-AcDON	pos	(M+H) ⁺	339,14	27	231,101 6*
					213,091 0
15-AcDON	pos	(M+H) ⁺	339,14	27	137,094 0*
					261,112 3
¹³ C-3AcDON	pos	(M+H) ⁺	356,20	27	245,148 8*
					227,138 2
HT-2	pos	(M+NH ₄) ⁺	442,24	18	263,127 4*
					215,106 5
¹³ C-HT-2	pos	(M+NH ₄) ⁺	464,32	18	278,175 0*
					229,153 8
T-2	pos	(M+NH ₄) ⁺	484,25	15	215,105 8*
					305,136 8
¹³ C-T2	pos	(M+NH ₄) ⁺	508,33	15	229,153 5*
					322,195 0
ZEA	pos	(M+H) ⁺	319,15	27	187,075 0*
					283,132 2
¹³ C-ZEA	pos	(M+H) ⁺	337,21	27	199,115 5*
					301,193 2