

DIN EN 17203

ICS 67.050

Einsprüche bis 2019-11-20
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 17203:2019-03

Entwurf

**Lebensmittel –
Bestimmung von Citrinin in Lebensmitteln mit HPLC-MS/MS;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17203:2019**

Foodstuffs –
Determination of citrinin in food by HPLC-MS/MS;
German and English version prEN 17203:2019

Produits alimentaires –
Dosage de la citrinine dans les produits alimentaires par CLHP-SM/SM;
Version allemande et anglaise prEN 17203:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-09-20 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, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 49 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17203:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium 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.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 17203:2019-03 wurde folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Notwendigkeit, täglich neue Kalibrierlösungen herzustellen, wurde gestrichen (5.24);
- b) die Anforderung für Kreuzkontamination unter 1 % wurde gestrichen (6.14.2);
- c) der letzte Teil „im negativen Ionenmodus“ des zweiten Absatzes vor Tabelle 2, beginnend mit „wenn ein Addukt-Ion als Vorgänger-Ion verwendet wird“, wurde gestrichen, da für dieses Verfahren nicht anwendbar (7.5.2);
- d) in Tabelle 2 wurde die letzte Spalte für den zweiten Qualifier wieder eingeführt (7.5.2);
- e) Absatz 3 wurde mit anderen Normen der CEN/TC 275/WG 5 abgestimmt (8.1).

Lebensmittel — Bestimmung von Citrinin in Lebensmitteln mit HPLC-MS/MS

Produits alimentaires — Dosage de la citrinine dans les produits alimentaires par CLHP-SM/SM

Foodstuffs — Determination of citrinin in food by HPLC-MS/MS

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Reagenzien	6
6 Ausrüstung und Geräte	9
7 Verfahren	10
7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	10
7.2 Extraktion von Citrinin	10
7.3 Aufstocken	10
7.4 Vorbereitung der Probenmesslösung	11
7.5 Bestimmung mit LC-MS/MS	11
7.5.1 Allgemeines	11
7.5.2 LC-MS/MS-Einstellungen	11
7.6 Identifizierung	12
8 Auswertung	13
8.1 Allgemeines	13
8.2 Berechnung mit dem internem Standard	13
9 Präzision	14
9.1 Allgemeines	14
9.2 Wiederholpräzision	14
9.3 Vergleichpräzision	14
10 Prüfbericht	15
Anhang A (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC MS/MS Systeme	16
A.1 Chromatographische Einstellungen für WATERS Acquity H-class, verbunden mit Xevo® TQ-S	16
A.2 Massenspektrometrische Detektionseinstellungen	17
Anhang B (informativ) Typische Chromatogramme	18
Anhang C (informativ) Präzisionsdaten	21
Literaturhinweise	24

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17203:2019) 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 wird EN 17203:2018 ersetzen.

Dieses Dokument wurde unter einem Normungsauftrag erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Gegenüber der Ausgabe von 2018 wurden die folgenden Änderungen vorgenommen:

- 5.24 Die Anforderung, Kalibrierlösungen täglich neu herzustellen, wurde gestrichen.
- 6.14.2 Die Anforderung einer Kreuzkontamination unter 1 % wurde gestrichen.
- 7.5.1 Der erste Satz wurde im Sinne einer besseren Ausdrucksweise umformuliert.
- 7.5.2 Der letzte Teil „im negativen Ionenmodus“ des vorletzten Absatzes vor Tabelle 2, beginnend mit „Wenn ein Addukt-Ion als Vorgänger-Ion verwendet wird“, wurde gestrichen, da er für dieses Verfahren nicht relevant ist.
- 7.5.2, Tabelle 2 Die letzte Spalte für den zweiten Qualifier wurde wieder eingeführt.
- 7.6, Absatz 2, Zeile 1 wurde im Sinne besserer Verständlichkeit umformuliert.
- 8.1, Absatz 3 wurde an andere Normen der CEN/TC 275/WG 5 angepasst.

Einleitung

Das Mycotoxin Citrinin ist ein Polyketid-Sekundärmetabolit, das hauptsächlich nach der Ernte in Lebensmitteln 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 daraus 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] (in der neuesten Fassung), sowie geeignete nationale Erklärungen sollten berücksichtigt werden.

WARNUNG 2 — Bei der Anwendung dieses Dokuments ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. 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 — Von Citrinin sind nephrotoxische Eigenschaften bekannt, die proximale Tubuli der Niere schädigen [6].

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung des Citriningehalts in Lebensmitteln (Getreide, rotem Reis [RYR, en: red yeast rice]), Kräutern und Nahrungsergänzungsmitteln mittels 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 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

Es werden keine Begriffe in diesem Dokument angegeben.

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

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

4 Kurzbeschreibung

Eine Einwaage wird mit einer wässrigen Salzsäurelösung versetzt 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 Phasentrennung der Mischung zu ermöglichen. Ein Aliquot des Überstands wird gesammelt, filtriert, mit einer Isotopenmarkierten internen Standardlösung (ISTD) versetzt und mit Umkehrphasen-LC-MS/MS analysiert. Der Analyt wird anhand des entsprechenden Citrinin/Citrinin-¹³C-Verhältnisses und den Citrininkonzentrationen quantifiziert.

5 Reagenzien

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

5.1 Ethylacetat, analysenrein oder höher.

5.2 Acetonitril, LC-MS-Reinheit.

5.3 Eisessig (CH_3COOH), analysenrein oder höher.

5.4 Eisessig (CH_3COOH), LC-MS-Reinheit.

5.5 Magnesiumsulfat, wasserfrei (MgSO_4), analysenrein oder höher.

5.6 Natriumchlorid (NaCl), analysenrein oder höher.

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

5.8 Wasser (H_2O), entionisiert (Ultrapure).

5.9 Wasser (H_2O), LC-MS-Reinheit.

5.10 Methanol (MeOH), LC-MS-Reinheit.

5.11 Ammoniumacetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), LC-MS-Reinheit.

5.12 Extraktionslösung 1.

990 ml Wasser (5.8) werden mit 10 ml Eisessig (5.3) versetzt und gemischt (Wasser + Eisessig, 99 + 1, v + v). 100 g Natriumchlorid (5.6) werden in 1 l dieser Mischung aufgelöst und diese wird mit 16 ml Salzsäurelösung (5.7) versetzt. Diese Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert 1 Monat verwendet werden.

5.13 Extraktionslösung 2.

240 ml Acetonitril (5.2) werden mit 750 ml Ethylacetat (5.1) und 10 ml Eisessig (5.3) versetzt und gemischt. Diese Lösung (Ethylacetat + Acetonitril + Eisessig, 75 + 24 + 1, v + v + v) kann bei Raumtemperatur gelagert 1 Monat verwendet werden.

5.14 Verdünnungslösung.

80 ml Methanol (5.10) werden mit 18 ml Wasser (5.9) und 2 ml Eisessig (5.4) versetzt und gemischt. Diese Lösung (Methanol + Wasser + Eisessig, 80 + 18 + 2, v + v + v) kann bei Raumtemperatur gelagert 1 Monat verwendet werden.

5.15 Ammoniumacetat/Eisessig in Wasser.

9,5 g Ammoniumacetat (5.11) werden in 12,5 ml Wasser (5.9) aufgelöst, mit 12,5 ml Eisessig (5.4) versetzt und gründlich gemischt. Diese Lösung kann bei $< -18^\circ\text{C}$ gelagert 12 Monate verwendet werden.

5.16 Mobile Phase A: Ammoniumacetat/Eisessig in Wasser, $c = 5 \text{ mmol/l}$.

999 ml Wasser (5.9) werden mit 1 ml Ammoniumacetat/Eisessig in Wasser (5.15) versetzt und sorgfältig gemischt.

5.17 Mobile Phase B: Ammoniumacetat/Eisessig in Methanol, $c = 5 \text{ mmol/l}$.

999 ml Methanol (5.10) werden mit 1 ml Ammoniumacetat/Eisessig (5.15) versetzt und sorgfältig gemischt.

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

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

5 mg kristallines Citrinin werden auf 0,1 mg in einen 10 ml-Messkolben eingewogen, in Acetonitril (5.2) gelöst und damit bis zur Marke aufgefüllt. Die Massenkonzentration dieser Stammlösung muss überprüft werden. Dies kann mit LC-MS/MS gegen die zertifizierte Standardlösung (5.18) oder durch photometrische Konzentrationsbestimmung mit dem molaren Extinktionskoeffizienten geschehen [8].

Die zertifizierte Standardlösung (5.18) kann alternativ als Stammlösung verwendet werden.

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

1 ml Stammlösung (5.19) wird zu 4 ml Verdünnungslösung (5.14) pipettiert und die Mischung wird homogenisiert.

Zur Korrektur der exakten Konzentration dieser Arbeitslösung (Massenkonzentration $\rho = 100 \text{ µg/ml}$) muss ein Korrekturfaktor (5.19) bestimmt und verwendet werden. Dieser Schritt darf bei der Verwendung der zertifizierten Standardlösung (5.18) entfallen.

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

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

4 950 µl Verdünnungslösung (5.14) werden mit einer Pipette mit 50 µl Citrinin-Arbeitslösung (5.20) versetzt (ergibt 5 ml) und die Mischung wird homogenisiert.

Diese Zwischenlösung wird als Aufstocklösung für die Wiederfindung verwendet. Sie kann 3 Monate verwendet werden, wenn sie in Braunglaskolben (6.13) bei $< -18 \text{ °C}$ aufbewahrt wird.

5.22 Citrinin- ^{13}C -Stammlösung, als Standardlösung bei einer gegebenen Massenkonzentration, z. B. $\rho = 100 \text{ µg/ml}$.

Nach dem Öffnen kann die Stammlösung üblicherweise 12 Monate verwendet werden, wenn sie bei $< -18 \text{ °C}$ in Braunglaskolben gelagert wird (siehe Verfallsdatum im Analysenzertifikat).

Wenn die Substanz in kristalliner Form erworben wurde, wird Citrinin- ^{13}C in einer geeigneten Menge an Acetonitril (5.2) gelöst, was eine Stammlösung mit passender Massenkonzentration (z. B. $\rho = 100 \text{ µg/ml}$) ergibt. Auch diese Stammlösung kann üblicherweise 12 Monate verwendet werden, wenn sie bei $< -18 \text{ °C}$ gelagert wird.

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

Zur Herstellung einer Citrinin- ^{13}C -Zwischenlösung mit einer Massenkonzentration von $\rho = 100 \text{ ng/ml}$ wird Citrinin- ^{13}C -Stammlösung (5.22) zur Verdünnungslösung (5.14) pipettiert und diese gemischt. Diese Lösung wird als interner Standard (ISTD) verwendet und zu jedem der Probenextrakte, den Kalibrierlösungen (5.24) und der Citrinin-Kontroll-Lösung (5.25) hinzugefügt.

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

5.24 Kalibrierlösungen.

Die folgenden Kalibrierlösungen (beispielsweise im Bereich von 0,25 ng/ml bis 50 ng/ml) wie in Tabelle 1 beschrieben werden unter Verwendung der Citrinin-Zwischenlösung (5.21) und der Verdünnungslösung (5.14) hergestellt und die Mischungen homogenisiert.

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	Massen- konzentration ng/ml	Gesamt- volumen µl	Citrinin- Zwischen- lösung (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.

Die Volumina der Kalibrier- und Zwischenlösungen können auch proportional zueinander erhöht werden.

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

Eine Citrinin-Kontroll-Lösung wird aus der zertifizierten Citrinin-Standardlösung (5.18) hergestellt. Alternativ wird die Citrinin-Kontroll-Lösung aus einer geeigneten unabhängigen Citrinin-Stammlösung hergestellt, die photometrisch oder über die zertifizierte Standardlösung (5.18) geprüft wurde. Die Kontroll-Lösung ($\rho = 25$ ng/ml) wird durch Verdünnen der Stammlösung mit der Verdünnungslösung (5.14) hergestellt.

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

Diese Kontroll-Lösung kann bei Lagerung in Braunglaskolben bei < -18 °C 3 Monate verwendet werden.

6 Ausrüstung und Geräte

Übliche Laborglasgeräte und Ausrüstung, und insbesondere die Folgenden:

Um Lichteinwirkungen und den Abbau von Citrinin zu reduzieren, werden vorzugsweise Glasgeräte 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 geeignet.

6.5 Zentrifuge, für 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen geeignet.

6.6 Pipetten, einstellbar, z. B. 1 µl bis 1 000 µl, geeignet für organische Lösungsmittel, mit entsprechenden Spitzen.

6.7 Zentrifugenröhrchen, 50 ml.

6.8 Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen, (z. B. Eppendorf[®]¹-Röhrchen), 1,5 ml.

6.9 Spritze, 2 ml.

6.10 Spritzenfilter, aus Polytetrafluorethylen, (PTFE) mit 0,2 µm Porengröße.

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

6.12 Glaseinsätze.

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.

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

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

6.14.4 Säulenthermostat.

1 Eppendorf ist die Herstellerbezeichnung eines Zentrifugenröhrchens von Eppendorf International. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

6.14.5 Tandem-Massenspektrometer (MS/MS), geeignet für die Ionisation von Citrinin mit „multiple reaction monitoring“ (MRM) mit einem ausreichend großen dynamischem Bereich.

6.14.6 Datenauswertungssystem.

7 Verfahren

7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Laborprobe wird fein gemahlen, homogenisiert und bis zur Entnahme der Einwaage im Dunkeln aufbewahrt.

7.2 Extraktion von Citrinin

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

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

Die Mischung wird etwa 1 h mit einem Laborschüttler (6.3) bei Raumtemperatur geschüttelt.

Danach werden 6,0 g Magnesiumsulfat (5.5) und 1,5 g Natriumchlorid (5.6) zum Gemisch gegeben und sogleich 30 s 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 etwa 5-minütiges Zentrifugieren (6.4) bei etwa 4 000 g getrennt.

1 ml der organischen Phase wird durch einen PTFE-Spritzenfilter (6.9, 6.10) in ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen (6.8) filtriert.

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

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

Sollte dieser verdünnte Extrakt trübe sein (besonders bei rotem Reis), wird ein Aliquot des verdünnten Extrakts (> 1 ml) in ein anderes 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen (6.8) gegeben und die Mischung erneut bei etwa 4 000 g (6.5) zentrifugiert.

7.3 Aufstocken

Eine 4 g-Einwaage wird mit 80 µl Citrinin-Zwischenlösung (5.21) versetzt (entsprechend einem Massenanteil von 20 µg/kg Citrinin in der Probe) und mindestens 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen (equilibriert). Für andere Kontaminationsbereiche wird die Aufstockkonzentration durch die Zugabe eines geeigneten Volumens angepasst. Alternativ kann zertifiziertes Referenzmaterial verwendet werden.

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

7.4 Vorbereitung der Probenmesslösung

45 µl des gefilterten Extrakts (7.2) werden in einen Glaseinsatz (6.12) gegeben, mit 5 µl Citrinin-¹³C-Zwischenlösung (5.23) versetzt und gut gemischt.

Der Glaseinsatz wird in das Injektionsfläschchen aus Braunglas (6.11) gegeben und dieses zugeschraubt.

Die Kalibrierlösungen (5.24) und die Kontroll-Lösung (5.25) werden ebenso behandelt.

Eine geeignete Menge dieser Messlösungen wird in das LC-MS/MS-System (6.14) injiziert, wobei die LC-MS/MS-Analysen aufgrund von Instabilität innerhalb von 24 h nach der Probenextraktion durchgeführt werden müssen.

7.5 Bestimmung mit LC-MS/MS

7.5.1 Allgemeines

Die analytische Säule, die Zusammensetzung der mobilen Phase, die Gradienteneinstellungen und das Injektionsvolumen müssen so ausgewählt und kombiniert werden, dass die Bedingungen eine akzeptable Trennung und zuverlässige Ergebnisse bei den erforderlichen Massenkonzentrationen ermöglichen, wobei die Selektivität für eine hinreichend niedrige Anzahl falsch verdächtigter Ergebnisse ausreichend sein muss.

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

Zur Überprüfung der Stabilität des LC-MS/MS-Systems wird die Kontroll-Lösung (5.25) injiziert.

7.5.2 LC-MS/MS-Einstellungen

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

- Kontroll-Lösung (5.25, Bestätigung der Spezifität);
- Verdünnungslösung (5.14, Prüfen auf Verschleppung aus dem Injektor);
- Kalibrierkurve (5.24);
- Kontroll-Lösung (5.25, Eignung des Systems);
- Probenextrakte (7.3, 7.2) (einschließlich Verdünnungslösung (5.14) und Kontroll-Lösung (5.25) nach jeweils 6 bis 10 Probeninjektionen);
- Kontroll-Lösung (5.25);
- Verdünnungslösung (5.14).

Bei Verwendung der Säule (6.14.3), der mobilen Phasen A (5.16) und B (5.17) und des in Tabelle A.1 angegebenen Elutionsverhältnisses sind die folgenden Parameter anwendbar.

Durchfluss:	0,5 ml/min
Temperatur des Säulenofens:	40 °C
Injektionsvolumen:	1 µl
Ionenquelle:	Elektrospray
Ionisationsmodus:	negativer Ionisationsmodus
Funktionstyp:	multiples Reaktionsmonitoring (MRM) mit 3 Kanälen
Ionenquelleneinstellungen:	Quellentemperatur 150 °C, Desolvatisierungstemperatur 450 °C, Desolvatisierungsgasfluss 1 000 l/h, Cone-Gasfluss 150 l/h und Kapillarspannung 1 kV.

Die oben genannten LC-Parameter können als Richtwerte gelten. Je nach verwendeter 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.

Wenn ein Addukt-Ion als Vorgänger-Ion verwendet wird und die Abspaltung des Adduktes als Übergang für den Quantifier dient, müssen mindestens 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	Cone- spannung V	Produkt-Ion m/z (Kollisionsenergie)		
				Quantifier	1. Qualifier	2. Qualifier
Citrinin	3,8	281,0	50	249,0 (15 eV)	205,0 (25 eV)	177,0 (30 eV)
Citrinin- ¹³ C		294,0	50	262,0 (15 eV)	n. z. ^a	n. z.
^a nicht zutreffend						

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 Empfindlichkeit kann durch eine optimale Auswahl des Ionisationsmodus, der Vorläufer-Ionen und der Produkt-Ionen sowie die Optimierung von Conespannungen und Kollisionsenergie maximiert werden.

Beispielchromatogramme sind in Anhang B aufgeführt.

7.6 Identifizierung

Citrinin wird durch Vergleich der Retentionszeit der Standardlösung mit der der Probenmesslösung identifiziert. Der Analyt wird anhand 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 Retentionszeit der Probenpeaks sollte bei ±0,2 min des Mittelwertes der Kalibrierlösungen liegen [3]. Ionenverhältnisse, die als Qualifier-Signalgröße/Quantifier-Signalgröße definiert sind, müssen denen der Kalibrierlösungen aus derselben Analysensequenz entsprechen (±30 % des Mittelwertes) [3].

8 Auswertung

8.1 Allgemeines

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

ANMERKUNG Akzeptable Wiederfindungsbereiche können [4] und [7] entnommen werden.

8.2 Berechnung mit dem internem Standard

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

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

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

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 Kalibrierkurve;
- 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 Achsenabschnitt der mit den Kalibrierlösungen ermittelten Kalibrierkurve.

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

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

Dabei ist:

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