

DIN EN 17203

ICS 67.050

Einsprüche bis 2018-01-17

Entwurf**Lebensmittel –****Bestimmung von Citrinin in Lebensmitteln mit Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17203:2017**

Foodstuffs –

Determination of citrinin in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS);

German and English version prEN 17203:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-11-17 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 53 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17203:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) nach eingehenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 5 „Biotoxine“ erarbeitet.

Das zuständige deutsche Arbeitsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-03 AA „Biotoxine“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

EN ISO 3696	siehe DIN ISO 3696
ISO 5725 (alle Teile)	siehe DIN ISO 5725 (alle Teile)

Der Text dieser Norm enthält neben den gesetzlichen Einheiten auch die Einheit „psi“, die in Deutschland nicht zugelassen ist. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Anwendung dieser Einheit im nationalen amtlichen und geschäftlichen Verkehr aufgrund des Gesetzes über Einheiten im Messwesen nicht zulässig ist.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN ISO 5725 (alle Teile), *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen*

Lebensmittel — Bestimmung von Citrinin in Lebensmitteln mit Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Foodstuffs — Determination of citrinin in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.8l

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Chemikalien	5
6 Ausrüstung und Geräte	8
7 Verfahren	9
7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	9
7.2 Extraktion von Citrinin	9
7.3 Aufstocken	10
7.4 Vorbereitung der Probenmesslösung	10
7.5 Bestimmung mit LC-MS/MS	10
7.5.1 Allgemeines	10
7.5.2 LC-MS/MS Einstellungen	11
7.6 Identifizierung	12
8 Auswertung	12
8.1 Allgemeines	12
8.2 Berechnung mit internem Standard Citrinin (ISTD)	12
9 Präzision	14
9.1 Allgemeines	14
9.2 Wiederholpräzision	14
9.3 Vergleichspräzision	14
10 Prüfbericht	15
Anhang A (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS	16
A.1 Chromatographische Einstellungen für WATERS Acquity H-Klasse, angeschlossen an Xevo® TQ-S	16
A.2 Massenspektrometrische Detektionsparameter	16
Anhang B (informativ) Typische Chromatogramme	18
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	23
Literaturhinweise	26

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17203:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Einleitung

Das Mycotoxin Citrinin ist ein Polyketid-Sekundärmetabolit, das hauptsächlich nach der Ernte in Nahrungsmitteln und Futtermitteln durch mehrere Pilze der Gattungen *Penicillium* (z. B. *P. citrinum*), *Aspergillus* (z. B. *A. candidus*) und *Monascus* (z. B. *M. purpureus*) gebildet wird. Citrinin tritt vorwiegend in gelagerten Körnern wie Reis, Mais, Weizen, Gerste, Hafer und Roggen auf. Citrinin kann als Schadstoff in rotem mit *Monascus purpureus* fermentiertem Reis und dessen formulierten Nahrungsergänzungsmitteln gefunden werden.

WARNUNG 1 — Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, (EG) Nr. 1907/2006 [5], sowie geeignete nationale Erklärungen sollten berücksichtigt werden.

WARNUNG 2 — Bei der Anwendung dieser Europäischen Norm ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Diese Norm erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung festzulegen, welche einschränkenden Vorschriften gelten.

WARNUNG 3 — Von Citrinin sind nephrotoxische Eigenschaften, die proximale Tubuli der Niere schädigen, bekannt.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung des Citriningehalts in Lebensmitteln (Getreide, rotem Reis (RYR, en: red yeast rice)), Kräutern und Nahrungsergänzungsmitteln mit Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

Dieses Verfahren wurde für Citrinin in rotem Reis und in entsprechend zusammengesetzten Nahrungsergänzungsmitteln im Bereich von 2,5 µg/kg bis 3 000 µg/kg sowie für Citrinin in Weizenmehl im Bereich von 2,5 µg/kg bis 100 µg/kg validiert.

Laborerfahrungen haben gezeigt, dass dieses Verfahren auch auf weißen Reis, auf Kräuter wie *Ginkgo-Biloba*-Blätter in Pulverform und entsprechend zusammengesetzte Nahrungsergänzungsmittel im Bereich von 2,5 µg/kg bis 50 µg/kg anwendbar ist.

2 Normative Verweisungen

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

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

3 Begriffe

In diesem Dokument sind keine Begriffe aufgelistet.

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

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

4 Kurzbeschreibung

Eine Prüfmenge wird mit einer wässrigen Salzsäurelösung befeuchtet und mit einem Ethylacetat/Acetonitril/Eisessig-Gemisch 60 min extrahiert. Der Extrakt wird mit Magnesiumsulfat und Natriumchlorid versetzt, gerührt und zum Abscheiden des Wassers zentrifugiert, um die organische Phasentrennung aus der Mischung zu ermöglichen. Ein Aliquot des Überstands wird gesammelt, filtriert, mit einer isotopisch markierten internen Standardlösung (ISTD) versetzt und mit Umkehrphasen-LC-MS/MS analysiert. Die Quantifizierung basiert auf passenden Citrinin/Citrinin-¹³C-Verhältnissen und Citrinin-Nominalkonzentrationen.

5 Chemikalien

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Handelsübliche Lösungen mit gleichwertigen Eigenschaften wie die aufgeführten dürfen verwendet werden.

- 5.1 **Ethylacetat (EtAc)**, von anerkannter Analysenreinheit oder höher.
- 5.2 **Acetonitril (ACN)**, von anerkannter Analysenreinheit oder höher.
- 5.3 **Eisessig (AcH)**, von anerkannter Analysenreinheit oder höher.

5.4 Eisessig (AcH), LC-MS-Reinheit.

5.5 Magnesiumsulfat — wasserfrei (MgSO₄), von anerkannter Analysenreinheit oder höher.

5.6 Natriumchlorid (NaCl), von anerkannter Analysenreinheit oder höher.

5.7 Salzsäure-Lösung (HCl), von anerkannter Analysenreinheit oder höher, Volumenanteil φ (HCl) = 37 % (acidimetrisch).

5.8 Wasser (H₂O), entionisiert (Ultrapure).

5.9 Wasser (H₂O), LC-MS-Reinheit.

5.10 Methanol (MeOH), LC-MS-Qualität.

5.11 Ammoniumacetat (CH₃COONH₄), LC-MS-Qualität.

5.12 Extraktionslösung 1.

990 ml H₂O (5.8) werden mit 10 ml AcH (5.3) versetzt und gemischt; dies ergibt H₂O/AcH (99/1, v/v). 100 g NaCl (5.6) werden in 1 l dieser Mischung aufgelöst und mit 16 ml HCl (5.7) versetzt. Diese Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert 1 Monat verwendet werden.

5.13 Extraktionslösung 2.

750 ml EtAc (5.1) werden mit 240 ml ACN (5.2) und 10 ml AcH (5.3) versetzt und gemischt; dies ergibt (EtAc/ACN/AcH, 75/24/1, v/v/v). Diese Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert 1 Monat verwendet werden.

5.14 Verdünnungslösung.

80 ml MeOH (5.10) werden mit 18 ml H₂O (5.9) und 2 ml AcH (5.4) versetzt und gemischt. Diese Lösung (MeOH/H₂O/AcH, 80/18/2, v/v/v) kann bei Raumtemperatur gelagert 1 Monat verwendet werden.

5.15 Ammoniumacetat/AcH in Wasser.

9,5 g Ammoniumacetat (5.11) werden in 12,5 ml H₂O (5.9) aufgelöst, mit 12,5 ml AcH (5.4) versetzt und gut durchmischt. Diese Lösung kann bei < –18 °C gelagert 12 Monate verwendet werden.

5.16 Mobile Phase A: Ammoniumacetat in Wasser, $c = 5$ mmol/l.

999 ml Wasser (5.9) werden mit 1 ml AcH (5.15) versetzt und sorgfältig gemischt.

5.17 Mobile Phase B: Ammoniumacetat in Methanol, $c = 5$ mmol/l.

999 ml Methanol (5.10) werden mit 1 ml AcH (5.15) versetzt und sorgfältig gemischt.

5.18 Citrinin, analytischer Standard > 99 %, z. B. kristallin oder als zertifizierte Standardlösung.

5.19 Citrinin-Stammlösung, Massenkonzentration $\rho = 500$ µg/ml.

5 mg kristallines Citrinin werden auf 0,1 mg in einen 10-ml-Messkolben eingewogen, in ACN (5.2) gelöst und damit bis zur Marke aufgefüllt. Die Massenkonzentration dieser Stammlösung muss durch Verdünnung und mit LC-MS/MS gegen die zertifizierte Standardlösung in Acetonitril zur Kontrolle überprüft werden.

5.20 Citrinin-Arbeitslösung, $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$.

1 ml Stammlösung (5.19) wird mit 4 ml Verdünnungslösung (5.14) verdünnt und die Mischung wird homogenisiert.

Zur Korrektur der exakten Konzentration dieser Arbeitslösung (Massenkonzentration $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$) muss ein Korrekturfaktor bestimmt und verwendet werden. Dieser Schritt darf bei der Verwendung der zertifizierten Standardlösung entfallen. Diese zertifizierte Standardlösung dient dann als Stammlösung.

Die Stamm- und Arbeitslösungen können mindestens 12 Monate verwendet werden, wenn sie bei $< -18^\circ\text{C}$ gelagert und vor Licht und Feuchtigkeit geschützt werden.

BEISPIEL Eine zertifizierte Lösung von Citrinin kann bei Biopure-Romer Labs (Tulln, Österreich) bezogen werden.

5.21 Citrinin-Zwischenlösung, $\rho = 1 \mu\text{g/ml}$.

50 μl Citrinin-Arbeitslösung ($\rho = 100 \mu\text{g/ml}$, 5.20) werden mit 4 950 μl Verdünnungslösung (5.14) verdünnt, was 5 ml ergibt, und die Mischung wird homogenisiert.

Diese Zwischenlösung wird als Aufstocklösung für die Wiederfindung verwendet. Sie kann 3 Monate verwendet werden, wenn sie im Braunglasflaschen bei $< -18^\circ\text{C}$ aufbewahrt wird.

5.22 Citrinin-Stammlösung des isotopen-markierten (Citrinin- ^{13}C)-inneren Standards, als Standardlösung bei einer gegebenen Massenkonzentration, z. B. $\rho = 100 \mu\text{g/ml}$.

Die Stammlösung kann mindestens 12 Monate verwendet werden, wenn sie bei $< -18^\circ\text{C}$ gelagert und vor Licht und Feuchtigkeit geschützt wird. (siehe Verfallsdatum im Analysenzertifikat).

5.23 Citrinin- ^{13}C -Zwischenlösung, $\rho = 100 \text{ ng/ml}$.

20 μl Citrinin- ^{13}C -Stammlösung (5.22) werden mit 1 980 μl Verdünnungslösung (5.14) verdünnt, was 2 ml ergibt, und die Mischung wird homogenisiert.

Diese Lösung wird als interner Standard (ISTD) verwendet und zu jedem der Probenextrakte, der Kalibrier- und Kontrollstandardlösung (5.25) hinzugefügt.

Diese Lösung kann 6 Monate verwendet werden, wenn sie in Braunglasflaschen bei $< -18^\circ\text{C}$ gelagert wird. Bei der Verwendung nach 6 Monaten muss die Stabilität der Lösung überprüft werden.

5.24 Kalibrierlösungen.

Beispielsweise werden die folgenden Kalibrierlösungen (im Bereich von $\rho = 0,25 \mu\text{g/l}$ bis $50 \mu\text{g/l}$), wie in Tabelle 1 beschrieben unter Verwendung der Citrinin-Zwischenlösung (5.21) und der Verdünnungslösung (5.14) hergestellt und die Mischung homogenisiert. Diese Kalibrierlösungen müssen am Untersuchungstag frisch zubereitet werden.

Zuerst wird die Kalibrierlösung 6 hergestellt, die dann für die Herstellung der Kalibrierlösungen 1, 2 und 3 verwendet wird (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 — Beispiele geeigneter Kalibrierlösungen

Kalibrier- lösung Nr.	Massen- konzentration ng/ml	Gesamt- volumen µl	Citrinin- Zwischenlösung (5.21) µl	Kalibrier- lösung 6 µl	Verdünnungs- lösung (5.14) µl
1	0,25	1 000		5	995
2	0,5	1 000		10	990
3	1	1 000		20	980
4	10	1 000	10		990
5	20	1 000	20		980
6	50	1 000	50		950

Von jeder Kalibrierlösung (1 bis 6) werden 45 µl entnommen, jeweils mit 5 µl Citrinin-¹³C-Zwischenlösung (5.23) versetzt und gemischt.

5.25 Citrinin-Kontrolllösung, $\rho = 25$ ng/ml.

Parallel zu den Kalibrierlösungen wird diese Kontrolllösung direkt aus den zertifizierten Citrinin-Standardlösungen (5.18) und der Verdünnungslösung (5.14) hergestellt.

45 µl dieser Kontrolllösung werden vor der Untersuchung mit 5 µl Citrinin-¹³C-Zwischenlösung (5.23) versetzt.

Der Kontrollstandard kann 3 Monate verwendet werden, wenn er in Braunglasflaschen bei $< -18^{\circ} \text{C}$ gelagert wird.

6 Ausrüstung und Geräte

Übliche Laborglasgeräte und Ausrüstung, und insbesondere die unten aufgeführten müssen verwendet werden.

Um Lichteinwirkungen und den Abbau von Citrinin zu reduzieren, werden vorzugsweise Geräte aus Braunglas verwendet.

6.1 Laborwaage, Fehlergrenze: 0,01 g.

6.2 Analysenwaage, Fehlergrenze 0,1 mg.

6.3 Laborschüttler.

6.4 Zentrifuge, für 50 ml Zentrifugenröhrchen (6.7) geeignet.

6.5 Zentrifuge, für 1,5 ml Zentrifugenröhrchen (6.8) geeignet.

6.6 Mikropipetten, einstellbar, z. B. 1 µl bis 1 000 µl, geeignet für organische Lösungsmittel, mit entsprechenden Spitzen und korrekt kalibriert.

6.7 Zentrifugenröhrchen, 50 ml.

6.8 Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen von 1,5 ml (z. B. Eppendorf^{®1)} Röhrchen).

6.9 Spritze, 2 ml.

6.10 Filter für Spritzen aus PTFE mit 0,2 µm Porengröße.

6.11 Injektionsfläschche, aus Braunglas (1,5 ml), mit Schraubverschluss oder gleichwertig.

6.12 Glaseinsätze für die Injektionsfläschchen.

6.13 Braunglaskolben.

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

6.14.1 LC-Pumpe, geeignet für Gradientenelution.

6.14.2 Injektionssystem, geeignet für die Injektion eines geeigneten Volumens an Injektionslösung mit ausreichender Genauigkeit und Kreuzkontamination von unter 1 %.

6.14.3 LC-Säule, z. B. HSST3 C18 Säule, 1,8 µm, 2,1 × 100 mm und entsprechende Vorfilter oder Vorsäule.

Es dürfen auch Säulen mit anderen Abmessungen verwendet werden, die eine Basislinienauftrennung zum Unterscheiden des Citrininpeaks von allen anderen Peaks ermöglichen.

6.14.4 Säulenthermostat.

6.14.5 Tandem-Massenspektrometer (MS/MS), geeignet für die Ionisation von Citrinin (im negativen Ionenmodus) mit ausgewählter Reaktionsüberwachung (SRM, en: selected reaction monitoring) mit einem ausreichend großen Dynamikbereich.

MS/MS-Analysen müssen mit Triple Quadrupol, Ionenfalle oder hoher Auflösung durchgeführt werden.

6.14.6 Datenauswertungssystem.

7 Verfahren

7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Laborprobe wird fein gemahlen, homogenisiert und bis zur Untersuchung im Dunkeln aufbewahrt.

7.2 Extraktion von Citrinin

Von der homogenisierten Probe wird eine Prüfmenge von 4,00 g in 50 ml Zentrifugenröhrchen (6.7) auf 0,02 g eingewogen.

10 ml Extraktionslösung Nr. 1 (5.12) und gleich darauf 20 ml (V_{ex}) der Extraktionslösung Nr. 2 (5.13) werden hinzugefügt und das Röhrchen verschlossen.

Die Mischung wird etwa 1 Stunde mit einem Laborschüttler (6.3) bei Raumtemperatur extrahiert.

1) Eppendorf ist ein Handelsname eines Zentrifugationsröhrchens von Eppendorf International. Diese Information wird für die Annehmlichkeit der Benutzer dieser Europäischen Norm gegeben und stellt keine Billigung des genannten Produkts durch den CEN dar. Es dürfen gleichwertige Röhrchen verwendet werden, wenn belegt werden kann, dass sie zu den gleichen Prüfergebnissen führen.

Danach werden 6,0 g MgSO_4 (5.5) und 1,5 g NaCl (5.6) zum Gemisch gegeben und sogleich 30 Sekunden lang kräftig geschüttelt, um ein Zusammenklumpen der Salze zu vermeiden.

ANMERKUNG Dieser Schritt ist exotherm und führt zu einer moderaten, aber spürbaren Erwärmung des Röhrchens und seines Inhalts.

Die Mischung wird erneut mit einem Laborschüttler (6.3) etwa 3 min geschüttelt.

Die Phasen werden durch 5-minütiges Zentrifugieren (6.4) bei etwa 4 000 g getrennt.

1 ml der organischen Phase wird durch einen Polyetrafluorethylen (PTFE)-Spritzenfilter (0,2 µm Porendurchmesser) (6.9, 6.10) in ein 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen (6.8) filtriert.

Um die „hoch kontaminierten“ Chargen (z. B. Höchstgrenze = 2,000 µg/kg) analysieren zu können, wird der Extrakt bis zu 20-fach verdünnt.

BEISPIEL 10 µl des Extrakts stark kontaminierter Proben werden in 190 µl der Verdünnungslösung (5.14) verdünnt und die Mischung wird homogenisiert.

Wenn dieser verdünnte Extrakt manchmal trübe ist (besonders bei rotem Reis) wird ein Aliquot (> 1 ml) in das Zentrifugenröhrchen (6.8) gegeben und die Mischung erneut bei 3 800 g (6.5) zentrifugiert.

7.3 Aufstocken

Zum Aufstocken der Proben wird eine Prüfmenge (7.2) von 4 g mit 80 µl Citrinin-Standardlösung v (5.21) versetzt (entsprechend einem Massenanteil von 20 µg/kg Citrinin in der Probe) und die Mischung wird mindestens 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen (equilibriert).

10 ml Extraktionslösung Nr. 1 (5.12) und unmittelbar darauf 20 ml (V_{ex}) Extraktionslösung Nr. 2 (5.13) werden hinzugegeben und das Röhrchen verschlossen. Citrinin wird nach 7.2. aus den Proben extrahiert.

7.4 Vorbereitung der Probenmesslösung

5 µl Citrinin- ^{13}C -Zwischenlösung (5.23) werden in ein 0,5-ml-Zentrifugenröhrchen (6.14) gegeben und mit 45 µl des gefilterten Extrakts (7.2) versetzt.

Der Inhalt des Röhrchens wird gemischt (6.3) und in den Einsatz eines Injektionsfläschchens (6.12) geben. Das Injektionsfläschchen wird in die Braunglasflasche (6.11) geben und diese zugeschraubt.

Die Citrinin-Kalibrierlösungen (5.24) und die Kontrolllösung (5.25) werden ebenso behandelt.

Eine geeignete Menge der obigen hergestellten Lösungen werden in das LC-MS/MS-System (6.14) injiziert und beachtet, dass die LC-MS/MS-Analysen am Tag der Probenextraktion durchgeführt werden müssen.

7.5 Bestimmung mit LC-MS/MS

7.5.1 Allgemeines

Die Zusammenstellung der analytischen Säule, Zusammensetzung der mobilen Phase, Gradienteneinstellungen und Injektionsvolumen muss so beschaffen sein, dass ermöglicht wird, eine akzeptable Trennung und zuverlässige Ergebnisse auf den erforderlichen Niveaus zu erhalten, wobei die Selektivität für eine akzeptabel niedrige Anzahl an falsch vermuteten Ergebnissen ausreichen muss.

Die analytischen Parameter (Auswahl des Ionisationsmodus, Auswahl der Massen von Vorläufer- und Produkt-Ionen, Optimierung von Kegelspannungen und Kollisionsenergien) werden durch Infusion und Injektion von Einzel-Analyt-Standardlösungen von Citrinin und isotopisch-markiertem Citrinin optimiert.

Zur Überprüfung der Stabilität des LC-MS/MS-Systems und der Richtigkeit der Kalibrier- und Aufstocklösungen wird die Kontrolllösung (5.25) eingespritzt.

7.5.2 LC-MS/MS Einstellungen

Die Standardlösungen, Reagenzienblindwert und die Extrakte werden in folgender Reihenfolge injiziert:

- Kontrolllösung (5.25, Bestätigung der Spezifität);
- Reagenzienblindwert (5.14, Prüfen auf carry-over aus dem Injektorblock);
- Kalibrierkurve (5.24);
- Kontrolllösung (5.25, Eignung des Systems);
- Probenextrakte (7.3, 7.2) (einschließlich Reagenzienblindwert (5.14) und Kontrolllösung (5.25) nach je 6 bis 10 Probeninjektionen);
- Kontrolllösung (5.25);
- Reagenzienblindwert (5.14).

Bei Verwendung der Säule (6.14.3), der mobilen Phasen A und B und des in Tabelle A.1 (in Anhang A) angegebenen Elutionsverhältnisses sind die folgenden Parameter anwendbar.

Durchflussrate:	0,5 ml/min
Temperatur des Säulenofens:	40 °C
Injektionsvolumen:	1 µl
Retentionsfenster:	0 min bis 10 min
Ionenquelle:	Elektrospray
Ionisationsmodus:	negativer Ionisationsmodus
Funktionstyp:	Multiples Reaktionsmonitoring (MRM) mit 3 Kanälen
Ionenquelleneinstellungen:	Quellentemperatur 150 °C, Desolvationstemperatur 450 °C, Desolvationsgasfluss 1 000 l/h, Konus-Gasfluss 150 l/h und Kapillarspannung 1 kV.

Die oben genannten LC-Parameter gelten als Richtwerte. Je nach der verwendeten Säule müssen das Elutionsmittelverhältnis und/oder der Durchfluss so angepasst werden, dass die beste Trennung zwischen dem Analyten und den anderen im Extrakt befindlichen Matrixbestandteilen erreicht wird.

Im negativen Ionenmodus müssen drei Übergänge (ein Quantifier- und zwei Qualifier-Ionen) aufgenommen werden.

Geeignete massenspektrometrische Parameter sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 — Substanzspezifische massenspektrometrische Bedingungen für die Citrininanalyse

Analyt	Retentionszeit min	Vorläufer-Ion [M+MeOH-H] ⁻ m/z	Konus- spannung V	Produkt-Ion m/z (Kollisionsenergie)		
				Quantifier	Qualifier Nr. 1	Qualifier Nr. 2
Citrinin	3,8	281,0	50	249,0 (15 eV)	205,0 (25 eV)	177,0 (30 eV)
Citrinin- ¹³ C		294,0	50	217,0 (15 eV)		

Die besten Messbedingungen für Quantifier und Qualifier müssen daher für den betreffenden Geräteaufbau ermittelt werden. Als Quantifier muss der Massenübergang mit dem größten Signal-Rausch-Verhältnis gewählt werden.

Die Signalmaximierung muss durch eine optimale Auswahl des Ionisationsmodus, der Vorläufermassen und der Produkt-Ionen sowie der Optimierung von Kegelspannungen und Kollisionsenergie erreicht werden.

Beispielchromatogramme sind in Anhang B aufgeführt.

7.6 Identifizierung

Citrinin wird durch Vergleich der Retentionszeiten der Standardlösung mit der der Probenmesslösung identifiziert.

Der Analyt wird auf der Grundlage von mindestens zwei Massenübergängen identifiziert. Zusätzlich müssen die Retentionszeiten (Peaks in beiden Massenspuren) und das Flächenverhältnis der beiden Peaks mit denen der Standardsubstanz übereinstimmen.

Die beiden Hauptkriterien für die positive Identifizierung sind die Retentionszeit ($\pm 2,5$ %, innerhalb der gleichen Sequenz) und die Ionenverhältnisse, die als Qualifier-Bereich/Quantifier-Bereich definiert sind und den Parametern der Kalibrierungsstandards entsprechen müssen.

8 Auswertung

8.1 Allgemeines

Eine Mehrpunktkalibrierung wird mit Kalibrierlösungen durchgeführt werden (siehe Beispiel in Tabelle 1).

ANMERKUNG Zur Bewertung der Ergebnisse steht ein Dokument der EU-Kommission (2002/657/EG) zur Verfügung, um die Anforderung an die Ionenverhältnisse zu überprüfen. Ein Wiederfindungsbereich zwischen 70 % und 120 % ist akzeptabel (EU 519/2014).

Innerhalb der gleichen Sequenz muss die relative Standardabweichung (RSD) für alle Kontrollstandards ≤ 15 % betragen. Die 10 Extrakte vor und die 10 Extrakte nach jedem abgelehnten Kontrollstandard werden erneut injiziert.

8.2 Berechnung mit internem Standard Citrinin (ISTD)

Eine Mehrpunktkalibrierung wird durchgeführt (lineare 1/X-Kalibrierkurven durch Auftragen des Citrinin/Citrinin-¹³C-Verhältnisses, gemessen in den Kalibrierstandards gegenüber der Konzentration nach Tabelle 1).

Für die lineare Regressionskurve wird das Peak-Flächenverhältnis vom Analyten gegen das entsprechende Konzentrationsverhältnis aufgezeichnet. Die Massenkonzentration ρ_s^i von Citrinin in der injizierten Lösung leitet sich aus der linearen Regression in ng/ml ab, siehe Formel (1).

$$\rho_s^i \frac{A_a}{A_{ISTD}} = a_{Cal} \frac{\rho_a}{\rho_{ISTD}} + b_{Cal} \quad (1)$$

Dabei ist:

- A_a die Peakfläche des Analyten in der Kalibrierlösung;
- A_{ISTD} die Peakfläche des internen Standards in der Kalibrierlösung;
- a_{Cal} die mit den Kalibrierlösungen ermittelte Steigung der Kalibrierung;
- ρ_a die Massenkonzentration des Analyten in den Kalibrierlösungen in ng/ml;
- ρ_{ISTD} die Massenkonzentration des internen Standards in der Kalibrierlösung in ng/ml;
- b_{Cal} der von den Kalibrierlösungen ermittelte Achsenschnittpunkt der Kalibrierung.

Die Massenkonzentration ρ_a^s des Analyten in der Probenmesslösung in ng/ml, wird mit Formel (2) berechnet:

$$\rho_a^s = \frac{\frac{A_a^s}{A_{ISTD}^s} - b_{Cal}}{a_{Cal}} \rho_{ISTD}^s \quad (2)$$

Dabei ist:

- A_a^s die Peakfläche des Analyten in der Probenmesslösung;
- b_{Cal} der mit den Kalibrierlösungen ermittelte Achsenschnittpunkt der Kalibrierung;
- A_{ISTD}^s die Peakfläche des internen Standards in der Probenmesslösung;
- a_{Cal} die mit den Kalibrierlösungen ermittelte Steigung der Kalibrierung;
- ρ_{ISTD}^s die Massenkonzentration des internen Standards in der Probenmesslösung in ng/ml.

Der Massenanteil w_a des Analyten in der Probenmesslösung, in ng/g wird mit Formel (3) berechnet:

$$w_a = \frac{\rho_a^s \times V_{ex}}{m_s} \quad \text{oder} \quad w_a = \rho_a^s \times D \quad (3)$$

Dabei ist:

- ρ_a^s die Massenkonzentration des Analyten in der Probenmesslösung in ng/ml;
- V_{ex} das Volumen der Extraktionslösung (hier: 20,0 ml);
- m_s die Masse der Prüfmenge, (hier: 4,0 g);
- D V_{ex}/m_s führt zum Verdünnungsfaktor ($D = 5,0$), und bei Bedarf wird auch der zusätzliche Verdünnungsfaktor (20-fach) angewendet, der zum endgültigen $D = 100$ führt.

Eine Datenbehandlungssoftware darf verwendet werden, um automatisch Matrixeffektkorrekturen (Citrinin- ^{13}C -interne Standards) und Verdünnungsfaktoren ($D = 5$, durch Extraktion, und wenn zusätzliche Verdünnung erforderlich ist, mit einem Verdünnungsfaktor von 20) zu integrieren.

Wenn erforderlich, darf der ermittelte Massenanteil (w_a) nach Formel 4 um die Wiederfindung korrigiert werden (nur wenn $< 90 \%$ oder $> 120 \%$).

$$W_{\text{korrigiert}} = W_a / \text{Wiederfindung} \quad (4)$$

Dabei ist:

$W_{a\text{-korrigiert}}$ korrigierter Massenanteil des Analyten, in ng/g;

W_a der Massenanteil des Analyten, in ng/g;

Wiederfindung der aufgestockte Gehalt in Prozent aus der Wiederfindung

9 Präzision

9.1 Allgemeines

Einzelheiten über den Ringversuch zur Präzision des Verfahrens sind in Anhang C zusammengefasst. Die aus diesem Ringversuch abgeleiteten Werte sind nicht unbedingt auf andere als die in Anhang C angegebenen Citrinin Konzentrationsbereiche und Matrices anwendbar.

9.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Prüfergebnissen, die ein einzelner Bearbeiter an identischem Untersuchungsmaterial mit denselben Geräten innerhalb der kürzesten möglichen Zeitspanne erhält, überschreitet die Wiederholgrenze r nicht häufiger als in 5 % der Fälle.

9.3 Vergleichspräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Prüfergebnissen, die zwei Laboratorien für identisches Untersuchungsmaterial erhalten, überschreitet die Vergleichsgrenze R in Tabelle 3 nicht häufiger als in 5 % der Fälle.

Tabelle 3 — Validierungsdaten von Citrinin

Probe	Kontaminierte Bereiche	$\bar{x}$ µg/kg	r µg/kg	R µg/kg
Roter Reis (RYP)	Gering	38,0	8,7	16,8
	Hoch	1 913	342	544
Weizenmehl	Gering	31,1	6,6	12,3
Nahrungsergänzungsmittel — RYP	Gering	22,1	7,7	15,4
	Hoch	1 867	262	1 085
Ginkgo-Biloba-Blätter (GBL)	Gering	30,2	7,8	21,0
Nahrungsergänzungsmittel — GBL	Gering	21,7	8,9	22,7