

DIN EN 17683**DIN**

ICS 65.120

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Futtermitteln mittels
LC-MS/MS;
Deutsche Fassung EN 17683:2023**

Animal feeding stuffs –
Methods of sampling and analysis –
Determination of pyrrolizidine alkaloids in animal feeding stuff by LC-MS/MS;
German version EN 17683:2023

Alimentation animale –
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Dosage des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans l'alimentation animale par CL-SM/SM;
Version allemande EN 17683:2023

Gesamtumfang 71 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17683:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

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

Dieses Dokument enthält neben den gesetzlichen Einheiten auch die Einheit $\langle \text{psi} \rangle$, die in Deutschland nicht zugelassen ist. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Anwendung dieser Einheit im nationalen amtlichen und geschäftlichen Verkehr auf Grund des Gesetzes über Einheiten im Messwesen und die Zeitbestimmung (EinhZeitG) nicht zulässig ist. Die Angabe dieser Einheit dient lediglich als Hilfe im amtlichen und geschäftlichen Verkehr (z. B. bei Einfuhr und Ausfuhr) mit solchen Staaten, die diese Einheit anwenden.

Umrechnung:

Nicht zugelassene Einheit	Zugelassene Einheit	Umrechnung
psi	Pa	1 psi = 6 894,757 Pa

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

ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 5725-3	siehe	DIN ISO 5725-3

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

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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*

Deutsche Fassung
Futtermittel —
Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Futtermitteln
mittels LC-MS/MS

Animal feeding stuffs —
Methods of sampling and analysis —
Determination of pyrrolizidine alkaloids in animal
feeding stuff by LC-MS/MS

Alimentation animale —
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse —
Dosage des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans
l'alimentation animale par CL-SM/SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 17. Januar 2023 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	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
4.1 Allgemeines	8
4.2 Reagenzien	8
4.3 Analysestandards	8
4.4 Chemikalien	9
4.5 Lösungen	9
4.5.1 Eine 0,05-mol/l-Extraktionslösung von wässriger Schwefelsäure	9
4.5.2 Wässrige ammoniakalische Lösung (20/80) (Volumenanteil in %) zur Neutralisierung der Extrakte vor der SPE	9
4.5.3 Beispiele für mobile HPLC-Phasen	10
4.5.4 PA-Stammlösungen	10
4.5.5 Standard-Arbeitslösung (PA-Mischung), 1 µg/ml	10
5 Geräte	10
6 Durchführung	12
6.1 Allgemeines	12
6.2 Probenvorbereitung	12
6.3 Extraktion	13
6.4 SPE-Verfahren	13
6.5 Rekonstitution der Probe	14
6.6 Proben zur Qualitätskontrolle	14
6.7 Kalibrierung mithilfe von matrixangepassten Standards (MMS)	14
7 HPLC-MS/MS-Analyse	15
7.1 Flüssigchromatographische Trennung	15
7.2 Massenspektrometrische Betriebsbedingungen	15
7.3 Analysensequenz	16
8 Ergebnisse	16
8.1 Peakidentifizierung	16
8.2 Kalibrierfunktion	16
8.3 Quantifizierung	17
8.4 Angabe der Ergebnisse	17
8.5 Qualitätskontrolle - Leistungskriterien	17
9 Präzision	18
9.1 Allgemeines	18
9.2 Wiederholpräzision	18
9.3 Vergleichpräzision	18
10 Prüfbericht	19
Anhang A (informativ) Präzisionsdaten	20

A.1	Allgemeines	20
Anhang B (informativ) Beispiel für LC-MS/MS-Bedingungen		53
B.1	Allgemeines	53
B.2	Chromatographische Bedingungen	53
B.3	Massenspektrometrische Bedingungen.....	54
Anhang C (informativ) Beispiel LC-MS/MS-Chromatogramm eines Pyrrolizidinalkaloid-Gemisches.....		57
Anhang D (informativ) Verfahrensprotokoll zur Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Futtermitteln mittels LC-MS/MS nach Reduktion von N-Oxiden mit metallischem Zink		58
D.1	Allgemeines	58
D.2	Einleitung	58
D.3	Kurzbeschreibung.....	58
D.3.1	Allgemeines	58
D.3.2	Reagenzien.....	59
D.3.3	Analysestandards.....	59
D.3.4	Chemikalien.....	59
D.3.5	Lösungen.....	59
D.3.6	Geräte.....	59
D.3.7	Durchführung	60
D.3.8	HPLC-MS/MS-Analyse	61
D.3.9	Ergebnisse	61
D.4	Ergebnisse	62
D.5	Leistungsdaten des Verfahrens.....	63
D.5.1	Leistungsdaten des Verfahrens, die während der Validierung in einem einzelnen Labor gewonnen wurden	63
D.5.2	Während des Ringversuchs erhaltene Leistungsdaten des Verfahrens.....	63
D.6	Bericht	67
Anhang E (informativ) Liste der potentiell ko-eluierenden Pyrrolizidinalkaloid(PA)-Isomere.....		68
Literaturhinweise.....		69

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17683:2023) 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 September 2023, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis September 2023 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 Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

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

Pyrrolizidinalkaloide (PA) sind Sekundärmetaboliten von Blütenpflanzen. Die Einnahme hoher Dosen führt zu akuten Leberschäden. In Tierversuchen haben sich einige PA als genotoxische Karzinogene erwiesen. PA sind daher unerwünschte Stoffe in Lebens- und Futtermitteln [1], [2]. Es wurde über Vergiftungen bei Tieren berichtet, wobei bekannte Ausbrüche auf *Heliotropium*-, *Trichodesma*-, *Senecio*- und *Crotalaria*-Arten zurückzuführen sind. Im Allgemeinen meiden Weidetiere PA-tragende Pflanzen. Werden jedoch Unkrautpflanzen für die Produktion von Heu, Silage oder anderen pflanzlichen Futtermitteln verwendet, können die Tiere bei der Fütterung nicht mehr unterscheiden, da die Toxine die Lagerungsprozesse überleben und vollständig mit dem Futter vermischt werden. Daher werden analytische Verfahren zur Kontrolle des PA-Gehalts in Futtermitteln benötigt [1], [2]. Dieses Dokument beschreibt Probenahme- und Analyseverfahren für die Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Futtermitteln mittels LC-MS/MS.

Das Verfahren wurde in einem Ringversuch für die Matrices Alleinfuttermittel für Pferde, Ergänzungsfuttermittel für Pferde, Ergänzungsfuttermittel für Nagetiere, Heu, Alfalfa und Grassilage erfolgreich validiert. Die Validierung wurde für die in Abschnitt 1 beschriebenen PA- und Konzentrationsbereiche durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die PA-Isomerenpaare Senecivernin und Senecionin sowie Senecivernin-N-Oxid und Senecionin-N-Oxid aufgrund unzureichender chromatographischer Trennung nicht einzeln bestimmt werden können. Die Summen der einzelnen PA der Isomerenpaare wurden jedoch mit ausreichender Vergleichspräzision quantifiziert. Die Ko-Elution von anderen PA-Isomeren, die nicht in den Anwendungsbereich des Verfahrens fallen, muss berücksichtigt werden. Eine Liste der potentiell ko-eluierenden Isomere ist in der Verordnung (EU) 2020/2040 der Kommission [3] enthalten.

Obwohl der Kalibrierbereich des Verfahrensprotokolls von 10 µg/kg bis 300 µg/kg festgelegt ist, zeigten die Ergebnisse des Ringversuchs, dass die Verdünnung von Probenextrakten mit Blindprobenextrakten die Quantifizierung von Konzentrationen ermöglicht, die den Kalibrierbereich überschreiten. Eine zufriedenstellende Vergleichspräzision wurde bei der Quantifizierung von bis zu 1 428 µg/kg für einzelne PA und bis zu 887 µg/kg für die Summe der Isomerenpaare erreicht.

WARNUNG — Die Verwendung dieses Protokolls beinhaltet gefährliche Materialien, Vorgänge und Geräte. Dieses Protokoll erhebt nicht den Anspruch, alle Sicherheitsprobleme im Zusammenhang mit seiner Verwendung zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Protokolls, geeignete Gesundheits- und Sicherheitspraktiken festzulegen und die Vereinbarkeit mit behördlichen Einschränkungen vor der Verwendung zu bestimmen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden (PA) in den in Tabelle 1 angegebenen Konzentrationsbereichen in Allein- und Ergänzungsfuttermitteln sowie in Grünfüttermitteln mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) nach Aufreinigung durch Festphasenextraktion (SPE, en: solid phase extraction) fest.

Tabelle 1 — Zusammenfassung der im Ringversuch geprüften Konzentrationsbereiche je PA

Geprüftes Pyrrolizidinalkaloid (PA)	Abkürzung	Geprüfter Konzentrationsbereich ^a µg/kg	
		von	bis
Echimidin	Em	20	435
Echimidin-N-Oxid	EmN	5	30
Erucifolin	Er	20	245
Erucifolin-N-Oxid	ErN	20	370
Europin	Eu	15	330
Europin-N-Oxid	EuN	25	285
Heliotrin	Hn	25	280
Heliotrin-N-Oxid	HnN	25	245
Jacobin	Jb	20	230
Jacobin-N-Oxid	JbN	20	215
Lasiocarpin	Lc	20	350
Lasiocarpin-N-Oxid	LcN	5	250
Intermedin	Im	25	560
Intermedin-N-Oxid	ImN	5	395
Lycopsamin	La	25	500
Lycopsamin-N-Oxid	LaN	20	280
Monocrotalin	Mc	20	360
Monocrotalin-N-Oxid	McN	20	365
Retrorsin	Re	250	375
Retrorsin-N-Oxid	ReN	5	285
Senecionin ^b	Sc	25	205
Senecionin-N-Oxid ^b	ScN	5	300
Senecivernin ^b	Sv	20	205
Senecivernin-N-Oxid ^b	SvN	5	165
Senkirkin	Sk	20	275
Seneciphyllin	Sp	25	225
Seneciphyllin-N-Oxid	SpN	5	225

Geprüftes Pyrrolizidinalkaloid (PA)	Abkürzung	Geprüfter Konzentrationsbereich ^a	
		von	bis
Trichodesmin	Td	5	250
Intermedin + Lycopsamin	Im+La	50	890
Intermedin-N-Oxid + Lycopsamin-N-Oxid	ImN+LaN	5	645
Senecivernin + Senecionin	Sv+Sc	30	280
Senecivernin-N-Oxid + Senecionin-N-Oxid	SvN+ScN	10	380

^a Gerundete Zahlen.

^b Einzelne PA der Isomerenpaare Sv+Sc und SvN+ScN wurden aufgrund unzureichender chromatographischer Trennung nicht statistisch ausgewertet.

ANMERKUNG 1 Ein zweites Verfahren war Teil des Haupt-Ringversuchs zur Verfahrensvalidierung. Bei diesem Verfahren werden PA-N-Oxide durch Zugabe von Zinkpulver zum Extrakt des Futtermittels reduziert. Die folgenden Schritte entsprechen dem ersten und wichtigsten Verfahren. Die quantitativen Ergebnisse für jedes PA mit Ausnahme des PA vom Otonecin-Typ Senkirkin stellen die Summe der freien PA-Base und ihres entsprechenden N-Oxids dar.

ANMERKUNG 2 Aufgrund einer unzureichenden Anzahl von Daten für einige Analyt-Matrix-Kombinationen war die statistische Auswertung für die Normung nicht gültig. Die erhaltenen Daten weisen auf die Anwendbarkeit des Verfahrens in erfahrenen Laboren mit entsprechenden Qualitätssicherungsmaßnahmen hin. Daher ist die Verfahrensbeschreibung als informativer Anhang (Anhang D) beigelegt.

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

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Eine Prüfmenge von 2 g Futtermittel wird zur PA-Extraktion zweimal in wässriger Schwefelsäurelösung beschallt. Nach der Zentrifugation wird ein Aliquot des Überstandes durch Festphasenextraktion (SPE) mit Umkehrphasenmaterial (C18) gereinigt. PA werden mit Methanol aus der Kartusche gelöst. Anschließend wird das Eluat zur Trockne verdampft und in Methanol/Wasser rekonstituiert (HPLC-Ausgangsbedingungen).

Für die chromatographische Trennung wird eine RP-HPLC-Säule mit einem binären Gradienten verwendet. Die Analyten werden mittels dreistufiger Quadrupol-Massenspektrometrie nachgewiesen. Die Quantifizierung von PA erfolgt mithilfe einer matrixangepassten Kalibrierung.

4.2 Reagenzien

Alle Chemikalien sollten mindestens analysenrein sein. Hinweise auf Produkte oder Anbieter dienen nur der allgemeinen Information und bedeuten nicht, dass andere Produkte oder Hersteller mit den gleichen oder ähnlichen Eigenschaften ausgeschlossen sind.

Wenn nicht anders angegeben, werden nur analysenreine Reagenzien und Lösemittel, die für HPLC-MS/MS geeignet sind, verwendet.

4.3 Analysestandards

4.3.1 **Senecionin (Sc)**, CAS-Nr.: 130-01-8

4.3.2 **Senecionin-N-Oxid (ScN)**, CAS-Nr.: 13268-67-2

4.3.3 **Seneciphyllin (Sp)**, CAS-Nr.: 480-81-9

4.3.4 **Seneciphyllin-N-Oxid (SpN)**, CAS-Nr.: 38710-26-8

4.3.5 **Monocrotalin (Mc)**, CAS-Nr.: 315-22-0

4.3.6 **Monocrotalin-N-Oxid (McN)**, CAS-Nr.: 35337-98-5

4.3.7 **Retrorsin (Re)**, CAS-Nr.: 480-54-6

4.3.8 **Heliotrin (Hn)**, CAS-Nr.: 303-33-3

4.3.9 **Heliotrin-N-Oxid (HnN)**, CAS-Nr.: 6209-65-0

4.3.10 **Trichodesmin (Td)**, CAS-Nr.: 548-90-3

4.3.11 **Retrorsin-N-Oxid (ReN)**, CAS-Nr.: 15503-86-3

4.3.12 **Echimidin (Em)**, CAS-Nr.: 520-68-3

4.3.13 **Echimidin-N-Oxid (EmN)**, CAS-Nr.: 41093-89-4

4.3.14 **Intermedin (Im)**, CAS-Nr.: 10285-06-0

4.3.15 **Intermedin-N-Oxid (ImN)**, CAS-Nr.: 95462-14-9

4.3.16 **Lycopsamin (La)**, CAS-Nr.: 10285-07-1

4.3.17 Lycopsamin-N-Oxid (LaN), CAS-Nr.: 95462-15-0

4.3.18 Erucifolin (Er), CAS-Nr.: 40158-95-0

4.3.19 Erucifolin-N-Oxid (ErN), CAS-Nr.: 123864-94-8

4.3.20 Senecivernin (Sv), CAS-Nr.: 72755-25-0

4.3.21 Senecivernin-N-Oxid (SvN), CAS-Nr.: 101687-28-9

4.3.22 Jacobin (Jb), CAS-Nr.: 6870-67-3

4.3.23 Jacobin-N-Oxid (JbN), CAS-Nr.: 38710-25-7

4.3.24 Lasiocarpin (Lc), CAS-Nr.: 303-34-4

4.3.25 Lasiocarpin-N-Oxid (LcN), CAS-Nr.: 127-30-0

4.3.26 Europin (Eu) als Europinhydrochlorid, CAS-Nr.: 570-19-4

4.3.27 Europin-N-Oxid (EuN), CAS-Nr.: 65582-53-8

4.3.28 Senkirkin (Sk), CAS-Nr.: 2318-18-5

4.4 Chemikalien

4.4.1 Ameisensäure (HCOOH), 98 – 100 % Massenanteil

4.4.2 Methanol (MeOH) in LC-MS-Qualität

4.4.3 Schwefelsäure (H₂SO₄), 98 % Massenanteil

4.4.4 Ammoniak (NH₃), 32 % Massenanteil

4.4.5 Ammoniumformiat (NH₄COOH) in LC-MS-Qualität

4.4.6 Acetonitril (CH₃CN) in LC-MS-Qualität

4.4.7 Wasser (H₂O) in LC-MS-Qualität doppelt destilliertes Wasser oder Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696

4.5 Lösungen

4.5.1 Eine 0,05-mol/l-Extraktionslösung von wässriger Schwefelsäure

Eine 0,05-mol/l-Lösung von wässriger Schwefelsäure wird vorbereitet. 2,665 ml Schwefelsäure (H₂SO₄) (4.4.3) werden mit Wasser auf 1 l aufgefüllt (4.4.7). Die Extraktionslösung kann bei Lagerung bei Raumtemperatur 1 Monat verwendet werden.

4.5.2 Wässrige ammoniakalische Lösung (20/80) (Volumenanteil in %) zur Neutralisierung der Extrakte vor der SPE

Ein Volumenanteil von 20 % Ammoniak 32 % Massenanteil (4.4.4) wird mit einem Volumenanteil von 80 % Wasser (4.4.7) verdünnt. Die Lösung muss an jedem Arbeitstag vorbereitet werden.

BEISPIEL 5 ml Ammoniak 32 % Massenanteil wird mit 20 ml Wasser (4.4.7) gemischt.

4.5.3 Beispiele für mobile HPLC-Phasen

- Eluent A 5 mmol/l Ammoniumformiat in Wasser mit 0,1 % Ameisensäure:

Es werden 315 mg Ammoniumformiat (4.4.5) abgewogen und in 5 ml Wasser (4.4.7) in einem 1 000-ml-Messkolben gelöst. Anschließend wird 1 ml Ameisensäure (4.4.1) zugegeben und mit Wasser (4.4.7) auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung kann bei Lagerung bei Raumtemperatur 1 Monat verwendet werden.

- Eluent B 5 mmol/l Ammoniumformiat in Methanol mit 0,1 % Ameisensäure:

Es werden 315 mg Ammoniumformiat (4.4.5) abgewogen und in 5 ml Wasser (4.4.7) in einem 1 000-ml-Messkolben gelöst. Anschließend wird 1 ml Ameisensäure (4.4.1) zugegeben und mit Methanol (4.4.2) auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung kann bei Lagerung bei Raumtemperatur 3 Monate verwendet werden.

4.5.4 PA-Stammlösungen

Um eine Stammlösung herzustellen, werden 1 mg bis 10 mg (abhängig von der verfügbaren Menge je gekaufter Einheit) eines Pyrrolizidin-Alkaloid-Standards in einem 10-ml-Messkolben unter Verwendung einer Analysenwaage (5.2) abgewogen und mit einem geeigneten organischen Lösemittel wie Methanol oder Acetonitril auf 10 ml aufgefüllt. Die resultierende Konzentration der Stammlösung beträgt 0,1 mg/ml bis 1 mg/ml. Stammlösungen sind bei Lagerung bei unter -18°C mindestens 2 Jahre stabil.

Wenn die zur Verfügung stehende Analysenwaage keine ausreichende Genauigkeit bietet, müssen größere Mengen abgewogen werden.

ANMERKUNG Anweisungen von Anbietern von Standards können geeignete Lösemittel für die Herstellung von Stammlösungen enthalten, diese müssen aber nicht verwendet werden.

4.5.5 Standard-Arbeitslösung (PA-Mischung), 1 µg/ml

Die entsprechenden Volumina jeder PA-Stammlösung zwischen 0,1 mg/ml und 1 mg/ml (4.5.4) werden mit einer geeigneten Vorrichtung (5.1) in einen Messkolben (5.12) überführt und mit Acetonitril (4.4.6) aufgefüllt, um eine Konzentration von 1 µg/ml für jedes in der Mischung enthaltene PA zu erreichen. Langzeitstabilitätsprüfungen ergaben, dass Acetonitril das am besten geeignete Lösemittel ist, aber nicht verwendet werden muss. Die PA-Mischung ist bei Lagerung bei unter -18°C mindestens 2 Jahre stabil.

Wenn für ein Isomerenpaar (Intermedin(-N-Oxid) und Lycopsamin(-N-Oxid); Senecivernin(-N-Oxid) und Senecionin(-N-Oxid)) keine Grundlinientrennung erreicht werden kann, kann die Summenkonzentration beider PA über die Kalibrierung eines der beiden berechnet werden. Die Zusammensetzung der Standardmischung muss entsprechend vorbereitet werden, indem nur ein Isomer des Paares enthalten ist. Im Falle einer Grundlinientrennung der Isomerenpaare sollten alle PA-Analysestandards, einschließlich 4.3.20 und 4.3.21, in der PA-Mischung enthalten sein.

5 Geräte

Laborausrüstungen und insbesondere die folgenden Elemente werden verwendet.

ANMERKUNG Verweisungen auf Produkte, Messgeräte oder Anbieter dienen nur der allgemeinen Information und bedeuten nicht, dass andere Produkte oder Hersteller mit den gleichen oder ähnlichen Eigenschaften ausgeschlossen sind.

5.1 Verschiedene Kolbenhubpipetten und Mehrfachdispenser und entsprechende Spitzen

5.2 Analysenwaage, mit der auf 0,1 mg gewogen werden kann

5.3 Kammertrockner

5.4 Zentrifugalmühle mit 0,5-mm-Sieb

5.5 Zentrifuge für 50-ml-Zentrifugenröhrchen, geeignet für mindestens 5 000 g

5.6 Laborschüttler

5.7 Überkopfschüttler

5.8 Verdampfungsstation mit oder ohne Vakuumunterstützung

5.9 Ultraschallbad

5.10 Zentrifugenröhrchen, 50 ml

5.11 Kulturröhrchen, 15 ml

5.12 Messkolben, 10 ml und 20 ml

5.13 Faltenfilter

5.14 SPE-Kartuschen: C18, 500 mg Sorptionsmittel

ANMERKUNG Supelco Discovery® DSC18 500 mg/6 ml ist ein Beispiel für ein geeignetes Produkt, das im Handel erhältlich ist¹.

5.15 Indikatorstreifen

5.16 SPE-Vakuumkammer

5.17 Membranfilter, 0,2 µm oder 0,45 µm

Zentrifugalfilter sollten ein Fassungsvermögen von > 0,5 ml haben und eine modifizierte Nylonmembran enthalten. Es können auch andere Filterwerkzeuge verwendet werden.

5.18 HPLC-Fläschchen, 2 ml

5.19 Glaseinsätze, 250 µl konisch, für HPLC-Fläschchen

5.20 Chromatographische Säule

C18-Umkehrphasen-Packungsmaterial, das bei sauren pH-Bedingungen (pH-Wert 2 bis pH-Wert 3) anwendbar ist, geeignet zur Grundlinientrennung von Analyten mit identischer Molekülmasse, Trennung von Isomerenpaaren ist wünschenswert. Andere stationäre Phasen (z. B. Biphenylphasen) oder mobile Phasen (z. B. mit basischem pH-Wert) können verwendet werden, wenn eine vergleichbare oder bessere Grundlinientrennung der Isomere erreicht wird.

5.21 LC-MS/MS-System

Geeignet, um im positiven Ionisationsmodus ein Multiple/Selected Reaction Monitoring bei ausreichend großem Dynamikbereich durchzuführen; zur Trennung von Masseneinheiten geeignet und mit einem rechnergestützten Datenverarbeitungssystem ausgestattet. Es darf jede Ionenquelle eingesetzt werden, die zu einer ausreichenden Ionisierung führt. Beispielhafte Gerätekonfiguration und Messbedingungen sind in Anhang B dargestellt.

1 Supelco Discovery® ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterstützung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

6 Durchführung

6.1 Allgemeines

Futtermittel ist eine komplexe Matrix, die eine Vielzahl von Inhaltsstoffen in unterschiedlichen Mengen enthält, was zu variablen und probenabhängigen Matrixeffekten (Unterdrückung/Verstärkung) führt. Aus diesem Grund muss eine Quantifizierung der Analyten durch eine matrixangepasste Kalibrierung erfolgen.

Der Vergleich von Matrixeffekten verschiedener Futtermittel hat gezeigt, dass es je nach Analyt-Matrix-Kombination einen Unterschied in der Signalunterdrückung von etwa 50 % geben könnte. Da in der Regel eine Vielzahl von Futtermitteln in einer Sequenz analysiert werden kann, kann eine repräsentative Mischung von Blindproben aus Futtermitteln verwendet werden (z. B. 75 % verschiedene Grasarten, wie Heu und Silage, und Leguminosen und 25 % Getreide). Wenn die Sequenz nur Proben eines bestimmten Futtermittels enthält, sollte für die matrixangepasste Kalibrierung eine Blindmatrix verwendet werden, die der Probenmatrix so ähnlich wie möglich ist.

Proben, die den Kalibrierbereich überschreiten, können mit Blindprobenextrakt verdünnt werden. Die Wiederfindung muss mit jeder Probenreihe überprüft werden, die den erforderlichen Wiederfindungsbereich nachweist. Eine Korrektur der Wiederfindung wird durchgeführt, wenn die Wiederfindung entsprechend dem EURL-MP-Leitfaden zu Leistungskriterien für die Analyse von Mykotoxinen und Pflanzentoxinen in Lebens- und Futtermitteln [4] außerhalb von 90 % bis 110 % liegt.

6.2 Probenvorbereitung

Zur Bestimmung der PA-Konzentration, die für die gesamte Probe repräsentativ ist, sollte das Probenmaterial folgende Eigenschaften erfüllen: einheitliche Korngröße und homogene Verteilung. Dazu wird eine entsprechende Portion des Probenmaterials auf eine Korngröße von 0,5 mm zerkleinert (5.4) und z. B. mit einem Überkopfschüttler (5.7) homogenisiert.

Vor dem Zerkleinern werden frische Futtermittelproben (z. B. Silage oder Gras) bei 40 °C bis 45 °C bei Atmosphärendruck für etwa 18 h in einem Trockenofen (5.3) getrocknet. Eingefrorene Proben werden vor dem Trocknen bei Raumtemperatur aufgetaut.

Trockene Proben werden mit Trockeneis gemischt (Verhältnis 2 : 1) und die Mischung wird 10 min stehen gelassen, bevor sie mit einer Ultrazentrifugalmühle (5.4) auf eine Korngröße von 0,5 mm zerkleinert wird. Das zerkleinerte Material wird durch Schütteln, z. B. mit einem Überkopfschüttler (5.7), für 1 h homogenisiert.

ANMERKUNG Das Zerkleinern mit Trockeneis hat sich bewährt, da es aufgrund der Scherkräfte und der Porosität des gefrorenen Probenmaterials hervorragende Zerkleinerungsergebnisse erzielt.

Wenn das Prüfmaterial nicht ohne Wärmeentwicklung auf eine Korngröße von 0,5 mm oder kleiner zerkleinert werden kann, ist auch eine Erhöhung der Einwaage auf mindestens 10 g möglich, um die Repräsentativität der Ergebnisse für die Probe zu erhöhen. Um ein konstantes Verhältnis von Probenmenge zu Extraktionsvolumen zu erhalten, muss das verwendete Volumen der Extraktionslösung (4.5.1) entsprechend erhöht werden.

Die Labore müssen nachweisen, dass die Leistungsfähigkeit des von ihnen verwendeten Homogenisierungsverfahrens ausreichend ist.

6.3 Extraktion

2,0 g $\pm$ 0,1 g der homogenisierten Probe werden in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen (5.10).

- 1) **Extraktionsschritt 1:** 20 ml der Extraktionslösung (4.5.1) werden der Probe zugegeben und gemischt (5.6), um das Probenmaterial vollständig zu benetzen, bevor die Extraktion durch Ultraschall (5.9) für 15 min bei Raumtemperatur erfolgt.

ANMERKUNG 1 Die Extraktion kann auch mit anderen Techniken als der Ultraschallextraktion durchgeführt werden (z. B. mit einem Überkopfschüttler), wenn bei der internen Validierung eine ausreichende Extraktionseffizienz nachgewiesen wurde.

- 2) **Zentrifugation:** Das Röhrchen wird 10 min $\pm$ 2 min bei etwa 3 800 g zentrifugiert (5.5). Der Überstand (Extrakt 1) wird in ein sauberes Zentrifugenröhrchen (5.10) überführt und das Sediment wird für den zweiten Extraktionsschritt verwendet.
- 3) **Extraktionsschritt 2:** Dem Sediment werden 20 ml Extraktionslösung (4.5.1) zugesetzt. Das Zentrifugenröhrchen wird kräftig geschüttelt, um die Probe zu verteilen (die Probe kann bei Bedarf auch gerührt werden), und die Extraktion erfolgt erneut mit Ultraschall für 15 min bei Raumtemperatur.

ANMERKUNG 2 Die Extraktion kann auch mit anderen Techniken als der Ultraschallextraktion durchgeführt werden (z. B. mit einem Überkopfschüttler), wenn bei der internen Validierung eine ausreichende Extraktionseffizienz nachgewiesen wurde.

- 4) **Zentrifugation:** Das Röhrchen wird 10 min $\pm$ 2 min bei etwa 3 800 g zentrifugiert (siehe 5.5) und der Überstand (Extrakt 2) mit Extrakt 1 vermischt.
- 5) **Neutralisation:** Der pH-Wert der vermischten Extrakte wird mit der Neutralisationslösung (4.5.2) auf einen pH-Wert 7 eingestellt. Der pH-Wert wird mit Indikatorstreifen überprüft. In der Regel werden etwa 500 μ l bis 1 000 μ l der Lösung benötigt.
- 6) **Filtration:** Der vollständig neutralisierte Extrakt wird durch ein Filter (z. B. Faltenfilter, siehe 5.13) gegeben oder alternativ zentrifugiert. Ein Aliquot des filtrierten Überstandes wird für die SPE verwendet. Bei größeren Restmengen an Partikeln in der Lösung wird der Filtrationsschritt wiederholt. Dadurch kann eine Verstopfung der SPE-Kartuschen vermieden werden.

6.4 SPE-Verfahren

Bei Verwendung anderer als der unter 5.14 vorgeschlagenen SPE-Kartuschen müssen die Lösemittelvolumina für die Konditionierung, die Probenlast, das Waschen und die Elution angepasst werden. Je nach Festphasenmaterial könnte es notwendig sein, das Eluat bis zum Waschschrift vor dem Trocknen zu schützen.

- 1) **Konditionierungsschritt 1:** 5 ml Methanol (4.4.2) werden auf die SPE-Kartusche (5.14) gegeben und unter Normaldruck durchlaufen gelassen.
- 2) **Konditionierungsschritt 2:** 5 ml Wasser (4.4.7) werden auf die SPE-Kartusche (5.14) gegeben und unter Normaldruck durchlaufen gelassen.
- 3) **Probenaufgabe:** 10 ml des Probenextrakts (vermischte Überstände aus 6.3) werden auf die SPE-Kartusche (5.14) gegeben und durchlaufen gelassen, ohne die Kartusche trocken werden zu lassen.
- 4) **Waschschrift:** Die SPE-Kartusche (5.14) wird mit (2 $\times$ 5) ml Wasser gewaschen.
- 5) **Trocknen der Kartuschen:** Die SPE-Kartuschen (5.14) werden durch Anlegen eines Vakuums für 5 min bis 10 min getrocknet (die Vakuumkammer (5.15) wird verwendet).
- 6) **Elution der PA:** Die Analyten werden mit (2 $\times$ 5) ml Methanol (siehe 4.4.2) aus den SPE-Kartuschen (siehe 5.14) in ein sauberes Reagenzglas (5.11) eluiert. Das Eluat wird unter einem Stickstoffstrom bei 50 °C $\pm$ 5 °C (5.8) oder entsprechend den Empfehlungen für das verwendete Verdampfungsgerät getrocknet.

6.5 Rekonstitution der Probe

Der Rückstand wird in 1 ml Methanol/Wasser (5/95, Volumenanteil in %) unter Schütteln (5.7) gelöst.

Die rekonstituierten Probenextrakte werden durch ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm bis 0,45 µm (5.17) filtriert. Bei Verwendung von Zentrifugalfiltern werden 500 µl der Probe bei 20 000 g für 10 min ± 3 min zentrifugiert. 200 µl des Filtrats werden in ein HPLC-Fläschchen (5.18) mit Glaseinsatz (5.19) überführt.

6.6 Proben zur Qualitätskontrolle

In jeder Probencharge muss die Wiederfindung als Summe von Extraktionseffizienz, Aufreinigung und LC-MS/MS-Nachweis überprüft werden. Vorzugsweise sollte ein Referenzmaterial oder gut charakterisierte positive Proben verwendet werden. Wenn kein Referenzmaterial zur Verfügung steht, kann die Wiederfindung durch Aufstocken eines repräsentativen Futtermittels (siehe 6.1), das frei von PA ist, bestimmt werden. Aufstockverfahren (Beispiel):

BEISPIEL 2 g der Blindprobe aus Futtermittel werden mit PA-Arbeitslösung (4.5.5) aufgestockt, vorgewirbelt oder von Hand kräftig gemischt und 1 h offen stehengelassen, damit das Lösemittel verdampfen kann. Die aufgestockte Probe wird gemeinsam mit den unbekannten Proben analysiert.

ANMERKUNG Die Zugabe von 50 µl der PA-Arbeitslösung (4.5.5) wurde in der Verfahrensvalidierungsstudie verwendet und hat gut funktioniert.

6.7 Kalibrierung mithilfe von matrixangepassten Standards (MMS)

Zur Korrektur von Matrixeffekten wird eine matrixangepasste Kalibrierung verwendet. Um die gleiche Matrixstärke in den MMS (en: matrix matched standards) und in den Proben zu erhalten, muss die Blindprobe wie in Abschnitt 6 beschrieben verarbeitet werden, um einen Blindmatrixextrakt zu erhalten. Anschließend werden die MMS durch Mischen verschiedener Volumina der Standardarbeitslösung mit dem Blindmatrixextrakt hergestellt. Das Volumen des Matrixextrakts sollte in jeder MMS-Lösung mindestens 80 % ausmachen. Kalibrierebenen mit niedriger Konzentration können durch Verdünnen höherer MMS-Ebenen mit Blindprobenextrakt hergestellt werden. Tabelle 2 zeigt ein beispielhaftes Schema für die Herstellung von MMS.

Proben, die PA in einer Konzentration enthalten, die den höchsten Kalibrierwert übersteigt, sollten mit Blindprobenextrakt verdünnt werden, um PA-Werte im Kalibrierbereich zu erhalten.

Tabelle 2 — Beispiel für die Herstellung von matrixangepassten Kalibrierlösungen

Nr. der Kalibrier-ebene	Endgültige PA-Konzentration in der Kalibrierlösung ng/ml	Endgültige PA-Konzentration im Futtermittel µg/kg	Aliquot entnommen aus	Aliquot-Volumen µl	Aliquot entnommen aus dem Blindprobenextrakt µl
1	5	10	MMS_4	20	180
2	10	20	MMS_4	40	160
3	25	50	Standard-Arbeitslösung (1 µg/ml)	5	195
4	50	100	Standard-Arbeitslösung (1 µg/ml)	10	190

Nr. der Kalibrier- ebene	Endgültige PA- Konzentration in der Kalibrier- lösung ng/ml	Endgültige PA- Konzentration im Futtermittel µg/kg	Aliquot entnommen aus	Aliquot- Volumen µl	Aliquot entnommen aus dem Blindproben- extrakt µl
5	75	150	Standard-Arbeits- lösung (1 µg/ml)	15	185
6	100	200	Standard-Arbeits- lösung (1 µg/ml)	20	180
7	125	250	Standard-Arbeits- lösung (1 µg/ml)	25	175
8	150	300	Standard-Arbeits- lösung (1 µg/ml)	30	170

7 HPLC-MS/MS-Analyse

7.1 Flüssigchromatographische Trennung

Die Messungen können mit verschiedenen Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) (5.21) und Trennsäulen (5.20) durchgeführt werden. Die chromatographischen Bedingungen können frei gewählt werden. Die akzeptable Mindestverweilzeit ist das Doppelte der Verweilzeit für das Totvolumen der Säule. Analyten, die nicht mittels Massenspektrometrie unterschieden werden können, sollten chromatographisch getrennt werden. Wenn keine Grundlinientrennung für PA-Isomere erreicht werden kann, kann die Summenkonzentration der PA über die Kalibrierung eines repräsentativen PA bestimmt werden. Die Zusammensetzung der Standardmischung muss entsprechend vorbereitet werden, indem nur eines der ko-eluierenden Isomere aufgenommen wird.

Die Ko-Elution von PA-Isomeren ist bekannt und kann auch PA umfassen, die nicht in den Anwendungsbereich dieses Verfahrens fallen. Anhang E enthält eine Liste von PA, die in unbekannten Proben vorhanden sein können und mit den 28 PA, die in den Ringversuch einbezogen wurden, ko-eluieren könnten. Diese Liste basiert auf der Verordnung (EU) 2020/2040 der Kommission vom 11. Dezember 2020 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 hinsichtlich der Höchstgehalte an Pyrrolizidinalkaloiden in bestimmten Lebensmitteln [3].

Die in Anhang A aufgeführten Bedingungen unter Verwendung einer C18-Säule (5.20) und der in 4.5.3 beschriebenen mobilen Phase haben sich als geeignet erwiesen. Sie werden jedoch exemplarisch gezeigt.

7.2 Massenspektrometrische Betriebsbedingungen

Die Messungen können mit MS/MS-Geräten (5.21) verschiedener Hersteller durchgeführt werden. In Anhang A sind beispielhaft die gerätespezifischen Einstellungen eines Messsystems angegeben. Massenspektrometrische (MS) Bedingungen sollten im Labor mithilfe von reinen Standards optimiert werden, um Analytsignale mit ausreichender Empfindlichkeit und Selektivität zu liefern.

Mindestens zwei Übergänge von den Vorläufer- zu den charakteristischen Produkt-Ionen sollten ausgewählt werden, um in das Verfahren der ausgewählten Reaktionsüberwachung (SRM, en: selected reaction monitoring) aufgenommen zu werden. Vorzugsweise sollte die Masse des protonierten molekularen Mutter-Ions als Vorläufermasse gewählt werden, und die Produkt-Ionen sollten spezifisch für die Verbindung sein. Vorzugsweise sollten keine Produkt-Ionen ausgewählt werden, die durch den Verlust von Wasser aus dem

protonierten Molekül-Ion gebildet werden. Jeder chromatographische Peak sollte aus mindestens 10 MS-Datenpunkten bestehen.

7.3 Analysensequenz

Für die quantitative Analyse werden die folgenden Kriterien festgelegt.

Injektion: Standards und alle Proben, falls gewünscht, werden in zweifacher Ausführung injiziert, um die Wiederholpräzision der MS-Detektion zu beurteilen und eine mögliche Response-Drift während der Sequenz zu überprüfen. Die Response-Drift dient als Parameter für die Qualitätskontrolle (siehe 8.5).

Sequenz: Die folgende Reihenfolge der Analyse sollte in einer Sequenz festgelegt werden:

- 1) Lösemittelblindprobe;
- 2) Matrixangepasste Standards, 1. Injektion;
- 3) Lösemittelblindprobe;
- 4) Proben inklusive Qualitätskontrolle (QC), 1. Injektion;
- 5) Lösemittelblindprobe;
- 6) Matrixangepasste Standards, 2. Injektion;
- 7) Lösemittelblindprobe (optional);
- 8) Proben einschließlich QC, 2. Injektion (optional).

8 Ergebnisse

8.1 Peakidentifizierung

Der qualitative Nachweis erfolgt durch Vergleich der Verweilzeit und relativen Häufigkeit der gemessenen Übergänge (mindestens 2 je Analyt, siehe SANTE/12089/2016 [5]) in der Probe mit denen der Kalibrierstandards. Die maximale Abweichung der Verweilzeit des Analyten in der Probe und den Kalibrierstandards sollte $\pm 0,1$ min betragen. Die Peakflächenverhältnisse der Quantifizierer- und Qualifiziererübergänge des Analyten in der Probe sollten in einem Bereich von ± 30 % der jeweiligen Verhältnisse in den Kalibrierstandards nach intern anerkannten Richtlinien (z. B. SANTE/12089/2016 [5]) liegen. Die Ergebnisse des Ringversuchs haben jedoch gezeigt, dass bei ko-eluierenden Isomerenpaaren die Abweichung der Ionenverhältnisse höher als ± 30 % sein kann.

8.2 Kalibrierfunktion

Zur Bestimmung der Kalibrierfunktion werden die für die Kalibrierebenen (mindestens 3 bis 5) erhaltenen Peakflächen gegen die jeweiligen Konzentrationen aufgetragen. Ein geeigneter Ansatz sollte verwendet werden, um die Kalibrierfunktion für jeden Analyten zu berechnen. Geeignete Kalibrierungen entsprechend dem Leitfaden zu Verfahren der analytischen Qualitätskontrolle und Methodenvalidierung für die Analyse von Pestizidrückständen in Lebens- und Futtermitteln SANTE/12682/2019 [6] und dem EURL-MP-Leitfaden [4] sind lineare oder quadratische Kalibrierungen, mit oder ohne Wägung oder das Erzwingen der Funktion durch Null.

8.3 Quantifizierung

Die quantitative Bestimmung erfolgt nach dem Verfahren des matrixangepassten Standards durch Integration der Peakflächen in Bezug auf die Kalibrierfunktion mithilfe der Gleichung (1).

Je nach Aufbau der Analysesequenz (siehe 7.3) kann zur Quantifizierung des Analyten eine Klammerkalibrierung mit einem Probensatz oder zwei unabhängigen Sätzen von matrixangepassten Standards und Proben angewendet werden.

Bei der Klammerkalibrierung wird die mittlere Kalibrierfunktion der beiden Datensätze der matrixangepassten Standards zur Quantifizierung der Analyten in den Klammerproben (eine Probeninjektion) verwendet. Wenn die Proben zweimal injiziert wurden (keine Klammerung), werden die Analytkonzentrationen für die beiden Injektionen der Proben einzeln berechnet und anschließend zur Berechnung des Mittelwerts verwendet.

$$c_s = \beta \times F = \left[\frac{y - b}{a} \right] \times \frac{V_{\text{extract}}}{m_{\text{weight}}} \times \frac{1}{V_{\text{SPE}}} \times V_{\text{sample}} \quad (1)$$

Dabei ist

c_s	die Konzentration der einzelnen Analyten in der Probe, in µg/kg;
β	die Analytkonzentration in ng/ml im Probenextrakt;
F	der Umrechnungsfaktor von ng/ml in µg/kg;
y	die Peakfläche des Zielanalyten;
a	die Steigung der Kalibrierfunktion (berechnet für $b = 0$, siehe 8.2);
b	der Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion ($b = 0$, wenn die Funktion durch „Null“ erzwungen wird);
V_{extract}	das Volumen der Extraktionslösung, in ml;
m_{weight}	das Probengewicht, in g;
V_{SPE}	das Volumen des für die SPE eingesetzten Extrakts, in ml;
V_{sample}	das Endvolumen der Probenlösung für die LC-MS/MS-Analyse, in ml.

8.4 Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden in µg/kg mit zwei signifikanten Nachkommastellen angegeben. Um die Konzentration in der Probenlösung, in ng/ml, in die Konzentration in der Futtermittelprobe, in µg/kg, umzurechnen, wird ein Faktor von 2 entsprechend dem in Abschnitt 6 beschriebenen Probenvorbereitungsverfahren verwendet.

Eine Korrektur der Wiederfindung wird durchgeführt, wenn die Wiederfindung entsprechend dem EURL-MP-Leitfaden zu Leistungskriterien für die Analyse von Mykotoxinen und Pflanzentoxinen in Lebens- und Futtermitteln [4] außerhalb von 90 % bis 110 % liegt.

8.5 Qualitätskontrolle – Leistungskriterien

Die Wiederfindungskontrolle (siehe 6.6) unter Verwendung einer aufgestockten Probe oder einer gut charakterisierten positiven Probe muss in jeder Probencharge überprüft werden. Tolerierbare Bereiche der Wiederfindung können z. B. 70 % bis 120 % entsprechend dem Leitfaden der EURL-MP zu Leistungskriterien für die Analyse von Mykotoxinen und Pflanzentoxinen in Lebens- und Futtermitteln [4] (in Entwicklung) und Anhang II (Abschnitt 4) der Verordnung (EG) Nr. 401/2006 der Kommission [5] betragen. In einigen Fällen kann eine niedrigere Wiederfindung akzeptiert werden, wenn sie innerhalb des Bereichs der mittleren Wiederfindung $\pm 2 \times \text{RSD}$ aus den Ergebnissen der ersten Verfahrensvalidierung oder der laufenden

Wiederfindung entsprechend dem Leitfaden für die Analyse von Pestizidrückständen [6] liegt. Wiederfindungen außerhalb des akzeptablen Bereichs erfordern geeignete Maßnahmen, z. B. eine erneute Analyse der Probencharge.

Die Qualität der Kalibrierfunktion sollte ebenfalls überwacht werden. Die Abweichung der rückgerechneten Konzentrationen der Kalibrierstandards von den tatsächlichen Konzentrationen unter Verwendung der verwendeten Kalibriergleichung sollte nicht mehr als ± 20 % betragen [6]. Wenn die Eliminierung einzelner abweichender Kalibrierebenen bei einer angemessenen Anzahl von Kalibrierebenen möglich ist, können Analytkonzentrationen innerhalb des angepassten Kalibrierbereichs noch quantifiziert werden. Andernfalls sollte die Probencharge erneut analysiert werden.

Änderungen der Empfindlichkeit während einer Sequenz müssen anhand der Steigungen der 1. und 2. Kalibrierkurve überprüft werden. Die relative Abweichung der beiden Steigungen sollte entsprechend SANTE/12682/2019 [6] nicht mehr als 30 % betragen (wenn die höhere Steigung auf 100 % eingestellt ist). Ist die Response-Drift größer als 30 %, ist eine erneute Analyse der Sequenz erforderlich, es sei denn, es sind keine positiven Proben für den jeweiligen Analyten betroffen.

9 Präzision

9.1 Allgemeines

Die Präzisionsdaten wurden im Rahmen eines Ringversuchs gewonnen. Die Ergebnisse zur Präzision dieses Verfahrens sind in Anhang A detailliert aufgeführt. Neben der Wiederholpräzision und Vergleichpräzision werden auch die funktionellen Zusammenhänge zwischen der gemessenen Konzentration der Analyten und der erzielten Wiederholpräzision und Vergleichpräzision gezeigt.

9.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen an identischen Untersuchungsmaterialien durch einen Bearbeiter unter Verwendung derselben Geräteausstattung innerhalb des kürzestmöglichen Zeitintervalls wird die Wiederholgrenze r in höchstens 5 % der Fälle überschreiten. Sie kann aus der Wiederholstandardabweichung s_r berechnet werden als:

$$r = 2,8 \times s_r \quad (2)$$

Dabei ist

r die Wiederholgrenze;

s_r die Wiederholstandardabweichung.

9.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die an identischem Untersuchungsmaterial in zwei verschiedenen Laboren gewonnen wird, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Vergleichgrenze R überschreiten.

$$R = 2,8 \times s_R \quad (3)$$

Dabei ist

R die Vergleichgrenze;

s_R die Vergleichstandardabweichung.

10 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

- a) Informationen, die für die Identifizierung der Probe erforderlich sind;
- b) das Datum des Eingangs der Probe;
- c) das Datum der Analyse der Probe;
- d) eine Verweisung auf dieses Dokument, d. h. EN 17683:2023;
- e) alle Abweichungen vom Verfahren;
- f) ungewöhnliche Besonderheiten, die beobachtet wurden;
- g) die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie ausgedrückt wurden. Erforderlichenfalls müssen die Wiederfindungsraten zusammen mit den Untersuchungsergebnissen angegeben werden, und es muss angegeben werden, ob die Untersuchungsergebnisse mit diesen Wiederfindungsraten korrigiert wurden.

Anhang A (informativ)

Präzisionsdaten

A.1 Allgemeines

Die folgenden Daten wurden in einem Ringversuch gewonnen, der entsprechend den AOAC-Richtlinien für Ringversuchsverfahren zur Validierung von Merkmalen eines Analyseverfahrens durchgeführt wurde [8]. Ein ausführlicher Bericht über den Ringversuch ist verfügbar [9].

Bei den Materialien F01-F06 und F08-F13 handelte es sich um sechs verschiedene Futtermittel, die mit Extrakten aus PA-Pflanzen und PA-Standardlösungen aufgestockt waren und den Teilnehmern als Blindduplikate zur Verfügung gestellt wurden. Das Material F07 war eine Blindmischung aus verschiedenen Futtermitteln. Das gleiche Material wurde zusätzlich als bekannte Blindprobe für die Herstellung der Wiederfindungsprobe und der matrixangepassten Standardlösungen bereitgestellt. Eine Beschreibung der Materialien ist in Tabelle A.1 enthalten.

Tabelle A.1 — Zusammenfassung der im Ringversuch bereitgestellten unbekannten Probenmaterialien

Probecode	Matrix-Beschreibung	PA-Verunreinigung
F01 (+ F10)	Alleinfuttermittel für Pferde	ja
F02 (+ F08)	Ergänzungsfuttermittel für Pferde	ja
F03 (+ F13)	Ergänzungsfuttermittel für Nagetiere	ja
F04 (+ F12)	Heu	ja
F05 (+ F11)	Alfalfa	ja
F06 (+ F09)	Grassilage	ja
F07	Mischung aus gleichen Teilen Grassilage, Heu, Alfalfa und Kräutermüsli für Pferde	nein (Blindprobe)

Neunzehn Labore nahmen am Haupt-Ringversuch teil, alle haben Ergebnisse eingereicht. Ein Datensatz wurde als Ausreißerlabor nach der Mandel-Statistik ausgeschlossen, weil 75 % der vom Labor gelieferten Daten den kritischen h- oder k-Wert $\alpha = 0,01$ überschritten. Die akzeptierten Datensätze wurden mit klassischer Statistik ausgewertet. Nach der Eliminierung von Ausreißern nach Grubbs, Cochran und Mandel wurden auch Datenpunkte entfernt, die als erratisch angesehen wurden (z. B. Werte, die niedriger als die Hälfte der niedrigsten Kalibrierebene waren, oder Wiederholungsdaten, bei denen einer der Datenpunkte einen negativen Wert hatte).

Die verbleibenden Daten wurden zur Bewertung der Leistungsfähigkeit des Verfahrens durch Berechnung der Wiederfindungs-, Wiederholpräzisions- und Vergleichpräzisionswerte entsprechend ISO 5725-2 und ISO 5725-3 [10, 11] verwendet. Die im Ringversuch erzielten Ergebnisse sind in Tabelle A.2 bis Tabelle A.31 dargestellt.