

DIN EN 17256



ICS 65.120

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung der Alkaloide des Mutterkorns und der Tropanalkaloiden in
Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln mittels LC-MS/MS;
Deutsche Fassung EN 17256:2019**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of ergot alkaloids and tropane alkaloids in feed materials and compound feeds
by LC-MS/MS;
German version EN 17256:2019

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Détermination de la teneur en alcaloïdes de l'ergot et en alcaloïdes tropaniques dans les
matières premières et les aliments composés par CL-SM/SM;
Version allemande EN 17256:2019

Gesamtumfang 40 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17256:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

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

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-5:1998	siehe DIN ISO 5725-5:2002-11
EN ISO 3696:1995	siehe DIN ISO 3696:1991-06

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696:1991-06, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen — Identisch mit ISO 3696:1987*

DIN ISO 5725-5:2002-11, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 5: Alternative Methoden für die Ermittlung der Präzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-5:1998)*

Deutsche Fassung

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung der Alkaloide des Mutterkorns und der
Tropanalkaloiden in Einzelfuttermitteln und
Mischfuttermitteln mittels LC-MS/MS**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis —
Determination of ergot alkaloids and tropane alkaloids in
feed materials and compound feeds by LC-MS/MS

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et
d'analyse — Détermination de la teneur en alcaloïdes
de l'ergot et en alcaloïdes tropaniques dans les matières
premières et les aliments composés par CL-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 28. Juli 2019 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 Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	6
6 Geräte	10
7 Durchführung	11
8 Analyse	13
9 Prüfergebnisse	15
10 Präzision	16
11 Untersuchungsbericht	17
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	18
Anhang B (informativ) Beispiel von LC-MS/MS-Bedingungen	34
Anhang C (informativ) Beispiel für LC-MS/MS-Chromatogramme von Mutterkornalkaloiden und Tropanalkaloiden in einer Probe von Ergänzungsfuttermitteln für Rinder	36
Literaturhinweise	38

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17256:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis März 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 2020 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 wurde im Rahmen eines Mandats erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben.

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

Mutterkornalkaloide sind Mykotoxine, die von der Gattung *Claviceps* produziert werden. In Europa ist *Claviceps purpurea* die am meisten verbreitete Pilzart. Der Pilz kann Pflanzenarten der Familie der Poaceae (echte Gräser) befallen und dunkel gefärbte Körper bilden, sogenanntes sklerotisches oder (Roggen-)Mutterkorn. Wirtschaftlich wichtige Getreidearten, die von *C. purpurea* infiziert werden können, sind Roggen, Weizen, Triticale, Gerste, Hirse und Hafer. Die Sklerotien enthalten eine Reihe von Mutterkornalkaloiden, von denen zwölf als Hauptbestandteile anerkannt sind: Ergocornin, Ergocorninin, Ergocristin, Ergocristinin, Ergocryptin, Ergocryptinin, Ergometrin, Ergometrinin, Ergosin, Ergosinin, Ergotamin und Ergotaminin. Ergocryptin und Ergocryptinin treten als Gemisch aus α - und β -Isomeren auf.

Tropanalkaloide sind Pflanzengifte, die durch mehrere Gattungen der Familie der Solanaceae (Nachtschattengewächse) produziert werden. Die wichtigsten Arten sind *Datura* (Stechapfel), *Hyoscyamus* (Bilsenkraut) und *Atropa* (Belladonna, Tollkirsche). Samen und andere Pflanzenteile enthalten erhebliche Mengen an Atropin (Hyoscyamin) und Scopolamin, die die wichtigsten toxischen Prinzipien darstellen. *Datura*-, *Hyoscyamus*- und *Atropa*-Gattungen können als Unkraut auf Ackerflächen vorkommen und können gemeinsam geerntet werden, was zu kontaminierten Futterkörnern und Futtermitteln führt.

Dieses Protokoll erhebt nicht den Anspruch, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Protokolls, geeignete Maßnahmen für die Sicherheit und den Gesundheitsschutz zu ergreifen und dafür Sorge zu tragen, dass behördliche und gesetzliche Regelungen eingehalten werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung einzelner Mutterkornalkaloide und Tropanalkaloide in unverarbeitetem Getreide und getreidebasierten Mischfuttermitteln durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Ringversuches in folgenden Matrices erfolgreich validiert: Roggen, Gerste, Weizen, Alleinfuttermittel für Rinder, Schweine und Geflügel. Die Validierung in Buchweizen ergab akzeptable Ergebnisse, die relative Standardvergleichspräzision war jedoch bei den meisten Analyten, verglichen mit anderen Matrices, höher. Dies kann mit der Matrix zusammenhängen. Der validierte Verfahrensbereich liegt etwa zwischen 10 µg/kg und 250 µg/kg für einzelne Alkaloide. Durch Anwendung eines höheren Dotierniveaus und der Verdünnung des Probenextrakts ist die Bestimmung von Konzentrationen über 250 µg/kg möglich, wurde jedoch im Ringversuch nicht validiert.

Dieses Dokument wird angewendet für die Bestimmung, mittels einer Ein-Punkt-Standardaddition der Probe, von:

- Ergocornin im geprüften Bereich von 12 µg/kg bis 221 µg/kg;
- Ergocorninin im geprüften Bereich von 9 µg/kg bis 196 µg/kg;
- Ergocristin im geprüften Bereich von 14 µg/kg bis 312 µg/kg;
- Ergocristinin im geprüften Bereich von 12 µg/kg bis 258 µg/kg;
- α-Ergocryptin im geprüften Bereich von 10 µg/kg bis 184 µg/kg;
- der Summe von α- und β-Ergocryptinin im geprüften Bereich von 8 µg/kg bis 171 µg/kg;
- Ergometrin im geprüften Bereich von 12 µg/kg bis 174 µg/kg;
- Ergometrinin im geprüften Bereich von 3 µg/kg bis 172 µg/kg;
- Ergosin im geprüften Bereich von 12 µg/kg bis 226 µg/kg;
- Ergosinin im geprüften Bereich von 9 µg/kg bis 273 µg/kg;
- Ergotamin im geprüften Bereich von 11 µg/kg bis 443 µg/kg;
- Ergotaminin im geprüften Bereich von 10 µg/kg bis 273 µg/kg;
- Atropin im geprüften Bereich von 16 µg/kg bis 252 µg/kg;
- Scopolamin im geprüften Bereich von 15 µg/kg bis 246 µg/kg.

2 Normative Verweisungen

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

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

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 <http://www.iso.org/obp>

4 Kurzbeschreibung

Die Alkaloide werden durch Mischen von 4 g einer homogenisierten, fein gemahlten Probe mit 40 ml Methanol/Wasser 60/40 (v/v), das 0,4 % Methansäure enthält, extrahiert. Die Mischung wird 30 min geschüttelt. Nach der Zentrifugation wird ein Teil der überstehenden Flüssigkeit weiter durch einen 30-kDa-Ultrafilter gereinigt. Das Filtrat wird in ein Fläschchen transferiert und mit einem Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometer (LC-MS/MS) analysiert. Zur Trennung der Analyten wird eine Umkehrphasensäule in Kombination mit einer wässrigen mobilen Phase mit einem pH-Wert > 7 und einem organischen Modifikator verwendet. Die Quantifizierung erfolgt durch eine Ein-Punkt-Standardaddition der Probe.

5 Reagenzien

WARNUNG — Mykotoxine können äußerst gesundheitsgefährdend sein. Bestimmte Mykotoxine haben kanzerogene, mutagene, toxische, teratogene und immunotoxische Wirkung. Inhalation oder Exposition der Haut bei Mykotoxinen können an Arbeitsplätzen stattfinden. Abhängig vom Ausmaß der Exposition sind beide Auswirkungen, akut und chronisch, möglich. Die Tropanalkaloide Atropin und Scopolamin sind akut toxisch, sie können beim Einatmen oder Verschlucken tödliche Folgen haben. Zusätzlich kann Hautkontakt mit Scopolamin lebensgefährlich sein.

5.1 Analytische Standards

Analytische Standards sollten eine nachgewiesene Reinheit von mindestens 90 %, vorzugsweise 95 % oder mehr, aufweisen.

ANMERKUNG 1 Ergotamin und Ergometrin sind als Drogenausgangsstoffe der Kategorie I aufgeführt und für diese Verbindungen wäre eine behördliche Zulassung erforderlich und besondere Verfahren für die Lagerung und Verwaltung wären einzuhalten (EC 273/2004) [1]. Atropin ist das racemische Gemisch aus L-(–)-Hyoscyamin und D-(+)-Hyoscyamin. In diesem Verfahren werden die Enantiomere des Hyoscyamins nicht getrennt. Beide Enantiomere erzeugen identische Fragmentierungsspektren. In diesem Verfahren kann entweder ein Standard von Atropin oder Hyoscyamin verwendet werden.

ANMERKUNG 2 β -Ergocryptin und β -Ergocryptinin sind gegenwärtig nicht von gewerblichen Anbietern als analytische Standards von ausreichender Reinheit und Qualität erhältlich. In diesem Dokument wird α -Ergocryptinin für die Bestimmung der Summe von α - und β -Ergocryptinin verwendet. Für die Bestimmung von β -Ergocryptin sollte α -Ergocryptin verwendet werden, jedoch ist dieses nicht in der Laborvergleichsuntersuchung validiert worden. In Abschnitt 8 sind weitere Informationen zur Analyse dieser Alkaloide zu finden.

ANMERKUNG 3 Isotopisch markierte Analoga von Ergometrin, Ergometrinin, Atropin und Scopolamin sind bei gewerblichen Anbietern erhältlich. Optional können diese isotopisch markierten Analoga als interne Standards verwendet werden, vorausgesetzt, dass die Massenzunahme im Molekül durch die isotopischen Markierungen mindestens 3 beträgt.

5.1.1 Ergocornin

5.1.2 Ergocorninin

5.1.3 Ergocristin

5.1.4 Ergocristinin

5.1.5 α -Ergocryptin

5.1.6 α -Ergocryptinin

5.1.7 Ergometrin (Maleat)

5.1.8 Ergometrinin

5.1.9 Ergosin

5.1.10 Ergosinin

5.1.11 Ergotamin (Tartrat)

5.1.12 Ergotaminin

5.1.13 Atropin oder Hyoscyamin

5.1.14 Scopolamin (Hydrochlorid)

5.2 Reagenzien

5.2.1 Acetonitril, LC-MS- oder HPLC-Qualität.

5.2.2 Methanol, LC-MS- oder HPLC-Qualität.

5.2.3 Methansäure, 98 % bis 100 %.

5.2.4 Ammoniumcarbonat, anhydrisch.

5.2.5 Ammoniak, 25 %.

5.2.6 Wasser

Wasser der LC-MS-Qualität, doppelt destilliert oder Wasser der Qualität 1, wie in EN ISO 3696:1995 festgelegt.

5.3 Standardlösungen

Von jedem Standard (5.1.1 bis 5.1.14) werden zwischen 5 mg und 6 mg in eine separate bernsteinfarbene Glasflasche mit 60 ml Kapazität (6.12) abgewogen (6.1). Ein Volumen Acetonitril (5.2.1) wird hinzugegeben, um eine Lösung mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ herzustellen. Dabei ist das Gewicht, die Reinheit und das Aussehen des Standards zu berücksichtigen.

Viele Mutterkornalkaloid-Standards sind nur in geringen Mengen (5 mg oder weniger) im Handel erhältlich. Vorzugsweise sollte ein Standard mit einer Menge von mindestens 5 mg hergestellt werden. Wenn der Standard jedoch nur in einer Menge von 5 mg oder weniger verfügbar ist, kann eine geringere Menge abgewogen werden, vorausgesetzt, dass eine genaue Gewichtsmessung gewährleistet werden kann. Grundsätzlich ist dies dem Spülen des Behälterinhalts mit mehreren Volumina Lösemittel vorzuziehen, um das Material zu lösen und zu sammeln. Dennoch können einige Mutterkornstandards nur als getrocknete Standards verfügbar sein, die in Lösemitteln rekonstituiert werden müssen.

Die Stammlösungen sind, bei einer Temperatur von unter -18°C , über einen Zeitraum von 6 Monaten stabil. Mutterkornalkaloidstandards sind allerdings lichtempfindlich und können, wenn Säure oder Base vorhanden ist, schnell epimerisieren. Standardlösungen sollten in bernsteinfarbenen Glasflaschen aufbewahrt und bei einer Temperatur unter -18°C gelagert werden. Acetonitril ist das bevorzugte Lösemittel, da in diesem die Epimerisierungsrate am geringsten ist.

Vor der Verwendung müssen Stammlösungen und gemischte Standardlösungen, die im Gefrierschrank gelagert wurden, möglicherweise im Vortex-Schüttler (6.7) behandelt oder beschallt (6.8) werden, um die vollständige Lösung der Analyten sicherzustellen.

Zur weiteren Reduzierung der Auswirkungen der Epimerisierung dürfen gemischte Standard-Stammlösungen, die die jeweiligen Epimer-Paare enthalten, hergestellt werden.

5.3.1 Ergocornin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.2 Ergocorninin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.3 Ergocristin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.4 Ergocristinin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.5 α -Ergocryptin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.6 α -Ergocryptinin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.7 Ergometrin-Stammlösung, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

ANMERKUNG Ergometrin kann schwer löslich sein (insbesondere, wenn es als maleate Salzform vorliegt). Die Lösung kann für bis zu 30 min beschallt (6.8) oder für die Dauer von bis zu 30 min in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 60°C gegeben werden. Die Beschallung ist der Erwärmung im Wasserbad vorzuziehen. Alternativ kann dem Lösemittel eine geringe Menge Wasser (10 %) zugesetzt werden, um die Lösung der Salzform zu erleichtern.

5.3.8 Ergometrinin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.9 Ergosin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.10 Ergosinin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.11 Ergotamin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.12 Ergotaminin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.13 Atropin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

ANMERKUNG Anstelle von Atropin kann Hyoscyamin verwendet werden.

5.3.14 Scopolamin-Stammlösung, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5.3.15 Gemischte Standardlösung, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Es werden 1 ml von jeder Stammlösung 5.3.1 bis 5.3.7 und 5.3.9 bis 5.3.14 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 2 ml der Stammlösung 5.3.8 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in einen kalibrierten 20-ml-Messkolben (6.11) pipettiert (6.10) und das Volumen mit Acetonitril (5.2.1) aufgefüllt und gemischt. Die Inhalte werden in eine bernsteinfarbene 30-ml-Glasflasche (6.12) transferiert. Die Lösung kann bei Lagerung im Dunkeln unter -18°C 12 Monate verwendet werden.

ANMERKUNG Die zubereitete gemischte Standardlösung kann in 4 Teile zu 5 ml aufgeteilt und in getrennten bernsteinfarbenen 10-ml-Glasflaschen (6.12) gelagert werden.

5.3.16 Gemischte Standardlösung, 1 000 ng/ml

Es werden 4 ml der gemischten Standardlösung (5 µg/ml) (5.3.15) in einen kalibrierten 20-ml-Messkolben (6.11) pipettiert (6.10) und das Volumen mit Acetonitril (5.2.1) aufgefüllt und gemischt. Der Inhalt wird in eine bernsteinfarbene 30-ml-Glasflasche (6.12) transferiert. Die Lösung kann bei Lagerung im Dunkeln unter –18 °C 12 Monate verwendet werden.

ANMERKUNG Eine neue gemischte Standardlösung kann alle 3 Monate hergestellt werden, indem ein neuer, nicht verwendeter Teil der gemischten Standardlösung 5.3.15 verwendet wird.

5.3.17 Gemischte Standardlösung, 200 ng/ml

Es werden 4 ml der gemischten Standardlösung (1 000 ng/ml) (5.3.16) in einen kalibrierten 20-ml-Messkolben (6.11) pipettiert (6.10) und das Volumen mit Acetonitril (5.2.1) aufgefüllt und gemischt. Der Inhalt wird in eine bernsteinfarbene 30-ml-Glasflasche (6.12) transferiert. Die Lösung kann bei Lagerung im Dunkeln unter –18 °C 12 Monate verwendet werden.

ANMERKUNG Eine neue gemischte Standardlösung kann alle 3 Monate aus einer frisch hergestellten gemischten Standardlösung 5.3.16 hergestellt werden.

5.3.18 Gemischte Standardlösung, 50 ng/ml

Es werden 5 ml der gemischten Standardlösung (200 ng/ml) (5.3.17) in einen kalibrierten 20-ml-Messkolben (6.11) pipettiert (6.10) und das Volumen mit Acetonitril (5.2.1) aufgefüllt und gemischt. Der Inhalt wird in eine bernsteinfarbene 30-ml-Glasflasche (6.12) transferiert. Die Lösung kann bei Lagerung im Dunkeln unter –18 °C 12 Monate verwendet werden.

ANMERKUNG Eine neue gemischte Standardlösung kann alle 3 Monate aus einer frisch hergestellten gemischten Standardlösung 5.3.17 hergestellt werden.

5.3.19 Standardarbeitslösung, 10 ng/ml

Die gemischte Standardlösung von 1 000 ng/ml (5.3.16) wird mit Extraktionslösemittel (5.4.1) im Volumenverhältnis 1 : 100 verdünnt. An jedem neuen Analysetag wird eine neue Lösung hergestellt. Diese wird bei +4 °C gelagert.

5.4 Reagenzlösungen

5.4.1 Extraktionslösemittel 0,4 % Methansäure in Methanol:Wasser (60:40)

600 ml Methanol (5.2.2), 400 ml Wasser (5.2.6) und 4 ml Methansäure (5.2.3) werden in einer 1 000-ml-Glasflasche gemischt. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und kann 3 Monate verwendet werden.

5.4.2 LC-MS/MS mobile Phase A: 10 mM Ammoniumcarbonat, pH-Wert 10,0

0,96 g Ammoniumcarbonat (5.2.4) werden abgewogen und in 1 000 ml Wasser (5.2.6) in einer 1 000-ml-Glasflasche gelöst. Mit einer Direktverdrängungspipette (6.10) werden Ammoniak 25 % (5.2.5) zugegeben, um den pH-Wert auf $10,0 \pm 0,1$ mit einem pH-Messgerät einzustellen (6.9). Diese Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und kann 1 Monat verwendet werden.

Eine mobile Phase A, bestehend aus 10 mM Ammoniumcarbonat pH-Wert 9,0 hat sich als gleichermaßen funktionsfähig erwiesen. 0,96 g Ammoniumcarbonat werden abgewogen und in 1 000 ml Wasser (5.2.6) in einer 1 000-ml-Glasflasche gelöst. Falls notwendig wird der pH-Wert mit Methansäure (5.2.3) oder Ammoniak 25 % (5.2.5) unter Verwendung eines pH-Messgeräts (6.9) auf $9,0 \pm 0,1$ eingestellt. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und kann 1 Monat verwendet werden.

Eine mobile Phase A, bestehend aus einer Lösung von 6 mM Ammoniak in Wasser, hat sich als gleichermaßen funktionsfähig erwiesen. 500 µl Ammoniak 25 % (5.2.5) werden mit 1 000 ml Wasser (5.2.6) in einer 1 000-ml-Glasflasche gemischt. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und kann 1 Woche verwendet werden.

6 Geräte

Übliche Laborausstattung und im Besonderen die folgenden Geräte.

6.1 Analysewaage, mit einer Massenauflösung von 0,1 mg oder besser

6.2 Laborwaage, mit einer Massenauflösung von 0,1 g oder besser

6.3 Mühle

Einzelne Mühle oder Mehrfachmühlen, die geeignet sind, die Prüfmaterialien auf eine Partikelgröße $\leq 500 \mu\text{m}$ zu mahlen.

6.4 Mischwerkzeug

Geeignet zur ausreichenden Homogenisierung der gemahlenen Prüfmaterialien.

6.5 Vertikaler oder horizontaler Laborschüttler, einstellbar

6.6 Zentrifuge

Geeignet für 50-ml-Zentrifugenröhrchen (6.13) und Ultrafilter (6.14) und in der Lage, eine relative Zentrifugalkraft (rcf) (en: relative centrifugal force) von 3 000 *g* zu erzeugen.

6.7 Mini-Laborschüttler oder Vortex-Mischer

6.8 Ultraschallbad

6.9 pH-Messgerät

6.10 Pipettierer

Einstellbar, geeignet für organische Lösemittel, ordnungsgemäß kalibriert, mit geeigneten Spitzen.

6.11 Messkolben, kalibriert, 20 ml

6.12 Bernsteinfarbene Glasflasche in den Größen 10 ml, 30 ml und 60 ml mit Schraubverschluss

6.13 Zentrifugenröhrchen, Polypropylen, 50 ml, mit Schraubverschluss

6.14 Ultrafilter (Zentrifugalfiltereinheit) mit einer Trenngrenze von 30 kDa

Die Zentrifugalfiltereinheit muss mit 60 % Methanol und 0,4 % Methansäurelösung verträglich sein. Die Membran sollte aus regenerierter Zellulose bestehen. Der Ultrafilter sollte eine Kapazität von 4 ml und die Membran sollte eine aktive Oberfläche von $\geq 300 \text{ mm}^2$ aufweisen.

6.15 HPLC-Fläschchen, Glas oder Polypropylen, 2 ml

6.16 HPLC-System, bestehend aus