

DIN EN 16204

ICS 67.120.30

Lebensmittel –**Bestimmung der lipophilen Algentoxine (Okadasäuregruppen-Toxine, Yessotoxine, Azaspirosäuren, Pectenotoxine) in Schalentieren und Schalentiererzeugnissen mit LC-MS/MS;
Deutsche Fassung EN 16204:2012**

Foodstuffs –

Determination of lipophilic algal toxins (okadaic acid group toxins, yessotoxins, azaspiracids, pectenotoxins) in shellfish and shellfish products by LC-MS/MS;
German version EN 16204:2012

Produits alimentaires –

Dosage des toxines algales lipophiles (toxines du groupe acide okadaïque, yessotoxines, azaspiracides, pecténotoxines) dans les coquillages et les produits à base de coquillages par CL-SM/SM;
Version allemande EN 16204:2012

Gesamtumfang 38 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16204:2012) ist vom Technischen Komitee TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) nach eingehenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 5 „Biotoxine (Mycotoxine und Phycotoxine)“ erarbeitet worden.

Das zuständige deutsche Arbeitsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-03 AA „Biotoxine“ des Normenausschusses „Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte“ (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

Dieses Dokument beschreibt ein Multireferenzverfahren zum Nachweis und zur Bestimmung einer Reihe von lipophilen Toxinen. Diese Lipophilen Toxine sind fettlösliche Algentoxine, die von marinen Algen (Dinoflagellaten) produziert werden. Dazu gehören Dinophysistoxine (DSP-Toxine: DTX1 und 2 sowie Okadasäure (OA) und deren Ester), Azaspirosäuren, Pectenotoxine und Yessotoxine. Sie werden von Muscheln aufgenommen und können beim Menschen nach Verzehr dieser Muscheln zu verschiedenen gesundheitlichen Problemen führen.

Das Verfahren wurde in einem aus drei Teilen bestehenden Ringversuch durch die Untersuchung sowohl natürlich kontaminierter Homogenate als auch aufgestockter Extrakte validiert. Die Nachweisgrenze (LOD) wurde für DSP-Toxine, Azaspirosäuren und Pectenotoxine mit 6 µg/kg Schalentierfleisch und für Yessotoxine mit 10 µg/kg Schalentierfleisch bestimmt.

Bis zum Erscheinen der Verordnung (EU) Nr. 15/2011 hinsichtlich *anerkannter Testmethoden zum Nachweis mariner Biotoxine in lebenden Muscheln* war es durch die Europäische Gesetzgebung vorgegeben, diese Toxine mit einem Maus-Bioassay nachzuweisen. Mit dieser Norm ist es nun möglich, diese Toxine durch ein chemisch-analytisches Verfahren nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen, was den Tierversuch überflüssig macht und den Verbraucherschutz erhöht. Zudem erlaubt die im Vergleich zum Maus-Bioassay geringere Nachweisgrenze ein früheres Erkennen einer Toxinbelastung in Muschelfanggewässern.

Alle in den Beispielen verwendeten Begriffe der Einstellungen am LC-MS/MS-Gerät sind herstellerspezifisch und werden in der englischen Sprache, die in der üblichen Gerätebeschreibung benutzt wird, wiedergegeben.

Deutsche Fassung

Lebensmittel - Bestimmung der lipophilen Algentoxine
(Okadasäuregruppen-Toxine, Yessotoxine, Azaspirosäuren,
Pectenotoxine) in Schalentieren und Schalentiererzeugnissen
mit LC-MS/MS

Foodstuffs - Determination of lipophilic algal toxins (okadaic acid group toxins, yessotoxins, azaspiracids, pectenotoxins) in shellfish and shellfish products by LC-MS/MS

Produits alimentaires - Dosage des toxines algales lipophiles (toxines du groupe acide okadaïque, yessotoxines, azaspiracides, pecténotoxines) dans les coquillages et les produits à base de coquillages par CL-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 20. April 2012 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

Seite

Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen.....	5
3 Kurzbeschreibung	5
4 Chemikalien.....	5
5 Geräte und Hilfsmittel	7
6 Durchführung.....	8
6.1 Vorbereitung der Proben	8
6.2 Homogenisierung und Extraktion	8
6.3 Hydrolyse.....	8
7 HPLC-MS/MS-Analyse	9
7.1 Allgemeines.....	9
7.2 HPLC-Betriebsbedingungen 1 (Chromatographie unter sauren Bedingungen)	9
7.3 HPLC-Betriebsbedingungen 2 (Chromatographie unter basischen Bedingungen)	10
7.4 Massenspektrometrische Betriebsbedingungen	10
7.5 Kalibrierkurve.....	10
7.6 Bestimmung der Algentoxine in den Prüflösungen der Probe.....	11
7.7 Qualitätskontrollmessungen für die Sequenzen	11
8 Berechnung	12
8.1 Peakidentifizierung.....	12
8.2 Quantitative Bestimmung mit externer Kalibrierung und Matrixkorrektur	12
8.3 Beschreibung der Matrixkorrektur.....	13
8.4 Berechnung der Gesamt-Toxizität	14
9 Präzision	14
10 Untersuchungsbericht	14
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	15
Anhang B (informativ) Beispiele für geeignete MS-Nachweisbedingungen	29
Anhang C (informativ) Typisches Chromatogramm	35
Literaturhinweise	36

Vorwort

Dieses Dokument (EN 16204:2012) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis November 2012, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2012 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

Lipophile marine Biotoxine sind die am häufigsten vorkommenden Algentoxine in Europa. Sie werden durch einige marine Dinoflagellaten gebildet und können sich in Schalentieren, die sich über die Filtration von Meerwasser ernähren, bis zu hochtoxischen Gehalten anreichern und nach Verzehr verschiedene Krankheiten im Menschen hervorrufen wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall.

Die Verordnung (EU) Nr. 15/2011 der Kommission legt die LC-MS/MS als Referenzmethode fest und bezieht sich auf ein durch das EU-RL-Netzwerk validiertes Verfahren. Das in dieser FprEN 16204 festgelegte Verfahren wird als Alternative zu dem vom EU-RL validierten Verfahren vorgeschlagen.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Multireferenzverfahren zum Nachweis und zur Bestimmung lipophiler Algentoxine (fettlösliche Algentoxine, die von einigen Dinoflagellaten produziert werden) in rohen Schalentieren und Schalentiererzeugnissen und gekochten Muscheln mit Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie LC-MS/MS [1], [2], [3] fest. Dieses Verfahren wurde in einem aus drei Teilen bestehenden Ringversuch durch die Untersuchung sowohl natürlich kontaminierter Miesmuschelhomogenate als auch aufgestockter Extrakte von Miesmuscheln, Austern und Venusmuscheln validiert. Hinsichtlich weiterer Informationen siehe Anhang A. In anderen Studien wurden auch weitere Matrices untersucht [4], [5].

Die Nachweisgrenze (LOD) wurde für die Toxine der Okadasäuregruppe, Azaspirosäuren und Pectenotoxine mit 6 µg/kg Schalentierfleisch und für Yessotoxine mit 10 µg/kg Schalentierfleisch bestimmt.

Die quantitative Bestimmung von Okadasäure (OA), Pectenotoxin-2 (PTX-2), Azaspirosäure-1 (AZA-1) und Yessotoxin (YTX) kann aufgrund kommerziell erhältlicher Standardsubstanzen direkt durchgeführt werden. Unter der Annahme eines gleichen Responsefaktors wird Okadasäure für die indirekte quantitative Bestimmung der beiden Dinophysistoxine Dinophysistoxin-1 (DTX-1), Dinophysistoxin-2 (DTX-2) verwendet; ebenso wird Azaspirosäure-1 (AZA-1) für die indirekte quantitative Bestimmung von Azaspirosäure-2 (AZA-2) und Azaspirosäure-3 (AZA-3) verwendet, während YTX für Homo-Yessotoxin (Homo-YTX) und 45-OH-Yessotoxin und 45-OH-homo-Yessotoxin verwendet wird, und PTX-2 für Pectenotoxin-1 (PTX-1).

Als Bestimmungsgrenze (LOQ) ergab sich für die Toxine der Okadasäuregruppe, Azaspirosäuren und Pectenotoxine ein Wert von 20 µg/kg Schalentierfleisch und für Yessotoxine ein Wert von 35 µg/kg Schalentierfleisch.

Mit Hilfe eines Hydrolyseschrittes [6] können auch die Ester von Okadasäure, DTX-1 und DTX-2 als freie Säuren quantitativ gemessen werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 3696:1995, *Wasser für analytische Zwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696: 1987)*

3 Kurzbeschreibung

Das gesamte Schalentierfleisch wird aus der Schale ausgelöst und homogenisiert. Die Extraktion erfolgt mit wässrigem Methanol ($\varphi = 80\%$). Zur Trennung wird eine HPLC-Säule mit einer Umkehrphase und einem binären Gradienten verwendet; die Detektion erfolgt durch Tandem-Massenspektrometrie mit Triple-Quadrupol-Technik. Die Konzentration der lipophilen Toxine wird mit externer Kalibrierung bestimmt.

4 Chemikalien

Soweit nicht anders festgelegt, sind analysenreine Chemikalien und für die LC-MS/MS geeignete Lösemittel zu verwenden. Das verwendete Wasser muss in Glasgefäßen destilliert oder entmineralisiert werden oder von entsprechender Reinheit nach EN ISO 3696:1995 sein.

Die in diesem Verfahren vorgesehenen Arbeiten mit gesundheitsschädlichen Chemikalien müssen unter geeigneten Vorsichts- und Schutzmaßnahmen, wie Vermeidung des Hautkontaktes und Benutzung des Abzuges, durchgeführt werden.

4.1 Wässriges Methanol ($\varphi = 80\%$)

ANMERKUNG Das Verfahren wurde unter Verwendung von 80%igem Methanol validiert. Es wurde jedoch gezeigt, dass gleichwertige Ergebnisse auch mit 100 %igem Methanol erhalten werden können [4], [5].

4.2 Acetonitril

4.3 Natriumhydroxid, $c(\text{NaOH}) = 2,5 \text{ mol/l}$

4.4 Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 2,5 \text{ mol/l}$

4.5 Ameisensäure, 98% bis 100% w/w

4.6 Ammoniumformiat

4.7 Stickstoff, gasförmig, mind. Reinheit: 5,0

4.8 Ammoniumhydrogencarbonat

4.9 Mobile Phase 1 (Chromatographie unter sauren Bedingungen)

4.9.1 Eluent A1

126 mg Ammoniumformiat (4.6) (um eine 2 mmol/l Lösung zu erhalten) und 2 ml Ameisensäure (4.5) (um eine 50 mmol/l Lösung zu erhalten) werden in 50 ml Wasser gelöst und auf 1 000 ml mit Wasser aufgefüllt. Bei Bedarf wird der Eluent über einen 0,45-µm-Membranfilter filtriert.

4.9.2 Eluent B1

126 mg Ammoniumformiat (4.6) (um eine 2 mmol/l Lösung zu erhalten) und 2 ml Ameisensäure (4.5) (um eine 50 mmol/l Lösung zu erhalten) werden in 50 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 950 ml Acetonitril (4.2) wird der Eluent bei Bedarf über einen 0,45-µm-Membranfilter filtriert.

4.10 Mobile Phase 2 (Chromatographie unter basischen Bedingungen)

4.10.1 Eluent A2

395 mg Ammoniumhydrogencarbonat (4.8) (um eine 5 mmol/l Lösung zu erhalten) werden in 1 000 ml Wasser gelöst. Der Eluent wird bei Bedarf über einen 0,45-µm-Membranfilter filtriert.

4.10.2 Eluent B2

395 mg Ammoniumhydrogencarbonat (4.8) (um eine 5 mmol/l Lösung zu erhalten) werden in 50 ml Wasser gelöst. 950 ml Acetonitril (4.2) werden in 100 ml-Anteilen zugegeben. Nach jeder Zugabe wird kräftig geschüttelt. Der Eluent wird bei Bedarf über einen 0,45-µm-Membranfilter filtriert.

4.11 Toxinfreies Schalentierhomogenat

Zur Abschätzung und Bestimmung der Matrixeffekte werden Standardlösungen hergestellt. Das für diesen Zweck erforderliche Schalentierhomogenat wird aus Muscheln hergestellt, die nachweisbar frei von Toxinen sind.

4.12 Referenzsubstanzen¹⁾

ANMERKUNG Während der Validierung waren die folgenden Referenzsubstanzen erhältlich. Wenn mittlerweile andere zertifizierte Referenzsubstanzen erhältlich sein sollten, so wird die Verwendung auch dieser Substanzen empfohlen.

4.12.1 Okadasäure (OA)

4.12.2 Pectenotoxin-2 (PTX-2)

4.12.3 Azaspirosäure-1 (AZA-1)

4.12.4 Yessotoxin (YTX)

1) Referenzsubstanzen können z.B. vom National Research Council Canada (NRC), Institute for Marine Biosciences, Halifax, bezogen werden (<http://www.nrc-cnrc.gc.ca>). Das ist ein Beispiel für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN.

4.12.5 Multitoxin-Standardlösungen

Standard-Kalibrierlösungen (Multitoxinstandard) werden in wässrigem Methanol (4.1) hergestellt. Die folgenden Konzentrationsstufen werden empfohlen:

OA, AZA-1, PTX-2: 1,5 ng/ml; 2,5 ng/ml; 5,0 ng/ml; 10,0 ng/ml; 15,0 ng/ml und 25,0 ng/ml

YTX: 3,0 ng/ml; 5,0 ng/ml; 10,0 ng/ml; 20,0 ng/ml; 30,0 ng/ml und 50,0 ng/ml

4.12.6 Multitoxin-Matrixstandardlösungen

Für die Abschätzung oder Bestimmung der Matrixeffekte wird eine Standardkonzentrationsstufe durch Verdünnung in einem toxfreien methanolischen Schalentierextrakt (6.2) hergestellt. Die folgenden Konzentrationsstufen werden empfohlen:

OA, AZA-1, PTX-2: 15,0 ng/ml

YTX: 30,0 ng/ml

5 Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laborglasgeräte und -ausrüstung und insbesondere Folgendes:

5.1 Mechanisches hochtouriges Zerkleinerungsgerät oder Homogenisator, (z. B. Grindomix, Ultra-Turrax). ²⁾

5.2 Zentrifuge (einstellbar auf mindestens $2\,000 \times g$) mit **Zentrifugengläsern** (Nennvolumen 20 ml)

5.3 Vibrationsschüttelgerät (z. B. Vortex)

5.4 Heizblock

5.5 Analysenwaage, auf 0,1 mg genau

5.6 Messkolben, 20 ml oder 10 ml

5.7 Messzylinder und geeignete Pipetten

5.8 Hochleistungsflüssigchromatograph (HPLC-System), geeignet zur Gradientenelution

5.9 HPLC-Probengefäße (Fläschchen)

5.10 Triple-Quadrupol-LC-MS/MS-Gerät

5.11 Analytische Umkehrphasen-Trennsäule, z. B. RP C18, Partikelgröße 3 μm , 150 mm (Länge) $\times$ 2 mm (Durchmesser) oder C8, 50 mm (Länge) $\times$ 2 mm (Durchmesser), 3 μm Partikelgröße, (nur für saure Bedingungen).

Wahlweise kann eine geeignete Vorsäule verwendet werden.

5.12 Spritzenfilter oder Membranfilter (z. B. regenerierte Zellulose-Membranen mit einem Porendurchmesser von 0,45 μm)

5.13 Spritzen für Filtersystem, z. B. 1 ml

5.14 Hochtourige Tischzentrifuge (bis zu $10\,000 \times g$)

2) Ultra-Turrax ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt verschiedener Hersteller. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN.

6 Durchführung

6.1 Vorbereitung der Proben

6.1.1 Allgemeines

Die Lagerung der Schalentierproben in gefrorenem Zustand (-18 °C) bis zu einem Jahr zeigt keinen negativen Einfluss [7] auf die mit dem beschriebenen Verfahren erhaltenen Ergebnisse.

6.1.2 Rohe Proben

Rohe Proben sollten nach dem Eingang von den Schalen befreit, abgetropft und bis zur Untersuchung eingefroren oder umgehend extrahiert werden.

6.1.3 Gekochte Proben

Die Probe wird nach Erhalt gekocht oder mit Dampf behandelt, abgetropft und von Schalen befreit. Wenn sie nicht unmittelbar untersucht wird, kann sie auch bis zu 24 h gekühlt werden.

Zum Kochen der Schalentiere wird eine ausreichende Menge Wasser (etwa 2 l bis 3 l Wasser je 1 kg Schalentiere) zum Sieden erhitzt. Sobald das Wasser siedet, werden die Schalentiere in das siedende Wasser gegeben und unter weiterer Wärmezufuhr etwa 3 min gekocht. Nach dem Kochen wird das Schalentierfleisch aus den geöffneten Schalen entnommen und homogenisiert.

6.2 Homogenisierung und Extraktion

Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, werden zur Bestimmung der lipophilen Algentoxine 100 g bis 200 g Schalentierfleisch oder 50 bis 100 ganze Schalentiere homogenisiert. Stehen nur geringere Mengen zur Verfügung, wird die gesamte Probenmenge aufgearbeitet.

Das Schalentierfleisch wird mit einem mechanischen Zerkleinerungsgerät (5.1) homogenisiert und sofort aufgearbeitet oder bei -18 °C gelagert.

2,00 g $\pm$ 0,02 g Homogenat werden in ein Zentrifugenglas (5.2) eingewogen und mit 9 ml wässrigem Methanol (4.1) versetzt. Der Inhalt des Zentrifugenglases wird 1 min mit einem Zerkleinerungsgerät (5.1) bei $13\,500\text{ min}^{-1}$ durchmischt. Das Gemisch wird anschließend 5 min bei etwa $2\,000 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert (5.2). Der Überstand wird in einen 20-ml-Messkolben dekantiert. Die Extraktion wird wiederholt. Der zweite Überstand wird ebenso in den 20-ml-Messkolben dekantiert und dieser wird bis zur Marke mit wässrigem Methanol (4.1) aufgefüllt. Anschließend wird der Extrakt über einen $0,45\text{-}\mu\text{m}$ -Membranfilter (5.12) filtriert. Alternativ zur Filtration können die Proben in einer hochtourigen Tischzentrifuge (5.14) mit $10\,000 \times g$ zentrifugiert werden.

Steht nur eine geringe Probenmenge zur Verfügung, kann auch 1,00 g $\pm$ 0,01 g Homogenat mit $2 \times 4,5\text{ ml}$ Methanol (4.1) extrahiert und bis zur Marke auf 10 ml aufgefüllt werden.

6.3 Hydrolyse

Der Hydrolyseschritt ist für die Bestimmung der Toxine der Okadasäurengruppe erforderlich, sofern sie als Ester gebunden sind. Bei diesem Schritt wird die Summe der freien und gebundenen Toxine der Okadasäurengruppe bestimmt. Die gebundenen Toxine werden aus der Differenzberechnung der Summe (nach der Hydrolyse) und der freien Toxine (ohne Hydrolyse) bestimmt.

1,0 ml des methanolischen Extrakts (6.2) wird in ein Fläschchen (5.9) pipettiert, 125 μl Natronlauge (4.3) werden hinzugegeben und der Extrakt wird 40 min in einem Heizblock (5.4) bei $76\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur werden 125 μl Salzsäure (4.4) zum Neutralisieren hinzugefügt und 30 s geschüttelt (5.3). Anschließend werden die Proben über einen Membranfilter (5.12) filtriert.

Es können auch andere Mengen zur Hydrolyse eingesetzt werden. Es ist darauf zu achten, dass folgende Verhältnisse sichergestellt werden:

- Unbearbeiteter/roher Extrakt / NaOH (2,5 mol/l) / HCl (2,5 mol/l) entspricht 1 / 0,125 / 0,125

Die Fläschchen müssen während der Hydrolyse gut verschlossen sein (der Siedepunkt von Methanol ist 65 °C). Durch Wägen der Fläschchen vor und nach dem Erhitzen kann geprüft werden, ob Lösemittel während der Hydrolyse verdampft ist.

7 HPLC-MS/MS-Analyse

7.1 Allgemeines

Die angegebenen Messbedingungen sind Richtwerte; sie können den betreffenden örtlichen Bedingungen angepasst werden. Triple Quadrupol Tandem Massenspektrometrie sollte verwendet werden. Analyten, die nicht massenspektrometrisch voneinander unterschieden werden können, (z. B. OA und DTX-2) müssen eine Basislinienauftrennung im Chromatogramm aufweisen.

Vor Beginn der Messung sollte das HPLC-System ausreichend gespült werden (Verwenden der Startbedingungen). Weiterhin wird empfohlen, vor dem Beginn der Sequenz einen Testlauf mit mindestens einer Probe durchzuführen.

7.2 HPLC-Betriebsbedingungen 1 (Chromatographie unter sauren Bedingungen)

Die chromatographischen Bedingungen können frei gewählt werden. Die akzeptable Mindestretentionszeit (für den zu untersuchenden Analyten) beträgt das Doppelte der Retentionszeit für das Totvolumen der Säule.

BEISPIEL 1 Bei Anwendung der in 5.11 festgelegten C18-Säule und der mobilen Phasen A1 (4.9.1) und B1 (4.9.2) haben sich die Einstellungen in Tabelle 1 als geeignet erwiesen:

Tabelle 1 HPLC-Betriebsbedingungen 1

Zeit min	Durchfluss ml/min	Mobile Phase A1 %	Mobile Phase B1 %
0	0,2	60	40
6,0	0,2	10	90
14,5	0,2	10	90
15,5	0,2	60	40
21,0	0,2	60	40

- Durchfluss der mobilen Phase (Säule): 0,2 ml/min
- Injektionsvolumen: 5 µl bis 10 µl
- Säulenofentemperatur (einschließlich der Vorsäule): 40 °C

BEISPIEL 2 Bei Anwendung der in 5.11 festgelegten C8-Säule und der mobilen Phasen A1 (4.9.1) und B1 (4.9.2) haben sich die Einstellungen in Tabelle 2 als geeignet erwiesen:

Tabelle 2 HPLC-Betriebsbedingungen 2

Zeit min	Durchfluss ml/min	Mobile Phase A1 %	Mobile Phase B1 %
0	0,2	70	30
8,0	0,2	10	90
11,0	0,2	10	90
11,5	0,2	70	30
16,0	0,2	70	30

- Durchfluss der mobilen Phase (Säule): 0,2 ml/min
- Injektionsvolumen: 5 µl bis 10 µl
- Säulenofentemperatur (einschließlich der Vorsäule): 40 °C

7.3 HPLC-Betriebsbedingungen 2 (Chromatographie unter basischen Bedingungen)

Bei Anwendung der in 5.11 festgelegten Säule und der mobilen Phasen A2 (4.10.1) und B2 (4.10.2) haben sich die folgenden Einstellungen als geeignet erwiesen, siehe auch Bild C.1:

Tabelle 3 HPLC-Betriebsbedingungen 3

Zeit min	Durchfluss ml/min	Mobile Phase A2 %	Mobile Phase B2 %
0	0,2	80	20
15,0	0,2	10	90
20,0	0,2	10	90
21,0	0,2	80	20
26,0	0,2	80	20

- Durchfluss der mobilen Phase (Säule): 0,2 ml/min
- Injektionsvolumen: 5 µl bis 10 µl
- Säulenofentemperatur (einschließlich der Vorsäule): 40 °C

7.4 Massenspektrometrische Betriebsbedingungen

Die Messung kann mit verschiedenen Messgeräten und gerätespezifischen Parametern erfolgen. Einige gerätespezifische Parameter sind in Anhang B aufgelistet. Diese Bedingungen haben gezeigt, dass sie zufriedenstellende Ergebnisse liefern.

7.5 Kalibrierkurve

Eine Kalibrierkurve wird erstellt, die mindestens 6 Konzentrationsstufen enthält (ohne den Nullpunkt) und den Konzentrationsbereich von beispielsweise 1,5 ng/ml bis 25 ng/ml (oder 3,0 ng/ml bis 50 ng/ml für YTX) umfasst. Ist ein größerer Konzentrationsbereich erforderlich, kann die Kalibriergerade in kleinere Bereiche unterteilt werden oder eine gewichtete Kalibrierung vorgenommen werden.

Der kleinste Wert der Kalibrierkurve sollte in der Nähe oder gleich der LOQ liegen.