

Projectnr.: 71.666.01  
Analysemethoden diervoeders

Projectleider: W.A. Traag

*Dit project kon gerealiseerd worden dankzij een financiële bijdrage uit het LNV programma 378*

Rapport 2003. 011

Juli 2003

Ontwikkeling en implementatie van een LC-MS bevestigingsmethode voor de bepaling van mycotoxinen in diervoeders en diervoedergrondstoffen.

T. de Rijk, P. Zomer en W.A. Traag

Business Unit: Analyse en Ontwikkeling  
Cluster: Bestrijdingsmiddelen en Contaminanten

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Telefoon 0317-475400  
Telefax 0317-417717  
Internet: [www.rikilt.wur.nl](http://www.rikilt.wur.nl)

Copyright 2003, Instituut voor voedselveiligheid (RIKILT).

Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

## VERZENDLIJST

### INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (4x)

marketing & communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

### EXTERN:

Ministerie LNV, DL, Drs. J. Verkerk

Ministerie LNV, WA, (drs. M.E. Siemelink, dr. R.M.C. Theelen,)

Ministerie LNV, DWK, Ir. J.A. Cornelese

Rijksdienst voor keuring van Vee en Vlees (ing. J.H. Drenth)

Algemene Inspectie Dienst (drs. M. Jansen, G. Kolkman)

Voedsel en Warenautoriteit (drs. B.W. Ooms)

<b>INHOUD</b>	blz. 1
<b>SAMENVATTING</b>	3
<b>1 INLEIDING</b>	5
<b>2 UITGEVOERD ONDERZOEK</b>	6
2.1 Infusie	6
2.2 Chromatografie	6
2.3 Extractie	7
2.4 Detectiegrens	7
2.5 Terugvinding	9
2.6 Analyse van Certified Reference Material	9
<b>3 CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN</b>	11
<b>4 LITERATUUR</b>	11
 <b>BIJLAGEN</b>	
A Chromatografie	
B Extractie	
C RSV A0255	

## SAMENVATTING

Voor het aantonen van 16 mycotoxinen in diervoeder(grondstoffen) is een vloeistof-chromatografische-tandem massaspectrometrische analysemethode ontwikkeld. De methode is vastgelegd in een RIKILT Standaard Voorschrift (RSV A0255) welk vanaf 1 maart 2003 operationeel is. Na extractie met een mengsel van acetonitril/water wordt het extract gesplitst in twee fracties (A en B). Fractie A wordt direct gemeten terwijl aan 1 ml van fractie B 3 ml water wordt toegevoegd. Beide fracties worden onder dezelfde chromatografische omstandigheden gemeten met behulp van LC-MS-MS waarbij de instelling van de massaspectrometer zodanig is afgeregeld dat in beide fracties verschillende mycotoxinen gemeten kunnen worden. In tabel 1 is een overzicht gegeven van de mycotoxinen waarvoor de methode toepasbaar is.

Tabel 1: Mycotoxinen waarvoor methode toepasbaar is

<b>Component</b>	<b>MRL (ng/g)</b>	<b>Gewenste rapportagegrens (ng/g)</b>	<b>LOQ (ng/g)</b>	<b>Fractie</b>
Aflatoxin B1	5-50	5	0.5	A
Aflatoxin B2	nvt	5	0.5	A
Aflatoxin G1	nvt	5	0.2	A
Aflatoxin G2	nvt	5	0.3	A
Deoxynivalenol (DON)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	1000	100	B
3-acetyl-DON	nvt	1000	20	B
Diacetoxyscirpenol (DAS)	nvt	250	5	B
Fumonisin B1	100-10 <sup>3</sup>	100	1	A
Fumonisin B2	nvt	100	1	A
HT2-toxin	nvt	100	5	B
T2-toxin	500	500	5	B
Ochratoxin A	50-500	50	1	A
Sterigmatocystin	nvt	5	0,5	A
Zearalenon	50-500	50	5	A
alfa-Zearalenol	nvt	250	10	A
beta-Zearalenol	nvt	250	10	A

Patulin, Fusaric acid, Cyclopiazonic acid, Kojic acid, Moniliformin en Citrinin zijn niet binnen de ontwikkelde LC-MSMS methode te bepalen. Nader onderzoek naar chromatografische en massaspectrometrische parameters is noodzakelijk.

## 1 INLEIDING

Mycotoxinen zijn voor mens en dier giftige stoffen die gevormd worden door schimmels die groeien op landbouwgewassen. De grootste risico's van mycotoxinen voor de mens liggen in de consumptie van gecontamineerde plantaardige voedingsmiddelen (vooral granen en noten). In sommige gevallen is de overdracht vanuit diervoeder naar het dierlijk product niet verwaarloosbaar en veelal onbekend. De situatie is complex vanwege de grote variatie in schimmelinfecties en de sterk wisselende contaminatie met mycotoxinen, het grote aantal hierbij betrokken stoffen (veelal onbekend) en de beperkte kennis m.b.t. voorkomen en toxiciteit.

Het onderzoek m.b.t. mycotoxinen is tot nu toe beperkt tot het meten van slechts enkele mycotoxinen (aflatoxinen, ochratoxine, zearalenon en DON). Van de dierlijke producten is melk het meest onderzocht en dan met name voor de aanwezigheid van aflatoxine M1. Het optimaliseren en valideren van huidige HPLC methoden lijkt op voorhand niet zinvol. Het toepassen van een bijzonder gevoelige massa-spectrometrische techniek in combinatie met een voorscheiding met behulp van vloeistofchromatografie is op louter theoretische gronden een betere aanpak. Het grote voordeel van massa-spectrometrie voor de detectie is de hoge absolute gevoeligheid welke velen malen groter is dan b.v. UV absorbtie. Door deze hogere gevoeligheid is er absoluut gezien minder van een bepaald mycotoxine in het te meten extract nodig om te komen tot een eenduidige uitspraak. Hierdoor is het mogelijk om minder monster in bewerking te nemen en/of tijdrovende en gecompliceerde opzuiveringsstappen achterwege te laten terwijl het gewenste detectieniveau betrouwbaarder, d.w.z. met een betere reproduceerbaarheid, recovery etc, behaald kan worden. Ook is uit onder andere diverse ringtesten gebleken dat zowel de HPLC als de GC methode voor DON niet specifiek genoeg is resulterend in te hoge waarden en soms zelfs in vals positieve uitslagen. In deze studie is nagegaan of de analyse van de mycotoxinen Fumonisin B1/B2, Aflatoxin B1/B2/G1/G2, Ochratoxin A,  $\alpha/\beta$ -Zearalenol, Zearalenon, Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, T2-toxin, HT2-toxin, Sterigmatocystin, Diacetoxyscripenol, Cyclopiazonic acid, Fusaric acid, Patulin, Kojic acid, Citrinin en Monoliformin in diervoer en meel met behulp van vloeistofchromatografie in combinatie met tandem massaspectrometrie mogelijk is. Het grote voordeel van de gekozen methode is het vermogen van LC-MSMS om veel verschillende verbindingen in één run te kunnen scheiden en kwantificeren. Het RIKILT heeft een groot aantal LC-MSMS systemen staan, waaronder twee Micromass Quattro Ultima's en drie Micromass Quattro Micro's. Door Micromass, TLR<sup>1)</sup> en KvW-Amsterdam<sup>2)</sup> wordt een Micromass Quattro Ultima aanbevolen en beide machines zijn onderzocht. Omwille van operationele flexibiliteit is ook een Micromass Quattro Micro machine onderzocht.

De methodeontwikkeling voor mycotoxinen mbv. LC-MSMS is op te delen in onderstaande deelgebieden.

- Infusie.
- Chromatografie
- Extractie
- Detectiegrens
- Terugvinding
- Analyse van Certified Reference Material

## 2. UITGEVOERD ONDERZOEK EN RESULTATEN

### 2.1. Infusie

Met deze techniek worden de massaspectrometrische parameters vastgelegd van de verschillende mycotoxinen. Omdat deze kunnen verschillen tussen de verschillende LC-MSMS machines zijn infusiegegevens op drie verschillende LC-MSMS machines (Micromass Quattro Ultima 1, Micromass Quattro Ultima 2 en Micromass Quattro Micro 2) vastgesteld.

Van Fumonisin B1/B2 (resp. FB1/FB2), Aflatoxin B1/B2/G1/G2 (resp. AB1/AB2/AG1/AG2), Ochratoxin A (OTA),  $\alpha/\beta$ -Zearalenol (resp. aZL/bZL), Zearalenon (ZON), Deoxynivalenol (DON), 3-Acetyldeoxynivalenol (3Ac-DON), T2-toxin (T2), HT2-toxin (HT2), Sterigmatocystin (STER), Diacetoxyscripenol (DAS), Cyclopiazonic acid (CPA), Fusaric acid (FA), Patulin (PAT), Kojic acid (KA), Citrinin (CIT) en Monoliformin (MLF) zijn de massaspectrometrische parameters bepaald. Onder ESI(+) omstandigheden wordt, met uitzondering van Patulin en Monoliformin, voor elke component een massaspectrum vastgelegd. Onder ESI(-) omstandigheden wordt voor  $\alpha/\beta$ -Zearalenol, Zearalenone, Cyclopiazonic acid, Fusaric acid, Monoliformin en Citrinin een massaspectrum vastgelegd (Datamap A&O BC 02-129 en RSV A0255 (bijlage 3)).

Voor Patulin kan onder zowel ESI(+) als ESI(-)omstandigheden geen massaspectrum worden vastgelegd. Literatuur over Patulin is niet consistent: één referentie geeft aan dat zowel met ESI als met APCI geen spectrum vast te leggen is terwijl een andere referentie aangeeft dat met APCI wél een meting mogelijk is. Dit moet nog nader worden onderzocht.

### 2.2. Chromatografie

De chromatografiemethode is robuust mits de HPLC-loopmiddelen zorgvuldig gemaakt worden. Met name kleine variaties in de hoeveelheid acetonitril hebben grote invloed op de retentietijd waarbij het "grootste probleem" ligt in het gebied waar AB2, AG1, DAS, AB1 en HT-2 elueren. Variatie in de hoeveelheid mierenzuur (getest is 0,05%, 0,1% en 0,2%) is van ondergeschikt belang, zowel voor de chromatografie als voor de vorming van de massaspectra.

Voor de componenten FB1/FB2, AB1/AB2/AG1/AG2, OTA, aZL/bZL, ZON, DON, 3Ac-DON, T2, HT2, STER en DAS wordt een goede piekvorm (piekbreedte 10-15 seconden) en een verwaarloosbare carry-over (<0,1%) vastgesteld. Een voorbeeld van de chromatografie wordt gegeven in bijlage 1. CPA en FA vertonen sterke tailing waardoor de piekbreedte oploopt tot 5 minuten. CPA heeft tevens 10-15% carry-over. De oorzaak van dit slechte chromatografische gedrag en de hoge carry-over ligt mogelijk in het sterk polaire, deels ionogene karakter van de verbindingen. Hierdoor kunnen ze blijven 'plakken' aan allerlei polaire bestanddelen van het chromatografie systeem (bv. roestvrijstalen onderdelen van de HPLC-pomp of het silica-drager materiaal van de HPLC-kolommen). Voor CPA, FA, CIT, KA en MLF zou chromatografie op een ionenwisselaar (bv. Alltech Adsorbosphere NH<sub>2</sub>) of andersoortige kolom (bv. ShodexRSPak DE613) een geschikt alternatief kunnen zijn en de moeite van het onderzoeken waard.

De piekvorm van DON (en 3Ac-DON) in de extracten is slecht (fronting). Dit wordt veroorzaakt door een te hoog percentage acetonitril in het extractiemiddel (84% v/v). Dit is echter noodzakelijk om een goede extractie van alle mycotoxinen te verkrijgen. Het verlagen van het acetonitril percentage in het eindextract kan op twee manieren bereikt worden:

- a. het verdampen van acetonitril na de extractie
- b. het toevoegen van water na de extractie.

Bij a. wordt acetonitril verdampt bij 40°C onder een N<sub>2</sub>-stroom. Een voordeel hierbij is dat het extract tevens geconcentreerd wordt waardoor de detectielimieten van de mycotoxinen verbeterd worden. Voorkomen moet worden dat het extract droog geblazen wordt want weinig polaire mycotoxinen als aZL, bZL en ZON zullen slecht in water heroplossen.

Bij b. wordt het monster verdund. De gestelde detectielimieten voor DON en 3AcDON worden ruimschoots gehaald zodat doorverdunnen de eenvoudigste oplossing is. Voor een aantal andere mycotoxinen is de detectielimiet dan echter te hoog. Dit betekent dus wel dat de analyse over twee injecties 'verdeeld' wordt (RSV A0255, bijlage 3). De eerste injectie (A) wordt in het onverdunde extract uitgevoerd. De tweede injectie (B) na verdunning met 3 delen water.

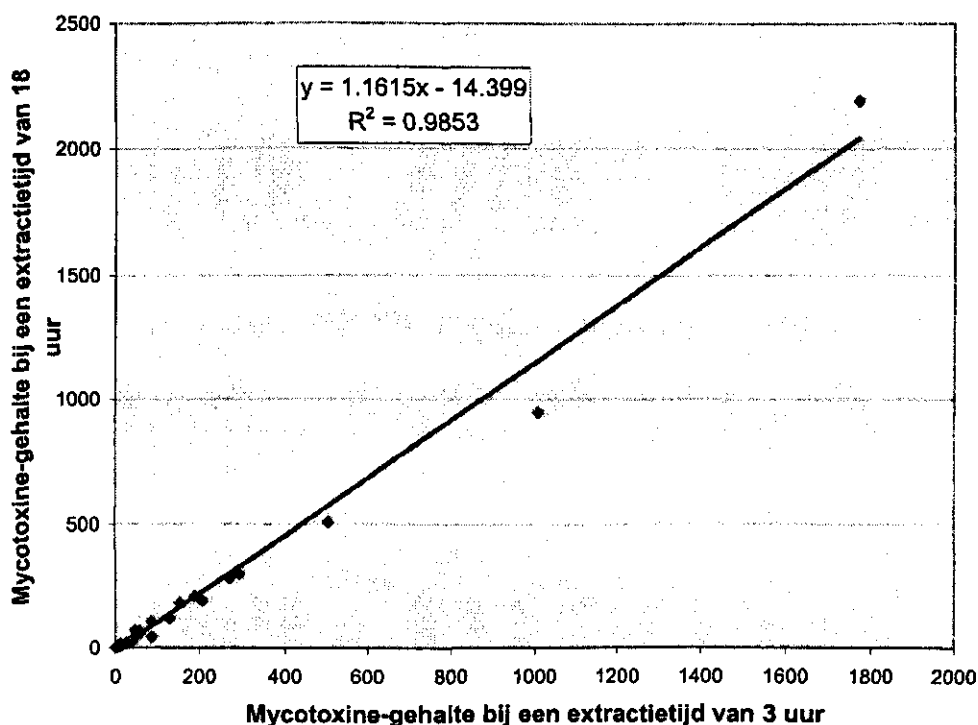
### 2.3. Extractie

De extractie van mycotoxinen uit meel en diervoeder wordt uitgevoerd met het extractiemiddel dat door AOAC is voorgeschreven: acetonitril/water (84/16 v/v). Dit wordt ook door diverse collega-laboratoria toegepast (TLR<sup>11</sup>, KvW-Amsterdam<sup>2</sup>). In RSV A0255 (bijlage 3) wordt de methode in detail beschreven. Binnen het kader van dit onderzoek is onderzocht of de tijdsduur van de extractie een belangrijke parameter is in de analyse van mycotoxinen. Hierbij is gebruik gemaakt van Certified Reference Material (CRM). Een extractie gedurende drie uur is vergeleken met een extractie gedurende 16 uur (overnacht). De resultaten zijn vermeld in bijlage 2. In figuur 1 is het verband tussen beide analysetijden uitgezet. Hierbij zijn de resultaten van alle mycotoxine-gehaltenes (in ng/g) van de drie-uur extractie op de x-as uitgezet tegen de resultaten van alle mycotoxine-gehaltenes van de 16-uur extractie (op de y-as). De helling van de lijn  $y = ax + b$  is 1,16 wat aangeeft dat beide extractieprocedures vergelijkbare resultaten geven. Verder is de correlatiecoëfficiënt  $r^2 = 0,99$  wat aangeeft dat er goede samenhang is tussen de resultaten.

### 2.4. Detectiegrens

In tabel 2 worden de detectiegrenzen weergegeven zoals die haalbaar zijn op de drie geteste

Figuur 1 Extractietijd



systemen Ultima 1, Ultima 2 en Micro 2. Hierbij is in ESI+ gemeten en zijn de LOQ's berekend uitgaande van s/n-ratio = 6. De aangegeven LOQ-waarden zijn indicatief, de definitieve detectiegrenzen moeten uit de nog uit te voeren validatie komen.

De vereiste ondergrens is vastgesteld aan de hand van bekende MRL-waarden. Als MRL-waarden ontbreken is gebruik gemaakt van expert opinion om de overige ondergrenzen vast te stellen. Tussen haakjes staat de ondergrens vermeld zoals op dit moment door RIKILT worden opgegeven. Deze zijn gebaseerd op een target compound analyse.

De detectiegrenzen zijn vastgesteld in een onverdund extract (met uitzondering van DON en 3Ac-DON die 1:3 verdund zijn met water). Ze zijn sterk afhankelijk van de opwerkingsmethode. Zo is hierbij nog geen concentratie van het extract uitgevoerd waarmee de detectiegrens zeker met een factor twee verbeterd zal worden. De bereikte detectiegrenzen op Ultima 1 zijn in overeenstemming met (of zijn beter dan) de detectiegrenzen zoals ze door TLR<sup>1)</sup> opgegeven worden. Met name voor de Aflatoxines zijn de detectiegrenzen op de Micromass Micro 2 onvoldoende.

Tabel 2. Detectiegrens

Component	MRL (ng/g)	Vereiste ondergrens (ng/g)	LOQ	LOQ	LOQ
			Ultima 1 (ng/g)	Ultima 2 (ng/g)	Micro 2 (ng/g)
Aflatoxin B1	5-50	5 (1)	0.5	1	2
Aflatoxin B2	-	5	0.5	1	2
Aflatoxin G1	-	5	0.2	0.5	4
Aflatoxin G2	-	5	0.3	2	4
DON	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	1000 (200)	100	150	100
3-acetyl-DON	-	1000	20	25	200
DAS	-	250	5	20	50
Fumonisin B1	100-10 <sup>3</sup>	100	1	5	10
Fumonisin B2	-	100	1	1	5
HT2-toxin	-	100	5	10	100
T2-toxin	500	500	5	10	100
Ochratoxin A	50-500	50 (1, 0,1)	1	0.5	10
Sterigmatocystin	-	5	0.5	1	1
Zearalenon	50-500	50 (50,1)	5	10	15
Alfa-Zearalenol	-	250	10	10	10
Beta-Zearalenol	-	250	10	10	10



## 2.5. Terugvinding

De terugvinding is bepaald door toevoeging van 125 resp. 250 µl (nivo's zie tabel 3) van een standaardoplossing aan 5 g. blanco gerst, mais, haver, tarwe en zonnebloemschroot, gevolgd door een wachtperiode van 4 uur waarna de extractie en analyse zijn uitgevoerd.

In tabel 3 wordt het gemiddelde terugvindingspercentage weergegeven zoals berekend is uit spikes op de twee genoemde nivo's. De terugvinding van een groot aantal analyten (bv. DON, 3-AcDON, AG2, AB2, AG1, DAS, AB1, HT2, bZL, aZL, T2, OTA, ZON en STER in gerst, haver en tarwe) is goed (65-130%) en in overeenstemming met resultaten zoals bij TLR bereikt zijn. De matrices mais en zonnebloemschroot geven slechtere resultaten. Met name bij FB1 en FB2 is de terugvinding matig tot slecht. Dit kan wijzen op een matrix-afhankelijke suppressie. De oplossing hiervoor bestaat uit het toevoegen van <sup>13</sup>C-gelabelde standaarden. Deze zijn echter niet commercieel verkrijgbaar. Om toch meer inzicht te krijgen in suppressie is <sup>13</sup>C-gelabeld coffeïne besteld. Dit is relatief goedkoop verkrijgbaar en zal zich naar verwachting in de analyse analoog gedragen aan de te onderzoeken mycotoxinen. Als dit niet tot een oplossing leidt kan het probleem ook opgelost worden door een ijklijn in blanco matrix te maken.

Tabel 3. Terugvinding

Component	Vereiste ondergrens (ng/g)	Spike (ng/g)	1 Spike (ng/g)	2 Spike (ng/g)	Gerst (n=2)	Mais (n=2)	Haver (n=2)	Tarwe (n=2)	Zonne-Bloem (n=2)
DON	1000 (200)	125	250		116%	57%	111%	112%	58%
3-AcDON	1000	125	250		94%	46%	73%	95%	42%
FB1	100	62.5	125		61%	43%	33%	23%	18%
FB2	100	25	50		84%	56%	52%	42%	27%
AG2	5	2.5	5		110%	62%	76%	126%	106%
AB2	5	2.5	5		125%	58%	77%	88%	57%
AG1	5	2.5	5		118%	64%	123%	103%	140%
DAS	250	125	250		116%	87%	70%	99%	90%
AB1	5 (1)	2.5	5		114%	77%	77%	129%	78%
HT2	100	125	250		95%	85%	89%	92%	88%
BZL	250	12.5	25		78%	51%	67%	82%	104%
AZL	250	12.5	25		72%	51%	68%	79%	64%
T2	500	125	250		91%	100%	94%	71%	93%
OTA	50 (1, 0,1)	2.5	5		102%	96%	89%	101%	88%
ZON	50 (50, 1)	6.25	12.5		87%	64%	86%	77%	69%
STER	5 (1)	2.5	5		72%	86%	92%	80%	82%

## 2.6. Analyse van Certified Reference Material.

CRM monsters zijn verkregen van het BCR (Community Bureau of Reference, Europese Commissie) en FAPAS (Central Science Laboratory, Department for Environment, Food & Rural Affairs, Engeland). Helaas is voor slechts een klein deel van de mycotoxinen CRM's verkrijgbaar. Het RIKILT streeft ernaar zoveel mogelijk CRM's te verkrijgen en te analyseren. De resultaten van de analyses zijn niet gecorrigeerd voor de terugvinding en staan vermeld in tabel 4.

Met uitzondering van FB1, FB2 en AB2 zijn de resultaten van metingen boven de bovengrenzen zoals ze door BCR en FAPAS worden opgegeven. Hiervoor kunnen een aantal redenen aanwezig zijn. Ten eerste zijn de opgegeven gehalten het resultaat van een statistische analyse van de analyseresultaten van een groot aantal laboratoria. Deze werken nog niet met LC-MSMS maar met LC-UV, LC-Fluorescentie of GC-MS of GC-ECD. Hiervoor is een uitgebreide clean-up noodzakelijk, vaak in combinatie met derivatisering. Dit kan aanleiding zijn tot het optreden van moeilijk te onderkennen systematische fouten. Ten tweede kunnen de door ons gebruikte standaarden afwijken van de correcte waarde. Daartoe zijn gecertificeerde standaardoplossingen besteld die de basis gaan vormen van de mycotoxinen analyse.

Tabel 4. Resultaten van het onderzoek in CRM's

	Matrix	Mycotoxine	Opgegeven gehalte (ng/g)	Spreiding (ng/g)	Gemeten gehalte (ng/g)
BCR 375	Diervoer	AB1	< 1	-	< 0,5
BCR 376	Diervoer	AB1	9,3	8,8 - 9,8	13,4
FAPAS T0446	Mais	AB1	6,8	3,8 - 9,8	10,8
		AB2	1,7	0,9 - 2,4	1,9
BCR 471	Tarwe	OTA	< 0,6	-	< 1
BCR 472	Tarwe	OTA	8,2	7,2 - 9,2	15,1
FAPAS T1718	Gerst	OTA	5,4	3,0 - 7,8	9,4
BCR 377	Mais	DON	< 50	-	< 100
FAPAS T2207	Tarwe	DON	695	460 - 929	1008
FAPAS T2208	Mais	FB1	879	432 - 1326	505
		FB2	306	150 - 461	293

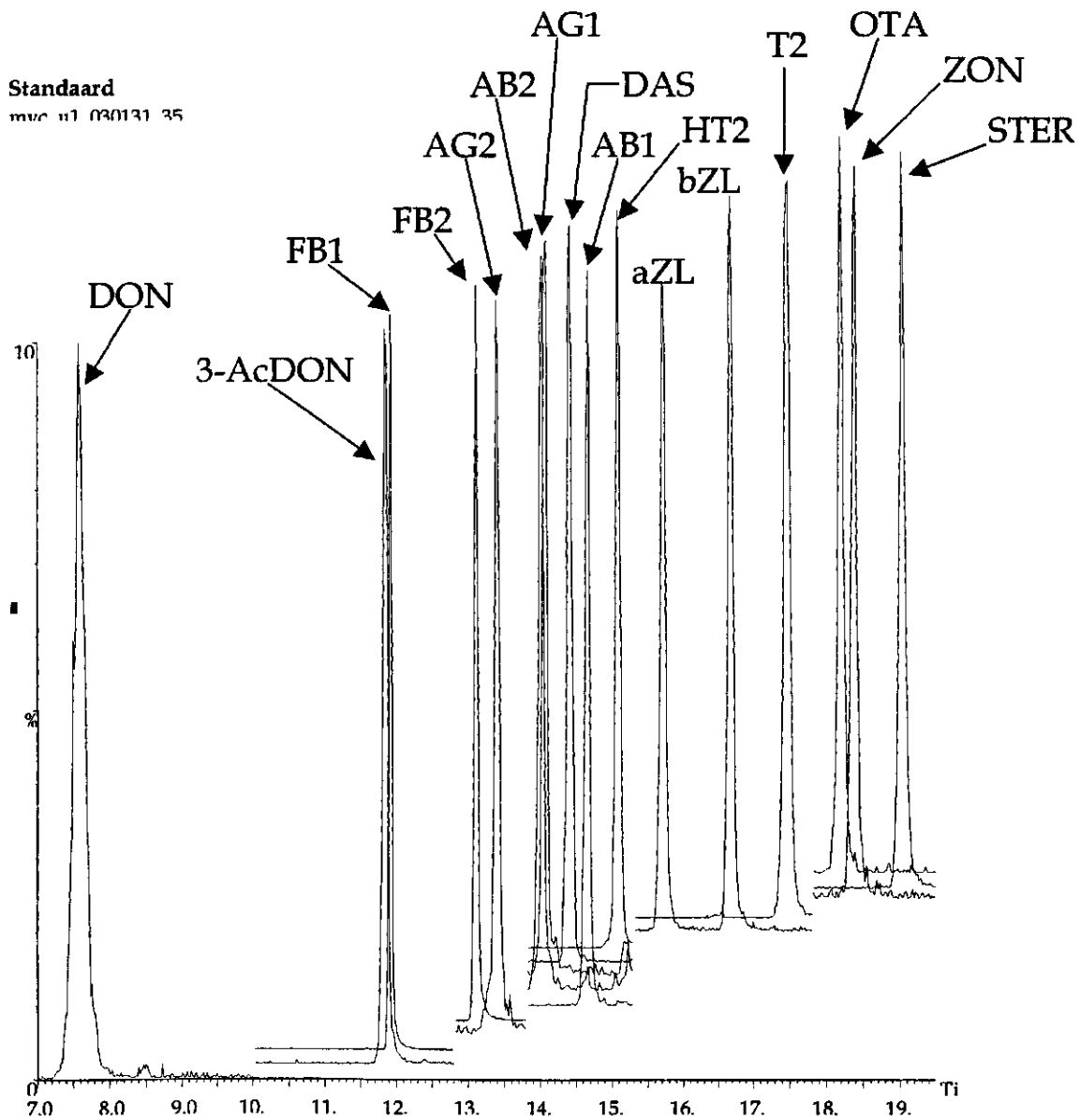
### 3. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

- Voor Fumonisin B1/B2, Aflatoxin B1/B2/G1/G2, Ochratoxin A,  $\alpha/\beta$ -Zearalenol, Zearalenon, DON, 3-Ac-DON, T2-toxin, HT2-toxin, Sterigmatocystin, en DAS is een werkbare methode ontwikkeld die voldoet aan eisen voor (chromatografische) stabiliteit, detectielimiet en terugvinding.
- Het onderzoek heeft geresulteerd in een RIKILT Standaard Voorschrift (RSV A0255, bijlage 3). De ontwikkelde methode zal de komende maanden parallel gaan lopen met de target-compound analyses op Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A en Zearalenon zoals deze al op het RIKILT uitgevoerd worden. Ook zal gedurende deze periode de methode (RSV A0255) volgens NEN 7777<sup>3)</sup> en RSV A0906<sup>4)</sup> gevalideerd worden.
- Voor Fusaric acid, Cyclopiazonic acid, Kojic acid, Moniliformin en Citrinin moet de chromatografie aangepast worden en hiervoor wordt nader onderzoek aanbevolen. Eveneens is nader onderzoek vereist voor Patulin, met name gericht op MSMS-condities.

### LITERATUUR

1. TLR, mondelinge informatie Gerard Franken.
2. Single run LC-MS/MS analysis of mycotoxins subject to actual and upcoming EU legislation in one sample extract, poster gepresenteerd op The second World Mycotoxin Forum, 17-18 febr. 2003 te Noordwijk, Nederland.
3. NEN 7777, Nederlands Normalisatie-instituut, Delft.
4. RSV A0906, RIKILT, Wageningen.

# Bijlage A: Chromatografie



## Bijlage B: Extractie

	Extractietijd 3 uur Gehalte (ng/g)	Extractietijd 16 uur Gehalte (ng/g)
<b>DON</b>		
FAPAS T0446	1771	2191
FAPAS T2207	1008	948
FAPAS T2208	154	181
<b>3-Ac- DON</b>		
FAPAS T0446	190	209
<b>FB1</b>		
BCR 377	86	105
FAPAS T0446	208	190
FAPAS T2208	505	508
<b>FB2</b>		
BCR 377	48	71
FAPAS T0446	130	119
FAPAS T2208	293	298
<b>AG2</b>		
BCR 376	5,7	9,3
<b>AB2</b>		
BCR 376	1,2	1,4
FAPAS T0446	1,9	2,1
<b>AG1</b>		
BCR 376	8,0	6,4
<b>DAS</b>		
Geen positief CRM aanwezig	<5	<5
<b>AB1</b>		
BCR 375	1,0	<0,5
BCR 376	13,4	16,9
FAPAS T0446	10,8	9,1
FAPAS T1718	1,1	1,1
<b>HT2</b>		
BCR 375	38	52
BCR 376	34	59
<b>bZL</b>		
Geen positief CRM aanwezig	<10	<10
<b>aZL</b>		
Geen positief CRM aanwezig	<10	<10
<b>T2</b>		
BCR471	60	58
BCR 472	58	66
<b>OTA</b>		
BCR 375	1,5	1,8
BCR 376	1,6	2,3
BCR 377	1,2	1,4
BCR 472	15,1	8,8
FAPAS T1718	9,4	9,4
FAPAS T2207	<1	1,0
<b>ZON</b>		
BCR 375	45	38
BCR 376	86	43
BCR 377	24	17
FAPAS T0446	271	281
FAPAS T2207	27	23
FAPAS T2208	39	23
<b>STER</b>		
BCR 375	3	3
BCR 376	10	6

<b>RSV</b>	<b>A0255</b>						
<b>titel</b>	<b>Diervoeder en meel - Multimethode mycotoxinen – LC-MSMS</b>						
<b>datum</b>	<b>21-8-03</b> <span style="float: right;">(opslag)</span>						
<b>auteur(s)</b>	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">NAAM</td> <td>HANDTEKENING</td> </tr> <tr> <td>T. de Rijk</td> <td><hr/></td> </tr> <tr> <td>P. Zomer</td> <td><hr/></td> </tr> </table>	NAAM	HANDTEKENING	T. de Rijk	<hr/>	P. Zomer	<hr/>
NAAM	HANDTEKENING						
T. de Rijk	<hr/>						
P. Zomer	<hr/>						
<b>goedgekeurd</b>	W.A. Traag						
<b>gezien hfd.afd.</b>	A.E.M. Vermunt						

te distribueren aantallen bewaakte gebruiksexemplaren <sup>1)</sup>						
A&O		Directie		FBZ		Derden (naam, aantal)
O&E		KVM	1	FD		
				P&O		
				M&C		

toetsing KVM						
lay-out	bijlagen			identificatie en datering	Tekenen en distributie	
formulering titel	codering nummering (lijst)			versienummer: => identificatiepag. => koptekst	auteur(s)	
indeling van paragrafen (F0001/F0003)	aantal pagina's: => identificatiepag. => werkelijk			uitgiftedatum: => identificatiepag. => koptekst	Goedkeuring	
paragraaf 1.2	performance Sheet & Dossier			uitgiftedatum: => bijlagen	gezien hoofd	
renvooierring (mutatie)	Bijlage F0004/4		<b>X</b>	DAM code	distributie schema	
datum KVM in	1. 2. 3. 4.			indien retour datum KVM uit	1. 2. 3. 4.	

<sup>1)</sup> In te vullen door auteur / autorisatie / afd. hoofd (naar keuze) .code.

TITEL

DIERVOEDER EN MEEL - MULTIMETHODE MYCOTOXINEN - LC-MSMS

NAAM

HANDTEKENING

Opgesteld door : T. de Rijk

P. Zomer

Goedgekeurd door : W.A. Traag

Directeur : C.D. de Gooijer

<p>VALIDATIESTATUS <i>Volledig gevalideerd</i></p>	<p>RSV nr. : A0255 vervangt: Xxxxx DAM code : editie nr. : 1 datum uitgifte :</p>	
<p>UITGIFTE naam : P.H.U. de Vries  handtekening</p>	<p>RSV aantal pagina's : aantal bijlagen :  afdeling :</p>	<p>Uitgifte bijlagen 1:</p>
		<p>Lijst: F0001/1 datum:</p>

## CONCEPT

KVM	RSV nr.	:	A0255
paraaf	editie nr.	:	1
	datum uitgifte	:	
	pagina	:	1 van 7

### 1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

#### 1.1 Toelichting

Het toepassingsgebied van de methode is een kwantitatieve, bevestigende analyse van de mycotoxinen Aflatoxin B1 (AB1), Aflatoxin B2 (AB2), Aflatoxin G1 (AG1), Aflatoxin G2 (AG2), Fumonisin B1 (FB1), Fumonisin B2 (FB2), T2-toxin (T2), HT2-toxin (HT2), Deoxynivalenol (DON), 3-Acetyl-deoxynivalenol (3AcDON), Diacetoxyscirpenol (DAS),  $\alpha$ -Zearalenol (aZL),  $\beta$ -Zearalenol (bZL), Zearalenon (ZON), Ochratoxin A (OTA) en Sterigmatocystin (STER) in diervoeder en meel. De methode wordt gevalideerd volgens NEN 7777 en RSV A0906. Hierbij wordt uitgegaan van een component afhankelijke beslisgrens van 5 tot 1000 ng/gram product (zoals vermeld in tabel 1 en tabel 2).

#### 1.2 Niet-aanwezige paragrafen welke conform F0001 vereist zijn

nvt

#### 1.3 Prestatiekenmerken

Zie bijlage 1.

### 2 DEFINITIE

Dit voorschrift beschrijft een kwantitatieve bevestigende analysemethode voor Aflatoxin B1, Aflatoxin B2, Aflatoxin G1, Aflatoxin G2, Fumonisin B1, Fumonisin B2, T2-toxin, HT2-toxin, Deoxynivalenol, 3-Acetyl-deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol,  $\alpha$ -Zearalenol,  $\beta$ -Zearalenol, Zearalenon, Ochratoxin A en Sterigmatocystin in diervoeder en meel. De methode kent een component afhankelijke beslisgrens van 5-1000 ng/g.

### 3 BEGINSEL

De te onderzoeken monsters worden gemalen en geëxtraheerd met acetonitril/water 84/16 (v/v). Na filtratie worden de monsters kwalitatief en kwantitatief geanalyseerd met vloeistofchromatografie-massa spectrometrie (LC-MSMS).

### 4 REAGENTIA EN HULPSTOFFEN

Alle chemicaliën dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of hoger. Met "water" wordt bedoeld gedemineraliseerd water, gereinigd met een Milli-Q<sup>®</sup>-installatie en met een minimale weerstand van 10 M $\Omega$ <sup>cm</sup> of water van een vergelijkbare kwaliteit.

De referentiestoffen dienen van de grootst mogelijke zuiverheid te zijn. Hierbij moet niet alleen gedacht



## CONCEPT

KVM	RSV nr.	:	A0255
paraaf	editie nr.	:	1
	datum uitgifte	:	
	pagina	:	2 van 7

worden aan onzuiverheden, maar ook aan eventueel aanwezige hoeveelheden oplosmiddelen. Indien de totale zuiverheid <99% is dient gecorrigeerd te worden voor dit percentage.

Verwijzing naar een product en/of fabrikant dient enkel ter informatie en identificatie en houdt geen uitsluiting in van andere producten en/of fabrikanten die mogelijk ook voldoen.

### 4.1 Chemicaliën

- 4.1.1 Mierenzuur 96 % (Aldrich 25,736-4)
- 4.1.2 Acetonitril (Biosolve HPLC Supra Gradient 01203502)
- 4.1.3 Aflatoxin B1 (SIGMA A6636, 99%)
- 4.1.4 Aflatoxin B2 (SIGMA A9887, 98%)
- 4.1.5 Aflatoxin G1 (SIGMA A0138, 98%)
- 4.1.6 Aflatoxin G2 (SIGMA A0263, >98%)
- 4.1.7 Fumonisin B1 (SIGMA F1147, 98%)
- 4.1.8 Fumonisin B2 (SIGMA F3771, 98%)
- 4.1.9 T2-toxin (SIGMA T4887, 99%)
- 4.1.10 HT2-toxin (SIGMA T4138, >97%)
- 4.1.11 Deoxynivalenol (SIGMA D0156, 99%)
- 4.1.12 3-Acetyl-deoxynivalenol (SIGMA A6166, 99%)
- 4.1.13 Diacetoxyscirpenol (SIGMA D0761, 99%)
- 4.1.14  $\alpha$ -Zearalenol (SIGMA Z0166, 99.7%)
- 4.1.15  $\beta$ -Zearalenol (SIGMA Z2000, 99%)
- 4.1.16 Zearalenon (SIGMA Z2125, >99%)
- 4.1.17 Ochratoxin A (SIGMA O1877, 98%)
- 4.1.18 Sterigmatocystin (SIGMA S3255, 99%)
- 4.1.19 Caffeïne-3C<sup>13</sup> (Aldrich 48.536-5, 99%)

### 4.2 Reagentia

- 4.2.1 HPLC-eluens A. Pipetteer 1,0 ml mierenzuur (4.1.1) in een één-liter maatkolf, voeg 50,0 ml acetonitril (4.1.2) en vul aan met water tot de maatstreep. Homogeniseer en filtreer over een 0,45  $\mu$ m filter. Houdbaarheid twee maanden bij 20°C.
- 4.2.2 HPLC-eluens B. Pipetteer 1,0 ml mierenzuur (4.1.1) in een één-liter maatkolf, voeg 50,0 ml water en vul aan met acetonitril (4.1.2) tot de maatstreep. Homogeniseer en filtreer over een 0,45  $\mu$ m filter. Houdbaarheid twee maanden bij 20°C.

**CONCEPT**

KVM	RSV nr. :	A0255
paraaf	editie nr. :	1
	datum uitgifte :	
	pagina :	3 van 7

4.2.3 Extractieoplossing. Meng 840 ml acetonitril (4.1.2) met 160 ml water. Houdbaarheid 6 maanden bij bij 20°C.

4.2.4 Stockoplossing. De hierbij beschreven werkwijze geldt voor alle analyten (4.1.3 t/m 4.1.18). Omdat de hoeveelheid standaardmateriaal veelal te gering is om af te wegen (1-5 mg) wordt ervan uitgegaan dat de aangegeven hoeveelheid exact aanwezig is in de verpakking (corrigeer eventueel indien zuiverheid <99%). Dit wordt kwantitatief overgespoeld in een 50 ml maatkolf met extractieoplossing (4.2.3) en aangevuld tot de maatstreep. Na homogeniseren is de houdbaarheid bij +4°C en in het donker gelijk aan de houdbaarheid zoals omschreven in RSV A0772 Bestrijdingsmiddelen en organische contaminanten – beheer en aanmaak van standaarden. De concentratie zal dus variëren per analyt!

4.2.5 Tussenoplossing. De hierbij beschreven werkwijze geldt voor de analyten Aflatoxin B1 (4.1.3), Aflatoxin B2 (4.1.4), Aflatoxin G1 (4.1.5), Aflatoxin G2 (4.1.6) en Sterigmatocystin (4.1.18). Omdat de concentratie analyt in de stockoplossingen (4.2.4) varieert van component tot component en van batch tot batch is geen eenduidig pipetteerschema vast te stellen. Daarom wordt in tabel 1 volstaan met het aangeven van de absolute hoeveelheid van de analyten. Voor de omrekening wordt een voorbeeld gegeven. Bij het maken van een nieuwe tussenoplossing moeten de gekozen verdunningsfactoren nauwkeurig in het labjournaal worden vastgelegd. De houdbaarheid is zes maanden bij +4°C en in het donker.

Tabel 1 Tussenoplossing

	Beslisgrens (ng/g)	Hoeveelheid (in µg) in 10,0 ml extractieoplossing (4.2.3)	Concentratie (µg/ml)
Aflatoxin B1	5	10,0	1,0
Aflatoxin B2	5	10,0	1,0
Aflatoxin G1	5	10,0	1,0
Aflatoxin G2	5	10,0	1,0
Sterigmatocystin	5	10,0	1,0

*Voorbeeld:*

*De stockoplossing van Aflatoxin B1 bevat 189 µg/ml. De tussenoplossing moet 10 µg bevatten dus moet  $10,0/189 \cdot 1000 = 52,9 \mu\text{l}$  in 10,0 ml extractieoplossing (4.2.3) worden verdund.*

4.2.6 Standaardoplossing. De hierbij beschreven werkwijze geldt voor de analyten Fumonisin B1 (4.1.7), Fumonisin B2 (4.1.8), T2-toxin (4.1.9), HT2-toxin (4.1.10), Deoxynivalenol (4.1.11), 3-Acetyl-deoxynivalenol (4.1.12), Diacetoxyscirpenol (4.1.13),  $\alpha$ -Zearalenol (4.1.14),  $\beta$ -Zearalenol (4.1.15), Zearalenon (4.1.16), Ochratoxin A (4.1.17) en de tussenoplossing (4.2.5). Omdat de concentratie

**CONCEPT**

KVM	RSV nr. : A0255
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : pagina : 4 van 7

analyt in de stockoplossingen (4.2.4) varieert van component tot component en van batch tot batch is geen eenduidig pipetteerschema vast te stellen. Daarom wordt in tabel 2 volstaan met het aangeven van de absolute hoeveelheid van de analyten. Voor de omrekening wordt een voorbeeld gegeven. Bij het maken van een nieuwe standaardoplossing moeten de gekozen verdunningsfactoren nauwkeurig in het labjournaal worden vastgelegd. De houdbaarheid is zes maanden bij +4°C en in het donker.

Tabel 2 Standaardoplossing

	Beslisgrens (ng/g)	Hoeveelheid (in µg) in 10,0 ml extractieoplossing (4.2.3)	Concentratie (µg/ml)
Fumonisin B1	100	20	2,0
Fumonisin B2	100	20	2,0
T2-toxin	500	100	10,0
HT2-toxin	100	20	2,0
Deoxynivalenol	1000	200	20,0
3-Acetyl-deoxynivalenol	1000	200	20,0
Diacetoxyscirpenol	250	50	5,0
A-Zearalenol	250	50	5,0
B-Zearalenol	250	50	5,0
Zearalenon	50	10	1,0
Ochratoxin A	50	10	1,0
Tussenoplossing (4.2.5)		1,0	0,10

*Voorbeeld:*

*De stockoplossing van Ochratoxin A bevat 183 µg/ml. De standaardoplossing moet 10 µg bevatten dus moet  $10,0/183 \cdot 1000 = 54,6 \mu\text{l}$  in 10,0 ml extractieoplossing (4.2.3) worden opgelost.*

*De tussenoplossing (4.2.5) bevat 1,0 µg/ml en moet 10x verdund worden: 1,0 ml → 10,0 ml.*

- 4.2.7 Caffeïne-3C<sup>13</sup>-stockoplossing. Maak een caffeïne-3C<sup>13</sup> van 2000 µg/ml in methanol zoals beschreven is RSV A0772, Bestrijdingsmiddelen en organische contaminanten - beheer en aanmaak van standaarden. Hierin wordt tevens de houdbaarheid omschreven.
- 4.2.8 Int.Std.-oplossing. Verdun 50 µl Caffeïne-3C<sup>13</sup>-stockoplossing (4.2.7) tot 10,0 ml met extractieoplossing (4.2.3). Houdbaarheid één jaar bij +4°C.
- 4.2.9 Ijkoplossingen. Tijdens iedere meting worden vijf ijkoplossingen meegenomen die samengesteld worden volgens tabel 3. Ze worden samengesteld uit de aangegeven hoeveelheden van de Standaardoplossing (4.2.6) en de Int.Std.-oplossing (4.2.8) te verdunnen met verdunningsoplossing (4.2.10) tot het aangegeven volume. Houdbaarheid één maand bij +4°C en in het donker.

**CONCEPT**

KVM	RSV nr. : A0255
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : pagina : 5 van 7

**Tabel 3 IJkoplossingen**

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
Int.Std. oplossing (4.2.8)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Standaardoplossing (4.2.6)	0 µl	25 µl	125 µl	250 µl	1250 µl
Verdunningsoplossing (4.2.10)	Tot 10,0 ml	Tot 10,0 ml	Tot 10,0 ml	Tot 10,0 ml	Tot 10,0 ml

**Berekende concentraties**

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
Component	Conc in ng/ml	Conc in ng/ml	Conc in ng/ml	Conc in ng/ml	Conc in ng/ml
Aflatoxin B1	0,00	0,25	1,25	2,50	12,5
Aflatoxin B2	0,00	0,25	1,25	2,50	12,5
Aflatoxin G1	0,00	0,25	1,25	2,50	12,5
Aflatoxin G2	0,00	0,25	1,25	2,50	12,5
Sterigmatocystin	0,00	0,25	1,25	2,50	12,5
FB1	0,00	5,0	25	50	250
FB2	0,00	5,0	25	50	250
T2	0,00	25	125	250	1250
HT2	0,00	5,0	25	50	250
DON	0,00	50	250	500	2500
3-Ac-DON	0,00	50	250	500	2500
DAS	0,00	12,5	62,5	125	625
A-ZL	0,00	12,5	62,5	125	625
B-ZL	0,00	12,5	62,5	125	624
ZON	0,00	2,5	12,5	25	125
OTA	0,00	2,5	12,5	25	125

4.2.10 Verdunningsoplossing. Meng 830 ml water met 170 ml acetonitril (4.1.2). Houdbaarheid zes maanden bij +4°C.

## CONCEPT

KVM	RSV nr.	:	A0255
paraaf	editie nr.	:	1
	datum uitgifte	:	
	pagina	:	6 van 7

### 5 APPARATUUR

Verwijzing naar een product en/of fabrikant dient enkel ter informatie en identificatie en houdt geen uitsluiting in van andere producten en/of fabrikanten die mogelijk ook voldoen.

- 5.1 Bovenweger (Mettler PM2000 (nauwkeurigheid +/- 0,01 g))
- 5.2 Analytische balans (Mettler AT261 (nauwkeurigheid +/- 0,1 mg))
- 5.3 PP buis 50 mL (Greiner 2100261)
- 5.4 Schudmachine (Edmund Bühler SM-30 Control)
- 5.5 Centrifuge (Eppendorf 5810)
- 5.6 Vortex mixer (Labinco L46)
- 5.7 Pyrex reageerbuis (Corning 99445-13, 13x100 mm)
- 5.8 2 ml wegwerpspuit (BD Plastipak 300185)
- 5.9 Filter, 0,45  $\mu$  (Acrodisc CR25 met PTFE-membraan)
- 5.10 Crimp neck vials met bijpassende caps (Alltech 98213)
- 5.11 LC-MSMS systeem, bestaande uit een Waters 2690 HPLC-systeem (Ontgasser, pomp, autosampler, kolomoven) en een Micromass Quattro Ultima MSMS-systeem

### 6 WERKWIJZE

#### 6.1 Algemeen

Per serie worden maximaal 10 monsters in bewerking genomen. Hierbij worden de monsters met én zonder toevoeging gemeten (spike op beslisgrens nivo). Tevens worden een blanco meel en een blanco meel met toevoeging (spike op beslisgrens nivo) meegenomen. Tenslotte wordt Certified Reference Material (CRM) meegenomen.

#### 6.2 Voorzorgsmaatregelen

Mycotoxinen gelden in het algemeen als accuut toxische en carcinogene stoffen. Ieder huidcontact met de zuivere stof of oplossingen daarvan moet daarom vermeden worden (handschoenen, labjas).

Neem voorzorgsmaatregelen om inhalatie van organische oplosmiddelen te voorkomen, werk bij voorkeur in een afzuigkast. Draag handschoenen bij het omgaan met de gerubriceerde organische oplosmiddelen.

De opwerking van mycotoxinen dient onder gedempt licht uitgevoerd te worden. Ook gefilterd licht zoals bv. aanwezig is in lab 1-68 is geschikt.

#### 6.3 Voorbehandeling van het monster

## CONCEPT

KVM	RSV nr.	:	A0255
paraaf	editie nr.	:	1
	datum uitgifte	:	
	pagina	:	7 van 7

De voorbehandeling vindt plaats door personeel van de monsterkamer. Hierbij wordt het monster tot 1 mm gemalen.

### 6.4 Proefeenheid

Er wordt 5,0 gram diervoeder/meel in bewerking genomen.

### 6.5 Omschrijving procedure

#### 6.5.1 Extractie

Weeg 5,0 ( $\pm$  0,1) gram gemalen diervoeder/meel in duplo af in twee Greinerbuizen van 50 ml (5.3). Voeg voor de gespikete monsters een hoeveelheid van de standaardoplossing (4.2.6) toe volgens tabel 4 en incubeer gedurende 24 uur. Voeg vervolgens 200  $\mu$ l Int.Std.-oplossing (4.2.9) en 20,0 ml extractieoplossing (4.2.3) toe en schud gedurende minimaal twee uur en maximaal vier uur in het schudapparaat (5.4, 120-150 rpm). Centrifugeer gedurende 5 minuten bij 3000 rcf (5.5). Splits de bovenstaande vloeistof in twee delen en behandel ze volgens (A, onverdund) en (B, 4x verdund).

(A) Filtreer 1,0 ml mbv. een plastic 2 ml wegwerpspuit (5.8) voorzien van een 0,45  $\mu$ m filter (5.9) in een HPLC-vial (5.10). Sluit het vial met een crimp-cap (5.10).

(B) Pipetteer 1,0 ml bovenstaande vloeistof in een pyrex reageerbuis (5.7), voeg 3,0 ml water toe en vortex krachtig (5.6). Filtreer het 1,0 ml hiervan mbv. een plastic 2 ml wegwerpspuit (5.8) voorzien van een 0,45  $\mu$ m filter (5.9) in een HPLC-vial (5.10). Sluit het vial met een crimp-cap (5.10).

Bewaar de monsters bij bij +4°C in het donker gedurende maximaal twee weken.

Tabel 4. Spike-monsters

Monsteromschrijving	Toe te voegen hoeveelheid analyt
Monster zonder toevoeging	0 $\mu$ l
Monster met toevoeging op beslisgrens-nivo	250 $\mu$ l Standaardoplossing (4.2.6)

#### 6.5.2 LC-MS/MS

##### 6.5.2.1 LC condities

Analytische kolom: Waters Symmetry (150x3 mm), 5  $\mu$ m (WAT054200) voorzien van Waters X-Terra guard column (10x2,1 mm), 5  $\mu$ m (186000648).

Kolomtemperatuur: 35 °C

Injectievolume: 10-20  $\mu$ l

Eluens: volgens de in tabel 5 vermelde gradiënt. Hierbij zijn de overgangen lineair.

**CONCEPT**

KVM	RSV nr. : A0255
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : pagina : 8 van 7

Tabel 5. HPLC-gradient

Time	Flow (ml.min <sup>-1</sup> )	%A	%B
0,00	0,30	95	5
2,00	0,30	95	5
20,00	0,30	0	100
22,50	0,30	0	100
23,00	0,30	95	5
30,00	0,30	95	5

De kolomflow wordt ongesplitst in de MS gebracht.

**6.5.2.2 MS/MS condities**

De algemene MS/MS instellingen worden in tabel 6 vermeld.

Tabel 6. Algemene MS/MS instellingen

	ESI +
Capillary voltage	3,00 kV
Cone voltage:	Component afhankelijk
Source temperatuur	120 °C
Desolvation temperatuur	300 °C
Cone gas	100 – 140 l/uur
Desolvation gas	500 – 550 l/uur
LM + HM 1 Resolution	15,0 V
Ion energy 1	1,0 V
LM + HM 2 Resolution	13,0 V
Ion energy 2	1,0 V
Multiplier	750 V

De analyt afhankelijke MS/MS parameters worden in tabel 7 vermeld. Per analyt wordt één kwantificerende MSMS-overgang aangegeven en één bevestigende MSMS-overgang. Indien de bevestigende overgang verstoord is, wordt een tweede bevestigende overgang gegeven. Het interchannel delay is 0,03 s. en het interscan delay is 0,01 s.

**CONCEPT**

KVM	RSV nr. : A0255
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : pagina : 9 van 7

**Tabel 7. Analyt afhankelijke MS/MS parameters**

Component	Overgang (m/z) voor kwantificering	Overgang (m/z) voor bevestiging	Functie	Extract	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Caffeïne 3C <sup>13</sup>	198,0>140,0	198,0>112,1	A1/B1	A/B	0,05	20	20
		198,0>182,2			0,05	20	20
					0,05	20	20
Aflatoxin B1	313,1>269,2	313,1>285,0	A3	A	0,03	30	30
		313,1>241,0			0,03	30	30
					0,03	30	35
Aflatoxin B2	314,9>287,0	314,9>258,8	A3	A	0,03	30	28
		314,9>314,8			0,03	30	30
					0,03	30	2
Aflatoxin G1	329,0>242,9	329,0>311,0	A3	A	0,03	40	25
		329,0>283,0			0,03	40	25
					0,03	40	25
Aflatoxin G2	331,0>245,0	331,0>313,0	A3	A	0,03	60	30
		331,0>257,0			0,03	60	30
					0,03	60	30
Sterigmatocystin	325,1>281,0	325,1>310,0	A5	A	0,03	10	30
		325,1>325,0			0,03	10	30
					0,03	10	2
Fumonisin B1	722,2>352,2	722,2>370,1	A2	A	0,05	50	38
		722,2>334,3			0,05	50	38
					0,05	50	38
Fumonisin B2	706,2>336,2	706,2>318,2	B2	B	0,05	50	38
		706,2>512,2			0,05	50	40
					0,05	50	30
T2-toxin	467,2>245,1	467,2>305,2	B4	B	0,05	25	8
		467,2>215,2			0,05	25	8
					0,05	25	8
HT2-toxin	425,2>245,0	425,2>215,1	B3	B	0,05	20	15
		425,2>263,1			0,05	20	15
					0,05	20	15
Deoxynivalenol	297,0>249,1	297,0>218,9	B1	B	0,05	20	15
		297,0>203,2			0,05	20	15
					0,05	20	15



**CONCEPT**

KVM	RSV nr. : A0255
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : pagina : 10 van 7

Component	Overgang (m/z) voor kwantificering	Overgang (m/z) voor bevestiging	Functie	Extract	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
3-Acetyl-deoxynivalenol	339,2>231,1		B2	B	0,05	30	15
		339,2>203,1			0,05	30	15
		339,2>189,2			0,05	30	30
Diacetoxyscirpenol	367,1>349,0		B3	B	0,05	10	10
		367,1>307,1			0,05	10	12
		367,1>247,2			0,05	10	15
$\alpha$ -Zearalenol	321,1>303,0		A4	A	0,05	15	10
		321,1>285,1			0,05	15	12
		321,1>267,1			0,05	15	10
$\beta$ -Zearalenol	321,1>303,0		A4	A	0,05	15	10
		321,1>285,1			0,05	15	12
		321,1>267,1			0,05	15	10
Zearalenon	319,1>283,1		A5	A	0,03	20	12
		319,1>301,2			0,03	20	12
		319,1>187,0			0,03	20	20
Ochratoxin A	404,1>238,8		A5	A	0,03	35	25
		404,1>221,0			0,03	35	35
		404,1>193,0			0,03	35	38

De meting is verdeeld over twee injecties: éénmaal in het onverdunde extract en éénmaal in het vier maal verdunde extract. Hierbij is injectie A verdeeld in vijf functies en injectie B in vier functies (zie tabel 8). De hierbij aangegeven tijden zijn richttijden en dienen aangepast te worden als de chromatografie verandert.

Tabel 8. MSMS-Functiebeschrijving

Functie	A (minuten)	B (minuten)
Solvent Delay 1	0,0 – 7,0	0,0 – 5,0
1	7,0 – 10,0	5,0 – 10,0
2	10,0 – 12,8	10,0 – 13,8
3	12,8 – 15,3	13,8 – 16,5
4	15,3 – 17,6	16,5 – 20,0
5	17,6 – 20,0	-
Solvent Delay 2	20,0 – 30,0	20,0 – 30,0

Deze grenzen liggen scherp waardoor de afwijkingen van de diverse componenten niet meer dan 0,1 minuut mag bedragen. Bij grotere afwijkingen dienen de tijden van de functies zodanig aangepast te worden dat de

## CONCEPT

KVM	RSV nr.	:	A0255
paraaf	editie nr.	:	1
	datum uitgifte	:	
	pagina	:	11 van 7

componenten weer binnen de functies vallen.

Deze parameters zijn geoptimaliseerd voor de Micromass Quattro-Ultima LC-MSMS no 1. De Micromass Quattro-Ultima LC-MSMS no 2 kan eventueel ook gebruikt worden maar zowel de LC als de MSMS-parameters moeten opnieuw geoptimaliseerd worden. In het algemeen zal de LOD 2-5 x slechter zijn als op de Micromass Quattro-Ultima LC-MSMS no 1.

Op een Micromass Quattro Micro wordt de detectiegrens niet altijd gehaald en dus kan op deze machines niet gemeten worden zonder een concentratiestap in de opwerking op te nemen (niet beschreven binnen dit RSV).

### 6.5.3 Monsterserie

Iedere monsterserie ziet er als volgt uit:

Allereerst worden ijkoplossing C (4.2.9, tabel 3) en een blanco oplosmiddel (water) geanalyseerd. Hieruit blijkt of de chromatografie nog aansluit bij MS/MS-functies van injectie A en B. Als dit niet correct is moeten de tijden van functies zodanig aangepast worden dat de analyten binnen de juiste functies vallen. Als de chromatografie correct is worden de ijkoplossingen A t/m E (4.2.9, tabel 3) geïnjecteerd, gevolgd door het blanco meel-extract, het blanco meel-extract met toevoeging op beslisgrens-nivo (6.5.1, tabel 4), een oplosmiddel (water), de CRM-extracten, een oplosmiddel (water), tien monsters, gevolgd door ijkoplossing C (4.2.9, tabel 3) en weer tien monsters met toevoeging op beslisgrens-nivo. De meetserie wordt afgesloten met een oplosmiddel (water), de ijkoplossingen A t/m E (4.2.9, tabel 3) en een oplosmiddel (water).

## 7 RESULTATEN

De beoordeling van de resultaten wordt gesplitst in twee delen: 7.1 t/m 7.3 hebben betrekking op het HPLC-MS/MS systeem en moeten positief doorlopen worden voordat de resultaten van de monsters (7.4) beoordeeld mogen worden. Indien niet wordt voldaan aan één van deze eisen, dan moet de verdere afhandeling van de serie met de leidinggevende worden besproken.

### 7.1 Beoordeling chromatografie

Aan de hand van ijkoplossing C (4.2.9, tabel 3) wordt de chromatografie beoordeeld. Alle analyten moeten binnen de functies meetbaar zijn. Zonodig moeten de grenzen van de functies aangepast worden en moet de chromatografie herhaald worden totdat alle analyten meetbaar zijn.

### 7.2 Beoordeling gevoeligheid van het systeem

## CONCEPT

KVM	RSV nr. :	A0255
paraaf	editie nr. :	1
	datum uitgifte :	
	pagina :	12 van 7

Aan de hand van ijkoplossing C (4.2.9, tabel 3) wordt de gevoeligheid van het systeem getest. Het systeem is bruikbaar indien voor alle overgangen een minimale signaal/ruis verhouding van 30 (Peak-to-peak) wordt waargenomen.

### 7.3 Carry-over

In het chromatogram van het oplosmiddel, geïnjecteerd na ijkoplossing C (4.2.9, tabel 3), mag geen signaal van welke analyt dan ook worden waargenomen. Als dit wél wordt waargenomen moet met de project en/of clusterleider overlegd worden voordat verder gegaan kan worden met de analyse.

### 7.4 Beoordeling kwalitatieve resultaten van monsters

De retentietijd van de analyt in het monster en de spike mag niet meer afwijken dan 2,5% ten opzichte van de retentietijd van de analyt in de standaard.

De maximale afwijking van de ratio tussen de oppervlakte van de kwantificerings-ionovergang én de oppervlakte van de bevestigings-ionovergang moet voldoen aan de waarden gesteld in tabel 9.

Tabel 9 Maximale oppervlakte ratio afwijking

Relatieve intensiteit (% van de hoogste ion-overgang)	Maximaal toegestane afwijking
>50%	± 20%
>20% - 50%	± 25%
>10% - 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

Bron: SANCO 1805/2000 Rev.7

### 7.5 Beoordeling kwantitatieve resultaten van monsters

Nader in te vullen mbv. gegevens verkregen vanuit de validatie.

## 8 REGISTRATIE

De afgewogen hoeveelheden en eventuele bijzonderheden worden in een labjournaal vastgelegd. De chromatogrammen worden als hard-copy in data-mappen vastgelegd. De ruwe data worden uitgewerkt mbv. QuanLynx, een door MicroMass geleverde berekeningsmodule als onderdeel van MassLynx, het LC-MS/MS

## CONCEPT

KVM	RSV nr.	:	A0255
paraaf	editie nr.	:	1
	datum uitgifte	:	
	pagina	:	13 van 7

---

besturingsprogramma. De ruwe data en de analyseresultaten worden voor lange termijn vastgelegd op CD-ROM en netwerkschijf.

### LITERATUUR

NEN 7777

RSV A0772

RSV A0906

SANCO 1805/2000 Rev.7

Performance Sheet (in te vullen na validatie)

PERFORMANCE PARAMETERS				
Omschrijving	eenheid	werkgebied	niveau 1	niveau 2
<b>JUISTHEID</b>				
Gehanteerd model voor bepaling juistheid <sup>c</sup>	( ( (	met behulp van (gecertificeerd) ref. mat. met behulp van ref. methode met behulp van spikes		
Het gehanteerde hoge resp. lage conc.niveau		NVT		
Niveau van de richtwaarde		10 ng/g	10 ng/g	10 ng/g
Berekende juistheid	J			
Berekende relatieve standaardafwijking van de juistheid	RSD <sub>j</sub>			
Berekende terugvinding	%			
Berekende systematische afwijking	%			
<b>PRECISIE</b>				
Standaardafwijking op geselecteerd niveau	S			
Herhaalbaarheid	R			
Binnen lab. reproduceerbaarheid	RL			
Reproduceerbaarheid	R			
<b>AANTOONBAARHEID</b>				
<b>BEPAALBAARHEID</b>				

<sup>c</sup> doorhalen wat **niet** van toepassing is

LINEARITEIT  
(ref. naar documentatie)

ROBUUSTHEID  
(ref. naar documentatie)

OVERIGE INFORMATIE (w.o. referentie naar nr. labjournaal)

Goedgekeurd door (naam)	Paraaf	Datum
W.A. Traag		2003-08-21