

DIN EN 17521



ICS 67.050

Einsprüche bis 2020-07-08

Entwurf

**Lebensmittel –
Bestimmung von Alternariatoxinen in Tomaten, Weizen und
Sonnenblumenkernen mit Flüssigchromatographie und
Tandem-Massenspektrometrie;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17521:2020**

Foodstuffs –

Determination of Alternaria toxins in tomato, wheat and sunflower seeds by SPE clean-up and HPLC-MS/MS;

German and English version prEN 17521:2020

Produits alimentaires –

Détermination de la teneur en toxines d'Alternaria dans la tomate, le blé et les graines de tournesol par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem;

Version allemande et anglaise prEN 17521:2020

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-05-08 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 75 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17521:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

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

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

Lebensmittel — Bestimmung von Alternariatoxinen in Tomaten, Weizen und Sonnenblumenkernen mit Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie

Produits alimentaires — Détermination de la teneur en toxines d'Alternaria dans la tomate, le blé et les graines de tournesol par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Foodstuffs — Determination of Alternaria toxins in tomato, wheat and sunflower seeds by SPE clean-up and HPLC-MS/MS

ICS:

Deskriptoren

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

STD Version 2.10b

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Reagenzien	6
6 Geräte und Ausrüstung	10
7 Durchführung	11
7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	11
7.2 Extraktion	11
7.3 Reinigung durch Festphasenextraktion	12
7.4 Vorbereitung der Probenmesslösung	12
7.5 LC-MS/MS-Analyse	13
7.5.1 LC-MS/MS-Betriebsbedingungen	13
7.5.2 Kalibrierkurve	13
7.5.3 Injektionssequenz	13
7.6 Identifizierung	13
7.7 Kalibrierung	14
8 Berechnung	15
9 Präzision	15
9.1 Allgemeines	15
9.2 Wiederholpräzision	15
9.3 Vergleichpräzision	15
10 Prüfbericht	17
Anhang A (informativ) Beispielchromatogramme	18
Anhang B (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	21
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	25
Literaturhinweise	36

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17521:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Einleitung

Die Spezies *Alternaria*, unter denen *A. alternata* die am weitesten verbreitete ist, bilden mehr als 70 Sekundärmetabolite, von denen jedoch nur wenige ihrer Struktur nach als Mykotoxine identifiziert und dokumentiert wurden [1]. Bei *Alternaria*-Pilzen handelt es sich um häufige Pflanzenschadorganismen an Getreide, Ölsaaten, Obst und Gemüse und anderen Lebensmitteln, und das Auftreten von *Alternaria*-Toxinen bei diesen Grunderzeugnissen wurde umfassend dokumentiert [1]. Diese Toxine kontaminieren nicht nur Ernten, sondern können Lebensmittel auch bei Kühlschranktemperaturen verderben lassen.

Von diesen *Alternaria*-Toxinen sind Altenuen (ALT), Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME), Tentoxin (TEN) und Tenuazonsäure (TEA) von größtem Belang. ALT, AOH und AME sind Dibenzo- α -Pyrone, TEN ist ein zyklisches Tetrapeptid und TEA ein Derivat der Tetramsäure. ALT und TEA weisen *in vitro* sowie in Tierversuchen eine akute Toxizität auf. AME und AOH sind nicht sehr akut toxisch, wurden jedoch als Auslöser von genotoxischen und mutagenen Wirkungen beschrieben [1] bis [3].

Im Allgemeinen treten diese Toxine bei Tomatenerzeugnissen, Getreide und Ölsaaten (z. B. Sonnenblumenkernen) auf, weshalb diese in diesem Dokument schwerpunktmäßig behandelt werden.

WARNUNG 1 — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, (EG) Nr. 1907/2006 [4] (in der neuesten Fassung), sowie geeignete nationale Erklärungen sollten berücksichtigt werden.

WARNUNG 2 — Die Anwendung dieses Dokuments kann den Einsatz gefährlicher Werkstoffe, Arbeitsgänge und Geräte mit sich bringen. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, entsprechende Maßnahmen zum Arbeits- und Gesundheitsschutz zu ergreifen sowie vor der Anwendung die Kompatibilität mit einschränkenden Vorschriften zu bestimmen.

WARNUNG 3 — Einige *Alternaria*-Toxine weisen genotoxische und mutagene Wirkungen auf.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung von fünf *Alternaria*-Toxinen an Weizen, Tomatenmark und Sonnenblumenkernen durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) in Verbindung mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) fest.

Das Verfahren wurde mit sowohl natürlich kontaminierten als auch dotierten Weizen-, Tomatenmark- und Sonnenblumenkernproben validiert.

Die Validierungswerte für Altenuen (ALT) lagen im Bereich von 2,18 µg/kg bis 13,8 µg/kg.

Die Validierungswerte für Alternariol (AOH) lagen im Bereich von 1,82 µg/kg bis 46,7 µg/kg.

Die Validierungswerte für Alternariolmonomethylether (AME) lagen im Bereich von 1,29 µg/kg bis 47,2 µg/kg.

Die Validierungswerte für Tentoxin (TEN) lagen im Bereich von 5,29 µg/kg bis 218 µg/kg.

Die Validierungswerte für Tenuazonsäure (TEA) lagen im Bereich von 41,8 µg/kg bis 1 618 µg/kg.

Mit diesem Verfahren sind Bestimmungsgrenzen von 1 µg/kg für ALT (ausgenommen bei Weizen und Sonnenblumenkernen), AOH und AME, von 5 µg/kg für TEN und von 10 µg/kg für TEA oder niedriger erreichbar.

2 Normative Verweisungen

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

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

3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

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

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

4 Kurzbeschreibung

Eine Prüfmenge der Probe, die mit den isotoopenmarkierten internen Standards dotiert ist, wird mit einer Lösung aus Methanol, Wasser und Essigsäure extrahiert. Die Probe/Das Gemisch mit Extraktionslösemittel wird zentrifugiert und ein Aliquot des Überstands wird aufgefangen. Der Extrakt wird mit einem gleichen Volumen wässriger Essigsäurelösung von 1 % verdünnt und an einem Adsorptionsmittel zur polymerischen Festphasen-Extraktion (solid-phase extraction, SPE) aufkonzentriert. Der Extrakt wird aus der SPE-Säule mit einer Lösung aus Methanol und Essigsäureethylester eluiert. Dann wird das Eluat verdampft, rekonstituiert, durch ein Spritzenfilter aus Polytetrafluorethylen (PTFE) gefiltert und anschließend per HPLC-MS/MS analysiert.

5 Reagenzien

Sofern keine anderslautenden Festlegungen bestehen, werden nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Die Lösungen müssen, sofern nicht anders festgelegt, von geeigneter Qualität für die LC-MS-Analyse sein. Handelsübliche Lösungen mit gleichwertigen Eigenschaften wie die aufgeführten dürfen verwendet werden.

5.1 Stickstoff-Druckgas, Reinheit von 99,99 % oder höher.

5.2 Wasser (H₂O), HPLC-Qualität.

5.3 Wasser (H₂O), LC-MS-Qualität.

5.4 Methanol, analysenrein.

5.5 Methanol, LC-MS-Qualität.

5.6 Essigsäureethylester, analysenrein oder höher.

5.7 Ammoniumhydroxid (NH₄OH), LC-MS-Qualität, Volumenanteil $\varphi(\text{NH}_4\text{OH}) = 25 \%$.

5.8 Ammoniumhydroxid (NH₄OH), $\varphi(\text{NH}_4\text{OH}) = 2,5 \%$.

1 ml Ammoniumhydroxid 25 % (5.7) wird in einen mit ungefähr 5 ml Wasser (5.3) gefüllten 10-ml-Messkolben gegeben und bis zur Marke mit Wasser (5.3) aufgefüllt.

5.9 Essigsäure, $\varphi \geq 99,7 \%$.

5.10 Ammoniumacetat (CH₃COONH₄), LC-MS-Qualität.

5.11 Ammoniumacetat-Lösung (CH₃COONH₄), Stoffmengenkonzentration $c = 1 \text{ mol/l}$.

77,08 g Ammoniumacetat (5.10) werden in 1 l Wasser (5.3) gelöst.

5.12 Extraktionsgemisch, Gemisch aus Methanol + Wasser + Essigsäure (85 + 14 + 1, v + v + v).

850 ml Methanol (5.4) werden mit 140 ml Wasser (5.2) und 10 ml Essigsäure (5.9) gemischt.

5.13 Wässrige Essigsäurelösung, Essigsäure + Wasser (1 + 99, v + v), $\varphi = 1 \%$.

10 ml Essigsäure (5.9) werden mit 990 ml Wasser (5.2) gemischt und gut homogenisiert.

5.14 Elutionslösung, Methanol + Essigsäureethylester (75 + 25, v + v).

750 ml Methanol (5.4) werden mit 250 ml Essigsäureethylester (5.6) gemischt und gut homogenisiert.

5.15 Mobile HPLC-Phase A, 5 mmol/l Ammoniumacetatpuffer mit einem pH-Wert von ungefähr 8,0.

5 ml Ammoniumacetat-Lösung (5.11) und ungefähr 200 µl Ammoniumhydroxid 2,5 % (5.8) werden mit 900 ml Wasser (5.3) gemischt. Das Volumen wird mit Wasser (5.3) auf 1 l aufgefüllt und das Gemisch wird gut homogenisiert.

Der pH-Wert der mobilen Phase A wird überprüft. Der pH-Wert muss zwischen 7,95 und 8,05 liegen. Mit Ammoniumhydroxid 2,5 % (5.8) wird der pH-Wert auf diesen Bereich eingestellt.

5.16 Mobile HPLC-Phase B, Methanol (5.5).

5.17 Standards der *Alternaria*-Toxine, z. B. kristallin, als Film oder als Referenzmaterial.

5.17.1 Altenuen, Reinheit mindestens 96 % (m/m).

5.17.2 Alternariol, Reinheit mindestens 96 % (m/m).

5.17.3 Alternariolmonomethylether, Reinheit mindestens 96 % (m/m).

5.17.4 Tentoxin, Reinheit mindestens 96 % (m/m).

5.17.5 Tenuazonsäure, Reinheit mindestens 96 % (m/m).

ANMERKUNG Labore können sich um eine höhere Reinheit bemühen, sofern diese auf dem Markt erhältlich ist.

5.18 Isotopenmarkierte interne Standards, z. B. kristallin oder als Standardlösung.

5.18.1 Isotopenmarkierter interner Standard von Altenuen (ALT-ISTD), z. B. ALT-(Methoxy-d3, Methyl-d3) (ALT-d6).

5.18.2 Isotopenmarkierter interner Standard von Alternariol (AOH-ISTD), z. B. AOH-(Methyl-d3) (AOH-d3).

5.18.3 Isotopenmarkierter interner Standard von Alternariolmonomethylether, (AME-ISTD), z. B. AME-(1-Methyl-d3) (AME-d3).

5.18.4 Isotopenmarkierter interner Standard von Tentoxin (TEN-ISTD), z. B. TEN-d3.

5.18.5 Isotopenmarkierter interner Standard von Tenuazonsäure (TEA-ISTD), z. B. TEA-(Acetyl-¹³C₂) (TEA ¹³C₂), Gemisch aus Diastereomeren in Methanol.

ANMERKUNG Labore können sich um isotopenmarkierte interne Standards mit höherem Deuterierungsgrad oder ¹³C-Anreicherung bemühen.

WARNUNG — Zu jeder Zeit sollten Schutzkleidung, Handschuhe und Schutzbrillen getragen werden und alle Phasen der Standard- und Probenvorbereitung sollten unter einem Abzug ausgeführt werden.

5.19 Stammlösungen von ALT, AOH, AME, TEN und TEA, z. B. mit einer Massenkonzentration $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$.

Bei kristallinen Pulvern werden z. B. 5 mg ALT (5.17.1), AOH (5.17.2), AME (5.17.3), TEN (5.17.4) und TEA (5.17.5) auf 0,1 mg genau in einzelne 50-ml-Messkolben eingewogen und diese bis zur Marke mit Methanol (5.5) aufgefüllt. Das Gemisch wird kräftig homogenisiert.

Bei getrockneten Filmen wird der Standard im Fläschchen nach dem Zertifikat des einzelnen Standards rekonstituiert.

Die Stammlösungen sind für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq 18^\circ\text{C}$ gelagert werden.

ANMERKUNG Zur photometrischen Verifizierung der Konzentration gravimetrisch hergestellter Standards stehen molare Extinktionskoeffizienten in der Literatur zu AOH [5], AME [5], ALT [6], TEN [7] und TEA [8] zur Verfügung.

5.20 Standardlösung 1.

Eine methanolhaltige Standardlösung wird hergestellt, die ALT (5.17.1), AOH (5.17.2), AME (5.17.3) in einer Konzentration von 500 ng/ml, TEN (5.17.4) in einer Konzentration von 2 500 ng/ml und TEA (5.17.5) in einer Konzentration von 5 000 ng/ml enthält.

Hierzu werden z. B. 25 µl der Stammlösung von ALT, AOH und AME (5.19) in einen 5-ml-Messkolben überführt. In denselben 5-ml-Messkolben werden z. B. 125 µl der Stammlösung von TEN (5.19) und 250 µl der Stammlösung von TEA (5.19) überführt. Mit Methanol (5.5) wird bis zur Kalibriermarke aufgefüllt. Die Lösung wird kräftig homogenisiert. Die Stammlösung 1 ist für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq 18\text{ °C}$ gelagert wird.

ANMERKUNG Die exakten zu messenden Volumen für die Herstellung der Standardlösung 1 (5.20) werden aus der exakten Konzentration der Stammlösungen (5.19) abgeleitet.

5.21 Standardlösung 2.

Eine methanolhaltige Standardlösung wird hergestellt, die ALT (5.17.1), AOH (5.17.2), AME (5.17.3) in einer Konzentration von 100 ng/ml, TEN (5.17.4) in einer Konzentration von 500 ng/ml und TEA (5.17.5) in einer Konzentration von 1 000 ng/ml enthält. Die Standardlösung 2 wird durch Verdünnung der Standardlösung 1 (5.20) hergestellt.

1 000 µl der Standardlösung 1 (5.20) werden in einen 5-ml-Messkolben überführt. Mit Methanol (5.5) wird bis zur Kalibriermarke aufgefüllt. Die Lösung wird kräftig homogenisiert. Die Standardlösung 2 ist für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq 18\text{ °C}$ gelagert wird.

5.22 Stammlösungen von ALT-ISTD, AOH-ISTD, AME-ISTD, TEN-ISTD und TEA-ISTD, z. B. mit einer Massenkonzentration $\rho = 750\text{ µg/ml}$.

Die Stammlösungen werden hergestellt, indem z. B. je 1 mg kristallines Pulver von ALT-ISTD (5.18.1), AOH-ISTD (5.18.2), AME-ISTD (5.18.3), TEN-ISTD (5.18.4) und TEA-ISTD (5.18.5) in einzelnen Fläschchen mit 1 500 µl Methanol (5.5) gelöst werden. Die Lösungen werden kräftig homogenisiert. Die Stammlösungen sind für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq 18\text{ °C}$ gelagert werden. TEA-ISTD ist gegebenenfalls bereits als methanolhaltige Lösung mit ungefähr derselben Konzentration erhältlich.

5.23 Interne Standardlösung 1.

Eine methanolhaltige Standardmischung wird hergestellt, die AOH-ISTD (5.18.2), AME-ISTD (5.18.3) und TEN-ISTD (5.18.4) in einer Konzentration von 5 µg/ml, ALT-ISTD (5.18.1) in einer Konzentration von 10 µg/ml und TEA-ISTD (5.18.5) in einer Konzentration von 25 µg/ml enthält.

Hierzu werden z. B. 33,3 µl der Stammlösungen von AOH-ISTD, AME-ISTD und TEN-ISTD (5.22) in einen 5-ml-Messkolben überführt. Es werden z. B. 66,7 µl der Stammlösung von ALT-ISTD (5.22) und 166,7 µl der Stammlösung von TEA-ISTD (5.22) in denselben 5-ml-Messkolben überführt. Mit Methanol (5.5) wird bis zur Kalibriermarke aufgefüllt. Die Lösung wird kräftig homogenisiert. Die interne Stammlösung 1 ist für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq 18\text{ °C}$ gelagert wird.

5.24 Interne Standardlösung 2.

Eine methanolhaltige Standardmischung wird hergestellt, die AOH-ISTD (5.18.2), AME-ISTD (5.18.3) und TEN-ISTD (5.18.4) in einer Konzentration von 500 ng/ml, ALT-ISTD (5.18.1) in einer Konzentration von 1 000 ng/ml und TEA-ISTD (5.18.5) in einer Konzentration von 2 500 ng/ml enthält. Die interne Standardlösung 2 wird durch Verdünnung der internen Standardlösung 1 (5.23) hergestellt.

1 000 µl der internen Standardlösung 1 (5.23) werden in einen 10-ml-Messkolben überführt. Mit Methanol (5.5) wird bis zur Kalibriermarke aufgefüllt. Die Lösung wird kräftig homogenisiert. Die interne Stammlösung 2 ist für mindestens sechs Monate haltbar, sofern sie bei $\leq 18\text{ °C}$ gelagert wird.

5.25 Polysorbat 20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$) (Tween®20¹), analysenrein.

5.26 Polysorbat-20-Lösung ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ -Lösung), 2 % (v + v) in Wasser.

2 ml Polysorbat 20 (5.25) werden mit der Pipette in einen 100-ml-Messkolben gegeben und bis zur Marke mit Wasser (5.2) aufgefüllt. Die Lösung wird gut homogenisiert. Diese Lösung (Polysorbat 20 + Wasser, 2 + 98, v + v) kann drei Monate verwendet werden, sofern sie bei ungefähr 4 °C gelagert wird.

5.27 Kalibrierlösungen.

Verschiedene Volumen der Standardlösung (5.20 bzw. 5.21) und die interne Standardlösung 2 (5.24) werden in fünf HPLC-Fläschchen (6.18) gegeben, z. B. wie in Tabelle 1 aufgeführt. Die in Tabelle 1 festgelegten Volumen an Methanol (5.5) werden hinzugegeben und alles wird vorsichtig gemischt. 600 µl der mobilen HPLC-Phase A (5.15) werden hinzugegeben, das Fläschchen wird verschlossen und der Inhalt 20 s lang in einem Mixer (6.15) gemischt.

Ein sechstes Fläschchen (Blindprobe) ohne Standardlösungen und ohne interne Standardlösung wird vorbereitet und als instrumentelle Blindprobe verwendet.

Tabelle 1 — Herstellung der Kalibrierlösungen

					ALT	AOH	AME	TEN	TEA
Kalibrier- lösung	Standard- lösung 1 (5.20)	Standard- lösung 2 (5.21)	Interne Standard- lösung 2 (5.24)	Methanol (5.5)	Gleichwertige Konzentration				
	µl	µl	µl	µl	µg/kg				
1		10	50	340	1	1	1	5	10
2		50	50	300	5	5	5	25	50
3		100	50	250	10	10	10	50	100
4	50	—	50	300	25	25	25	125	250
5	200	—	50	150	100	100	100	500	1 000
Blind- probe	—	—	—	400	—	—	—	—	—

¹ Tween®20 ist der Handelsname eines nichtionischen Detergens vom Typ Polysorbat 20, das von verschiedenen Lieferanten bezogen werden kann. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

6 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborglasgeräte und -ausrüstung und insbesondere Folgendes:

6.1 pH-Messgerät.

6.2 Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (PP), (50 ml) mit Messskala.

6.3 Laborwaage, Fehlergrenze: 0,01 g.

6.4 Analysenwaage, Fehlergrenze: 0,01 mg.

6.5 Einstellbarer mechanischer Vertikal- oder Horizontalschüttler.

6.6 Hochgeschwindigkeitsrührer (z. B. Ultra-turrax®²).

6.7 Zentrifuge, mit Temperaturregelung und in der Lage, eine relative Zentrifugalkraft von ungefähr 3 200 g zu erzeugen.

6.8 Vollpipetten mit Gradeinteilung, Nennvolumen von 10 ml.

6.9 Kolbenhubpipetten, z. B. Nennvolumen von 10 µl, 20 µl, 100 µl, 250 µl und 1 000 µl, mit entsprechenden Spitzen.

6.10 SPE-Säule, mit einem hydrophil modifizierten Styrolpolymer, mit einem Behältervolumen von 6 ml, 200 mg Adsorptionsmasse und einer Korngröße von 100 µm oder kleiner.

ANMERKUNG Es hat sich erwiesen, dass Phenomenex Strata-XL² mit einem Behältervolumen von 6 ml, 200 mg Adsorptionsmasse und einer Korngröße von 100 µm diese Spezifikationen erfüllen.

6.11 Vorratsbehälter aus Polypropylen (ungefähr 25 ml), passend zu den SPE-Säulen (6.10).

6.12 Spritzenfilter aus Polytetrafluorethylen (PTFE), mit einer Porengröße von 0,2 µm und einem Durchmesser von z. B. 13 mm oder 15 mm.

6.13 Spritze mit Kanüle, 1 ml.

6.14 Vakuumverteiler, für die Aufreinigung von SPE, mit Hähnen.

6.15 Mixer, mit hoher Scherrate.

6.16 Probenverdichter, mit Temperaturregelung und Gasversorgung.

6.17 Aufnahmeröhrchen aus Glas, für die Eluierung und Verdampfung der Probe.

6.18 HPLC-Fläschchen aus silanisiertem Glas, Nennvolumen von etwa 1,5 ml und Bördekappen oder gleichwertig.

6.19 Bechergläser, Nennvolumen von 250 ml.

² Ultra-turrax und Strata-XL werden als Beispiele angeführt, die bei IKA bzw. bei Phenomenex erhältlich sind. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

6.20 Messkolben, Nennvolumen von 5 ml, 10 ml, 50 ml, 100 ml und 1 l.

6.21 HPLC-MS/MS-System, mit den folgenden Komponenten:

6.21.1 HPLC-Pumpe, geeignet, bei für die verwendete analytische Säule geeigneten Fließgeschwindigkeiten einen binären Gradienten mit ausreichender Genauigkeit aufrechtzuerhalten.

6.21.2 Degaser, optional, zum Entgasen während der mobilen HPLC-Phasen.

6.21.3 Injektionssystem, geeignet für die Injektion eines geeigneten Volumens an Injektionslösung mit ausreichender Genauigkeit.

6.21.4 HPLC-Umkehrphasensäule.

Eine geeignete Säule und angemessene HPLC-Bedingungen mit ausreichender Retentionskapazität des ersten eluierenden Analyten. Ein Kapazitätsfaktor von 3 ($k' \geq 3,0$) und für jeden der Analyten eine Mindestanzahl von Platten ($N \geq 2\,000$) liefert nachweislich solche Chromatogramme wie in Anhang A dargestellt sind.

Beispiele geeigneter Säulen und Gradienten sind in Anhang B angegeben.

6.21.5 Vorsäule, mit dem gleichen Material für die stationäre Phase wie die analytische Säule (6.21.4).

6.21.6 Säulenofen, geeignet zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur.

6.21.7 Drei-Phasen-Massenspektrometer.

Triple-Quadrupol-Geräte oder Geräte mit Ionenfalle oder linearer Quadrupol-Ionenfalle, ausgestattet mit einer Elektrosprayionisations-(ESI-)Schnittstelle und betrieben im Modus für die Mehrfachreaktionsüberwachung (multiple reaction monitoring, MRM). Es darf jeder Ionisationsmodus (in der Regel negativ oder positiv) verwendet werden, mit dem eine ausreichende Ausbeute erreicht wird.

6.21.8 Rechnergestütztes System zur Gerätesteuerung und Datenevaluierung.

7 Durchführung

7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

In jedem Fall muss alles Raumtemperatur haben, bevor irgendeine Handhabung stattfindet.

Feste Laborproben müssen fein gemahlen und homogenisiert werden. Es ist darauf zu achten, die Probe während des Prozesses nicht zu überhitzen. Bei fetthaltigen Proben ist unter Umständen Kryomahlen erforderlich.

Halbfeste Proben müssen sorgfältig homogenisiert werden, indem sie 10 min lang kräftig geschüttelt werden.

7.2 Extraktion

Für die Einzelanalyse werden 2,00 g auf 0,01 g in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.2) eingewogen. 100 µl der internen Standardlösung 2 (5.24) werden hinzugefügt.

Bei Tomatenmark: 14,0 ml des Extraktionsgemisches (5.12) werden hinzugegeben. Bei Weizen und Sonnenblumenkernen: 15,0 ml des Extraktionsgemisches (5.12) werden hinzugegeben.

Das Röhrchen wird fest verschlossen und der Inhalt ungefähr 10 s lang zu einer homogenen Suspension gemischt.

Sonnenblumenkernmehl kann während der Handhabung klebrig werden und klumpen. Um eine vollständige Extraktion zu erreichen, müssen diese Proben vor der Extraktion mithilfe eines Hochgeschwindigkeitsrührers (6.6) 30 s lang im Extraktionsgemisch ausreichend dispergiert werden.

Es wird für 45 min kräftig mit einem Schüttler (6.5) geschüttelt.

Eine geringe Menge der Sonnenblumenprobe bleibt während der Extraktion möglicherweise an den Wänden der Röhrchen kleben. In diesem Fall werden die Röhrchen aus dem Schüttler genommen und 5 s per Hand geschüttelt, um das Material von den Wänden zu lösen. Die Röhrchen werden zurück in den Schüttler gegeben und die Extraktion wird fortgesetzt.

Die Probe wird bei ungefähr 22 °C und 3 200 g mindestens 10 min zentrifugiert (6.7) und 7,5 ml des Überstands (entspricht 1,0 g der Probe) werden in ein neues 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.2) überführt.

Es wird mit einem gleichen Volumen (7,5 ml) wässriger Essigsäurelösung 1 % (5.13) verdünnt. Alles wird 5 s lang durch Mischen homogenisiert.

Nach der Verdünnung des Extrakts tritt je nach Probe gegebenenfalls eine Trübung der Lösung auf. Falls diese Trübung die SPE-Kartusche verstopft, darf eine Zentrifugierung durchgeführt werden.

7.3 Reinigung durch Festphasenextraktion

Die SPE-Säule (6.10) wird an den Vakuumverteiler (6.14) angeschlossen.

Die Säule wird konditioniert, indem erst 7 ml Methanol (5.4), dann 7 ml Wasser (5.2) und 4 ml Essigsäurelösung 1 % (5.13) durchgeleitet werden.

Der Hahn unter der Säule wird verschlossen und weitere 3 ml Essigsäurelösung 1 % (5.13) werden mit der Pipette in die SPE-Säule gegeben. Ein Vorratsbehälter (6.11) wird mit der SPE-Säule verbunden.

Die verdünnte Probe wird in den Vorratsbehälter eingefüllt. Das 50-ml-Zentrifugenröhrchen, in dem die verdünnte Probe enthalten war, wird mit 4 ml Essigsäurelösung 1 % (5.13) gespült und diese wird in den Vorratsbehälter gefüllt. Der Hahn wird geöffnet und der Extrakt mit einer Fließrate von etwa 1 Tropfen je Sekunde durchgeleitet.

Der Vorratsbehälter wird entfernt und die Säule mit 4 ml Polysorbat-20-Lösung (C₅₈H₁₁₄O₂₆-Lösung) 2 % (5.26) und anschließend mit 4 ml wässriger Essigsäurelösung 1 % (5.13) gespült. Die Säule wird mittels Vakuum (ungefähr 10 min) gut getrocknet.

7.4 Vorbereitung der Probenmesslösung

Ein Aufnahmeröhrchen aus Glas (6.17) wird in den Vakuumverteiler gegeben. Der Extrakt wird mit 7 ml Elutionslösung (5.14) in das Aufnahmeröhrchen aus Glas eluiert. Nachdem die Lösung durchgeleitet wurde, wird die Säule 10 s lang mittels Vakuum getrocknet und das ganze Eluat aufgefangen.

Falls die Elutionslösung nicht von selbst zu tropfen beginnt, darf ein leichtes Vakuum zum Auslösen des Flusses angewendet werden. Sobald die ersten Tropfen aus der Säule ablaufen, ist kein Vakuum erforderlich.

Das Eluat wird im Auffangröhrchen aus Glas (6.17) bei 50 °C mithilfe des Probenverdichters (6.16) und eines schwachen Stickstoffstroms (5.1) verdampft.

400 µl Methanol (5.5) werden zu dem Trockenextrakt hinzugefügt und durch mindestens 20 s langes Mischen werden die Rückstände an den Wänden des Röhrchens erneut abgelöst.

600 µl der mobilen HPLC-Phase A (5.15) werden hinzugegeben und alles wird weitere 20 s gemischt.

Der Extrakt wird mithilfe einer 1-ml-Spritze (6.13) durch ein PTFE-Spritzenfilter (6.12) in ein HPLC-Fläschchen (6.18) filtriert.

ANMERKUNG Wenn nach dem Filtern die Prüflösung nicht klar ist, kann die Prüflösung zentrifugiert werden.

7.5 LC-MS/MS-Analyse

7.5.1 LC-MS/MS-Betriebsbedingungen

Analytische Säule, Zusammensetzung der mobilen Phase, Gradienteneinstellungen und Injektionsvolumen müssen so kombiniert werden, dass eine annehmbare chromatographische Trennung der Analyten erreicht und zuverlässige Ergebnisse bei den erforderlichen Massenkonzentrationen und mit ausreichender Selektivität erhalten werden.

In Anhang A ist ein Beispielchromatogramm dargestellt und in Anhang B sind Beispielsbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme angegeben.

7.5.2 Kalibrierkurve

Vor Beginn der Injektionssequenz muss das LC-MS/MS-Gerät durch Injektion von Blindprobenlösungen und matrixfreien Standardlösungen äquilibriert werden, bis eine stabile Response erreicht ist.

Die Kalibrierlösungen (5.27) werden einmal zu Beginn der Injektionsabfolge analysiert. Eine Kalibrierkurve wird erstellt, in der das Responseverhältnis (Peakfläche des Analyten geteilt durch die Peakfläche des isotoopenmarkierten internen Standards) gegen die entsprechende Konzentration in den injizierten Kalibrierlösungen (5.27) aufgetragen wird. Die Anweisungen in 7.7 werden befolgt.

7.5.3 Injektionssequenz

Die Blindprobenlösungen und die Probenmesslösungen werden in einer Sequenz analysiert, bei der Verschleppungs- und Kreuzkontaminationen vermieden werden. Die folgende Injektionssequenz erfüllt diese Anforderung:

- Blindprobe (5.27);
- die fünf Kalibrierstandardlösungen (5.27), von der niedrigsten zur höchsten Konzentration;
- Blindprobe(n) (5.27);
- die Probenmesslösungen;
- Blindprobe (5.27).

7.6 Identifizierung

Jedes *Alternaria*-Toxin wird durch Vergleich der Retentionszeiten der Probenmesslösung mit denen der Kalibrierlösungen identifiziert.

Die Retentionszeit des Analyten im Probenchromatogramm muss der durchschnittlichen Retentionszeit entsprechen, die für die Kalibrierstandards in der gleichen Sequenz bestimmt wurde, mit einer Grenzabweichung von $\pm 0,2$ min oder ± 50 % der Peakbreite bei halber Höhe (der jeweils größere Wert gilt). Die Retentionszeit des Analyten muss der Retentionszeit des markierten internen Standards entsprechen, mit einer Grenzabweichung von $\pm 0,05$ min [10].

Die Ionenverhältnisse, die als die Response des Ionenpeaks mit der kleineren Fläche geteilt durch die Response des Ionenpeaks mit der größeren Fläche (relative Intensität) definiert sind, werden anhand der Kalibrierlösungen berechnet.

Die in den Chromatogrammen festgestellten Ionenverhältnisse der Untersuchungsproben müssen (mit einer Grenzabweichung von $\pm 30\%$) mit dem entsprechenden durchschnittlichen Ionenverhältnis in den Kalibrierlösungen aus derselben Sequenz übereinstimmen [10].

7.7 Kalibrierung

Die Peaks der internen Standards müssen in den Kalibrier- und Probenchromatogrammen jederzeit sichtbar sein (Flächen dürfen sich je nach Matrix unterscheiden).

Der MRM-Ionenübergang mit dem größten Signal-Rausch-Verhältnis muss als Quantifier-Ionenspur ausgewählt werden. Es wird der MRM-Übergang desjenigen internen Standards ausgewählt, der diesem unter Berücksichtigung des Grads der Isotopenmarkierung entspricht. Die Peakfläche in den entsprechenden extrahierten Ionenchromatogrammen wird in allen folgenden Berechnungen eingesetzt.

Das Responseverhältnis jedes *Alternaria*-Toxins zum jeweiligen isotonenmarkierten internen Standard wird nach der folgenden Gleichung (1) berechnet.

$$RR_{An} = \frac{A_{An}}{A_{ISTD}} \quad (1)$$

Dabei ist

RR_{An} das Responseverhältnis des Analyten im Chromatogramm der Kalibrierlösung;

A_{An} die Peakfläche des Analyten in der Kalibrierlösung;

A_{ISTD} die Peakfläche des isotonenmarkierten internen Standards in der Kalibrierlösung.

Das Responseverhältnis des Analyten (y-Achse) in den Kalibrierlösungen wird gegen die entsprechenden Massenanteile [$\mu\text{g}/\text{kg}$] (x-Achse) aufgetragen und die Kalibrierkurve anhand einer linearen Regressionsfunktion berechnet, Gleichung (2). Die Parameter der linearen Regressionsfunktion werden bestimmt.

Zur Quantifizierung der Analytmengen, die ein Responseverhältnis (RR_{An}) zwischen den ersten beiden Kalibrierpunkten zeigen, muss die Kalibriergerade möglicherweise durch den Ursprung gezogen werden (linear durch Null). Falls die forcierte Regression durch den Ursprung für die unteren Kalibrierpunkte zu einer Verschiebung führt, ist es unter Umständen annehmbar, stattdessen die beiden oberen Kalibrierniveaus zu streichen.

$$RR_{An,Cal} = w_{An,Cal} \cdot a_1 + b_0 \quad (2)$$

Dabei ist

$RR_{An,Cal}$ das Responseverhältnis des Analyten in der Kalibrierlösung;

$w_{An,Cal}$ der Massenanteil des Analyten in der Kalibrierlösung, in $\mu\text{g}/\text{kg}$;

a_1 die Steigung, geschätzt mittels Regression der kleinsten Quadrate aus den Kalibrierdaten;

b_0 der Schnittpunkt, geschätzt mittels Regression der kleinsten Quadrate aus den Kalibrierdaten.

8 Berechnung

Der Massenanteil jedes *Alternaria*-Toxins, $w_{An,S}$ in µg/kg in der Probe wird nach Gleichung (3) berechnet:

$$w_{An,S} = \frac{RR_{An,S} - b_0}{a_1} \quad (3)$$

Dabei ist

$RR_{An,S}$ das Responseverhältnis des Analyten, festgestellt im Chromatogramm der Probenmesslösung.

Falls ein oder mehrere Verhältnisse in einer Untersuchungsprobe ($RR_{An,S}$) größer als das Verhältnis für den entsprechenden Analyt in der am höchsten konzentrierten Kalibrierlösung ($RR_{An,Cal}$) ist/sind (d. h. sie überschreiten den Kalibrierbereich), muss die Probe erneut analysiert werden. In diesem Fall wird ein zweiter Anteil von 2,00 g der Probe extrahiert, dem ein Mehrfaches (z. B. das Doppelte) aller Volumen hinzugefügt wurde (z. B. 30 ml Extraktionsgemisch (5.12) bei festen Proben, 28 ml Extraktionsgemisch (5.12) bei Tomatenmark und 200 µl der internen Standardlösung 2 (5.24)). Dieser Faktor wird bei der Bestimmung des Massenanteils des Analyten berücksichtigt.

9 Präzision

9.1 Allgemeines

Einzelheiten zu dem Ringversuch zur Präzision des Verfahrens sind in Anhang C zusammengefasst. Die Werte aus dem Ringversuch sind möglicherweise nicht auf andere Konzentrationsbereiche und Matrices als jenen in Anhang C anwendbar.

9.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Prüfergebnissen, die ein einzelner Bearbeiter an identischem Untersuchungsmaterial mit denselben Geräten innerhalb der kürzesten möglichen Zeitspanne erhält, überschreitet die Wiederholgrenze r in Tabelle 4 und Tabelle 5 nicht häufiger als in 5 % der Fälle.

9.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Prüfergebnissen, die zwei Laboratorien für identisches Untersuchungsmaterial erhalten, überschreitet die Vergleichsgrenze R in Tabelle 4 und Tabelle 5 nicht häufiger als in 5 % der Fälle.

Tabelle 4 — Validierungsdaten für TEA, ALT und AOH

Probe	TEA				ALT				AOH		
	Mittelwert	r	R		Mittelwert	r	R		Mittelwert	r	R
	µg/kg	µg/kg	µg/kg		µg/kg	µg/kg	µg/kg		µg/kg	µg/kg	µg/kg
Sonnenblume Nr. 1 (nk)	1 618	196	509		< 1				31,9	9,80	13,1
Sonnenblume Nr. 2 (nk)	936	123	356		< 1				15,2	4,30	8,13
Sonnenblume Nr. 3 (nk)	488	59,8	197		< 1				5,37	2,04	3,5
Sonnenblume Nr. 4 (nk, dot)	147	16,7	35,8		2,49				1,97	0,68	0,99

Probe	TEA				ALT				AOH		
	Mittelwert	<i>r</i>	<i>R</i>		Mittelwert	<i>r</i>	<i>R</i>		Mittelwert	<i>r</i>	<i>R</i>
	µg/kg	µg/kg	µg/kg		µg/kg	µg/kg	µg/kg		µg/kg	µg/kg	µg/kg
Sonnenblume Nr. 5 (nk, dot)	198	38,2	64,7		10,2	3,06	5,81		8,47	2,76	4,74
Tomatenmark Nr. 1 (nk)	961	90,5	164		0,95				27,4	4,77	9,67
Tomatenmark Nr. 2 (nk)	499	50,4	112		< 1				12,9	1,84	5,64
Tomatenmark Nr. 3 (nk)	183	12,9	32,2		< 1				6,06	1,37	2,41
Tomatenmark Nr. 4 (dot)	47,0	5,40	13,7		2,18	0,59	1,14		1,82	0,24	0,72
Tomatenmark Nr. 5 (dot)	194	19,6	45,1		11,2	2,08	5,19		9,68	1,70	3,73
Weizen Nr. 1 (nk)	264	39,5	55,0		< 1				2,04		
Weizen Nr. 2 (nk)	162	26,5	40,3		< 1				1,83	0,74	1,39
Weizen Nr. 3 (nk, dot)	41,8	6,33	10,2		13,8	3,08	8,33		46,7	9,37	19,9
Weizen Nr. 4 (dot)	55,1	4,80	13,2		4,73	1,04	4,14		4,90	1,13	1,85
Weizen Nr. 5 (nk, dot)	413	27,3	85,2		9,16	1,31	8,22		14,4	3,87	7,69
nk natürlich kontaminierte Probe dot dotierte Probe											

Tabelle 5 — Validierungsdaten für TEN und AOH

Probe	TEN				AME		
	Mittelwert	<i>r</i>	<i>R</i>		Mittelwert	<i>r</i>	<i>R</i>
	µg/kg	µg/kg	µg/kg		µg/kg	µg/kg	µg/kg
Sonnenblume Nr. 1 (nk)	75,2	9,83	21,9		12,2	3,24	4,90
Sonnenblume Nr. 2 (nk)	38,9	5,84	11,0		7,83	1,27	3,01
Sonnenblume Nr. 3 (nk)	19,2	1,57	5,29		3,74	1,21	1,59
Sonnenblume Nr. 4 (nk, dot)	47,8	15,7	17,7		2,08	0,58	1,09
Sonnenblume Nr. 5 (nk, dot)	168	41,1	74,9		17,1	3,02	4,91
Tomatenmark Nr. 1 (nk)	0,88				16,4	1,85	5,30
Tomatenmark Nr. 2 (nk)	0,57				6,19	0,88	1,90
Tomatenmark Nr. 3 (nk)	0,49				2,69	0,27	0,89
Tomatenmark Nr. 4 (dot)	44,9	2,85	11,8		1,98	0,25	0,72
Tomatenmark Nr. 5 (dot)	218	23,3	96,2		9,74	0,82	2,42
Weizen Nr. 1 (nk)	52,2	8,64	18,7		0,55		

Probe	TEN				AME		
	Mittelwert	<i>r</i>	<i>R</i>		Mittelwert	<i>r</i>	<i>R</i>
	µg/kg	µg/kg	µg/kg		µg/kg	µg/kg	µg/kg
Weizen Nr. 2 (nk)	5,29	0,85	3,67		1,29	0,60	0,96
Weizen Nr. 3 (nk, dot)	9,36	1,16	6,40		47,2	4,27	14,1
Weizen Nr. 4 (dot)	31,2	3,96	10,6		4,87	0,45	1,44
Weizen Nr. 5 (nk, dot)	86,8	17,8	41,3		14,8	1,60	3,13
nk natürlich kontaminierte Probe dot dotierte Probe							

10 Prüfbericht

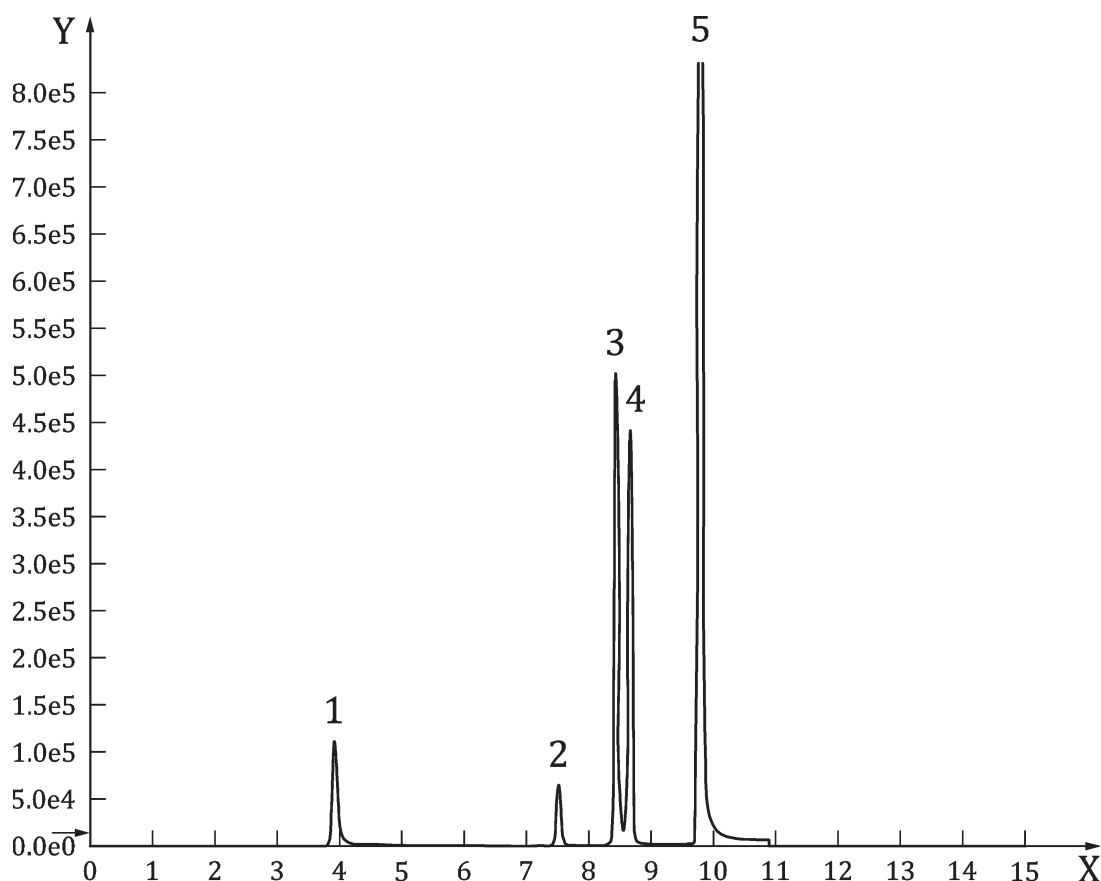
Der Prüfbericht sollte EN ISO/IEC 17025 [12] entsprechen und muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe (Art der Probe, Bezeichnung);
- b) eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- c) das Datum des Probeneingangs und die Art des Probenahmeverfahrens (wenn bekannt);
- d) das Datum der Prüfung;
- e) die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden, wo notwendig muss die Wiederfindung mit den jeweiligen Prüfergebnissen angegeben werden und ob die Prüfergebnisse anhand dieser Wiederfindungen korrigiert wurden;
- f) alle Besonderheiten, die während der Prüfung festgestellt wurden;
- g) alle Arbeitsschritte, die nicht in diesem Verfahren festgelegt sind oder als optional angesehen wurden und die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben.

Anhang A (informativ)

Beispielchromatogramme

Bild A.1 wurde mit den in Anhang B beschriebenen Einstellungen erstellt.

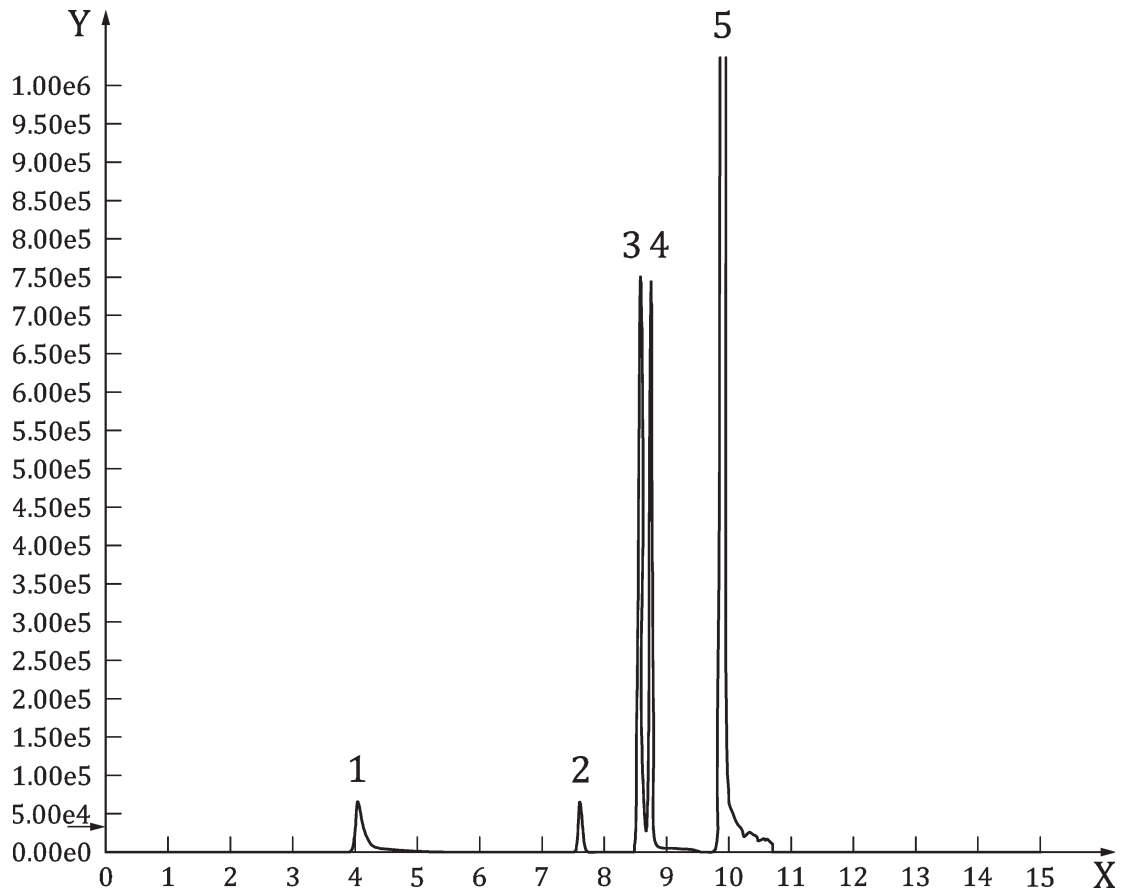


Legende

- X Zeit, in min
Y Intensität, als Zählrate
1 TEA 3,903 min
2 ALT 7,497 min
3 AOH 8,406 min
4 TEN 8,632 min
5 AME 9,757 min

Bild A.1 — Totalionenchromatogramm (TIC) einer Standardlösung der *Alternaria*-Toxine und der entsprechenden isopenmarkierten internen Standards, jeweils bei einer Konzentration von 50 ng/ml

Bild A.2 wurde unter denselben Bedingungen erstellt, ausgenommen der analytischen Säule, bei der es sich um eine Waters Acquity HSS T3³ (100 mm × 2,1 mm ID, 1,8 µm Korngröße) handelte, die mit einer Vorsäule VanGuard HSS T3³ (5 mm × 2,1 mm ID, 1,8 µm Korngröße) versehen war. Bild A.3 wurde ebenfalls unter denselben Bedingungen erstellt, ausgenommen der analytischen Säule, bei der es sich um eine Phenomenex Gemini NX C18³ (100 mm × 2,1 mm ID, 3 µm Korngröße) handelte.

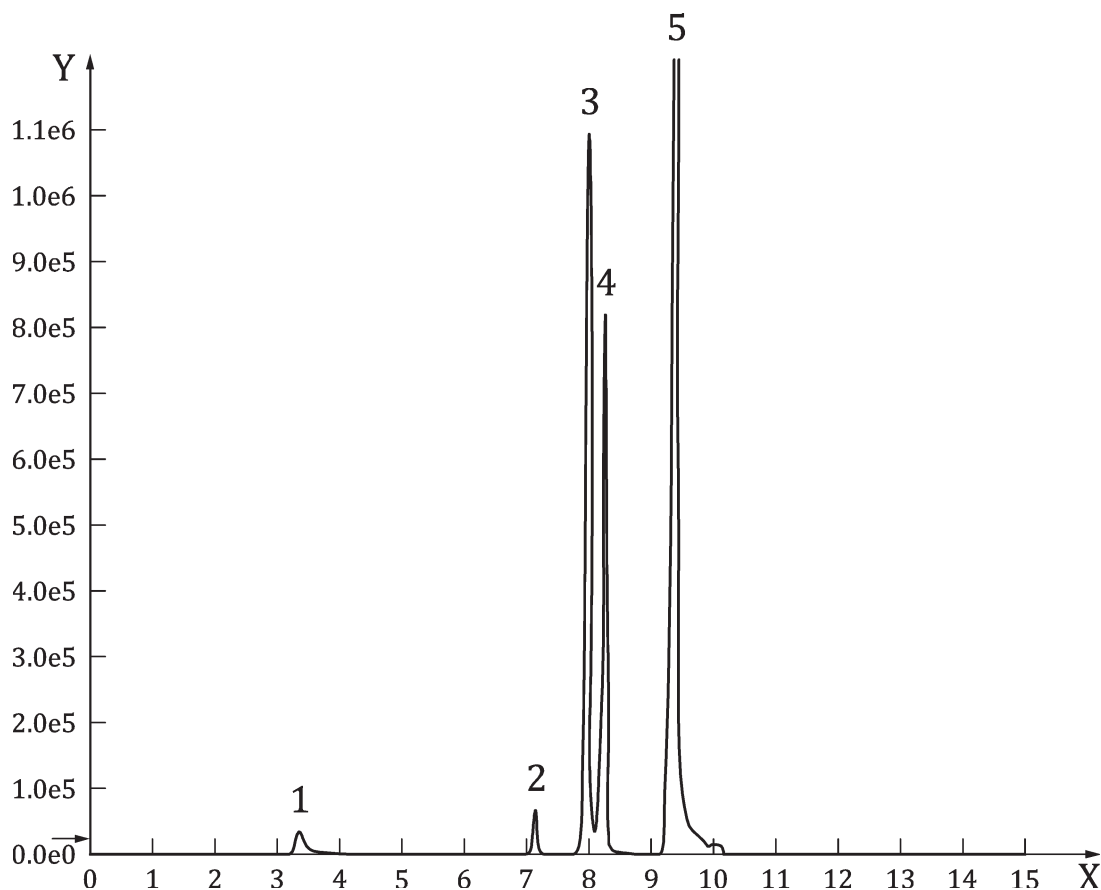


Legende

- X Zeit, in min
Y Intensität, als Zählrate
1 TEA 4,051 min
2 ALT 7,608 min
3 AOH 8,546 min
4 TEN 8,720 min
5 AME 9,861 min

Bild A.2 — Totalionenchromatogramm einer Standardlösung der *Alternaria*-Toxine und der entsprechenden isotopenmarkierten internen Standards, jeweils bei einer Konzentration von 50 ng/ml, erhalten mit der Säule Waters® Acquity HSS T3

³ Waters Acquity HSS T3, VanGuard HSS T3 und Phenomenex Gemini NX C18 dienen als Beispiele. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.



Legende

- X Zeit, in min
Y Intensität, als Zählrate
1 TEA 3,347 min
2 ALT 7,124 min
3 AOH 7,942 min
4 TEN 8,223 min
5 AME 9,336 min

Bild A.3 — Totalionenchromatogramm einer Standardlösung der *Alternaria*-Toxine und der entsprechenden isotopenmarkierten internen Standards, jeweils bei einer Konzentration von 50 ng/ml, erhalten mit der Säule Phenomenex® Gemini NX C18

Anhang B (informativ)

Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme

Bei Verwendung der Säule (6.21.4) und der mobilen Phasen A (5.15) und B (5.16) gelten die nachfolgenden Einstellungen als geeignet. Ein Beispielchromatogramm ist in Anhang A angegeben.

Diese Einstellungen sollten als Richtwerte betrachtet werden. Die exakten chromatographischen und Nachweisbedingungen hängen vom eingesetzten Analysegerät ab und dürfen daher leicht abweichen. Durch Messen von Standardlösungen wird sichergestellt, dass das Analysensystem geeignet ist.

Chromatographische Einstellungen, Ionenquellenparameter und allgemeine massenspektrometrische Spezifikationen (siehe ebenso Tabelle B.2, Tabelle B.3 und Tabelle B.4):

Säule	Waters X Select HSS T3 ⁴ mit den Maßen 100 mm × 2,1 mm Innendurchmesser und 2,5 µm Korngröße. Die Säule ist mit einer Vorsäule vom Typ XSelect HSS T3 VanGuard mit den Maßen 5 mm × 2,1 mm Innendurchmesser und 2,5 µm Korngröße ausgestattet.
Injektionsvolumen	5 µl
Autosampler-Temperatur	10 °C
Säulentemperatur	30 °C, geregelt
Durchflussrate	0,3 ml/min
Mobile Phase	HPLC-Gradient (5.15 und 5.16), siehe Tabelle B.1
Ionenquelle	Elektrosprayionisation (ESI)
Ionisationsmodus	negativ
Nachweis	MS/MS mit linearer Quadrupol-Ionenfalle
Analysezeit	16 min

Tabelle B.1 — Gradient

Zeit min	Mobile Phase A %	Mobile Phase B %
0,00	90	10
1,00	90	10
10,00	0	100
12,00	0	100
12,20	90	10
16,00	90	10

⁴ Die Säulen vom Typ Waters X Select HSS T3 dienen als Beispiele. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.