

## DIN EN 17425



ICS 67.050; 67.060

**Lebensmittel –  
Bestimmung von Ergotalkaloiden in Getreiden und Getreideerzeugnissen  
mit dSPE-Reinigung und LC-MS/MS;  
Deutsche Fassung EN 17425:2021**

Foodstuffs –

Determination of ergot alkaloids in cereals and cereal products by dSPE clean-up and  
HPLC-MS/MS;

German version EN 17425:2021

Produits alimentaires –

Dosage des alcaloïdes de l'ergot dans les céréales et les produits céréaliers par purification  
par dSPE et CL-SM/SM;

Version allemande EN 17425:2021

Gesamtumfang 44 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

## Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17425:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-03 AA „Biotoxine“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Die hier beschriebenen und für diese Norm anzuwendenden Analysegeräte sind ausschließlich mit englischsprachiger Beschriftung erhältlich. Daher wurden die Einstellungsparameter für die Geräte teilweise in englischer Sprache angegeben. Die Übersetzung in die deutsche Sprache wurde als hinderlich für die leichte Anwendung dieser Norm angesehen.

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

|                      |       |                                                                                        |
|----------------------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| EN ISO 3696          | siehe | DIN ISO 3696*                                                                          |
| ISO 5725 (all parts) | siehe | DIN ISO 5725-1<br>DIN ISO 5725-2<br>DIN ISO 5725-3<br>DIN ISO 5725-5<br>DIN ISO 5725-6 |

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

---

\* Die Internationale Norm ISO 3696:1987 wurde 1995 von CEN als EN ISO 3696:1995 übernommen. Davor war ISO 3696:1987 bereits als DIN ISO 3696:1991-06 in das Deutsche Normenwerk aufgenommen worden. Für EN ISO 3696:1995 erfolgte eine Anerkennungsnotiz, die Nummer DIN ISO 3696 wurde beibehalten.

## Nationaler Anhang NA (informativ)

### Literaturhinweise

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN ISO 5725-3, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 3: Präzisionsmaße eines vereinheitlichten Messverfahrens unter Zwischenbedingungen*

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

DIN ISO 5725-6, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 6: Anwendung von Genauigkeitswerten in der Praxis*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Lebensmittel —  
Bestimmung von Ergotalkaloiden in Getreiden und  
Getreideerzeugnissen mit dSPE-Reinigung und LC-MS/MS

Foodstuffs —  
Determination of ergot alkaloids in cereals and cereal  
products by dSPE clean-up and HPLC-MS/MS

Produits alimentaires —  
Dosage des alcaloïdes de l'ergot dans les céréales  
et les produits céréaliers par purification par dSPE et  
CL-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 21. September 2020 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 .....                                                       | 4     |
| Einleitung .....                                                                 | 5     |
| 1 Anwendungsbereich .....                                                        | 6     |
| 2 Normative Verweisungen .....                                                   | 6     |
| 3 Begriffe .....                                                                 | 6     |
| 4 Kurzbeschreibung .....                                                         | 6     |
| 5 Chemikalien .....                                                              | 6     |
| 6 Geräte und Ausrüstung .....                                                    | 9     |
| 7 Durchführung .....                                                             | 10    |
| 7.1 Probenvorbereitung .....                                                     | 10    |
| 7.2 Extraktion der Ergotalkaloide .....                                          | 10    |
| 7.2.1 Vorsichtsmaßnahmen .....                                                   | 10    |
| 7.2.2 Untersuchungsprobe .....                                                   | 10    |
| 7.2.3 Aufstocken .....                                                           | 10    |
| 7.2.4 Probenextraktion .....                                                     | 10    |
| 7.2.5 Reinigung .....                                                            | 10    |
| 8 LC-MS/MS-Analyse .....                                                         | 11    |
| 8.1 Allgemeines .....                                                            | 11    |
| 8.2 Aufbau der Messserien und Analysensequenz .....                              | 11    |
| 8.3 Identifizierung .....                                                        | 11    |
| 8.4 Kalibrierung .....                                                           | 11    |
| 9 Berechnung .....                                                               | 12    |
| 9.1 Berechnung der einzelnen Ergotalkaloidkonzentrationen .....                  | 12    |
| 9.2 Berechnung der Konzentration an Gesamtergotalkaloiden .....                  | 12    |
| 10 Präzision .....                                                               | 12    |
| 10.1 Allgemeines .....                                                           | 12    |
| 10.2 Wiederholpräzision .....                                                    | 13    |
| 10.3 Vergleichpräzision .....                                                    | 13    |
| 11 Prüfbericht .....                                                             | 13    |
| Anhang A (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme .....   | 14    |
| A.1 Systemeinstellungen für Waters® Xevo® TQ-S Mass Spectrometer .....           | 14    |
| A.1.1 Einstellungen für Chromatographie .....                                    | 14    |
| A.1.2 Detektorparameter .....                                                    | 15    |
| A.2 Systemeinstellungen für Micromass® Quattro Ultima Pt Mass Spectrometer ..... | 17    |
| A.2.1 Einstellungen für Chromatographie .....                                    | 17    |
| A.2.2 Detektorparameter .....                                                    | 17    |
| A.3 Systemeinstellungen für SCIEX API 5500 Mass Spectrometer .....               | 19    |
| A.3.1 Einstellungen für Chromatographie .....                                    | 19    |
| A.3.2 Detektorparameter .....                                                    | 20    |
| A.4 Andere LC-Bedingungen .....                                                  | 22    |
| Anhang B (informativ) Typische Chromatogramme .....                              | 23    |

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| Anhang C (informativ) Präzisionsdaten..... | 29 |
| Anhang D (informativ) Datenvergleich ..... | 39 |
| Literaturhinweise.....                     | 40 |

## **Europäisches Vorwort**

Dieses Dokument (EN 17425:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2021, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 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 wurde im Rahmen eines Mandats erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation 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

Ergotalkaloide gehören zu den Mykotoxinen, die von verschiedenen Pilzarten der Gattung *Claviceps* gebildet werden, die auf Getreiden und Futtergras wachsen. Diese Toxine sind eine Gefahr für Verbraucher, da sie in die Lebensmittelkette gelangen können. Alle Ergotalkaloide haben eine gemeinsame Struktur, das Ergolin-System, und sind in verschiedene Klassen aufgeteilt, je nach Vorhandensein funktionaler Gruppen. Das chirale Kohlenstoffatom C-8 ist verantwortlich für die Epimerisierung.

Die Isomere jeder dieser Verbindungen sind üblicherweise benannt als „-ine“ und „-inine“. Daneben können Ergocryptin und Ergocryptinin sowohl jeweils als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen auftreten.

**WARNUNG 1 — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, müssen geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen getroffen werden. Die aktuelle Version der Gefahrenstoffverordnung, Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 [3], sowie geeignete nationale Mitteilungen sollten berücksichtigt werden.**

**WARNUNG 2 — Die Anwendung dieses Dokuments kann die Verwendung gefährlicher Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte einschließen. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung festzulegen, welche einschränkenden Vorschriften gelten.**

**WARNUNG 3 — Ergotalkaloide können gefäßverengende, neurotoxische sowie reproduktions- und entwicklungsbeeinträchtigende Effekte verursachen und können akut und chronisch toxisch sein [4].**

## 1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren für die Bestimmung der Summe von sechs Ergotalkaloiden (Ergocornin, Ergometrin, Ergocristin, Ergotamin, Ergosin und Ergocryptin) und ihrer -inin-Epimerenpaare, wobei die Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) nach Reinigung durch dispersive Festphasenextraktion (dSPE) zum Einsatz kommt.

Dieses Verfahren wurde für die Summe von zwölf Ergotalkaloiden im Bereich von 13,2 µg/kg bis 168 µg/kg in Roggenmehl, Roggenbrot und Getreideerzeugnissen (Frühstückscerealien, Frühstückscerealien für Kleinkinder und Knäckebrötchen), die Roggen als Inhaltsstoff enthielten, wie auch in Vollkornmehl und einer Mehlmischung aus Roggen und Gerste validiert.

Das Verfahren erbrachte zufriedenstellende Ergebnisse im Bereich von 24,1 µg/kg bis 168 µg/kg, allerdings betrugen die RSD<sub>R</sub>-Werte bei den niedrigeren Konzentrationen mehr als 44 % und die HorRat-Werte überschritten 2,0, was darauf hinweist, dass das Verfahren möglicherweise als nicht zufriedenstellend bei Konzentrationen unter 24 µg/kg für die Summe der Ergotalkaloide zu bewerten ist. Dennoch ist das Verfahren bei diesen Konzentrationen zum Screening geeignet.

## 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, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696)*

## 3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

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

## 4 Kurzbeschreibung

Die Ergotalkaloide werden aus Getreiden und Getreideerzeugnissen mit einem Puffer bei pH 8,9 extrahiert und mit einem dispersiven Festphasenmaterial gereinigt, filtriert und mit Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) detektiert und quantifiziert.

## 5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Lösemittel müssen, wenn nicht anders festgelegt, von geeignetem Reinheitsgrad für die LC-Analyse sein.

ANMERKUNG Ergometrin und Ergotamin sind in der Verordnung (EC) Nr. 273/2004 [5] betreffend Drogenausgangsstoffe in der Kategorie 1 gelistet. Um diese Substanzen (und ihre entsprechenden -inin-Epimere) käuflich zu erwerben oder zu lagern, ist eine entsprechende Lizenz erforderlich.

- 5.1 Ergocornin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.2 Ergocorninin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.3 Ergocristin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.4 Ergocristinin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.5  $\alpha$ -Ergocryptin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.6  $\alpha$ -Ergocryptinin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.7 Ergometrin (Maleat)**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.8 Ergometrinin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.9 Ergosin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.10 Ergosinin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.11 Ergotamin (Tartrat)**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.12 Ergotaminin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.13 Acetonitril**, LC-MS-Reinheitsgrad.
- 5.14 Methanol**, LC-Reinheitsgrad.
- 5.15 Wasser**, geeignet für LC-MS/MS.
- 5.16 Festphasen-Extraktionsmaterial**, Bulk Sorbens mit einem primären und einem sekundären Amin (PSA) 40  $\mu\text{m}$ , 10 g; z. B. Bondesil <sup>TM</sup>,<sup>1</sup>.
- 5.17 Natriumhydroxid (NaOH)**, analytischer Reinheitsgrad.
- 5.18 Natriumhydroxid-Lösung**, Stoffmengenkonzentration  $c(\text{NaOH}) = 1,0 \text{ mol/l}$ .
- 4 g NaOH (5.17) werden in Wasser (5.15) gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
- 5.19 Salzsäure (HCl)**, analytischer Reinheitsgrad, Volumenanteil  $\varphi(\text{HCl}) = 37 \%$  (acidimetrisch), Dichte 1,18 g/cm<sup>3</sup> (20 °C).
- 5.20 Salzsäure-Lösung**, Stoffmengenkonzentration  $c(\text{HCl}) = 1,0 \text{ mol/l}$ .
- 8,3 ml HCl (5.19) werden in Wasser (5.15) gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
- 5.21 Ammoniumcarbonat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)**, LC-MS Reinheitsgrad.
- 5.22 Ammoniumcarbonat-Lösung**, Massenkonzentration  $\rho((\text{NH}_4)_2\text{CO}_3) = 200 \text{ mg/l}$ ; pH = 8,9  $\pm$  0,3.

---

1 Bondesil <sup>TM</sup> ist ein Handelsname eines von verschiedenen Lieferanten kommerziell erhältlichen Produktes. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

200 mg Ammoniumcarbonat (5.21) werden auf 1 mg eingewogen und in eine 1-l-Glasflasche überführt. 500 ml Wasser (5.15) werden zugegeben und die Flasche wird kräftig geschüttelt, um sicherzustellen, dass alle Feststoffe gelöst sind.

Nach der Auflösung wird der pH-Wert auf  $\text{pH} = 8,9 \pm 0,3$  mit Natriumhydroxid-Lösung (5.18) oder Salzsäurelösung (5.20) entsprechend eingestellt und die Flasche wird bis zur Marke mit Wasser (5.15) aufgefüllt.

Diese Lösung kann 3 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

### 5.23 Extraktionslösemittel.

Acetonitril (5.13) und Ammoniumcarbonat-Lösung (5.22) (84 + 16, V + V) werden gemischt und kräftig geschüttelt.

### 5.24 Einzelne Stammlösungen, $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$ , in Acetonitril.

Das Auflösen der einzelnen Ergotalkaloide (5.1 bis 5.12) als Filme erfolgt nach den entsprechenden Herstelleranweisungen. Falls kristallines Material verwendet wird, werden 5 mg jeder Standardsubstanz (5.1 bis 5.12) als Feststoff auf 0,2 mg jeweils in Wägeschiffchen aus Glas eingewogen, quantitativ in einzelne 50-ml-Messkolben überführt, die anschließend bis zur Marke mit Acetonitril (5.13) aufgefüllt werden. Um eine vollständige Auflösung sicherzustellen, wird für Ergometrin (5.7) und Ergometrinin (5.8) eine Mischung aus Acetonitril (5.13) und Wasser (5.15) (90 + 10, V + V) empfohlen. Die Lösung wird kräftig geschüttelt.

### 5.25 Gemischte Standardlösung $\rho = 0,5 \mu\text{g/ml}$ .

50  $\mu\text{l}$  jeder einzelnen Stammlösung (5.24) wird in denselben 10-ml-Messkolben pipettiert (6.5), und dieser bis zur Marke mit Acetonitril (5.13) aufgefüllt.

Wenn einzelne Stammlösungen verwendet werden, deren Massenkonzentration von  $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$  abweicht, wird das Volumen, das zur Herstellung einer gemischten Standardlösung von  $0,5 \mu\text{g/ml}$  erforderlich ist, berechnet.

### 5.26 Kalibrierlösungen.

Beispielsweise werden die Kalibrierlösungen nach Tabelle 1 hergestellt. Verschiedene Volumina der gemischten Standardlösung (5.25) werden in Messkolben eingebracht und bis zur Marke mit Acetonitril (5.13) aufgefüllt.

Tabelle 1 — Beispiele geeigneter Kalibrierlösungen

| Kalibrier-<br>lösung | Gemischte<br>Standardlösung<br>(5.25)<br>$\mu\text{l}$ | Endvolumen<br><br>ml | Massen-<br>konzentration an<br>Alkaloiden<br><br>ng/ml | entspricht<br>Massenanteil an<br>Alkaloiden<br><br>$\mu\text{g/kg}$ |
|----------------------|--------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 1                    | 10                                                     | 50                   | 0,1                                                    | 0,5                                                                 |
| 2                    | 20                                                     | 50                   | 0,2                                                    | 1                                                                   |
| 3                    | 10                                                     | 5                    | 1                                                      | 5                                                                   |
| 4                    | 20                                                     | 5                    | 2                                                      | 10                                                                  |
| 5                    | 40                                                     | 5                    | 4                                                      | 20                                                                  |
| 6                    | 100                                                    | 5                    | 10                                                     | 50                                                                  |

## 6 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborgeräte und Ausrüstung und insbesondere die Folgenden. Sofern nicht anders angegeben, müssen volumetrische Glaswaren der Güteklasse "A" sein. Ergotalkaloide sind empfindlich gegenüber Epimerisation durch Licht und nach Möglichkeit muss Braunglas verwendet werden.

**6.1 Laborwaage**, Fehlergrenze: 0,01 g.

**6.2 Analysenwaage**, Fehlergrenze: 0,1 mg.

**6.3 Einstufige oder mehrstufige Mühle.**

**6.4 Extraktionsgefäße mit Verschluss**, ausreichend für 50 ml Extraktionslösemittel und 10 g Probe, z. B. 100 ml.

**6.5 Pipette, einstellbar**, z. B. 25 µl, 50 µl, 250 µl, 1 000 µl, geeignet für organische Lösemittel, mit Einweg-Pipettenspitzen.

**6.6 Laborschüttler**, für die Lösemittlextraktion mit geeigneten 100-ml-Flaschen.

**6.7 Faltenfilter**, Durchmesser 12,5 cm, gehärtet, Grad 54.

**6.8 Gefäße mit Verschluss**, 40-ml-Braunglasgefäße.

**6.9 Gefäße mit Verschluss**, 4,0-ml-Braunglasgefäße.

**6.10 Kunststoff Luer-Lock-Spritze**, 1 ml.

**6.11 Polytetrafluorethylen (PTFE) Spritzenvorsatzfilter aus Kunststoff**, 13 mm × 0,22 µm.

**6.12 Gefäße mit Verschluss**, 2,0-ml-Braunglasgefäße.

**6.13 Autosampler-Fläschchen, geeignet für LC-MS/MS**, z. B. 200 µl.

**6.14 LC-MS/MS-System, bestehend aus:**

**6.14.1 LC-Pumpe**, geeignet für binäre Gradientenelution mit den für die Analysensäule geeigneten Flussraten mit ausreichender Genauigkeit.

**6.14.2 Injektionssystem**, geeignet zum Injizieren eines geeigneten Volumens der Injektionslösung mit ausreichender Genauigkeit.

**6.14.3 LC-Säule**, geeignet, Ergotalkaloide zurückzuhalten, vorzugsweise mit einem Retentionsfaktor von mindestens 2. Die Säule muss für mobile Phasen mit einem pH-Wert von > 7 geeignet sein.

**6.14.4 Säulenfilter**, in-line-Filter, geeignet für die verwendete LC-Säule (6.14.3).

**6.14.5 Säulenofen**, der eine konstante Temperatur aufrechterhalten kann.

**6.14.6 Tandem-Massenspektrometer (MS/MS)**, geeignet zur Ionisierung der Ergotalkaloide (zu positiven Ionen) und für „Selected Reaction Monitoring“ (SRM) mit einem ausreichend großen dynamischen Bereich.

Jede Ionisationsquelle, die ausreichende Ionenausbeuten liefert, darf verwendet werden.

**6.14.7 Datenauswertesystem**

## 7 Durchführung

### 7.1 Probenvorbereitung

Die Laborprobe wird vor der Analyse mit einer Mühle, mit einer Maschen- oder Siebgröße von 0,5 mm oder kleiner (6.3), gemahlen und homogenisiert.

Je nach Ausgangsmaterial (gemahlen oder ungemahlen), ist es angeraten, die Probe zuerst durch ein 1-mm-Sieb zu mahlen, um zu starke Hitzeentwicklung während des Mahlens zu vermeiden, die zur teilweisen Zersetzung der Analyten führen könnte. Dann wird die Probe durch ein 0,5-mm-Sieb gemahlen.

Die Proben werden vor Entnahme der Einwaage gut gemischt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### 7.2 Extraktion der Ergotalkaloide

#### 7.2.1 Vorsichtsmaßnahmen

Ergotalkaloide epimerisieren leicht durch Lichteinfluss, und daher muss nach Möglichkeit Braunglas verwendet werden. Die Analyse sollte unmittelbar nach der Extraktion erfolgen. Nur, wenn es absolut erforderlich ist, dürfen die Extrakte über Nacht bei 4 °C aufbewahrt werden.

#### 7.2.2 Untersuchungsprobe

10 g Probe werden auf 0,05 g in ein Extraktionsgefäß (6.4) eingewogen.

Es darf auch eine größere Probenmenge gewählt werden. In diesem Falle muss die Menge an Extraktionslösemittel entsprechend angepasst werden (7.2.4).

#### 7.2.3 Aufstocken

10 g  $\pm$  0,05 g „Blind“probe werden mit 200 µl gemischter Standardlösung (5.25) versetzt. Die aufgestockten Proben werden trocknen gelassen. Die Proben werden nach 7.2.4 extrahiert. Wenn eine höhere Einwaage an Untersuchungsprobe verwendet wird, wird das Aufstockvolumen entsprechend angepasst.

#### 7.2.4 Probenextraktion

50 ml Extraktionslösemittel (5.23) werden unter Verwendung eines Messzylinders in das Gefäß (6.4) gegeben.

Die Probengefäße werden in den Laborschüttler (6.6) gestellt und etwa 30 min bei mittlerer Geschwindigkeit geschüttelt.

Während die Proben geschüttelt werden, werden ausreichend Glastrichter mit Faltenfilter (6.7) vorbereitet, um die Proben in 40-ml-Braunglasgefäße (6.8) zu filtrieren.

Nach dem Schütteln der Proben wird jeder Kolben jeweils einzeln etwa 10 s manuell geschüttelt, bevor der Inhalt über Glastrichter und Faltenfilter (6.7) in 40-ml-Braunglasgefäße (6.8) überführt wird.

#### 7.2.5 Reinigung

1 ml Probenfiltrat wird in ein 4-ml-Braunglasgefäß (6.9), das (50  $\pm$  5) mg des SPE-Materials (5.16) enthält, überführt.