

DIN EN 16274

ICS 71.100.60

Ersatz für
DIN EN 16274:2012-12

**Analyseverfahren für Allergene –
Quantifizierung einer erweiterten Liste von 57 zu vermutenden Allergenen
in einspritzfertigen Duftstoffen mittels
Gaschromatographie/Massenspektrometrie;
Deutsche Fassung EN 16274:2021**

Method for analysis of allergens –

Quantification of an extended list of 57 suspected allergens in ready to inject fragrance
materials by gas chromatography mass spectrometry;
German version EN 16274:2021

Méthode d'analyse des allergènes –

Quantification de la liste étendue des 57 allergènes suspectés dans les matières premières de
parfumerie et les compositions parfumantes prêtes à être injectées, par chromatographie en
phase gazeuse/spectrométrie de masse;
Version allemande EN 16274:2021

Gesamtumfang 68 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16274:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 347 „Analyseverfahren für Allergene“ erarbeitet, dessen Sekretariat von SNV (Schweiz) gehalten wird.

Das zuständige deutsche/nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-07-01 AA „Kosmetische Mittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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

Dieses Dokument enthält in Gleichung (A.8), in Tabelle D.1 bis Tabelle D.4 und Tabelle J.1 sieben Nationale Fußnoten zu Fehlern in der englischen Referenzfassung.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 16274:2012-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Anzahl der Allergene wurde von 26 auf 57 chemisch definierte Moleküle erhöht;
- b) Lösemittel: geht von Methylpivalat und ortho-Fluorotoluol und Aceton zu Methylpivalat und MTBE und anderen Lösemitteln über, sofern diese vor ihrer Verwendung getestet werden;
- c) Probenvorbereitung: ermöglicht die Verwendung des Masse/Volumen-Ansatzes anstelle des reinen Masse/Masse-Ansatzes;
- d) Datenverarbeitung: bietet Erklärungen für eine Kalibrierkurve unter Verwendung eines erzwungenen Durch-Null-Ansatzes;
- e) redaktionelle Überarbeitung.

Frühere Ausgaben

DIN EN 16274: 2012-12

Deutsche Fassung

**Analyseverfahren für Allergene —
Quantifizierung einer erweiterten Liste von 57 zu
vermutenden Allergenen in einspritzfertigen Duftstoffen
mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie**

Method for analysis of allergens —
Quantification of an extended list of 57 suspected
allergens in ready to inject fragrance materials by gas
chromatography mass spectrometry

Méthode d'analyse des allergènes —
Quantification de la liste étendue des 57 allergènes
suspectés dans les matières premières de parfumerie et
les compositions parfumantes prêtes à être injectées,
par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie
de masse

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 8. Februar 2021 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 CEN-CENELEC-Management-Zentrum 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, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, 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

CEN-CENELEC

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	7
5.1 Lösemittel	7
5.1.1 Methylpivalat	7
5.1.2 tert-Butylmethylether (MTBE)	7
5.2 Referenzproben (zu vermutende Allergene)	7
5.2.1 Allgemeines	7
5.3 Interne Standards (ISTD)	11
5.3.1 1,4-Dibrombenzen (IS _A), CAS-Nr. [106-37-6], Reinheit $\geq 98\%$	11
5.3.2 4,4'-Dibrombiphenyl (IS _B), CAS-Nr. [92-86-4], Reinheit $\geq 98\%$	11
6 Geräte	11
6.1 Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID)	11
6.2 Gaschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer (GC-MS)	11
6.2.1 Allgemeines	11
6.2.2 GC-MS-System	11
6.3 Kapillarsäulen für GC	12
6.4 Analysenwaage	12
7 Stamm- und Probenlösungen - Herstellung und Lagerung	13
7.1 Allgemeine Informationen	13
7.1.1 Wahl des Lösemittels	13
7.1.2 Sonstiges	13
7.2 Herstellung von Stammlösungen aus Referenzproben	13
7.3 Herstellung von Lösungen des internen Standards und Kalibrierlösungen	13
7.3.1 Allgemeines	13
7.3.2 Stammlösungen von internen Standards (entspricht 1 g/kg)	14
7.3.3 Konzentrationen von Kalibrierlösungen	14
7.3.4 Herstellung von Kalibrierlösungen	15
8 Bedingungen für die Erfassung mit Massenspektrometern	17
8.1 Festlegung von Retentionszeiten und SIM-Chromatograph-Fenstern	17
8.2 SIM-Fenster — Einstellung und Kriterien	17
8.3 GC-MS-Scanmodus Überprüfung	18
9 Probenanalyse	18
9.1 Allgemeines	18
9.2 Herstellung der Probe für die Analyse	18
9.3 Ablauf	18
9.3.1 Blindwertprobe	18
9.3.2 Kalibrierlösungen	19
9.3.3 Kontrolllösung	19

9.3.4	Proben	19
10	Datenvalidierung und -bearbeitung.....	20
10.1	Allgemeines	20
10.2	Untersuchung von Q-Werten.....	20
10.3	Relative Intensität charakteristischer Ionen in SIM.....	21
10.4	Relative Ionenintensität bei Anwendung von Scandaten.....	21
10.5	Schema zur Überprüfung der Daten und Angabe der Endkonzentration.....	21
10.6	GC-MS-Scanmodus Überprüfung.....	21
10.7	Auswertung des Massenspektrums im SCAN-Modus	22
11	Prüfbericht.....	22
Anhang A (informativ) Bestimmung der Reinheit von Kalibriermitteln und Referenzproben		23
A.1	Allgemeine Informationen.....	23
A.2	Vollständige Charakterisierung der flüchtigen Bestandteile	25
A.2.1	Identifizierung der einzelnen Bestandteile der Referenzproben mittels GC-MS	25
A.2.2	Berechnung des vorhergesagten RRF (RRFpred).....	25
A.2.3	Berechnung der Menge an flüchtigen Bestandteilen in den einzelnen Referenzproben.....	26
A.3	Bestimmung der Reinheit (%) aus RRF oder FID-Fläche in %	27
Anhang B (informativ) GC-Kapillarsäulenparameter		30
Anhang C (informativ) SIM-Ionen für SIM- oder SIM-SCAN-Anwendungen		31
Anhang D (informativ) Beispiel für SIM-Fenster		37
Anhang E (informativ) Beispiel für Chromatogramme		45
Anhang F (normativ) Entscheidungsbaum zur Quantifizierung von zu vermutenden Allergenen.....		47
Anhang G (informativ) Herstellung von Stammlösungen aus Referenzproben.....		48
G.1	Allgemeine Informationen.....	48
G.2	Reinheit der Referenzprobe.....	48
G.3	Stammlösungen.....	49
G.3.1	Getrennte Stammlösungen von Allergenen (10 g/kg).....	49
Anhang H (informativ) Kalibrierverfahren und Ansatz.....		53
H.1	Auftragen der Kalibrierkurve.....	53
H.1.1	Allgemeines	53
H.1.2	Asymmetrie des Peaks und Auswirkung auf die Kalibrierung.....	53
H.1.3	Auswahl des internen Standards.....	54
H.1.4	Auswahl des internen Standards.....	54
Anhang I (informativ) Quantifizierung der Allergene.....		55
I.1	Allgemeine Informationen.....	55
I.2	Bestimmung von C ₀	56
I.3	Beurteilung der analytischen Messung.....	57
I.4	Untersuchung von Q-Werten.....	57
Anhang J (informativ) Als Zielanalyten ausgewählte zu vermutende Allergene — Begründung.....		58
Anhang K (informativ) Andere allgemeine Informationen		65
Literaturhinweise.....		66

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 16274:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 347 „Analyseverfahren für Allergene“ erarbeitet, dessen Sekretariat von SNV gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis November 2021, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2021 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN 16274:2012.

Die wesentlichen technischen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- Die Anzahl der Allergene wurde von 26 auf 57 chemisch definierte Moleküle erhöht.
- Lösemittel: geht von Methylpivalat und ortho-Fluorotoluol und Aceton zu Methylpivalat und MTBE und anderen Lösemitteln über, sofern diese vor ihrer Verwendung getestet werden.
- Probenvorbereitung: ermöglicht die Verwendung des Masse/Volumen-Ansatzes anstelle des reinen Masse/Masse-Ansatzes.
- Datenverarbeitung: bietet Erklärungen für eine Kalibrierkurve unter Verwendung eines erzwungenen Durch-Null-Ansatzes.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Mandats erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

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

Einleitung

Richtlinie 2003/15/EG zur Änderung der Richtlinie 76/768/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über kosmetische Mittel regelt die Verpflichtung, Verbraucher über das Vorhandensein von 24 chemisch definierten Duftstoffen zu informieren, die als potenzielle Allergene in kosmetischen Mitteln identifiziert wurden. Nach der Veröffentlichung des Dokuments des Wissenschaftlichen Ausschusses „Verbrauchersicherheit“ (en: Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS/1459/11) wurde vorgeschlagen, dieses Dokument auf 57 Duftstoffe auszudehnen, von denen einige in mehreren isomeren Formen oder als Gemische vorliegen. Dies erforderte die Entwicklung eines neuen Quantifizierungsverfahrens als Reaktion auf die Entwicklung von behördlichen Anforderungen.

Das neue Untersuchungsverfahren wurde unter Anwendung der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) entwickelt, um die 57 Duftstoffe und ihre relevanten Isomere in einspritzfertigen Verbindungen von Duftstoffen und Rohstoffen von Duftstoffen nachzuweisen und zu quantifizieren.

Das Verfahren, das in diesem Dokument beschrieben wird, enthält keine Anforderungen an die Probenvorbereitung in Matrices, bei denen ein direktes Einspritzen in den GC nicht durchführbar ist.

Das vorliegende Dokument beschreibt ein funktionierendes Untersuchungsverfahren, das auf den Entwicklungen der IFRA Analytical Working Group basiert. Das Untersuchungsverfahren wurde auf der Grundlage eines Ringversuchs validiert, der von der CEN-Arbeitsgruppe unter Anwendung des Genauigkeitsprofilansatzes durchgeführt wurde.

1 Anwendungsbereich

Das vorliegende Verfahren ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung der als Allergene vermuteten flüchtigen Verbindungen, die in den in kosmetischen Mitteln verwendeten Verbindungen von Duftstoffen und Rohstoffen von Duftstoffen enthalten sind. Die Analyse wird mithilfe der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) an Matrixproben durchgeführt, die „einspritzfertig“ und mit der Gaschromatographie kompatibel sind.

Die von diesem Verfahren erfassten Analyten basieren auf den Inhalten der in der Stellungnahme des SCCS 1459/11 (1) enthaltenen Tabelle 13.1 und Tabelle 13.2 und den von der Europäischen Kommission vorgeschlagenen aufgeführten Rechtsvorschriften. Die Begründung für die endgültige Auswahl der während des Verfahrens angewendeten Analyten ist in der in Anhang J enthaltenen Tabelle aufgeführt.

Das Verfahren wurde auf IFRA- und CEN-Ebene validiert.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

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:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

4 Kurzbeschreibung

Dieses Verfahren umfasst einen Kalibrierbereich von 2 ppm bis 240 ppm; dies erlaubt die Quantifizierung von zu vermutenden Allergenen in verdünnten Matrices im Bereich von 20 ppm bis 2 400 ppm je Analyt. Über die obere Konzentrationsstufe hinaus besteht die Empfehlung, dass die Probe weiter verdünnt werden sollte oder dass GC-FID (GC mit Flammenionisationsdetektion) vorzugsweise in Kombination mit internem Standard und Responsefaktoren angewendet wird.

Die Matrixproben werden in insgesamt 4 Durchläufen mithilfe von GC-MS auf zu vermutende Allergene analysiert, wobei 2 Analytensätze verwendet werden, die beide auf zwei getrennte Säulen unterschiedlicher Polarität injiziert werden. Wenn erforderlich, sollten die Matrixproben zuerst in einem geeigneten Lösemittel verdünnt werden.

Ihre Identifizierung und Quantifizierung wird durch die Betriebsart Einzelionenregistrierung (SIM, en: selected ion monitoring; SIM-SCAN) über die relative Häufigkeit von 3 charakteristischen Fragment-Ionen erreicht. Die Berechnung und Verwendung des entsprechenden Q-Werts oder eines ähnlichen Datenauswertungsfaktors können angewendet werden und es wird ein „Entscheidungsbaum“ (siehe Anhang F, Bild F.1) für die Endprüfung und Validierung der Daten durch einen geschulten und erfahrenen Analytiker beschrieben. Es wird eine zusätzliche vollständige SCAN-Analyse empfohlen, um das Vorhandensein des Allergens in Matrixproben zu bestätigen, wenn nur das SIM-Verfahren angewendet wurde.

Ihre Quantifizierung erfolgt in allen Modi durch Kalibrierung unter Anwendung von Standardlösungen und der internen Standards 1,4-Dibrombenzol und 4,4'-Dibrombiphenyl. Der „Entscheidungsbaum“ wird zur

Bestimmung der Endkonzentration unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Konzentrationswerte angewendet, die bei der Analyse in beiden Säulen erhalten wurden.

5 Reagenzien

5.1 Lösemittel

5.1.1 Methylpivalat

CAS [598-98-1]

Reinheit $\geq 99\%$

Eine Destillation zur Erzielung einer Reinheit von $> 99,9\%$ ist empfehlenswert, um Verunreinigungen zu beseitigen, die wahrscheinlich das Signal von Analyten, z.B. Terpenen, beeinträchtigen. Wird eine handelsübliche Qualität verwendet, muss untersucht und bestätigt werden, dass diese keine Störsignale hervorruft.

5.1.2 tert-Butylmethylether (MTBE)

CAS [1634-04-4]

Reinheit $\geq 99\%$

Eine Destillation zur Erzielung einer Reinheit von $> 99,9\%$ ist empfehlenswert, um Verunreinigungen zu beseitigen, die wahrscheinlich das Signal von Analyten, z.B. Terpenen, beeinträchtigen. Wird eine handelsübliche Qualität verwendet, muss analysiert und bestätigt werden, dass diese keine Störsignale hervorruft.

Alternative Lösemittel sind verfügbar. Wenn diese für dieses Verfahren verwendet werden, dann muss der Bearbeiter eine ausreichende Bewertung vornehmen, um nachzuweisen, dass das Lösemittel keine Bestandteile enthält, die die Analyten bei diesem Verfahren beeinträchtigen würden.

5.2 Referenzproben (zu vermutende Allergene)

5.2.1 Allgemeines

Zu Beginn sollte die Reinheit aller Standards durch GC-FID (Anhang A) bestimmt werden, wenn dies nicht vom Lieferanten zertifiziert wurde. Die genaue CAS-Nummer des Zielanalyten und die Begründung dafür sind in Anhang J angegeben.

5.2.1.1 α -Acetylcedren (Hauptisomer in Vertofix®, angegeben in CAS-Nummer), CAS-Nr. [32388-55-9]

Hochvariable Zusammensetzung mit mindestens zwölf Bestandteilen mit einer Molekülmasse von 246 atomaren Masseneinheiten (nachfolgend als u bezeichnet).

5.2.1.2 Acetylisoegenol/Isoegenolacetat, CAS-Nr. [93-29-8]

5.2.1.3 Amylsalicylat, Pentylsalicylat CAS-Nr. [2050-08-0]

Dieses kann Isoamylsalicylat (CAS-Nr. [87-20-7]) enthalten, das nicht in dieser Untersuchung enthalten sein sollte.

5.2.1.4 α -Amylzimtaldehyd (Flosal®), CAS-Nr. [122-40-7, 78605-96-6]

Zwei mögliche Isomere (*E*, *Z*); nur das *E*-Isomer wird quantifiziert.

5.2.1.5 α -Amyl-Zimtalkohol, CAS-Nr. [101-85-9, 184900-07-0]

Zwei mögliche Isomere (*E*, *Z*); nur das *E*-Isomer wird quantifiziert.

5.2.1.6 Anethol, CAS-Nr. [104-46-1, 4180-23-8]

Zwei mögliche Isomere (*E*, *Z*); nur das *E*-Isomer wird quantifiziert.

5.2.1.7 Anisalkohol, CAS-Nr. [105-13-5]

5.2.1.8 Benzaldehyd, CAS-Nr. [100-52-7]

5.2.1.9 Benzylalkohol, CAS-Nr. [100-51-6]

5.2.1.10 Benzylbenzoat, CAS-Nr. [120-51-4]

5.2.1.11 Benzylcinnamat, CAS-Nr. [103-41-3]

Zwei mögliche Isomere (*E*, *Z*); nur das *E*-Isomer wird quantifiziert.

5.2.1.12 Benzylsalicylat, CAS-Nr. [118-58-1]

5.2.1.13 Campher, CAS-Nr. [76-22-2]

5.2.1.14 Carvon, CAS-Nr. [99-49-0]

5.2.1.15 β -Caryophyllen, CAS-Nr. [87-44-5]

5.2.1.16 Zimtaldehyd, CAS-Nr. [104-55-2, 14371-10-9]

Zwei mögliche Isomere (*E*, *Z*); nur das *E*-Isomer wird quantifiziert.

5.2.1.17 Zimtalkohol, CAS-Nr. [104-54-1, 4407-36-7]

Zwei mögliche Isomere (*E*, *Z*); nur das *E*-Isomer wird quantifiziert.

5.2.1.18 Citral, CAS-Nr. [5392-40-5]

5.2.1.18.1 Neral

5.2.1.18.2 Geranial

Sowohl Neral (*Z*-Isomer, CAS-Nr. [106-26-3]) als auch Geranial (*E*-Isomer, CAS-Nr. [141-27-5]) werden quantifiziert.

5.2.1.19 Citronellol, CAS-Nr. [106-22-9]

5.2.1.20 Cumarin, CAS-Nr. [91-64-5]

5.2.1.21 β -Damascenon (Rosenketon-4), CAS-Nr. [23696-85-7]

5.2.1.22 α -Damascenon, CAS-Nr. [43052-87-5], umfasst sowohl E- als auch Z-Isomere

Zwei mögliche Isomere (E, Z); nur das Hauptisomer E CAS-Nr. [24720-09-0] (92 % bis 99 %) wird quantifiziert.

5.2.1.23 β -Damascenon (E), CAS-Nr. [23726-91-2]

5.2.1.24 δ -Damascenon (Rosenketon-3), CAS-Nr. [57378-68-4]

3 mögliche Isomere (trans/trans, cis/trans, trans/cis); nur das Hauptisomer (trans/trans, bis zu 90 %) wird quantifiziert.

5.2.1.25 Dimethylbenzylcarbinylnacetat (DMBCA), CAS-Nr. [151-05-3]

5.2.1.26 Ebanol, CAS-Nr. [67801-20-1]

5.2.1.26.1 Ebanol Isomer 1

5.2.1.26.2 Ebanol Isomer 2

Die zwei Isomere (E, Z) werden quantifiziert.

5.2.1.27 Eugenol, CAS-Nr. [97-53-0]

5.2.1.28 Acetyleugenol, CAS-Nr. [93-28-7]

5.2.1.29 Farnesol, CAS-Nr. [4602-84-0]

Empfehlung: Zur Quantifizierung anderer Isomere wird die Kalibrierkurve des E,E-Isomers angewendet.

Vier mögliche Isomere: das (E,E)-Isomer ist (CAS-Nr. [106-28-5]) und das (Z,E)-Isomer ist (CAS-Nr. [3790-71-4]) und zwei zusätzliche Nebenisomere.

5.2.1.30 Galaxolid (Hexamethylindanopyran), CAS-Nr. [1222-05-5]

Es werden nur die zwei Hauptisomere quantifiziert.

5.2.1.31 Geraniol, CAS-Nr. [106-24-1]

5.2.1.32 Geranylacetat, CAS-Nr. [105-87-3]

5.2.1.33 Hexadecanolacton/Dihydroambrettolid, CAS-Nr. [109-29-5]

5.2.1.34 α -Hexylzimaldehyd, CAS-Nr. [101-86-0, 165184-98-5]

Mindestens zwei Isomere; nur das E-Isomer wird quantifiziert.

5.2.1.35 Hydroxycitronellal, CAS-Nr. [107-75-5]

5.2.1.36 Tetramethylacetyloctahydronaphthalen (ISO E® Super)

ANMERKUNG Dieses besteht aus mehreren Isomeren, einschließlich α (CAS-Nr. [68155-66-8]); dem Hauptisomer β (CAS-Nr. [54464-57-2]); γ (CAS-Nr. [68155-67-9]) und einem Nebenisomer (CAS-Nr. [54464-59-4]).

5.2.1.37 Isoeugenol, CAS-Nr. [97-54-1]

Zwei mögliche Isomere (E, Z), nur das E-Isoeugenol wird quantifiziert.

5.2.1.38 α -Isomethylionon, CAS-Nr. [127-51-5]

Kann β -Isomethylionon (CAS-Nr. [79-89-0]), α -Methylionon (CAS-Nr. [7779-30-8]), β -Methylionon (CAS-Nr. [127-43-5]), Pseudo-Isomethylionon (CAS-Nr. [1117-41-5]) enthalten.

Andere Qualitäten dürfen andere Isomere enthalten, einschließlich des Hauptisomers. Diese Bestandteile sollten nicht untersucht werden.

5.2.1.39 Butylphenyl Methylpropional (Lilial®), CAS-Nr. [80-54-6]

5.2.1.40 Limonen, CAS-Nr. [138-86-3]

5.2.1.41 Linalool, CAS-Nr. [78-70-6]

5.2.1.42 Linalylacetat, CAS-Nr. [115-95-7]

5.2.1.43 Hydroxyisohexyl-3-cyclohexencarboxaldehyd (Lyrall®), CAS-Nr. [31906-04-4]

Enthält Hydroxyisohexyl-4-cyclohexencarboxaldehyd (CAS-Nr. 51414-25-6) (bekannt als Lyrall-Nebenisomer), das quantifiziert werden muss.

5.2.1.44 Trimethylbenzolpropanol (Majantol®), CAS-Nr. [103694-68-4]

5.2.1.45 Menthol, CAS-Nr. [1490-04-6, 89-78-1]

5.2.1.46 Methylsalicylat, CAS-Nr. [119-36-8]

5.2.1.47 Methylheptincarbonat (Folione®), CAS-Nr. [111-12-6]

5.2.1.48 α -Pinen, CAS-Nr. [80-56-8]

5.2.1.49 β -Pinen, CAS-Nr. [127-91-3]

5.2.1.50 3-Propylidennaphthalid, CAS-Nr. [17369-59-4]

Die zwei Isomere (E,Z) (E-Isomer: CAS-Nr. [56014-72-3] und Z-Isomer: CAS-Nr. [94704-89-9]) werden quantifiziert.

5.2.1.51 Salicylaldehyd, CAS-Nr. [90-02-8]

5.2.1.52 Santalol, CAS-Nr. [11031-45-1]

ANMERKUNG Die zwei Isomere α -Santalol (CAS-Nr. [115-71-9]) und β -Santalol (CAS-Nr. [77-42-9]) werden quantifiziert.

5.2.1.53 Sclareol, CAS-Nr. [515-03-7]

5.2.1.54 α -Terpinen, CAS-Nr. [99-86-5]

5.2.1.55 α -Terpineol, CAS-Nr. [98-55-5]

5.2.1.55.1 für γ -Terpineol CAS-Nr. [586-81-2];

5.2.1.55.2 für *cis*- β -Terpineol CAS-Nr. [138-87-4];

5.2.1.55.3 für *trans*- β -Terpineol CAS-Nr. [7299-41-4];

Empfehlung: Zur Quantifizierung anderer Isomere wird die Kalibrierkurve von α -Terpineol angewendet.

5.2.1.56 Terpinolen, CAS-Nr. [586-62-9]

5.2.1.57 Vanillin, CAS-Nr. [121-33-5]

5.3 Interne Standards (ISTD)

5.3.1 1,4-Dibrombenzen (IS_A), CAS-Nr. [106-37-6], Reinheit $\geq 98 \%$

5.3.2 4,4'-Dibrombiphenyl (IS_B), CAS-Nr. [92-86-4], Reinheit $\geq 98 \%$

6 Geräte

6.1 Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID)

Dieses Gerät wird nur zur Bestimmung der Reinheit von Referenzproben angewendet, die zur Verwendung für Kalibrierzwecke und falls erforderlich für die ISTDs vor der quantitativen Analyse vorgesehen sind, oder zur Quantifizierung von Analyten mit hoher Konzentration ($> 2,4 \%$, wie sie z. B. in ätherischen Ölen enthalten sind). Es wird empfohlen, die Reinheitsuntersuchung nach dem in Anhang A beschriebenen Verfahren durchzuführen.

Für die Messung von Analyten bei Konzentrationen $> 2,4 \%$ steht ein GC-FID-Verfahren zur Verfügung [3]. Es wird angemerkt, dass dieses Verfahren nicht implizit alle in diesem Verfahren genannten Allergene abdeckt: das in diesem Verfahren abgedeckte Prinzip kann jedoch auf alle in den vorgeschlagenen Rechtsvorschriften und in diesem Verfahren enthaltenen Analyte angewendet werden.

6.2 Gaschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer (GC-MS)

6.2.1 Allgemeines

Dieses Gerät wird für die quantitative Analyse angewendet, um das Vorhandensein der zu vermutenden Allergene zu überprüfen und deren Konzentration zu messen. Das System muss die folgende Empfehlung erfüllen können.

6.2.2 GC-MS-System

- Ausgestattet mit einer elektronischen Steuerung von Trägergasdrücken und/oder -strömen;
- es wird empfohlen, einen automatischen Probengeber für die Injektion der Kalibrier- und Probenlösung anzuwenden, der mit einer Spritze von passender Größe ausgestattet ist;
- der Glasinjektorliner muss inert sein und ein Innenvolumen aufweisen, das mit dem Ausdehnungsvolumen des Lösemittels zur Verdünnung kompatibel ist;
- für die quantitative Analyse müssen zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Phasentypen verwendet werden;
- die Einstellung des Massenspektrometers und der Luft- und Wasserstand sollten regelmäßig überprüft werden, um eine optimale Empfindlichkeit sicherzustellen; die Sauberkeit des Injektors sollte ebenfalls regelmäßig überprüft werden, um die analytische Leistungsfähigkeit aufrechtzuerhalten.

Die Empfindlichkeit des Massenspektrometers sollte auch durch Maximieren des Signal-Rausch-Verhältnisses optimiert werden. Eine Option könnte darin bestehen, die Spannung des Detektors (Elektronenvervielfachers) entsprechend den Funktionen des Instruments und den Empfehlungen des Herstellers zu erhöhen.

6.3 Kapillarsäulen für GC

Obwohl die Retentionszeiten und SIM-Fenster für die genannten Säulen festgelegt wurden, dienen diese nur zur Orientierung und der Anwender muss alle Retentionszeiten von Verbindungen und die zugehörigen SIM-Fenster für seine eigenen Installationen überprüfen.

Die Säulenlängen sind die für die Erstentwicklung und Validierung durch die AWG verwendeten. In der Praxis darf eine zusätzliche Trennung des Zielanalyten erreicht werden, indem zu einer längeren Säule (50 m oder 60 m) gewechselt wird. Wenn derartige Säulen verwendet werden, liegt es in der Verantwortung des Anwenders, die Leistung dieses Säulentyps/dieser Säulenlänge im Kontext dieses Verfahrens (Auflösung; SIM-Fenster) zu validieren und diese Länge für den bzw. die zu untersuchenden Analyten zu validieren (siehe Anhang B).

Tabelle 1 — Empfohlene GC-Säulenphase/-Typen und Analyseparameter

Phase	Maße (Länge × Innendurchmesser × Dicke)	Empfohlenes Ofentemperatur- programm	Injektions- bedingungen	Trärgas	Bedingungen für die MS	Mittlere Auflösung $\bar{R}$
100 % Poly- dimethyl- siloxan (PDMS)	30 m × 0,25 mm × 0,25 µm	80 °C für 4 min, dann 15 °C/min bis 105 °C für 2 min, dann 4 °C/min bis 150 °C, dann 10 °C/min bis 280 °C — 5 min halten	Split- /Splitlos- Injektor bei 250 °C — deaktivierter Liner — 1 µl mit Split 1 : 20 wird injiziert — Injektions- temperatur 250 °C (sowohl für die Kalibrie- rung als auch Proben)	Helium: konstanter Durchfluss bei 1,2 ml/min (Geschwin- digkeit etwa 40 cm/s)	Quellentem- peratur bei 250 °C — Quadrupol- temperatur bei 150 °C — Scan des Massen- bereichs (m/z) von 35 Da bis 350 Da — Ionierungs- energie: 70 eV	SIM-Ver- fahren 1 1.43
						SIM-Ver- fahren 2 1.40
50 % Phenyl- methyl- polysiloxan	30 m × 0,25 mm × 0,25 µm	80 °C für 1 min, dann 10 °C/min bis 135 °C für 2 min, dann 3 °C/min bis 170 °C für 1 min, dann 10 °C/min bis 280 °C — 5 min halten				SIM-Ver- fahren 1 1.40
50 % Poly- dimethyl- siloxan (PDMS)						SIM-Ver- verfahren 2 1.42

6.4 Analysenwaage

Alle Referenzproben und internen Standards müssen auf einer Analysenwaage mit einer Ablesbarkeit von 0,000 1 g gewogen werden.

7 Stamm- und Probenlösungen - Herstellung und Lagerung

7.1 Allgemeine Informationen

7.1.1 Wahl des Lösemittels

Methylpivalat und MTBE sind für die Herstellung von Stamm- und Kalibrierlösungen sowie zum Verdünnen von Proben vor der Analyse geeignet, da nachgewiesen wurde, dass sie die folgenden Anforderungen erfüllen:

- 1) sie weisen eine Inertheit bezüglich Bestandteilen und Allergenen in Duftmatrices auf;
- 2) sie weisen eine mittlere Flüchtigkeit auf, um die Stabilität und Konzentration der Lösung sicherzustellen;
- 3) das Ausdehnungsvolumen ist mit dem Innenvolumen des Injektoreinsatzes kompatibel.

Empfehlung: Informationen bezüglich des Lösemittels siehe 5.1.

Die Verwendung eines anderen Lösemittels erfordert vom Anwender Voruntersuchungen, um insbesondere die Inertheit gegenüber den Analyten nachzuweisen und dessen Reinheit zu bestimmen. Die Verwendung von Lösemitteln mit Hydroxyl- oder Carbonylfunktionen (Ethanol, Methanol, Aceton, ...) ist nicht empfehlenswert, um einen Abbau oder eine Reaktion mit den Analyten (z. B. Acetalbildung) zu vermeiden.

7.1.2 Sonstiges

Das gleiche Lösemittel muss zur Herstellung der Kalibrierlösungen, der Blindwertprobe des Systems und zum Verdünnen von Proben verwendet werden.

7.2 Herstellung von Stammlösungen aus Referenzproben

Die Herstellung der Kalibrier-Stammlösungen und der nachfolgenden Kalibrierlösungen kann aus zwei Quellen erfolgen — aus den einzelnen Referenzmaterialien selbst (nach Bestimmung/Bestätigung der Reinheit) oder aus im Handel erhältlichen Kalibrierlösungen mit bekannten Konzentrationen der Bestandteile.

Die folgende Beschreibung umfasst die Herstellung der Kalibrierlösungen aus handelsüblichen Kalibrierlösungen mit bekannter Konzentration. Wenn der Anwender das Verfahren zur Herstellung dieser Lösungen aus einzelnen Referenzmaterialien befolgen möchte, ist das entsprechende Verfahren in Anhang G enthalten.

In der folgenden Beschreibung wird vorgeschlagen, bei der Herstellung der verschiedenen Lösungen nach einem Masse/Masse-Ansatz zu arbeiten. Es ist auch möglich, bei der Herstellung der verdünnten Lösungen Volumina zu verwenden, ohne dass die Genauigkeit der Endergebnisse drastisch sinkt.

7.3 Herstellung von Lösungen des internen Standards und Kalibrierlösungen

7.3.1 Allgemeines

Alle nachfolgenden Erläuterungen beziehen sich auf einen Masse/Masse-Ansatz. Im Falle von Masse/Volumen besteht der einzige Unterschied darin, dass der Analytiker das Lösemittel nicht wiegen, sondern bis zur Markierung im Kolben mit dem Lösemittel auffüllen muss. Bearbeiter können sich auf Anhang G beziehen, wenn keine extern erworbenen Lösungen verwendet werden.

7.3.2 Stammlösungen von internen Standards (entspricht 1 g/kg)

Es wird eine Stammlösung (S-ISTD) hergestellt, die 1 g 1,4-Dibrombenzen (5.3.1) und 1 g 4,4'-Dibrombiphenyl (5.3.2) enthält, die mit Methylpivalat oder MTBE auf 1 kg aufgefüllt wird. Diese Lösung kann wie folgt hergestellt werden:

- Es wird eine Lösung (S-ISTD) hergestellt, indem 0,1 g jeder Verbindung (5.3.1 und 5.3.2) in einen geeigneten Kolben eingewogen und mit Methylpivalat oder MTBE auf 100 g aufgefüllt wird.
- Bei Masse/Masse-Konzentrationen werden die Masse jeder Verbindung und die Endmasse des verwendeten Lösemittels aufgezeichnet, um die Konzentration der fertigen Lösung jedes internen Standards zu bestimmen.
- Die Dichteunterschiede zwischen den Lösemitteln werden beachtet. Beispielsweise beträgt die relative Dichte für MTBE 0,740 4, d. h. es werden nur 74 mg jedes Standards eingewogen und zusammen mit MTBE in einen 100-ml-Kolben eingebracht (das Volumen des zugegebenen MTBE beträgt 74 g).

7.3.3 Konzentrationen von Kalibrierlösungen

Um die chemischen Reaktionen zwischen Analyten und den Abbau dieser zu begrenzen, werden zwei getrennte Stammlösungen in dem Lösemittel zur Verdünnung hergestellt:

- eine Stammlösung enthält Alkohole und Terpene ohne Carbonylfunktion;
- die andere Lösung enthält die verbleibenden zu vermutenden Allergene, insbesondere Aldehyde und Ketone.

Diese zwei Lösungen werden als A1 bzw. A2 bezeichnet.

Die Kalibrierlösungen werden aus diesen beiden Ansätzen von „Stamm“-Lösungen, A1 und A2, hergestellt, die die Analyten in einer Nennkonzentration von 2 g/kg enthalten. Die endgültigen Kalibrierlösungen werden mit Methylpivalat oder MTBE durch Verdünnen dieser Lösungen (oder eines weiteren Derivats davon; A3 und A4) auf eine bekannte Masse erhalten.

Für handelsübliche Standards mit alternativen Konzentrationen müssen die verwendeten Verdünnungsvolumina möglicherweise angepasst werden, um die in Tabelle 2 angegebenen Endkonzentrationen zu erhalten.

Um zu vermeiden, dass für die niedrigeren Kalibrierkonzentrationen sehr kleine Volumina (d. h. $< 10 \mu\text{l}$) aus den Stammlösungen A1 und A2 entnommen werden, können bei Bedarf zwei weitere Lösungen A3 und A4 nach den folgenden Schemata (Tabelle 2 und Tabelle 3) hergestellt werden.

Falls m/m-Konzentrationen angewendet werden, wird die Masse aller Standardlösungen sowie die Masse des Lösemittels aufgezeichnet.

Tabelle 2 — Herstellungsvolumen für Lösung A3

Ausgangslösung (2 g/kg)	Volumen der Ausgangslösung	Endvolumen der verdünnten Lösung (A3)	Endkonzentration der Allergene (mg/kg)
A1	1 ml	10 ml	200

Tabelle 3 — Herstellungsvolumen für Lösung A4

Ausgangslösung (2 g/kg)	Volumen der Ausgangslösung	Endvolumen der verdünnten Lösung (A4)	Endkonzentration der Allergene (mg/kg)
A2	1 ml	10 ml	200

Es wird sichergestellt, dass sie ausreichend verschlossen sind, um eine mögliche Verdunstung des Lösemittels auf ein Mindestmaß zu senken.

Die Stabilität der Stoffe in den Stammlösungen, die entsprechend dem nachstehend beschriebenen Protokoll hergestellt wurden, wurde in einer Glasflasche bei Dunkelheit und in einem Gefriergerät bei einer Temperatur von weniger als -18 °C untersucht. Unter diesen Bedingungen wurde für die beiden Stammlösungen A1 und A2 sowie für A3 und A4 eine Stabilitätsdauer von einem Monat ermittelt.

Wenn die Lagerbedingungen von den vorstehend beschriebenen abweichen, müssen Untersuchungen durchgeführt werden, um die Stabilität der Stoffe unter den neu festgelegten Bedingungen nachzuweisen.

7.3.4 Herstellung von Kalibrierlösungen

Die Kalibrierlösungen C1, C2, C3 werden hergestellt, indem die zwei Allergen-Ausgangslösungen A1 und A2 nach Zugabe der internen Standardlösung (S-ISTD) (8.3) entsprechend den folgenden Anweisungen und unter Bezugnahme auf das Verdünnungsschema in Tabelle 4, mit Methylpivalat oder MTBE auf 10 ml verdünnt werden. Die Masse der einzelnen vereinigten Lösungen muss aufgezeichnet werden.

Auf gleiche Weise werden die Kalibrierlösungen C4, C5, C6, C7 hergestellt, indem die Lösungen A3 und A4 (8.3) nach Zugabe der internen Standardlösung (S-ISTD) (8.3) entsprechend dem Verdünnungsschema in Tabelle 4 mit Methylpivalat auf 10 ml verdünnt werden. Die Masse der einzelnen vereinigten Lösungen muss aufgezeichnet werden.

Um die Kalibrierlösungen C1 bis C3 herzustellen, sollte der folgende Prozess angewendet werden:

- Für Lösung C1: 1,2 ml der Lösung A1 und 1,2 ml der Lösung A2 werden in einen gewogenen 10-ml-Messkolben gegeben; die Massen A1 und A2 (m_{A1} bzw. m_{A2}) werden bei jedem Schritt aufgezeichnet.

1 ml der Lösung des internen Standards wird hinzugefügt, die Masse aufgezeichnet und mit Lösemittel bis zur 10-ml-Marke aufgefüllt.

Die Endmasse = $m_{A1} + m_{A2} + m_{ISTD} + m_{\text{Lösemittel}}$ wird aufgezeichnet.

- Für Lösung C2: 0,6 ml der Lösung A1 und 0,6 ml der Lösung A2 werden in einen gewogenen 10-ml-Messkolben gegeben; die Massen A1 und A2 (m_{A1} bzw. m_{A2}) werden bei jedem Schritt aufgezeichnet.

1 ml der Lösung des internen Standards wird hinzugefügt, die Masse aufgezeichnet und mit Lösemittel bis zur 10-ml-Marke aufgefüllt.

Die Endmasse = $m_{A1} + m_{A2} + m_{ISTD} + m_{\text{Lösemittel}}$ wird aufgezeichnet.

- Für Lösung C3: 0,25 ml der Lösung A1 und 0,25 ml der Lösung A2 werden in einen gewogenen 10-ml-Messkolben gegeben; die Massen A1 und A2 (m_{A1} bzw. m_{A2}) werden bei jedem Schritt aufgezeichnet.

1 ml der Lösung des internen Standards wird hinzugefügt, die Masse aufgezeichnet und mit Lösemittel bis zur 10-ml-Marke aufgefüllt.

Die Endmasse = $m_{A1} + m_{A2} + m_{ISTD} + m_{L\ddot{o}semittel}$ wird aufgezeichnet.

Für die Lösungen C4 bis C7 sollten die Lösungen A3 und A4 verwendet werden, um mögliche Fehler bei der Abgabe kleiner Massen von A1 und A2 zu vermeiden:

- Für Lösung C4: 1 ml der Lösung A3 und 1 ml der Lösung A4 werden in einen gewogenen 10-ml-Messkolben gegeben; die Massen A3 und A4 werden bei jedem Schritt aufgezeichnet.

1 ml der Lösung des internen Standards wird hinzugefügt, die Masse aufgezeichnet und mit Lösemittel bis zur 10-ml-Marke aufgefüllt.

Die Endmasse = $m_{A3} + m_{A4} + m_{ISTD} + m_{L\ddot{o}semittel}$ wird aufgezeichnet.

- Für Lösung C5: 0,5 ml der Lösung A3 und 0,5 ml der Lösung A4 werden in einen gewogenen 10-ml-Messkolben gegeben; die Massen A3 und A4 werden bei jedem Schritt aufgezeichnet.

1 ml der Lösung des internen Standards wird hinzugefügt, die Masse aufgezeichnet und mit Lösemittel bis zur 10-ml-Marke aufgefüllt.

Die Endmasse = $m_{A3} + m_{A4} + m_{ISTD} + m_{L\ddot{o}semittel}$ wird aufgezeichnet.

- Für Lösung C6: 0,25 ml der Lösung A3 und 0,25 ml der Lösung A4 werden in einen gewogenen 10-ml-Messkolben gegeben; die Massen A3 und A4 werden bei jedem Schritt aufgezeichnet.

1 ml der Lösung des internen Standards wird hinzugefügt, die Masse aufgezeichnet und mit Lösemittel bis zur 10-ml-Marke aufgefüllt.

Die Endmasse = $m_{A3} + m_{A4} + m_{ISTD} + m_{L\ddot{o}semittel}$ wird aufgezeichnet.

- Für Lösung C7: 0,1 ml der Lösung A3 und 0,1 ml der Lösung A4 werden in einen gewogenen 10-ml-Messkolben gegeben; die Massen A3 und A4 werden bei jedem Schritt aufgezeichnet.

1 ml der Lösung des internen Standards wird hinzugefügt, die Masse aufgezeichnet und mit Lösemittel bis zur 10-ml-Marke aufgefüllt.

Die Endmasse = $m_{A3} + m_{A4} + m_{ISTD} + m_{L\ddot{o}semittel}$ wird aufgezeichnet.

Die 7-Punkt-Kalibrierkurve wurde verwendet, um dieses Verfahren zu validieren. Es ist auch möglich, mit einer 6-Punkt-Kalibrierkurve zu arbeiten, wobei nur C1 (240 mg/kg), C2 (120 mg/kg), C3 (50 mg/kg), C4 (20 mg/kg), C5 (10 mg/kg), C7 (2 mg/kg) beibehalten werden.

Diese Anweisungen können zusammengefasst werden und sind in der folgenden Tabelle 4 enthalten.

Tabelle 4 — Individuelle Konzentrationen von Allergen-Kalibrierstandardlösungen

	Allergen-Konzentrationen mg/kg	Volumen der Allergen-Lösung ml	Volumen der Allergen-Lösung ml	Volumen der hinzugefügten Lösung des internen Standards ml	Konzentration der internen Standards mg/kg	Endvolumen der Kalibrierlösung ml
Verwendete Ausgangslösungen		A1 (2 g/kg)	A2 (2 g/kg)	(1 g/kg)		
C1	240	1,200	1,200	1,000	100	10
C2	120	0,600	0,600	1,000	100	10
C3	50	0,250	0,250	1,000	100	10
Sekundär-lösungen		A3 (0,2 g/kg)	A4 (0,2 g/kg)	(1 g/kg)		
C4	20	1,000	1,000	1,000	100	10
C5	10	0,500	0,500	1,000	100	10
C6	5	0,250	0,250	1,000	100	10
C7	2	0,100	0,100	1,000	100	10

Allgemeine Anmerkungen und Informationen:

Wenn keine Daten zur Stabilität vorliegen, werden diese Lösungen frisch vorbereitet und nicht gelagert. Diese Kalibrierlösungen werden nach 48 h nicht mehr verwendet.

8 Bedingungen für die Erfassung mit Massenspektrometern

8.1 Festlegung von Retentionszeiten und SIM-Chromatograph-Fenstern

Im SCAN-Modus wird eine der Standardlösungen (z. B. hohe bis mittlere Kalibrierkonzentrationen) injiziert, um die Retentionszeiten und geeigneten SIM-Fenster für jeden Analyten zu bestimmen.

Es wird empfohlen, eine Konzentration im mittleren Bereich der Kalibrierkurve zu wählen.

Für jede Säule entwickelt der Anwender zwei SIM- oder SIM-SCAN-Verfahren (SIM1 und SIM2), um die 57 potenziell allergenen Stoffe in zwei Analytensätzen zu analysieren.

Typische SIM-Ionen (I1, I2 und I3) und deren zugehöriger interner Standard sind in Tabelle C.1, Tabelle C.2 und Tabelle C.3 ausführlich aufgeführt, wie in Anhang C angegeben. In seltenen Fällen können sich die ausgewählten Ionen für ein bestimmtes Allergen auf einer polaren Säule von den ausgewählten Ionen für eine unpolare Säule unterscheiden.

8.2 SIM-Fenster — Einstellung und Kriterien

Die Auswahl des für die Quantifizierung jedes Analyten zuzuweisenden internen Standards ist auch in Anhang C, Tabelle C.1, Tabelle C.2 und Tabelle C.3 aufgeführt.

Beispiele für SIM-Fenster für die beiden Analytensätze und die beiden Säulen sind in Anhang D, Tabelle D.1, Tabelle D.2, Tabelle D.3 und Tabelle D.4 angegeben.

Jedes SIM-Fenster sollte, wenn möglich nicht mehr als 6 Ionen enthalten. In den Bereichen des Chromatogramms, in denen die Elution der Analyten nahe beieinander liegt, dürfen die SIM-Fenster jedoch bis zu 9 oder mehr Ionen enthalten. Auf jeden Fall sollte die Verweilzeit so gewählt werden, dass sie mindestens 3 Scanzyklen je Sekunde und/oder mindestens 10 bis 15 Erfassungspunkte je chromatographischem Peak für eine genaue Integration aufweist.

Die Breite des SIM-Fensters muss auch die Peakform (einschließlich eines möglichen Peak-Tailings) und eine mögliche Elutionsverzögerung berücksichtigen, um eine weitere Peakintegration zu ermöglichen. Die gleiche Erfassungszeit muss für alle Ionen der Allergene im selben SIM-Fenster gelten.

8.3 GC-MS-Scanmodus Überprüfung

Es ist ein vollständiger SCAN-Modus erforderlich, um das Vorhandensein von Peaks zu identifizieren, von denen angenommen wird, dass sie sich aus ihrem üblichen SIM-Fenster herausbewegt haben oder durch störende Peaks ausgeblendet wurden (siehe Anhang E, einschließlich Bild E.1, Bild E.2, Bild E.3 und Bild E.4).

Weitere Informationen siehe Anhang K.

9 Probenanalyse

9.1 Allgemeines

Es wird empfohlen, vor der Analyse eine 10-fache Verdünnung der Probe durchzuführen, was bedeutet, dass exakt 1 g Probe in einen 10-ml-Messkolben eingewogen wird. Wenn festgestellt wird, dass die Analytkonzentrationen außerhalb des Kalibrierbereichs liegen, dann kann eine andere Probe bis zum maximalen 240-Fachen verdünnt und erneut analysiert werden.

9.2 Herstellung der Probe für die Analyse

- Eine Probenmenge (üblicherweise 1 g) wird (auf das nächste Milligramm genau) in einen 10-ml-Messkolben eingewogen.
- 1,0 ml der internen Standardlösung (S-ISTD), 8.3, wird zugegeben und die Masse aufgezeichnet. Die Endkonzentration des hinzugefügten internen Standards sollte mit der in den Kalibrierlösungen verwendeten Konzentration übereinstimmen.
- Mit Methylpivalat (oder dem gleichen zur Verdünnung wie für die Herstellung der Kalibrierlösungen verwendeten Lösemittels) wird auf die 10-ml-Marke eingestellt.
- Die Endmasse (mDIL) dieser Lösung wird aufgezeichnet.

Ein aliquoter Anteil der vorbereiteten Probe wird homogenisiert und in ein GC-Vial für die GC-MS-Analyse überführt.

9.3 Ablauf

9.3.1 Blindwertprobe

Wenn das GC-MS-System über einen längeren Zeitraum nicht benutzt wurde, kann sich Material im Injektionssystem ansammeln und Störungen während der Analyse verursachen. Es wird daher empfohlen, vor Beginn des Kalibrier-/Analysenablaufs einen ersten Blindwertprobendurchlauf mit Lösemittel durchzuführen, um den Einlass von jeglichen Rückständen zu reinigen.

Vor Beginn der Analyse sollten angemessene Blindwerte erhalten werden. Bei der Blindwertanalyse sollte kein Analyt über 75 % der unteren Kalibriergrenze nachgewiesen werden. Blindwertkorrekturen werden

bei diesem Verfahren nicht angewendet. Während des Analysenablaufs wird eine Blindwertanalyse angewendet, um eine Verschleppung oder Verunreinigung des Systems festzustellen. Wenn bei diesen Proben Analytkonzentrationen von $> 75 \%$ der unteren Kalibrierkonzentration festgestellt werden, dann ist eine Wartung des Einlasssystems erforderlich und die Abfolge ab dem letzten bekannten „guten Blindwert“ muss wiederholt werden.

9.3.2 Kalibrierlösungen

Jede Kalibrierlösung (C1 bis C7) wird auf die beiden einzelnen GC-MS-Säulen entsprechend des SIM- oder SIM-SCAN-Verfahrens injiziert.

Für jedes Allergen wird jedes Ion in Tabelle C.1 und Tabelle C.2 (Anhang C) (z. B. I1) abwechselnd als Quantifizier-Ion verwendet, wobei die verbleibenden zwei Ionen in Tabelle C.3 (z. B. I2 und I3) als Qualifizier-Ionen verwendet werden.

Je Säulentyp und Ion muss eine Kalibrierung durchgeführt werden, wodurch sich sechs Kurven je Allergenbestandteil ergeben.

Die Kalibrierkurve wird erstellt, indem das Flächenverhältnis zwischen dem Analyten und dem internen Standard als Funktion ihres Konzentrationsverhältnisses aufgetragen wird. R^2 muss über 0,995 liegen und die Residuen müssen auf beiden Seiten der Kurve verteilt sein.

Die empfohlene anzuwendende Kalibrierkurve ist:

Quadratischer Fit: Schnittpunkt durch den Nullpunkt

Zusätzlich darf eine Gewichtung von $1/\text{Konzentration}$ des Kalibrierpunkts angewendet werden, obwohl dies optional ist.

Diese Einstellungen wurden durch die Anwendung des Verfahrens zum Prüfen von Gemischen während der Entwicklungsphase des Verfahrens erreicht.

Eine ausführlichere Erläuterung des Kalibrierverfahrens ist in Anhang H enthalten.

9.3.3 Kontrolllösung

Die Kalibrierkontrolllösung (z. B. 20 mg/kg oder 20 mg/l) wird verwendet, um sicherzustellen, dass während des Analysenablaufs keine Verschiebung (en: drift) der Kalibrierung auftritt. Die Werte aus dieser Analyse sollten idealerweise nicht mehr als $\pm 20 \%$ von der erwarteten Konzentration jedes Allergens bei dieser Lösungskonzentration abweichen oder innerhalb der vom Labor festgelegten Leistungsbereiche liegen. Wenn sich herausstellt, dass die Ergebnisse außerhalb dieser Grenzwerte liegen, dann sollte der Kalibrierablauf erneut durchgeführt werden, eine neue Kalibrierung festgelegt und der vorherige Ablauf wiederholt werden.

Beim GC-MS-Analysenablauf müssen die verdünnten Proben, eine Kalibrierkontrolllösung oder die Blindprobe in jedes Vial, das die Kalibrierlösungen enthält, mindestens einmal unter den angegebenen Analysenbedingungen (z. B. jeder Säulentyp, SIM-, SIM-SCAN-Verfahren) injiziert werden.

9.3.4 Proben

Die verdünnte Probe wird auf dem GC-MS unter den gleichen Bedingungen wie für die Kalibrierstandards und auf jeder der beiden Chromatographiesäulen unter Verwendung der entsprechenden Erfassungsverfahren (SIM; SIM-SCAN) injiziert.

Dies sollte innerhalb von 48 h nach der Herstellung der Proben erfolgen.