

DIN EN 17641

ICS 67.050

Einsprüche bis 2021-03-08

Entwurf**Lebensmittel –****Multimethode für die Bestimmung von Aflatoxinen, Deoxynivalenol, Fumonisin, Ochratoxin A, T-2-Toxin, HT-2-Toxin und Zearalenon mittels LC-MS/MS;****Deutsche und Englische Fassung prEN 17641:2021****Foodstuffs –****Multimethod for the determination of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins, ochratoxin A, T-2 toxin, HT-2 toxin and zearalenone by LC-MS/MS;****German and English version prEN 17641:2021****Anwendungswarnvermerk**

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-01-08 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 98 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17641:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige 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.

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

Titel de: Lebensmittel — Multimethode für die Bestimmung von Aflatoxinen, Deoxynivalenol, Fumonisin, Ochratoxin A, T-2-Toxin, HT-2-Toxin und Zearalenon mittels LC-MS/MS

Titel en: Foodstuffs — Multimethod for the determination of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins, ochratoxin A, T-2 toxin, HT-2 toxin and zearalenone by LC-MS/MS

Titel fr:

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	6
6 Geräte und Ausrüstung	12
7 Durchführung	14
8 LC-MS/MS-Analyse	17
9 Berechnungen	18
10 Präzision	19
11 Prüfbericht	24
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	25
Anhang B (informativ) Überblick über die Probenvorbereitung	37
Anhang C (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	38
C.1 Allgemeines	38
C.2 Beispiele für LC-Systemeinstellungen	38
C.3 Beispiele für MS-Systemeinstellungen	41
Literaturhinweise	47

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17641:2021) 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.

Einleitung

Mykotoxine sind Metabolite von Schimmelpilzen, die in verschiedenen Lebensmitteln vorkommen können, wie z. B. Getreide, Nüsse, Gewürze, Früchte, Ölsaaten oder Kaffee. Mykotoxine können vor der Ernte in der Pflanze und sogar nach der Ernte gebildet werden, wenn die klimatischen Bedingungen für ein weiteres Pilzwachstum günstig sind. Milch kann auch mit Aflatoxin M₁, dem Hauptmetaboliten von Aflatoxin B₁ kontaminiert sein, wenn Kühe mit Aflatoxin B₁-kontaminiertem Futtermittel gefüttert werden. Zum Schutz der Gesundheit der Verbraucher wurden Höchstkonzentrationen für Mykotoxine in Lebensmitteln festgelegt, die in einer breiten Palette von Lebensmittelbedarfsgegenständen enthalten sind, darunter auch solche, die für den Verzehr durch Säuglinge und Kleinkinder bestimmt sind.

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 [1] 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 — Es ist bekannt, dass Aflatoxine karzinogene Wirkungen haben und sowohl akut als auch chronisch toxisch sind. Die Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ und M₁ wurden von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) als für Menschen krebserregend eingestuft (Gruppe 1). Fumonisin B₁, Fumonisin B₂ und Ochratoxin A wurden als für Menschen wahrscheinlich krebserregend eingestuft (Gruppe 2B) und Zearalenon, Deoxynivalenol und T-2 als nicht für Menschen krebserregend eingestuft (Gruppe 3) [2].

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren der Isotopenverdünnung für die quantitative Bestimmung der Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ und M₁ (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ und AFM₁), Ochratoxin A (OTA), Deoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZEN), T-2 und HT-2-Toxine (T-2 und HT-2) und Fumonisine B₁ und B₂ (FB₁ und FB₂) in Lebensmitteln durch Flüssigchromatographie (LC), gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).

Für Aflatoxine (AF) und OTA in Säuglings- und Kleinkindernahrung (z. B. Zerealien für Kleinkinder, Pulver auf Milchbasis), in Gewürzen, in Trockenfrüchten und in Nüssen ist eine spezifische Immunaффinitätssäulen (IAC)-Reinigung erforderlich.

Das Verfahren wurde durch eine gemeinschaftliche Studie zu verschiedenen Bereichen validiert: Getreide und Produkte auf Getreidebasis einschließlich Nahrung für Säuglinge und Kleinkinder, Nüsse, Gewürze, Trockenfrüchte und Milchpulver. Die Konzentrationsbereiche der einzelnen Mykotoxine in diesen natürlich kontaminierten und/oder aufgestockten Lebensmittelproben waren:

- Aflatoxin B₁: 0,085 7 µg/kg – 11,4 µg/kg;
- Aflatoxin B₂: 0,079 2 µg/kg – 12,5 µg/kg;
- Aflatoxin G₁: 0,062 8 µg/kg – 20,9 µg/kg;
- Aflatoxin G₂: 0,052 0 µg/kg – 15,0 µg/kg;
- Aflatoxin M₁: 0,034 2 µg/kg – 0,110 µg/kg;
- Ochratoxin A: 0,448 µg/kg – 17,2 µg/kg;
- Deoxynivalenol: 45,2 µg/kg – 743 µg/kg;
- Zearalenon: 9,57 µg/kg – 131 µg/kg;
- T-2-Toxin 10,3 µg/kg – 57,9 µg/kg;
- HT-2-Toxin 9,50 µg/kg – 81,8 µg/kg;
- Fumonisin B₁: 31,1 µg/kg – 4 262 µg/kg;
- Fumonisin B₂: 44,2 µg/kg – 1 299 µg/kg.

Die Messbereiche der Verfahren für jede Mykotoxin-/Matrix-Kombination sind in Tabelle 7 angegeben.

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, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods* (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 <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

4 Kurzbeschreibung

Die Mykotoxine werden mit Wasser und angesäuertem Acetonitril aus der Einwaage extrahiert und nach Zugabe von Magnesiumsulfat- und Natriumchloridsalzen wird eine Flüssig-Flüssig-Verteilung eingeleitet. Der entstehende Acetonitril-Überstand wird dann mit Hexan entfettet. Abhängig von der Mykotoxin-/Matrix-Kombination wird der Probenextrakt dann zwei verschiedenen Protokollen unterzogen (ein allgemeines Schema ist in Anhang B angegeben):

- *ohne IAC-Reinigung*: allgemeines Verfahren zur Bestimmung aller Mykotoxine in Getreide und Produkten auf Getreidebasis. Ein Aliquot des Acetonitril-Überstandes wird zur Trockenheit verdampft, dann in einer Methanol-Wasserlösung rekonstituiert und anschließend mittels LC-MS/MS analysiert;
- *mit IAC-Reinigung*: spezifisches Verfahren zur Bestimmung von AF und OTA in Säuglings- und Kleinkindernahrung (z. B. Zerealien für Kleinkinder, Milchpulver) zum Zweck der Empfindlichkeit und in Gewürzen, Nüssen und Trockenfrüchten zur Vermeidung von Matrixeffekten im Massenspektrometer. Ein Aliquot des Acetonitril-Überstands wird zunächst in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) verdünnt, und der gesamte Extrakt wird dann auf eine IAC aufgetragen, die für AF und OTA spezifische Antikörper enthält. Die IAC wird mit Wasser gewaschen und die Mykotoxine werden mit Methanol eluiert. Das Eluat wird zur Trockenheit verdampft, in einer Methanol-Wasserlösung rekonstituiert und anschließend mittels LC-MS/MS analysiert.

Die Quantifizierung erfolgt durch den Ansatz der Isotopenverdünnung unter Verwendung von ^{13}C -isotopenmarkierten Mykotoxinen als interne Standards (ISTD).

5 Reagenzien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Lösemittel müssen, wenn nicht anders festgelegt, von LC-MS-Reinheitsgrad für die LC-MS-Analyse sein. Handelsübliche Lösungen mit gleichwertigen Eigenschaften wie die aufgeführten dürfen verwendet werden.

WARNUNG 1 — Verfahren zur Dekontamination von Aflatoxin-haltigen Laborabfällen sind von der IARC entwickelt worden, siehe [3, 4].

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

5.2 Wasser, HPLC-Reinheitsgrad.

5.3 Wasser, LC-MS-Reinheitsgrad.

5.4 Methanol (MeOH), Analysenreinheit.

5.5 Methanol (MeOH), LC-MS-Reinheit.

5.6 Acetonitril (MeCN), Analysenreinheit.

5.7 Ameisensäure, Analysenreinheit.

5.8 Ammoniumformiat, LC-MS-Reinheit.

5.9 Essigsäure, Analysenreinheit.

5.10 n-Hexan, Analysenreinheit.

5.11 Magnesiumsulfat (MgSO₄) wasserfrei, Analysenreinheit.

5.12 Natriumchlorid (NaCl), Analysenreinheit.

5.13 Trennsalzgemisch, MgSO₄-NaCl (4 + 1, w + w).

4,0 g ± 0,2 g MgSO₄ (5.11) und 1,00 g ± 0,05 g NaCl (5.12) werden in ein 15-ml-Polypropylenröhrchen eingewogen.

Alternativ kann eine gebrauchsfertige Trennsalzmischung aus kommerziellen Quellen geliefert werden.

5.14 Kaliumchlorid (KCl), Analysenreinheit.

5.15 Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) ,Analysenreinheit.

5.16 Dinatriumhydrogenorthophosphat (Na₂HPO₄) ,Analysenreinheit.

5.17 Natriumhydroxid (NaOH), Analysereinheit.

5.18 Natriumhydroxid-Lösung (NaOH), Stoffmengenkonzentration $c = 0,1$ mol/l.

0,4 g Natriumhydroxid (5.17) werden in 100 ml Wasser (5.2) gelöst.

5.19 Salzsäurelösung (HCl), Analysereinheit, $\varphi(\text{HCl}) = 37 \%$.

5.20 Verdünnte Salzsäure-Lösung, $c = 0,1$ mol/l.

8,4 ml Salzsäure-Lösung (5.19) werden in einen 1-l Messkolben gegeben und das Volumen wird mit Wasser aufgefüllt (5.2).

5.21 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH $7,3 \pm 0,2$

0,20 g KCl (5.14), 0,20 g KH₂PO₄ (5.15), 1,15 g Na₂HPO₄ (5.16) und 8,00 g NaCl (5.12) werden auf 0,01 g gewogen und in einen 1-l-Messkolben gefüllt. Die Chemikalien werden in Wasser (5.2) gelöst, und es werden 900 ml Wasser (5.2) hinzugefügt.

Nach der Auflösung wird der pH-Wert auf pH = $7,3 \pm 0,2$ mit HCl-Lösung (5.20) oder NaOH-Lösung (5.18) eingestellt und die Flasche wird bis zur Marke mit Wasser (5.2) aufgefüllt.

Alternativ kann eine PBS-Lösung mit gleichen Eigenschaften aus handelsüblichem PBS-Material hergestellt werden.

5.22 Extraktionslösung, 5 ml/l Essigsäure in Acetonitril,

500 ml Acetonitril (5.6) und 5 ml Eisessig (5.9) werden in einen 1-l-Messkolben gemischt. Das Volumen wird mit Acetonitril (5.6) aufgefüllt und gut durchgemischt. Diese Lösung kann bei Lagerung bei Zimmertemperatur 3 Monate verwendet werden.

5.23 Verdünnungslösung, Methanol-Wasser (15 + 85, V + V).

15 ml Methanol (5.4) werden mit 85 ml Wasser (5.2) in einem 100-ml-Messkolben gemischt. Diese Lösung kann bei Lagerung bei Zimmertemperatur 3 Monate verwendet werden.

5.24 Mykotoxine analytischer Standard z. B. kristallin, als Film oder als zertifizierte Standardlösung.

5.24.1 Aflatoxin B₁ (AFB₁).

5.24.2 Aflatoxin B₂ (AFB₂).

5.24.3 Aflatoxin G₁ (AFG₁).

5.24.4 Aflatoxin G₂ (AFG₂).

5.24.5 Aflatoxin M₁ (AFM₁).

5.24.6 Ochratoxin A (OTA).

5.24.7 Deoxynivalenol (DON).

5.24.8 Zearalenon (ZEN).

5.24.9 T-2 Toxin (T-2).

5.24.10 HT-2 Toxin (HT-2).

5.24.11 Fumonisin B₁ (FB₁).

5.24.12 Fumonisin B₂ (FB₂).

5.25 Mykotoxin-Standard-Stammlösungen.

Die einzelnen Standard-Stammlösungen werden entweder durch Auflösen von sauberen (festen) Standardsubstanzen in einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt oder aus getrockneten Filmen hergestellt und anschließend nach dem Zertifikat jeder einzelnen Standardsubstanz rekonstituiert oder als gebrauchsfertige Lösungen gekauft (5.24).

Die in diesem Dokument behandelten Mykotoxine lösen sich gut in Acetonitril, mit Ausnahme der Fumonisine für die Acetonitril/Wasserlösung, (50 + 50, V + V) die für die Herstellung von individuellen Stammlösungen empfohlen wird.

5.26 Mykotoxin-Standardarbeitslösungen

Die Standardarbeitslösungen werden wie nachstehend beschrieben durch Kombinieren der entsprechenden Volumina der einzelnen Standard-Stammlösungen (5.25) unter Verwendung der entsprechenden Pipetten (6.1) und des genannten Lösungsmittels hergestellt. Diese Lösungen werden zur Erstellung der Kalibrierkurve (5.29) und zur Vorbereitung von positiven Kontrollproben (7.6) verwendet.

5.26.1 Kombinierte Aflatoxin (AF)-Standardarbeitslösung, AFB₁, AFB₂, AFG₁ und AFG₂, jeweils in der Massenkonzentration $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.26.2 Kombinierte Aflatoxin (AF)-Standardarbeitslösung, AFB₁, AFB₂, AFG₁ und AFG₂, jeweils bei $\rho = 0,01 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.26.3 AFM₁-Standardarbeitslösung, $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.26.4 AFM1-Standardarbeitslösung, $\rho = 0,01 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.26.5 Kombinierte [DON, T-2, HT-2, ZEN]-Standardarbeitslösung, in Acetonitril bei den in Tabelle 1 angegebenen Massenkonzentrationen.

Tabelle 1 — Kombinierte [DON, T-2, HT-2, ZEN]-Standardarbeitslösung

Verbindung	Massenkonzentration $\mu\text{g/ml}$
DON	5,0
T-2	2,5
HT-2	2,5
ZEN	2,0

5.26.6 Kombinierte Fumonisine (FB)-Standardarbeitslösung, FB1 und Fb2, jeweils bei $\rho = 5,0 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril-Wasserlösung (50 + 50, V + V).

5.26.7 OTA-Standardarbeitslösung, $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Methanol-Wasserlösung (15 + 85, V + V).

5.27 ^{13}C -isotopenmarkierte Mykotoxin-Analysestandards als zertifizierte Standardlösung.

5.27.1 ^{13}C -isotopenmarkiertes Aflatoxin₁ (^{13}C -AFB₁), z. B. ($^{13}\text{C}_{17}$)-Aflatoxin B₁, $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.2 ^{13}C -isotopenmarkiertes Aflatoxin B₂ (^{13}C -AFB₂), z. B. ($^{13}\text{C}_{17}$)-Aflatoxin B₂, $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.3 ^{13}C -isotopenmarkiertes Aflatoxin G₁ (^{13}C -AFG₁), z. B. ($^{13}\text{C}_{17}$)-Aflatoxin G₁, $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.4 ^{13}C -isotopenmarkiertes Aflatoxin G₂ (^{13}C -AFG₂), z. B. ($^{13}\text{C}_{17}$)-Aflatoxin G₂, $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.5 ^{13}C -isotopenmarkiertes Aflatoxin M₁ (^{13}C -AFM₁), z. B. ($^{13}\text{C}_{17}$)-Aflatoxin M₁, $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.6 ^{13}C -isotopenmarkiertes Ochratoxin A (^{13}C -OTA), z. B. ($^{13}\text{C}_{20}$)-Ochratoxin A, $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.7 ^{13}C -isotopenmarkiertes Deoxynivalenol (^{13}C -DON), z. B. ($^{13}\text{C}_{15}$)-Deoxynivalenol, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.8 ^{13}C -isotopenmarkiertes Zearalenon (^{13}C -ZEN), z. B. ($^{13}\text{C}_{18}$)-Zearalenon, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.9 ^{13}C -isotopenmarkiertes T-2-Toxin (^{13}C -T₂), z. B. ($^{13}\text{C}_{24}$)-T-2-Toxin, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.10 ^{13}C -isotopenmarkiertes HT-2-Toxin (^{13}C -HT₂), z. B. ($^{13}\text{C}_{22}$)-HT-2-Toxin, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.27.11 ^{13}C -isotopenmarkiertes Fumonisin B₁ (^{13}C -FB₁), z. B. ($^{13}\text{C}_{34}$)-Fumonisin B₁, $\rho = 25 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril-Wasserlösung (50 + 50, V + V).

5.27.12 ^{13}C -isotopenmarkiertes Fumonisin B₂ (^{13}C -FB₂), z. B. ($^{13}\text{C}_{34}$)-Fumonisin B₂, $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril-Wasserlösung (50 + 50, V + V).

5.28 Interne Standardlösungen (ISTD)

Die ISTD-Lösungen werden wie nachstehend beschrieben hergestellt, indem die entsprechenden Volumina der einzelnen isotopenmarkierten Mykotoxinlösungen unter Verwendung der entsprechenden Pipetten (6.1) und des genannten Lösungsmittels kombiniert werden. Diese Lösungen werden verwendet, um die Kalibrierkurve zu erstellen (5.29) und um jede Einwaage vor der Extraktion aufzustocken (7.3).

5.28.1 Interne ^{13}C -Aflatoxin ^{13}C -AF) Standardlösung, ^{13}C -AFB₁, ^{13}C -AFB₂, ^{13}C -AFG₁, ^{13}C -AFG₂, jeweils bei $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.28.2 ^{13}C -interne AFM1-Standardlösung, $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril.

5.28.3 ^{13}C -[DON, T-2, HT-2, ZEN] interne Standardlösung, in Acetonitril in den in Tabelle 2 angegebenen Konzentrationen.

Tabelle 2 — Interne ^{13}C -[DON, T-2, HT-2, ZEN] Standardlösung

Verbindung	Massenkonzentration $\mu\text{g/ml}$
^{13}C -DON	5,0
^{13}C -T-2	2,5
^{13}C -HT-2	2,5
^{13}C -ZEN	2,0

5.28.4 Interne ^{13}C -Fumonisin (^{13}C -FB) Standardlösung, ^{13}C -FB₁ und ^{13}C -FB₂, jeweils bei $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$ in Acetonitril-Wasserlösung (50 + 50, V + V).

5.28.5 Interne ^{13}C -OTA Standardlösung, $\rho = 0,1 \mu\text{g/ml}$ in Methanol-Wasserlösung (15 + 85, V + V).

5.29 Standardlösungen für externe Kalibrierkurve.

Die Standardlösungen für die Kalibrierung werden in neun separaten 15-ml-Polypropylenröhrchen vorbereitet, wie z. B. in Tabelle 3a beschrieben.

Die Standardlösungen werden unter einem Stickstoffstrom bei 40 °C bis zur Trockenheit verdampft und dann weiter für die Kalibrierung vorbereitet, wie z. B. in Tabelle 3b beschrieben.

Die Kalibriersubstanzen Kal 0 bis Kal 8 werden etwa 1 min lang im Ultraschall behandelt. Diese Lösungen werden in Glasfläschchen überführt und bei –20 °C lichtgeschützt bis zu 3 Monate gelagert.

Die Konzentration jedes Mykotoxins in jeder Kalibriersubstanz ist in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 3 a — Beispiel für ein Pipettierschema für die Vorbereitung der Kalibrierlösungen vor dem Verdampfungsschritt

Mykotoxin	Kal 0	Kal 1	Kal 2	Kal 3	Kal 4	Kal 5	Kal 6	Kal 7 ^a	Kal 8 ^a
	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl
AF (5.26.1)	0	-	-	-	20	40	160	320	640
AF (5.26.2)	-	5	20	40	-	-	-	-	-
AFM1 (5.26.3)	0	-	-	-	20	40	160	320	640
AFM1 (5.26.4)	-	5	20	40	-	-	-	-	-
[DON, T-2, HT-2, ZEN] (5.26.5)	0	5	10	20	40	80	160	320	640
FB (5.26.6)	0	5	10	20	40	80	160	320	640
¹³ C-AF (5.28.1)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
¹³ C-AFM1 (5.28.2)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
¹³ C-[DON, T-2, HT-2, ZEN] (5.28.3)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
¹³ C-FB (5.28.4)	20	20	20	20	20	20	20	20	20

^a Zur Quantifizierung stark kontaminierter Proben kann der Kalibrierbereich erweitert werden (9.2). Typischerweise können Kal 7 und Kal 8 wie in Tabelle 3a beschrieben vorbereitet werden, um den Bereich um den Faktor 2 (Kal 7) und um den Faktor 4 (Kal 8) zu erweitern.

ANMERKUNG Die Robustheit der Verfahren wird nicht beeinträchtigt, solange die gleichen ISTD-Lösungen sowohl für die Herstellung der Kalibrierstandardlösungen als auch für die Aufstockung der Einwaage verwendet werden (7.3).

Tabelle 3b — Beispiel für ein Pipettierschema für die Herstellung der Kalibrierlösungen nach dem Verdampfungsschritt

Verbindung	Kal 0	Kal 1	Kal 2	Kal 3	Kal 4	Kal 5	Kal 6	Kal 7 ^a	Kal 8 ^a
	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl
OTA (5.26.7)	0	2,5	5	10	20	40	160	320	640
¹³ C-OTA (5.28.5)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
MeOH-H ₂ O (15 + 85, V + V) (5.23)	1 980	1 978	1 975	1 970	1 960	1 940	1 820	1 660	1 340

^a Zur Quantifizierung stark kontaminierter Proben kann der Kalibrierbereich erweitert werden (9.2). Typischerweise können Kal 7 und Kal 8 wie in Tabelle 3a beschrieben vorbereitet werden, um den Bereich um den Faktor 2 (Kal 7) und um den Faktor 4 (Kal 8) zu erweitern.

ANMERKUNG 1 Die Robustheit der Verfahren wird nicht beeinträchtigt, solange die gleichen ISTD-Lösungen sowohl für die Herstellung der Kalibrierstandardlösungen als auch für die Aufstockung der Einwaage verwendet werden (7.3).

ANMERKUNG 2 OTA-Lösungen werden nach dem Verdampfungsschritt hinzugefügt, um unvorhersehbare OTA-Verluste bei der Verdampfung zu vermeiden.

Tabelle 4 — Beispiel für Massenkonzentrationen von Mykotoxinen und verwandte ISTD in Kalibrierlösungen

Mykotoxin	Kal 0 ng/ml	Kal 1 ng/ml	Kal 2 ng/ml	Kal 3 ng/ml	Kal 4 ng/ml	Kal 5 ng/ml	Kal 6 ng/ml	Kal 7 ng/ml	Kal 8 ng/ml
AF	0	0,025	0,1	0,2	1	2	8	16	32
AFM1	0	0,025	0,1	0,2	1	2	8	16	32
DON	0	12,5	25	50	100	200	400	800	1 600
T-2 und HT-2	0	6,25	12,5	25	50	100	200	400	800
ZEN	0	5	10	20	40	80	160	320	640
FB	0	12,5	25	50	100	200	400	800	1 600
OTA	0	0,125	0,25	0,5	1	2	8	16	32
¹³ C-AF	1	1	1	1	1	1	1	1	1
¹³ C-AFM1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
¹³ C-DON	50	50	50	50	50	50	50	50	50
¹³ C-T-2 und ¹³ C-H T-2	25	25	25	25	25	25	25	25	25
¹³ C-ZEN	20	20	20	20	20	20	20	20	20
¹³ C-FB	100	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-OTA	1	1	1	1	1	1	1	1	1

6 Geräte und Ausrüstung

Glaswaren und Ausrüstung (Messzylinder, Glastrichter, Bechergläser, Pipette usw.) und insbesondere die Folgenden:

- 6.1 Pipetten**, geeignet für organische Lösungsmittel im Bereich von 1 µl bis 1 ml.
- 6.2 Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss**, 50 ml mit Kappe.
- 6.3 Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss**, 15 ml mit Kappe.
- 6.4 Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen**, 1,5 ml.
- 6.5 HPLC-Glasfläschchen**, 1,5 ml mit Schraubverschluss.
- 6.6 Einstellbarer mechanischer Vertikal- oder Horizontalschüttler**, der mit 300 U/min schütteln kann.
- 6.7 Laborschüttler**.
- 6.8 Ultraschall-Wasserbad**
- 6.9 Laborwaage**, Fehlergrenze: 0,01 g.

6.10 Analysenwaage, Fehlergrenze: 0,000 1 g.

6.11 Zentrifuge, mit Rotoren, die für Polypropylenröhrchen mit 15 ml und 50 ml Volumen geeignet sind und eine relative Zentrifugalkraft von 4 000 *g* erzeugen können.

6.12 Zentrifuge, mit Rotoren, die für Polypropylenröhrchen von 15 ml Volumen geeignet sind und eine relative Zentrifugalkraft von 8 400 *g* erzeugen können.

6.13 Probenverdichter, mit Temperaturregelung und Stickstoffgasversorgung.

6.14 Vakuumverteiler für die Aufreinigung von SPE, mit Hähnen.

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

6.16 Einwegspritzen, 5 ml

6.17 Pasteurpipetten aus Kunststoff, unsteril, 7 ml.

6.18 Immunoaffinitätssäulen (IAC) für AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ und OTA

Die IAC enthält Antikörper gegen AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ und OTA mit einer Kapazität von mehr als 100 ng¹⁾.

6.19 Immunoaffinitätssäulen für AFM₁

Die IAC enthält Antikörper gegen das Aflatoxine M₁ mit einer Kapazität von mehr als 100 ng.

Alternativ könnte auch eine IAC mit Antikörpern gegen AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ mit einer Kreuzreaktivität zu AFM₁ geeignet sein¹⁾.

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

6.20.1 LC-Pumpe, geeignet für einen Binärgradienten mit geeignetem Fluss für die Trennsäule mit ausreichender Präzision.

6.20.2 Degaser, optional, zum Entgasen während der mobilen LC-Phasen.

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

6.20.4 LC-Säule, die in der Lage ist, den ersten eluierenden Analyten mit mindestens der doppelten Retentionszeit, die dem Totvolumen der Säule entspricht, zurückzuhalten. Beispiele geeigneter Säulen und Gradienten sind in Anhang C angegeben.

6.20.5 LC-Vorsäule, optional, mit dem gleichen Material für die stationäre Phase wie die LC-Säule (6.20.4).

6.20.6 Säulenofen, geeignet zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur.

¹ AFLAOCHRA PREP®-Säule von R-biopharm, ist ein Beispiel für ein geeignetes, kommerziell erhältliches Produkt. 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 den gleichen Ergebnissen führen.

6.20.7 Dreistufiges Massenspektrometer (z. B. Tripel-Quadrupol- oder Quadrupol-Linear-Ionenfalle), das mit einer Elektrospray-Ionisations-(ESI-)Schnittstelle ausgestattet ist und im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring) betrieben wird. Es darf jeder Ionisationsmodus (in der Regel negativ oder positiv) verwendet werden, mit dem eine ausreichende Ausbeute erreicht wird.

6.20.8 Rechnergestütztes System zur Gerätesteuerung und Datenevaluierung.

7 Durchführung

7.1 Vorbereitung der Laborprobe

Die Proben müssen in luftdichten Behältern aufbewahrt, vor Licht geschützt und vor der Analyse gründlich gemischt werden. Die Laborproben werden fein gemahlen und/oder weitgehend homogenisiert.

7.2 Wiegen der Einwaage

7.2.1 Getreide, Produkte auf Getreidebasis

Von der homogenisierten Probe wird eine Einwaage von 5,00 g in ein 50-ml-Polypropylenröhrchen (6.2) auf 0,05 g eingewogen.

7.2.2 Milchpulver, Nüsse, Gewürze, Trockenfrüchte

Von der homogenisierten Probe wird eine Einwaage von 2,00 g in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.2) auf 0,02 g eingewogen.

7.3 Aufstockung mit internen Standardlösungen (ISTD)

Jede Einwaage wird mit 50 µl ISTD-Lösungen (5.28) aufgestockt, wie in Tabelle 5 dargestellt. Die Wahl der zu dosierenden ISTD hängt vom Endzweck der Analyse ab, d. h. von dem/den zu überwachenden Mykotoxin(en).

ANMERKUNG Die Robustheit des Verfahrens wird nicht beeinträchtigt, solange die gleichen ISTD-Lösungen sowohl für die Herstellung der Kalibrierstandards (5.29) als auch für die Aufstockung der Einwaage verwendet werden.

Tabelle 5 — Aufstockung von ISTD-Lösungen

ISTD-Lösungen	Aufstockniveau µl	Menge jeder ISTD, die zur Einwaage hinzugefügt wird ng
¹³ C-AF, ρ = 0,1 µg/ml (5.28.1)	50	5
¹³ C-AFM1, ρ = 0,1 µg/ml (5.28.2)	50	5
¹³ C-[DON, T-2, HT-2, ZEN] (5.28.3) ^a	50	250, 125, 125, 100
¹³ C-FB-Mischung, ρ = 10 µg/ml (5.28.4)	50	500
¹³ C-OTA, ρ = 0,1 µg/ml (5.28.5)	50	5
^a Massenkonzentration für ¹³ C-DON, ¹³ C-T-2, ¹³ C-HT-2 und ¹³ C-ZEN beträgt 5,0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 2,5 µg/ml bzw. 2,0 µg/ml.		

7.4 Extraktion

7.4.1 Allgemeine Durchführung

10 ml Wasser (5.2) werden in das Polypropylenröhrchen gegeben, verschlossen und von Hand kräftig geschüttelt, bis die gesamte Probe vollständig in der Lösung verteilt ist.

10 ml der Extraktionslösung (5.22) werden in das Polypropylenröhrchen gegeben, verschlossen und mindestens 5 s kräftig von Hand geschüttelt.

Das Röhrchen wird auf einen mechanischen Schüttler (6.6) gelegt und etwa 10 min geschüttelt.

Die Trennsalzmischung (5.13) wird in das Röhrchen gegeben, verschlossen und sofort einige Sekunden lang von Hand geschüttelt, um Klumpenbildung mit dem Magnesiumsulfat zu vermeiden.

Das Röhrchen wird auf einem mechanischen Schüttler (6.6) etwa 1 min lang geschüttelt.

Das Polypropylenröhrchen wird bei 4 000 g für etwa 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (6.11).

5 ml des Acetonitrilphasen-Überstandes werden in ein 15-ml-Polypropylenröhrchen (6.3) überführt und mit 5 ml *n*-Hexan (5.10) versetzt.

Das Polypropylenröhrchen wird auf einen mechanischen Schüttler (6.6) gelegt und etwa 10 min geschüttelt.

Bei Raumtemperatur wird bei 4 000 g für etwa 1 min zentrifugiert, um eine effiziente Phasentrennung zu ermöglichen.

Das *n*-Hexan (obere Phase) wird mit einer Pasteurpipette aus Kunststoff (6.17) entsorgt.

Der Probenextrakt wird zwei verschiedenen Protokollen mit den Bezeichnungen „ohne IAC-Reinigung“ bzw. „mit AC-Reinigung“ entsprechend der Tabelle 6 unterzogen.

Tabelle 6 — Je nach Mykotoxin/Matrix-Kombination anzuwendendes Protokoll

Lebensmittelart	Zu analysierende Mykotoxine	Verfahren
Getreide und Produkte auf Getreidebasis	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA FB1, FB2, ZEN, DON, T-2, HT-2	<i>ohne Reinigung</i> (7.4.2)
Gewürze, Nüsse, Trockenfrüchte	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA	<i>mit IAC-Reinigung</i> (7.4.3)
Getreide und Produkte auf Getreidebasis, die für Säuglinge und Kleinkinder bestimmt sind	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA	<i>mit IAC-Reinigung</i> (7.4.3)
	FB1, FB2, ZEN, DON, T-2, HT-2	<i>ohne Reinigung</i> (7.4.2)
Milchpulver	AFM1	<i>mit IAC-Reinigung</i> (7.4.3)

7.4.2 Ohne IAC-Reinigung

Ein Aliquot von 1 ml der entfetteten Acetonitril-Phase (untere Phase, 7.4.1) wird in ein weiteres 15-ml-Polypropylenröhrchen (6.3) überführt.

Der Extrakt wird unter einem Stickstoffstrom (5.1) bei etwa 40 °C bis zur Trockenheit (6.13) verdampft.

Der trockene Rückstand wird mit 75 µl Methanol (5.4) rekonstituiert und etwa 1 min lang mit Ultraschall behandelt, um den Rückstand wieder aufzulösen. 425 µl Wasser (5.2) werden hinzugegeben und etwa 5 s lang mit einem Laborschüttler (6.7) gemischt.

Die resultierende Mischung wird in ein 1,5 ml-Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen (6.4) überführt und bei 8 500 g für etwa 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Überstand wird in ein LC-Glasfläschchen (6.5) überführt und mit der LC-MS/MS-Analyse fortgesetzt.

7.4.3 Mit IAC-Reinigung

Das Protokoll für die Verwendung von Immunaффinitätssäulen kann je nach Hersteller leicht variieren. Das Verfahren wird unter Berücksichtigung der Anweisungen der Hersteller angepasst.

Ein Aliquot von 2 ml der entfetteten Acetonitril-Phase (untere Phase, 7.4.1) wird in ein weiteres 50-ml-Polypropylenröhrchen (6.3) überführt.

Die PBS-Lösung (5.21) wird bis etwa zur 25-ml-Marke des Polypropylenröhrchens zugegeben. Die Lösung wird gut durchmischt.

Die IAC (6.18 oder 6.19) wird vor der Anwendung an die Raumtemperatur angepasst. Die IAC wird an den Vakuumverteiler (6.14) angeschlossen und ein SPE-Schlauchadapter mit einem Reservoir mit mindestens 25 ml Fassungsvermögen oben auf der IAC angebracht (6.15).

Laststufe:

Der gesamte verdünnte Extrakt (25 ml) wird in das IAC-Reservoir überführt und mit einer ungefähren Flussrate von 1 Tropfen/s bis 2 Tropfen/s durch die IAC geleitet. Es kann ein leichtes Vakuum angelegt werden.

Waschschritt:

Die Säule wird mit 20 ml Wasser (5.2) bei einer ungefähren Durchflussgeschwindigkeit von 1 Tropfen/s bis 2 Tropfen/s gewaschen. Das Reservoir wird entfernt und die Säule getrocknet.

Elutionsschritt:

Ein 15-ml-Polypropylenröhrchen wird unter die Säule gestellt und es werden zunächst 800 µl Methanol (5.4) aufgegeben.

Der erste Tropfen wird langsam eluiert und die Elution gestoppt. Das Methanol wird etwa 3 min lang diffundiert.

Das verbleibende Methanol wird durch Schwerkraft eluiert. Zwei weitere 800 µl Methanol werden überführt und durch Schwerkraft eluiert. Das 15-ml-Polypropylenröhrchen wird verschlossen und mit einem Laborschüttler (6.7) etwa 10 s lang gemischt.

Abschließende Behandlung:

Das Extrakt wird unter einem Stickstoffstrom (5.1) bei maximal 40 °C bis zur Trockenheit (6.13) verdampft.

Der trockene Rückstand wird mit 30 µl Methanol (5.4) rekonstituiert und etwa 1 min lang mit Ultraschall behandelt, um den Rückstand wieder aufzulösen. 170 µl Wasser (5.2) wird hinzugefügt und es wird mit einem Laborschüttler (6.7) etwa 5 s lang gemischt.

Die resultierende Mischung wird in ein 1,5-ml-Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (6.4) überführt und bei 8 500 g für etwa 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (6.12).

Der Überstand wird in ein LC-Glasfläschchen (6.5) überführt und mit der LC-MS/MS-Analyse fortgesetzt.

7.5 Negativkontrolle

Für jede Serie von Routineproben muss eine Negativkontrolle enthalten sein, d. h. eine Probe, die frei von den angestrebten Mykotoxinen (d. h. nicht nachweisbaren Konzentrationen) ist.

7.6 Positivkontrolle

Für jede Serie von Routineproben sollte eine Positivkontrolle enthalten sein. Es könnte ein Referenzmaterial verwendet werden, von dem bekannt ist, dass es die angestrebten Mykotoxine enthält. Alternativ kann eine Probe analysiert werden, die frei von den angestrebten Mykotoxinen ist (d. h. nicht nachweisbare Konzentrationen), die mit den Mykotoxinen innerhalb des Messbereichs angereichert sind.

8 LC-MS/MS-Analyse

8.1 Betriebsbedingungen

Die analytischen Parameter (Auswahl des Ionisationsmodus, Auswahl der Massen von Vorläufer- und Produkt-Ionen, Optimierung von Quellenparametern und Kollisionsenergien) werden durch Infusion jeder einzelnen Mykotoxin-Standardlösung optimiert. Mindestens zwei Ionenübergangsreaktionen sollten für jedes unmarkierte Mykotoxin überwacht werden. Als Quantifier muss der Ionenübergang mit dem größten Signal-Rausch-Verhältnis gewählt werden. Es wird die MRM-Übergangsreaktion desjenigen internen Standards ausgewählt, der diesem unter Berücksichtigung des Grads der Isotopenmarkierung entspricht.

Analytische Säule, Zusammensetzung der mobilen Phase, Gradienteneinstellungen und Injektionsvolumen müssen so kombiniert werden, dass eine annehmbare Trennung erreicht und zuverlässige Ergebnisse bei den erforderlichen Massenkonzentrationen und mit ausreichender Selektivität erhalten werden. Anhang C enthält einige geeignete Parameter.

8.2 Injektionsreihenfolge

Die Messreihe beginnt mit der Injektion eines Lösungsmittel-Blindwertes, um die Nicht-Kontamination des Systems nachzuweisen (5.23).

Dann werden die Kalibrierlösungen von Kal 0 bis Kal 6 (5.29) injiziert und sorgfältig geprüft, ob alle Mykotoxine und ihre jeweiligen IS auf der niedrigsten Kalibrierstufe (Kal 1) sichtbar sind.

Ein Lösungsmittel-Blindwert wird injiziert, um eine mögliche Verschleppung zu prüfen (5.23).

Die Probenextrakte (7.4.2 und/oder 7.4.3) werden injiziert und es wird regelmäßig ein Lösungsmittel-Blindwert injiziert, um eine mögliche Verschleppung zu überprüfen.

Die Reihe wird durch erneutes Injizieren der Kalibrierlösungen von Kal 0 bis Kal 6 beendet (5.29). Kal 7 und Kal 8 (5.29) können am Ende der Reihe injiziert werden. Die Säule wird anschließend durch Injektion einer Lösungsmittel-Blindlösung (5.23) gespült.

8.3 Datenbearbeitung

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

9 Berechnungen

9.1 Identifizierung und Bestätigung

Mykotoxine gelten als in der Probe positiv identifiziert, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind [5]:

- ein Signal für mindestens zwei diagnostische Übergangsreaktionen ist sichtbar, die für jedes Mykotoxin ausgewählt wurden;
- die Retentionszeit des Mykotoxins muss der Retentionszeit des markierten internen Standards entsprechen, mit einer Grenzabweichung von $\pm 0,05$ min;
- das Peakflächenverhältnis aus den beiden für jedes Mykotoxin aufgezeichneten Übergangsreaktionen (niedrigstes Flächen-/höchstes Flächenverhältnis) beträgt ± 30 % vom durchschnittlichen Ionenverhältnis der Kalibrierlösungen.

9.2 Kalibrierkurve und Messbereich

Die Kalibrierkurve wird durch Auftragen des Quantifier-Peakflächenverhältnisses jedes Mykotoxins und seiner ISTD (= y-Achse) gegen das Konzentrationsverhältnis jedes Mykotoxins und seiner ISTD (= x-Achse) unter Verwendung von Kalibrierlösungen von Kal 0 bis Kal 6 gezeichnet.

Um die Genauigkeit an den niedrigen Kalibrierpunkten zu verbessern, ist es ratsam, einen Gewichtungsfaktor (z. B. $1/x$ oder $1/x^2$) für die Kalibrierkurve zu verwenden. Alternativ könnte die Regressionsgerade auf null erzwungen werden.

Die Steigung und der Achsenabschnitt werden durch lineare Regression berechnet. Es wird überprüft, ob die Abweichung der rückberechneten Konzentration der Kalibrierstandards von der tatsächlichen Konzentration unter Verwendung der Kalibrierkurve nicht mehr als ± 20 % beträgt. Wenn höhere Abweichungen oder Nichtlinearität beobachtet werden, wird die Ursache ermittelt und die Analysen werden gegebenenfalls erneut durchgeführt.

Kal 7 und Kal 8 (5.29) werden bei stark kontaminierten Proben nur dann berücksichtigt, wenn die Mykotoxinwerte außerhalb des Kalibrierbereichs (Kal 0 bis Kal 6) liegen.

Die entsprechenden Messbereiche der einzelnen Mykotoxine sind in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7 — Beispiel Messbereiche von Mykotoxinen in Lebensmittelbedarfsgegenständen

Mykotoxin	Getreide und Produkte auf Getreidebasis und Getreide und Produkte auf Getreidebasis für Säuglinge und Kleinkinder ^a	Gewürze, Nüsse, Trockenfrüchte ^a	Milchpulver ^a
	$\mu\text{g/kg}$	$\mu\text{g/kg}$	$\mu\text{g/kg}$
AF	0,025 0 – 32,0	0,062 5 – 80	n. z.
OTA	0,125 – 32,0	0,312 – 80	n. z.
DON	12,5 – 1 600	n. z.	n. z.
T-2 und HT-2	6,25 – 800	n. z.	n. z.
ZEN	5,00 – 640	n. z.	n. z.

Mykotoxin	Getreide und Produkte auf Getreidebasis und Getreide und Produkte auf Getreidebasis für Säuglinge und Kleinkinder ^a	Gewürze, Nüsse, Trockenfrüchte ^a	Milchpulver ^a
	µg/kg	µg/kg	µg/kg
FB	12,5 – 1 600	n. z.	n. z.
AFM1	n. z.	n. z.	0,062 5 – 80
^a Lebensmittelbedarfsgegenstand, für den eine IAC-Reinigung erforderlich ist. n. z.: nicht zutreffend			

9.3 Berechnungen

Der Massenanteil jedes Analyten, w_a , (µg/kg) in der Probe wird anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$w_a = \frac{\left(\frac{A_a}{A_{ISTD}}\right) - I}{S} \times \frac{m_{ISTD}}{m_a}$$

Dabei ist:

- A_a die Peakfläche eines bestimmten Mykotoxins (Quantifizier-Übergangsreaktion);
- A_{ISTD} die Peakfläche der entsprechenden ISTD (Quantifizier-Übergangsreaktion);
- I der Schnittpunkt der (gewichteten) Regressionsgerade.
- S die Steigung der (gewichteten) Regressionsgerade;
- m_a die Masse der Einwaage, in g (entweder 2,0 g oder 5,0 g);
- m_{ISTD} die Masse der zur Einwaage hinzugefügten ISTD in ng (siehe Tabelle 5).

10 Präzision

10.1 Allgemeines

Einzelheiten zur Präzision des Verfahrens, die sich aus einem Ringversuch ergibt, sind in Anhang A zusammengefasst. Die aus dem Ringversuch abgeleiteten Werte sind möglicherweise nicht auf andere als die in Anhang A angegebenen Konzentrationsbereiche und Matrizen des Analyten anwendbar.

10.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die an identischem Untersuchungsmaterial durch einen Bearbeiter mit derselben Geräteausstattung in kürzest möglichem Zeitabstand gewonnen wurde, darf in nicht mehr als 5 % der Fälle die Wiederholgrenze r überschreiten (Tabelle 8 bis Tabelle 15).

10.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwei einzelnen Prüfungsergebnissen, die an identischem Prüfmaterial in zwei verschiedenen Laboratorien gewonnen wurde, darf in nicht mehr als 5 % der Fälle die Vergleichsgrenze R überschreiten (Tabelle 8 bis Tabelle 15).

Tabelle 8 — Präzisionsdaten für Aflatoxin B₁ und Aflatoxin B₂

Probe	Aflatoxin B ₁			Aflatoxin B ₂		
	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg
Paprika	6,46	0,887	1,87	4,06	0,336	0,625
Schwarzer Pfeffer	8,42	2,00	3,43	6,52	1,28	2,36
Haselnüsse	12,7	1,48	3,21	13,7	1,99	2,55
Mandelpulver	8,44	0,851	1,69	4,22	0,487	1,01
Getrocknete Rosinen	12,7	1,32	3,67	0,991	0,173	0,323
Getrocknete Feigen	2,89	0,406	0,840	1,09	0,131	0,244
Mais 1	4,86	0,801	1,93	-	-	-
Mais 2	2,33	1,26	1,52	2,07	0,406	0,690
Weizen	4,97	1,09	1,61	2,10	0,722	0,669
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Weizenbasis	0,237	0,035 9	0,087 3	0,269	0,062 0	0,0752
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Maisbasis	0,491	0,077 3	0,100	0,483	0,062 0	0,0868
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Reisbasis	0,084 8	0,028 3	0,043 3	0,077 8	0,021 6	0,033 9

Tabelle 9 — Präzisionsdaten für Aflatoxin G₁ und Aflatoxin G₂

Probe	Aflatoxin G ₁			Aflatoxin G ₂		
	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg
Paprika	2,06	0,263	0,432	2,32	0,270	0,540
Schwarzer Pfeffer	3,58	0,734	0,975	3,46	0,918	1,04
Haselnüsse	21,6	2,10	4,45	16,4	2,83	5,18
Mandelpulver	1,79	0,261	0,406	0,814	0,165	0,372
Getrocknete Rosinen	10,2	1,37	2,21	11,3	1,81	2,71
Getrocknete Feigen	3,02	0,670	0,745	0,885	0,155	0,202
Mais 1	-	-	-	-	-	-
Mais 2	1,71	0,482	0,661	3,13	1,35	1,84
Weizen	8,42	1,82	3,09	6,14	1,57	2,93

Probe	Aflatoxin G1			Aflatoxin G2		
	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Weizenbasis	0,199	0,074 9	0,063 7	0,304	0,116	0,136
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Maisbasis	0,504	0,049 5	0,094 8	0,488	0,125	0,121
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Reisbasis	0,061 3	0,013 6	0,023 4	0,052 0	0,021 7	0,021 7

Tabelle 10 — Präzisionsdaten für Gesamtaflatoxine und Ochratoxin A

Probe	Gesamtaflatoxine:			Ochratoxin A		
	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg
Paprika	15,0	1,89	3,40	17,7	1,78	7,64
Schwarzer Pfeffer	21,7	3,65	6,61	20,9	3,52	11,7
Haselnüsse	65,4	8,50	14,6	8,30	0,597	3,55
Mandelpulver	15,3	2,13	3,22	1,05	0,160	0,435
Getrocknete Rosinen	35,6	5,85	8,85	14,5	2,16	5,33
Getrocknete Feigen	7,83	0,979	1,58	9,81	0,857	3,72
Mais 1	-	-	-	3,37	1,05	1,19
Mais 2	8,90	1,81	3,80	4,51	1,52	3,56
Weizen	21,6	3,82	6,05	2,72	0,629	1,22
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Weizenbasis	1,00	0,144	0,205	0,604	0,085 1	0,194
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Maisbasis	1,95	0,161	0,271	0,535	0,096 6	0,169
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Reisbasis	0,268	0,085 3	0,098 3	0,444	0,095 4	0,158

Tabelle 11 — Präzisionsdaten für Deoxynivalenol und Zearalenon

Probe	Deoxynivalenol			Zearalenon		
	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg
Mais 1	739	61,6	136	127	18,8	29,2
Mais 2	527	116	147	80,1	16,4	28,2
Weizen	195	34,5	38,2	19,8	2,75	6,74
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Weizenbasis	220	29,2	43,4	17,2	3,42	5,08
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Maisbasis	269	53,0	70,8	26,3	5,92	7,73
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Reisbasis	43,7	9,19	10,8	8,79	2,05	3,17

Tabelle 12 — Präzisionsdaten für T-2 und HT-2-Toxine

Probe	T-2			HT-2		
	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg
Mais 1	56,9	9,79	10,6	81,1	14,5	28,6
Mais 2	44,4	9,22	16,8	30,3	6,56	13,1
Weizen	9,66	2,19	6,03	32,3	7,42	13,0
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Weizenbasis	16,1	2,48	4,32	15,9	3,47	5,03
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Maisbasis	22,2	4,25	6,16	16,1	5,02	8,06
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Reisbasis	10,6	1,95	2,43	8,10	2,31	2,89

Tabelle 13 — Präzisionsdaten für Fumonisin B₁ und Fumonisin B₂

Probe	Fumonisin B ₁			Fumonisin B ₂		
	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg
Mais 1	291	41,8	98,5	245	27,9	69,9
Mais 2	4735	721	1 515	1 500	202	504
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Weizenbasis	76,5	12,1	33,4	74,8	15,3	20,3
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Maisbasis	125	22,8	52,0	134	20,9	28,0
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Reisbasis	33,1	8,79	15,5	41,1	11,7	13,0

Tabelle 14 — Präzisionsdaten für Gesamtfumonisine und T-2+HT-2-Toxine

Probe	Gesamtfumonisine			T-2 + HT-2		
	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg
Mais 1	536	51,9	144	137	18,2	35,3
Mais 2	6 233	815	1647	74,7	12,4	18,8
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Weizenbasis	152	24,8	45,2	31,8	5,55	6,98
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Maisbasis	263	34,5	74,7	38,4	7,93	11,1
Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Reisbasis	76,0	15,7	31,7	18,7	3,28	5,37

Tabelle 15 — Präzisionsdaten für Aflatoxin M₁

Probe	Aflatoxin M ₁		
	Mittelwert µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg
Milchpulver 1	0,127	0,036 1	0,046 3
Milchpulver 2	0,033 3	0,020 4	0,024 3

11 Prüfbericht

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

- a) alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe (Art der Probe, Bezeichnung);
- b) eine Verweisung auf dieses Dokument;
- c) das Datum des Probeneingangs und die Art des Probenahmeverfahrens (wenn bekannt);
- d) das Datum der Untersuchung;
- 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 Untersuchung festgestellt wurden;
- g) alle Arbeitsschritte, die nicht in diesem Verfahren festgelegt sind oder als wahlfrei angesehen wurden und die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben.

Anhang A (informativ)

Präzisionsdaten

Das Verfahren wurde 2019 im Rahmen einer Ringversuchstudie mit 20 Teilnehmern geprüft [6]. Es wurden sowohl natürlich kontaminierte als auch aufgestockte Lebensmittelmatrizes berücksichtigt, und zwar Paprika, schwarzer Pfeffer, Mandeln, Haselnüsse, getrocknete Rosinen, getrocknete Feigen, Weizen, Mais ($n = 2$), Milchpulver ($n = 2$), Getreidekostproben auf Mais-, Reis- und Weizenbasis für Kleinkinder gemäß den AOAC-Richtlinien für Ringversuche [7]. Die Liste der an der Ringversuchstudie verwendeten Proben ist in Tabelle A.1 aufgeführt.

Bis auf eine Ausnahme handelte es sich bei allen Einheiten um ehemalige empfohlene Prüfmaterialien aus den letzten 2 Jahren, die zum Zeitpunkt des Ringversuchs noch als QC-Materialien im Handel erhältlich waren. Nur die Getreidekostprobe auf Reisbasis für Kleinkinder (Probe S12) wurde unter Verwendung eines mykotoxinfreien Handelsprodukts speziell aufbereitet. Daher wurde die Richtigkeit (beobachtete Wiederfindung, %) auf der Grundlage der zugewiesenen Werte bewertet, die von den Herstellern von Eignungsprüfungen für jedes einzelne Material angegeben wurden, mit Ausnahme der Probe S12, für die Referenzwerte durch eine interne Analyse ermittelt wurden.

Die Präzisionsdaten für sind in Tabelle A.2 bis Tabelle A.16 angegeben. HorRat-Werte werden unter Verwendung der vorhergesagten Standardabweichung von Horwitz für Konzentrationen über 120 µg/kg und unter Verwendung des 22 %-Wertes für Konzentrationen unter 120 µg/kg (Thompson) berechnet.

Alle mittleren Konzentrationen werden mit drei wertanzeigenden Stellen angegeben.

Tabelle A.1 — Liste der an der Ringversuchstudie verwendeten Proben (2019)

Probencode	Probenart
S1	Paprika
S2	Schwarzer Pfeffer
S3	Haselnüsse
S4	Mandelpulver
S5	Getrocknete Rosinen
S6	Getrocknete Feigen
S7	Mais 1
S8	Mais 2
S9	Weizen
S10	Getreidekost auf Weizenbasis für Kleinkinder
S11	Getreidekost auf Maisbasis für Kleinkinder
S12	Getreidekost auf Reisbasis für Kleinkinder
S13	Milchpulver 1
S14	Milchpulver 2

Tabelle A.2 — Präzisionsdaten für Aflatoxin B₁

Parameter	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
Anzahl der Laboratorien	20	19	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19
Anzahl der Ausreißer	1	0	2	2	2	1	2	0	0	0	2	0
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	19	19	18	18	18	19	18	20	20	20	18	19
Mittelwert, $\bar{x}$, µg/kg	6,46	8,42	12,7	8,44	12,7	2,89	4,86	2,33	4,97	0,237	0,491	0,0848
Wiederholstandardabweichung s_r , µg/kg	0,32	0,71	0,53	0,30	0,47	0,14	0,29	0,45	0,39	0,013	0,028	0,0101
Relative Wiederholstandardabweichung RSD_r , %	5	8	4	4	4	5	6	19	8	5	6	12
Wiederholgrenze r [$r = 2,8 \times s_r$], µg/kg	0,89	2,00	1,5	0,85	1,3	0,41	0,80	1,26	1,09	0,036	0,077	0,0283
Vergleichstandardabweichung s_R , µg/kg	0,67	1,22	1,1	0,60	1,3	0,30	0,69	0,54	0,57	0,031	0,036	0,0155
Relative Vergleichstandardabweichung RSD_R , %	10	15	9	7	10	10	14	23	12	13	7	18
Vergleichgrenze R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/kg	1,87	3,43	3,2	1,69	3,7	0,84	1,93	1,52	1,61	0,087	0,100	0,0433
Beobachtete Wiederfindung, %	120	129	111	103	113	116	100	116	109	91	96	99
Vorhergesagte Standardabweichung, %	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
HorRat-Wert	0,5	0,7	0,4	0,3	0,5	0,5	0,6	1,1	0,5	0,6	0,3	0,8

Tabelle A.3 — Präzisionsdaten für Aflatoxin B₂

Parameter	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
Anzahl der Laboratorien	20	19	20	20	20	20	-	18	20	20	20	19
Anzahl der Ausreißer	2	2	2	1	0	1		1	0	0	1	2
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	18	17	18	19	20	19		17	20	20	19	17
Mittelwert, $\bar{x}$, µg/kg	4,06	6,52	13,7	4,22	0,991	1,09		2,07	2,10	0,269	0,483	0,0778
Wiederholstandardabweichung s_r , µg/kg	0,12	0,46	0,71	0,17	0,062	0,05		0,15	0,26	0,022	0,022	0,0077
Relative Wiederholstandardabweichung RSD_r , %	3	7	5	4	6	4		7	12	8	5	10
Wiederholgrenze r [$r = 2,8 \times s_r$], µg/kg	0,34	1,28	2,0	0,49	0,2	0,13		0,41	0,72	0,062	0,062	0,0216
Vergleichstandardabweichung s_R , µg/kg	0,22	0,84	0,91	0,36	0,115	0,09		0,25	0,24	0,027	0,031	0,0121
Relative Vergleichstandardabweichung RSD_R , %	5	13	7	9	12	8		12	11	10	6	16
Vergleichgrenze R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/kg	0,62	2,36	2,6	1,01	0,3	0,24		0,69	0,67	0,075	0,087	0,033 9
Beobachtete Wiederfindung, %	123	117	109	96	110	113		109	105	108	97	98
Vorhergesagte Standardabweichung, %	22	22	22	22	22	22		22	22	22	22	22
HorRat-Wert	0,2	0,6	0,3	0,4	0,5	0,4		0,5	0,5	0,5	0,3	0,7

Tabelle A.4 — Präzisionsdaten für Aflatoxin G₁

Parameter	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
Anzahl der Laboratorien	20	19	20	20	20	20	-	18	20	20	20	19
Anzahl der Ausreißer	1	2	1	0	1	0		1	0	1	0	3
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	19	17	19	20	19	20		17	20	19	20	16
Mittelwert, $\bar{x}$, µg/kg	2,06	3,58	21,6	1,79	10,2	3,02		1,71	8,42	0,199	0,504	0,0613
Wiederholstandardabweichung s_r , µg/kg	0,09	0,26	0,7	0,09	0,5	0,24		0,17	0,65	0,027	0,018	0,0049
Relative Wiederholstandardabweichung RSD_r , %	5	7	3	5	5	8		10	8	13	4	8
Wiederholgrenze r [$r = 2,8 \times s_r$], µg/kg	0,26	0,73	2,1	0,26	1,4	0,67		0,48	1,82	0,075	0,050	0,0136
Vergleichstandardabweichung s_R , µg/kg	0,15	0,35	1,6	0,15	0,8	0,27		0,24	1,10	0,023	0,034	0,0083
Relative Vergleichstandardabweichung RSD_R , %	7	10	7	8	8	9		14	13	11	7	14
Vergleichgrenze R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/kg	0,43	0,97	4,4	0,41	2,2	0,75		0,66	3,09	0,064	0,095	0,0234
Beobachtete Wiederfindung, %	98	118	103	99	107	114		101	108	100	101	98
Vorhergesagte Standardabweichung, %	22	22	22	22	22	22		22	22	22	22	22
HorRat-Wert	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4		0,6	0,6	0,5	0,3	0,6