

DIN EN 17256

ICS 65.120

Einsprüche bis 2018-08-22

Entwurf

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung der Alkaloide des Mutterkorns und der Tropanalkaloiden in
Einzelfuttermitteln und Mischfuttermitteln mittels LC-MS/MS;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17256:2018**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of ergot alkaloids and tropane alkaloids in feed materials and compound feeds
by LC-MS/MS;
German and English version prEN 17256:2018

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Détermination des teneurs en alcaloïdes de l'ergot et alcaloïdes tropaniques dans les matières
premières pour aliments et les aliments composés pour animaux, par CL-SM;
Version allemande et anglaise prEN 17256:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-06-22 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 81 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

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

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

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

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien	8
5.1 Analytische Standards	8
5.1.1 Ergocornin	8
5.1.2 Ergocorninin	8
5.1.3 Ergocristin	8
5.1.4 Ergocristinin	8
5.1.5 α -Ergocryptin	8
5.1.6 α -Ergocryptinin	8
5.1.7 Ergometrin (Maleat)	8
5.1.8 Ergometrinin	8
5.1.9 Ergosin	8
5.1.10 Ergosinin	8
5.1.11 Ergotamin (Tartrat)	8
5.1.12 Ergotaminin	8
5.1.13 Atropin oder Hyoscyamin	8
5.1.14 Scopolamin (Hydrochlorid)	8
5.2 Chemikalien	8
5.2.1 Acetonitril, LC-MS- oder HPLC-Qualität	8
5.2.2 Methanol, LC-MS- oder HPLC-Qualität	8
5.2.3 Methansäure, 98 % bis 100 %, p.a.-Qualität	9
5.2.4 Ammoniumcarbonat, anhydrisch	9
5.2.5 Ammoniak, 25 %	9
5.2.6 Wasser	9
5.3 Standardlösungen	9
5.3.1 Ergocornin-Stammlösung (100 μ g/ml)	9
5.3.2 Ergocorninin-Stammlösung (100 μ g/ml)	9
5.3.3 Ergocristin-Stammlösung (100 μ g/ml)	9
5.3.4 Ergocristinin-Stammlösung (100 μ g/ml)	9
5.3.5 α -Ergocryptin-Stammlösung (100 μ g/ml)	9
5.3.6 α -Ergocryptinin-Stammlösung (100 μ g/ml)	9
5.3.7 Ergometrin-Stammlösung (50 μ g/ml)	9
5.3.8 Ergometrinin-Stammlösung (100 μ g/ml)	10
5.3.9 Ergosin-Stammlösung (100 μ g/ml)	10
5.3.10 Ergosinin-Stammlösung (100 μ g/ml)	10
5.3.11 Ergotamin-Stammlösung (100 μ g/ml)	10
5.3.12 Ergotaminin-Stammlösung (100 μ g/ml)	10
5.3.13 Atropin-Stammlösung (100 μ g/ml)	10
5.3.14 Scopolamin-Stammlösung (100 μ g/ml)	10
5.3.15 Gemischte Standardlösung (5 μ g/ml)	10

5.3.16	Gemischte Standardlösung (1 000 ng/ml)	10
5.3.17	Gemischte Standardlösung (200 ng/ml).....	10
5.3.18	Gemischte Standardlösung (50 ng/ml)	10
5.3.19	Standardarbeitslösung (10 ng/ml).....	11
5.4	Reagenzlösungen.....	11
5.4.1	Extraktionslösemittel 0,4 % Methansäure in Methanol/Wasser (60:40) (v/v).....	11
5.4.2	LC-MS/MS mobile Phase A: 10 mM Ammoniumcarbonat, pH 10,0.....	11
6	Prüfgeräte	11
6.1	Analysewaage mit einer Massenauflösung von 0,1 mg oder besser	11
6.2	Laborwaage, mit einer Massenauflösung von 0,1 g oder besser.....	11
6.3	Mühle	11
6.4	Mixwerkzeug.....	11
6.5	Vertikaler oder horizontaler Laborschüttler, einstellbar	11
6.6	Zentrifuge.....	11
6.7	Mini-Laborschüttler oder Vortex-Mischer	12
6.8	Ultraschallbad.....	12
6.9	pH-Messgerät	12
6.10	Pipettierer	12
6.11	Messkolben, kalibriert, 20 ml	12
6.12	Bernsteinfarbene Glasflasche in den Größen 10 ml, 30 ml und 60 ml mit Schraubverschluss	12
6.13	Zentrifugenröhrchen, Polypropylen, 50 ml, mit Schraubverschluss	12
6.14	Ultrafilter (Zentrifugalfiltereinheit) mit einer Trenngrenze von 30 kD.....	12
6.15	HPLC-Fläschchen, Glas oder Polypropylen, 2 ml.....	12
6.16	HPLC-System, bestehend aus	12
6.16.1	Autosampler, mit Temperaturregler	12
6.16.2	Binäres Pumpensystem.....	12
6.16.3	Säulenofen, mit Temperaturregler	12
6.16.4	Analytische Säule.....	12
6.16.5	Vorsäule, optional	12
6.17	Tandem-Massenspektrometer	12
7	Durchführung	13
7.1	Allgemeines	13
7.2	Probenvorbehandlung	13
7.3	Untersuchungsprobenmenge.....	13
7.4	Probenextraktion.....	13
7.5	Standardadditionsprobe.....	14
7.6	Vorbereitung Kalibrierungsbereich im Blindprobenextrakt	14
8	Analyse	15
8.1	Allgemeines	15
8.2	Analysenabfolge.....	16
9	Prüfergebnisse	17
9.1	Identifizierung.....	17
9.2	Quantifizierung	17
9.2.1	Allgemeines	17
9.2.2	Linearität der Kalibrierkurve.....	17
9.2.3	Berechnung der Analytkonzentration durch Standardaddition.....	17
9.2.4	Angabe der Ergebnisse	18
10	Präzision.....	18
10.1	Wiederholpräzision.....	18
10.2	Vergleichpräzision	18
11	Untersuchungsbericht	19

Anhang A (informativ) Präzisionsdaten.....	20
Anhang B (informativ) Beispiel von LC-MS/MS-Bedingungen.....	36
B.1 Allgemeines	36
B.2 Chromatographische Bedingungen	36
B.3 Massenspektrometrische Bedingungen.....	36
Anhang C (informativ) Beispiel für LC-MS/MS-Chromatogramme von Mutterkornalkaloiden und Tropanalkaloiden in einer Probe von Ergänzungsfuttermitteln für Rinder	38
Literaturhinweise.....	40

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17256:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

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

Einleitung

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

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

WARNUNG — Bei der Anwendung dieses Protokolls werden gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet. Es wird empfohlen, Inhalation und Hautkontakt mit den verwendeten Standards, Reagenzien und anderen Lösungen zu vermeiden und einen Laborkittel zu tragen und gegebenenfalls einen Abzug, Schutzbrille und Schutzhandschuhe zu verwenden.

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

1 Anwendungsbereich

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

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

Dieses Verfahren ist für die Bestimmung von Ergocornin, mittels einer Ein-Punkt-Standardaddition der Probe, im geprüften Bereich von 12 µg/kg bis 221 µg/kg, Ergocorninin im geprüften Bereich von 9 µg/kg bis 196 µg/kg, Ergocristin im geprüften Bereich von 14 µg/kg bis 312 µg/kg, Ergocristinin im geprüften Bereich von 12 µg/kg bis 258 µg/kg, α-Ergocryptin im geprüften Bereich von 10 µg/kg bis 184 µg/kg, α-Ergocryptinin im geprüften Bereich von 8 µg/kg bis 171 µg/kg, Ergometrin im geprüften Bereich von 12 µg/kg bis 174 µg/kg, Ergometrinin im geprüften Bereich von 3 µg/kg bis 172 µg/kg, Ergosin im geprüften Bereich von 12 µg/kg bis 226 µg/kg, Ergosinin im geprüften Bereich von 9 µg/kg bis 273 µg/kg, Ergotamin im geprüften Bereich von 11 µg/kg bis 443 µg/kg, Ergotaminin im geprüften Bereich von 10 µg/kg bis 273 µg/kg, Atropin im geprüften Bereich von 16 µg/kg bis 252 µg/kg und Scopolamin im geprüften Bereich von 15 µg/kg bis 246 µg/kg anwendbar.

2 Normative Verweisungen

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

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

3 Begriffe

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

4 Kurzbeschreibung

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

5 Reagenzien

5.1 Analytische Standards

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

ANMERKUNG 1 Ergotamin und Ergometrin sind als Drogenausgangsstoffe der Kategorie I aufgeführt und für diese Verbindungen wäre eine behördliche Zulassung erforderlich und besondere Verfahren für die Lagerung und Verwaltung wären einzuhalten (EC 273/2004) [1].

Atropin ist das racemische Gemisch aus L-(–)-Hyoscyamin und D-(+)-Hyoscyamin. In diesem Verfahren werden die Enantiomere des Hyoscyamins nicht getrennt. Beide Enantiomere erzeugen identische Fragmentierungsspektren. In diesem Verfahren kann entweder ein Standard von Atropin oder Hyoscyamin verwendet werden.

β -Ergocryptin und β -Ergocryptinin fallen nicht in den Anwendungsbereich des Verfahrens, da von gewerblichen Anbietern keine analytischen Standards ausreichender Reinheit und Qualität zur Verfügung stehen. Es sollte beachtet werden, dass β -Ergocryptin und β -Ergocryptinin auf natürliche Weise in Sklerotien der *Claviceps*-Arten vorkommen. In Abschnitt 8 sind weitere Informationen zur Analyse dieser Alkaloide zu finden.

ANMERKUNG 2 Isotopisch markierte Analoga von Atropin und Scopolamin sind bei gewerblichen Anbietern erhältlich. Optional können diese isotopisch markierten Analoga als interne Standards verwendet werden, vorausgesetzt, dass die Massenzunahme im Molekül durch die isotopischen Markierungen mindestens 3 beträgt. Isotopisch markierte Analoga sind derzeit für keines der Mutterkornalkaloide verfügbar.

5.1.1 Ergocornin

5.1.2 Ergocorninin

5.1.3 Ergocristin

5.1.4 Ergocristinin

5.1.5 α -Ergocryptin

5.1.6 α -Ergocryptinin

5.1.7 Ergometrin (Maleat)

5.1.8 Ergometrinin

5.1.9 Ergosin

5.1.10 Ergosinin

5.1.11 Ergotamin (Tartrat)

5.1.12 Ergotaminin

5.1.13 Atropin oder Hyoscyamin

5.1.14 Scopolamin (Hydrochlorid)

5.2 Chemikalien

5.2.1 Acetonitril, LC-MS- oder HPLC-Qualität

5.2.2 Methanol, LC-MS- oder HPLC-Qualität

5.2.3 Methansäure, 98 % bis 100 %, p.a.-Qualität

5.2.4 Ammoniumcarbonat, anhydrisch

5.2.5 Ammoniak, 25 %

5.2.6 Wasser

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

5.3 Standardlösungen

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

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

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

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

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

5.3.1 Ergocornin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.2 Ergocorninin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.3 Ergocristin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.4 Ergocristinin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.5 α-Ergocryptin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.6 α-Ergocryptinin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.7 Ergometrin-Stammlösung (50 µg/ml)

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

5.3.8 Ergometrinin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.9 Ergosin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.10 Ergosinin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.11 Ergotamin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.12 Ergotaminin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.13 Atropin-Stammlösung (100 µg/ml)

ANMERKUNG Anstelle von Atropin kann Hyoscyamin verwendet werden.

5.3.14 Scopolamin-Stammlösung (100 µg/ml)

5.3.15 Gemischte Standardlösung (5 µg/ml)

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

ANMERKUNG Es wird empfohlen, die zubereitete gemischte Standardlösung in 4 Teile zu 5 ml aufzuteilen und diese in getrennten bernsteinfarbenen 10-ml-Glasflaschen (6.12) zu lagern.

5.3.16 Gemischte Standardlösung (1 000 ng/ml)

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

ANMERKUNG Es wird empfohlen, alle 3 Monate eine neue gemischte Standardlösung herzustellen, indem ein neuer, nicht verwendeter Teil der gemischten Standardlösung 5.3.15 verwendet wird.

5.3.17 Gemischte Standardlösung (200 ng/ml)

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

ANMERKUNG Es wird empfohlen, alle 3 Monate eine neue gemischte Standardlösung aus einer frisch hergestellten gemischten Standardlösung 5.3.16 herzustellen.

5.3.18 Gemischte Standardlösung (50 ng/ml)

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

ANMERKUNG Es wird empfohlen, alle 3 Monate eine neue gemischte Standardlösung aus einer frisch hergestellten gemischten Standardlösung 5.3.17 herzustellen.

5.3.19 Standardarbeitslösung (10 ng/ml)

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

5.4 Reagenzlösungen

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

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

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

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

Eine mobile Phase A, bestehend aus 10 mM Ammoniumcarbonat pH 9,0 hat sich als gleichermaßen funktionsfähig erwiesen. 0,96 g Ammoniumcarbonat werden abgewogen und in 1 000 ml Wasser (5.2.6) in einer 1 000-ml-Glasflasche gelöst. Falls notwendig wird der pH-Wert mit Methansäure (5.2.3) oder Ammoniak (5.2.5) unter Verwendung eines pH-Messgeräts (6.14) auf $9,0 \pm 0,1$ berichtigt. Diese Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und kann 1 Monat verwendet werden.

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

6 Prüfgeräte

Übliche Laborausstattung und insbesondere die folgenden Geräte.

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

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

6.3 Mühle

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

6.4 Mixwerkzeug

Geeignet zur ausreichenden Homogenisierung der gemahlenen Prüfmateriale.

6.5 Vertikaler oder horizontaler Laborschüttler, einstellbar

6.6 Zentrifuge

Geeignet für 50 ml-Zentrifugenröhrchen (6.13) und Ultrafilter (6.15) und in der Lage, eine relative Zentrifugalkraft (rcf) (en: relative centrifugal force) von 3 000 g zu erzeugen.

6.7 Mini-Laborschüttler oder Vortex-Mischer

6.8 Ultraschallbad

6.9 pH-Messgerät

6.10 Pipettierer

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

6.11 Messkolben, kalibriert, 20 ml

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

6.13 Zentrifugenröhrchen, Polypropylen, 50 ml, mit Schraubverschluss

6.14 Ultrafilter (Zentrifugalfiltereinheit) mit einer Trenngrenze von 30 kD

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

6.15 HPLC-Fläschchen, Glas oder Polypropylen, 2 ml

6.16 HPLC-System, bestehend aus

6.16.1 Autosampler, mit Temperaturregler

In der Lage, eine Temperatur von $(10 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufrechtzuerhalten.

6.16.2 Binäres Pumpensystem

In der Lage, einen Binärgradienten mit den für die Analysensäule geeigneten Durchflussmengen mit ausreichender Genauigkeit zu liefern.

6.16.3 Säulenofen, mit Temperaturregler

In der Lage, eine Temperatur von mindestens $50 \pm 1^\circ\text{C}$ aufrechtzuerhalten.

6.16.4 Analytische Säule

Mit hohem pH-resistenten, vernetzten C18-Umkehrphasen-Verpackungsmaterial, das in der Lage ist, die Basislinien-Trennung von Analyten mit identischer Molekülmasse durchzuführen.

6.16.5 Vorsäule, optional

Mit dem gleichen stationären Phasenmaterial wie die analytische Säule und mit geeigneten Abmessungen.

6.17 Tandem-Massenspektrometer

In der Lage, mehrfach ausgewählte Reaktionsüberwachung im positiven Modus durchzuführen, mit einem ausreichend breiten dynamischem Bereich und in der Lage, Massentrennung durchzuführen und ausgestattet mit einem computergestützten Datenverarbeitungssystem. Jede Ionisationsquelle, die ein ausreichendes Feld bietet, darf eingesetzt werden.

7 Durchführung

7.1 Allgemeines

Tierfuttermittel ist eine komplexe Matrix mit einer Vielzahl von Inhaltsstoffen in unterschiedlichen Mengen. Aus diesem Grund ist es aufgrund variabler und probenabhängiger Matrixeffekte (Unterdrückung/Verbesserung) nicht möglich, die Quantifizierung der Analyten in einer Probe über einen direkten Vergleich mit einem Satz an Kalibrierungsproben durchzuführen. Jede Futtermittelprobe wird mittels der Standardaddition der Probe vor der Extraktion quantifiziert. Die Ergebnisse sind für die Wiederfindung nicht zu korrigieren.

Abhängig von der Empfindlichkeit und dem linearen Bereich des Massenspektrometers kann es erforderlich sein, die Probenextrakte (7.4, 7.5, 7.6) mit einem geeigneten Faktor mit Extraktionslösemittel (5.4.1) zu verdünnen, dabei ist die Summe der erwarteten Konzentration des Analyten in der Probe und die zugegebene Konzentration zu berücksichtigen, um die Reaktion des Detektors innerhalb des dynamischen Bereichs des Massenspektrometers zu halten. Alternativ kann das Injektionsvolumen der Probe innerhalb des kalibrierten Bereichs des Injektionssystems reduziert werden.

7.2 Probenvorbehandlung

Die Laborproben sollten, sofern anwendbar, nach der Europäischen Gesetzgebung [2] oder, in allen anderen Fällen, nach EN ISO 6498 entnommen und vorbereitet werden.

Um eine homogene Probe zu erhalten ist es von wesentlicher Bedeutung, dass die Probe fein gemahlen ($\leq 0,5$ mm) und mit einem Mahlwerk (6.3) homogenisiert wird. Abhängig vom Ausgangsmaterial (gemahlenes oder ungemahlenes Material), kann es ratsam sein, die Probe zunächst durch ein Sieb von 1 mm zu mahlen, um eine übermäßige Wärmeentwicklung beim Mahlen zu vermeiden, die zu einer teilweisen Zersetzung der Analyten führen könnte. Anschließend wird die Probe durch ein Sieb von 0,5 mm gemahlen. Die Proben werden bei Raumtemperatur gelagert.

7.3 Untersuchungsprobenmenge

Die Menge der homogenisierten Untersuchungsprobe beträgt $4,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$.

Das Laboratorium kann eine größere Untersuchungsprobengröße verwenden, um die Repräsentativität der Probe zu verbessern. Die Menge des Extraktionslösemittels muss in diesem Fall entsprechend angepasst werden (7.4). Die Verwendung einer größeren Untersuchungsprobengröße sollte nicht als Lösung für das Mahlen der Probe durch ein Sieb verwendet werden, das größer als 0,5 mm ist.

7.4 Probenextraktion

Eine Prüfmenge von $4,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ wird in ein Zentrifugenröhrchen von 50 ml (6.13) abgewogen. 40 ml Extraktionslösung (5.4.1) werden in die Flasche hinzugegeben; diese wird verschlossen und kräftig von Hand oder mit dem Vortex-Mischer (6.7) geschüttelt. Das Röhrchen wird 30 min in einen Schüttler gelegt, der sich mit mäßiger Geschwindigkeit dreht (6.5).

Das Röhrchen wird für 15 min bei $3\,000 \text{ g}$ bei Raumtemperatur (6.6) zentrifugiert. Der Überstand von 2 ml wird in Ultrafiltrerröhrchen (6.14) überführt. Das Röhrchen wird 15 min bei $3\,000 \text{ g}$ bei Raumtemperatur (6.6) zentrifugiert (siehe ANMERKUNG).

1 ml des Ultrafiltrats wird in ein HPLC-Fläschchen (6.15) überführt und das Fläschchen wird verschlossen.

ANMERKUNG Die erforderliche Zeit ist abhängig vom Matrixtyp und dem Mindestvolumen, das für die Vorbereitung der Probenextrakte benötigt wird.

7.5 Standardadditionsprobe

Zur Vorbereitung der Standardadditionsprobe wird eine Prüfmenge von $4,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ in ein Zentrifugenröhrchen von 50 ml (6.13) abgewogen. Die Prüfmenge wird mit 200 µl der gemischten Standardlösung 5 µg/ml (5.3.15) dotiert (6.10). Dies entspricht 250 µg/kg. Die dotierte Prüfmenge wird 15 s lang im Vortex-Mischer (6.7) geschüttelt und 30 min eingeweicht.

40 ml Extraktionslösung (5.4.1) werden in die Flasche hinzugegeben; diese wird verschlossen und kräftig von Hand oder mit dem Vortex-Mischer (6.7) geschüttelt. Die Röhrchen werden 30 min in einen Schüttler gelegt, der sich mit mäßiger Geschwindigkeit dreht (6.5).

Das Röhrchen wird für 15 min bei 3 000 *g* bei Raumtemperatur (6.6) zentrifugiert. Der Überstand von 2 ml wird in Ultrafiltrerröhrchen (6.14) überführt. Das Röhrchen wird 15 min bei 3 000 *g* bei Raumtemperatur (6.6) zentrifugiert. (Siehe ANMERKUNG).

1 ml des Ultrafiltrats wird in ein HPLC-Fläschchen (6.15) überführt und das Fläschchen wird verschlossen.

ANMERKUNG Die erforderliche Zeit ist abhängig vom Matrixtyp und dem Mindestvolumen, das für die Vorbereitung der Probenextrakte benötigt wird.

7.6 Vorbereitung Kalibrierungsbereich im Blindprobenextrakt

Zur Identifizierung der Analyten (9.1) und zur Überprüfung der Linearität des massenspektrometrischen Detektors (9.2.2) wird eine Kalibrierkurve im Blindprobenextrakt vorbereitet. Diese ist nicht für die Quantifizierung der Proben zu verwenden. Eine repräsentative Blindprobe wird verwendet.

ANMERKUNG 1 Eine Probe, die nach einer vorherigen Analyse keine der Mutterkornalkaloide und Tropanalkaloide oberhalb der Nachweisgrenze (LOD) enthält.

Eine Prüfmenge von $4,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ wird in ein Zentrifugenröhrchen von 50 ml (6.13) abgewogen. 40 ml Extraktionslösung (5.4.1) werden in die Flasche hinzugegeben; diese wird verschlossen und kräftig von Hand oder mit dem Vortex-Mischer (6.7) geschüttelt. Das Zentrifugenröhrchen wird 30 min in einen Schüttler gelegt, der sich mit mäßiger Geschwindigkeit dreht (6.5).

Das Röhrchen wird für 15 min bei 3 000 *g* bei Raumtemperatur (6.6) zentrifugiert. Bis zu 9 Aliquoten von 2 ml des Überstands werden in Ultrafiltrerröhrchen (6.14) überführt.

ANMERKUNG 2 Die Anzahl der erforderlichen Kalibrierungsextrakte ist abhängig von den zu erwartenden Konzentrationen in den Proben (7.4 und 7.5) und dem Dynamikbereich des Massenspektrometers. Es wird empfohlen, mindestens Kalibrierungsextrakte 1, 3 bis 8 aufzunehmen.

Die Röhrchen wird für 15 min bei 3 000 *g* bei Raumtemperatur (6.6) zentrifugiert.

ANMERKUNG 3 Die erforderliche Zeit ist abhängig vom Matrixtyp und dem Mindestvolumen, das für die Vorbereitung der Probenextrakte benötigt wird.

Aliquoten des Ultrafiltrats werden zur Vorbereitung von Kalibrierungsextrakten nach Tabelle 1 verwendet. Der Inhalt des Fläschchens wird gut gemischt (6.7) und das Fläschchen (6.15) wird verschlossen.

Tabelle 1 — Vorbereitung des Kalibrierungsbereiches in Blindprobenextrakten

Kenn- buch- stabe	Konzentration im Extrakt (ng/ml)	Proben- extrakt (7.6) (µl)	Gemischte Standard- lösung 50 ng/ml (5.3.18) (µl)	Gemischte Standard- lösung 200 ng/ml (5.3.17) (µl)	Gemischte Standard- lösung 1 000 ng/ml (5.3.16) (µl)	Gemischte Standard- lösung 5 µg/ml (5.3.15) (µl)	Extrak- tionslöse- mittel (5.4.1) (µl)
Cal 1	0	950	0	0	0	0	50
Cal 2	0,5	950	10	0	0	0	40
Cal 3	1	950	20	0	0	0	30
Cal 4	2,5	950	50	0	0	0	0
Cal 5	5	950	0	25	0	0	25
Cal 6	10	950	0	50	0	0	0
Cal 7	25	950	0	0	25	0	25
Cal 8	50	950	0	0	50	0	0
Cal 9	100	950	0	0	0	20	30

8 Analyse

8.1 Allgemeines

Die chromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen dürfen frei gewählt werden. Die optimalen Messbedingungen hängen stark von der verwendeten Geräteausrüstung ab. Wichtige Kriterien und Parameter in Bezug auf die chromatographische Trennung und den Nachweis der Analyten sind jedoch:

Die gewählten Säulenabmessungen und chromatographischen Bedingungen sollten geeignet sein, um die Grundlinientrennung von Epimeren oder Isomeren mit der gleichen Molekülmasse zu erhalten. Es sollte beachtet werden, dass Proben zwei Mutterkornalkaloide, β -Ergocryptin und β -Ergocryptinin, enthalten können, für die derzeit keine analytischen Standards zur Verfügung stehen. Im LC-MS/MS Chromatogramm eluiert β -Ergocryptin direkt nach α -Ergocryptin (siehe Bild C.2), während β -Ergocryptinin unter den meisten chromatographischen Bedingungen mit α -Ergocryptinin co-eluiert. Die Trennung von α -Ergocryptinin und β -Ergocryptinin wird unter den in diesem Verfahren beschriebenen chromatographischen Bedingungen nicht verfolgt. Während der hauseigenen Validierung war es nicht möglich, chromatographische Bedingungen zu finden, bei denen die Grundlinientrennung zwischen beiden Isomeren erreicht wurde.

Eine zufriedenstellende Trennung der Mutterkornalkaloid-Epimeren wurde nur mit einer mobilen Phase A bei einem pH-Wert > 7 erreicht. Als pH-Moderator haben sich, neben Ammoniumcarbonatpuffer pH 10, Ammoniumcarbonatpuffer pH 9 und 6 mM Ammoniumhydroxid bewährt. Die Verwendung eines mobilen Phasensystems mit einem pH-Wert > 7 erfordert eine analytische Säule, die eine stationäre Phase mit hoher pH-Beständigkeit enthält.

Das Injektionsvolumen sollte für die Säulenabmessungen und die Empfindlichkeit des Massenspektrometers optimiert werden. Die Verwendung von Volumina größer als 20 µl auf einer analytischen Säule mit einem Durchmesser von 3 mm oder Volumina größer als 10 µl auf einer analytischen Säule mit einem Durchmesser von 2,1 mm, kann zu verzerrten Peak-Formen führen.

Die gewählten massenspektrometrischen Bedingungen sollten geeignet sein, um die Analyten mit ausreichender Empfindlichkeit und Spezifität zu messen. Vorzugsweise sollte die protonierte Ausgangsmolekülmasse als Vorläufermasse gewählt werden und die Produkt-Ionen sollten für die Mischung spezifisch sein. Vorzugsweise sollten Produkt-Ionen, die durch den Verlust von Wasser aus dem protonierten Molekül-Ion gebildet werden, nicht ausgewählt werden. Mindestens zwei Vorläufer der Produkt-Ionen-Kombinationen werden ausgewählt, um in das Verfahren zur mehrfachen Reaktionsüberwachung (MRM) einbezogen zu werden. Jeder chromatographische Peak sollte aus mindestens 10 Datenpunkten bestehen.

Das Gerät sollte ausreichend empfindlich sein, um die Analyten auf einem Gehalt von 10 µg/kg in der Futtermittelprobe mit einem maximalen Signal-Rausch-Verhältnis von 6 für das schwächste Produkt-Ion nachzuweisen. Dies entspricht in etwa einem Signal-Rausch-Verhältnis von 50 für das schwächste Produkt-Ion im Arbeitsstandard 10 ng/ml (5.3.19).

Die Analysenserie sollte nicht begonnen werden, bevor nicht durch mindestens dreimaliges Injizieren des Arbeitsstandards (5.3.19) überprüft wurde, dass das System stabile Retentionszeiten des Analyten erzeugt und dass die Empfindlichkeit des Detektors ausreichend und stabil ist.

In Anhang B sind Beispielmessbedingungen und Beispielvorfänger von Produktkombinationen gegeben. Beispielchromatogramme sind in Anhang C dargestellt.

8.2 Analysenabfolge

Für die Qualitätskontrolle des Analysendurchlaufs wird empfohlen, in jede Analysenreihe eine unabhängige Probe aufzunehmen, die sich in einer vorherigen Analyse als frei von Analyten erwiesen hat.

Eine geeignete Analysenabfolge:

- Standardarbeitslösung 10 ng/ml (5.3.19), mindestens drei Mal injiziert oder bis stabile Messbedingungen erreicht sind
- Extraktionsblindprobenlösung (5.4.1)
- Kalibrierungsbereichsextrakte (7.6)
- Extraktionsblindprobenlösung (5.4.1)
- Probenextrakt (7.4)
- Standardadditionsextrakt (7.5)
- Nächster Probenextrakt (7.4)
- Nächster Standardadditionsextrakt (7.5)
- (usw.)
- Extraktionsblindprobenlösung (5.4.1)
- Standardarbeitslösung 10 ng/ml (5.3.19)

9 Prüfergebnisse

9.1 Identifizierung

Der Nachweis und die Identifizierung von Mutterkorn- und Tropanalkaloiden in der Probe basiert auf vorhandenen co-eluierenden chromatographischen Peaks für die für jeden Analyten gemessenen Übergänge. Retentionszeit und relative Häufigkeit der Übergänge sollten mit denen in den Kalibrierproben übereinstimmen. Die Abweichung der Retentionszeit des Analyten in der Probe sollte 0,2 min im Vergleich zur durchschnittlichen Retentionszeit in den Kalibrierungsextrakten 3 bis 9 nicht überschreiten (Tabelle 1). Die relativen Intensitäten der Übergänge in der Probe sollten um nicht mehr als 30 % im Vergleich zum Durchschnitt der relativen Intensitäten von Übergängen in den Kalibrierungsextrakten 3 bis 9 abweichen (Tabelle 1).

9.2 Quantifizierung

9.2.1 Allgemeines

Die Quantifizierung basiert auf der Ein-Punkt-Standardaddition der Probe vor der Extraktion. Der Summenbereich beider Produkt-Ionen wird für alle Berechnungen herangezogen.

ANMERKUNG Optional kann der Bereich des Quantifizierungs-Ions nur in den Berechnungen der Analytkonzentration und -wiederfindung herangezogen werden. Dies kann zu einem leicht erhöhten, jedoch akzeptablen Fehler in den berechneten Ergebnissen führen.

9.2.2 Linearität der Kalibrierkurve

Die Summe der Produkt-Ionenbereiche ist für jeden Analyten in den Kalibrierungsextrakten (7.6) in Abhängigkeit von der ergänzten Konzentration einzutragen. Die abgewogene lineare Regression der kleinsten Quadrate ist über alle Datenpunkte zu verwenden, um Steigung und Achsenabschnitt der Kalibrierlinien zu schätzen. Die Linearität der Kalibrierkurven ist mittels einer geeigneten Prüfung auf Linearität zu prüfen (z. B. grafische Darstellung der Residuen gegen angepasste Werte; Berechnung des Korrelationskoeffizienten, Siehe ANMERKUNG). Zeigt die Prüfung eine Nichtlinearität an, ist die Ursache zu ermitteln und geeignete Maßnahmen zu ergreifen (z. B. durch Reduzierung des Arbeitsbereichs der Kalibrierkurve oder durch Verdünnung der Extrakte).

In der grafischen Darstellung der Residuen gegen angepasste Werte, sollten die berechneten Konzentrationen für einzelne Kalibrierpunkte um weniger als 20 % abweichen. Der Korrelationskoeffizient der Kalibrierkurve sollte mindestens 0,990 betragen.

9.2.3 Berechnung der Analytkonzentration durch Standardaddition

Die Konzentration des Analyten in der Probe wird anhand von Gleichung (1) berechnet.

$$C_{\text{Probe}} = \left(\frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{hinzugefügt}} - A_{\text{Probe}}} \right) \times C_{\text{hinzugefügt}} \quad (1)$$

Dabei ist

C_{Probe} die Konzentration des Analyten in der Probe, in µg/kg;

A_{Probe} die Summe des Bereichs der Produkt-Ionen des Analyten im Probenextrakt (7.4);

$A_{\text{hinzugefügt}}$ die Summe des Bereichs der Produkt-Ionen aus dem Probenextrakt, dem das Analyt in der Konzentration $C_{\text{hinzugefügt}}$ (7.5) hinzugefügt wurde;

$C_{\text{hinzugefügt}}$ die Konzentration des der Probe hinzugefügten Analyten, in µg/kg.

ANMERKUNG In der Regel beträgt $C_{\text{hinzugefügt}}$ 250 µg/kg.

9.2.4 Angabe der Ergebnisse

Die erhaltene Konzentration (in µg/kg) befindet sich auf der Probe, wie sie vom Laboratorium erhalten wurde.

10 Präzision

Einzelheiten des Ringversuchs zur Präzision dieses Verfahrens sind in Anhang A aufgeführt. Eine Zusammenfassung der Präzisionsdaten ist in Tabelle A.2 angegeben.

10.1 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die durch denselben Bearbeiter an identischen Untersuchungsmaterialien mit denselben Geräten innerhalb des kürzesten Zeitabstandes gewonnen wurde, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Wiederholgrenze r überschreiten. In Tabelle A.2 sind die funktionalen Verhältnisse zwischen der gemessenen Konzentration für jeden der 14 Analyten und die Wiederholstandardabweichung s_r aufgeführt. Daraus kann die Wiederholgrenze r wie folgt berechnet werden:

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

Dabei ist

r die Wiederholgrenze;

s_r die Wiederholstandardabweichung.

Für weitere Informationen siehe die Tabellen in Anhang A.

10.2 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die an identischen Untersuchungsmaterialien in zwei Laboratorien gewonnen wurde, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die Vergleichgrenze R überschreiten. In Tabelle A.2 sind die funktionalen Verhältnisse zwischen der gemessenen Konzentration für jeden der 14 Analyten und die Vergleichstandardabweichung s_R aufgeführt. Daraus kann die Vergleichgrenze R wie folgt berechnet werden:

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

Dabei ist

R die Vergleichgrenze;

s_R die Vergleichstandardabweichung.

Für weitere Informationen siehe die Tabellen in Anhang A.

Tabelle 2 — Zusammenfassung der Präzisionsdaten für Mutterkornalkaloide und Tropanalkaloide in unverarbeitetem Getreide und getreidebasierten Futtermischungen

Komponente	Konzentration, C µg/kg	Wiederholstandard- abweichung, s_r µg/kg	Vergleichstandard- abweichung, s_R µg/kg
Ergocornin	11,8 bis 221,2	$0,179 \times C$	$0,306 \times C$
Ergocorninin	9,0 bis 195,9	$0,159 \times C$	$0,211 \times C$
Ergocristin	14,1 bis 312,4	$0,180 \times C$	$0,228 \times C$
Ergocristinin	12,2 bis 258,3	$0,316 \times C$	$0,301 \times C$
α-Ergocryptin	10,3 bis 183,6	$0,279 \times C$	$0,299 \times C$
α-Ergocryptinin	7,6 bis 171,4	$0,163 \times C$	$0,281 \times C$
Ergometrin	11,5 bis 173,5	$0,246 \times C$	$0,243 \times C$
Ergometrinin	3,3 bis 172,4	$0,199 \times C$	$0,234 \times C$
Ergosin	11,8 bis 225,9	$0,154 \times C$	$0,194 \times C$
Ergosinin	9,4 bis 272,8	$0,276 \times C$	$0,346 \times C$
Ergotamin	10,9 bis 442,9	$0,271 \times C$	$0,277 \times C$
Ergotaminin	10,1 bis 272,5	$0,245 \times C$	$0,300 \times C$
Atropin	16,0 bis 252,0	$0,313 \times C$	$0,313 \times C$
Scopolamin	14,8 bis 245,9	$0,342 \times C$	$0,343 \times C$

11 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) alle erforderlichen Angaben zur vollständigen Identifizierung der Probe;
- b) das Datum des Probeneingangs;
- c) das Datum der Analyse der Probe;
- d) eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- e) die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden.

Anhang A (informativ)

Präzisionsdaten

Die folgenden Daten wurden in einem Ringversuch nach den AOAC-Richtlinien für die Durchführung von Ringversuchen zur Validierung von Kennwerten eines Analyseverfahrens [3] erhalten. Um die Notwendigkeit des Ausschlusses von einzelnen „Ausreißer“-Ergebnissen zu vermeiden, wurden robuste Statistiken nach ISO 5725-5 [4] angewendet. Ein detaillierter Bericht über den Ringversuch ist verfügbar [5].

Material A und Material B waren Gerste. Material A diente als Blindprobenmaterial, während Material B mit einer Mischung aus Mutterkorn- und Tropanalkaloid-Standards dotiert war. Material C2 war Buchweizen, gemischt mit gemahlenen Stechapfelsamen, mit einer Mischung aus Mutterkornstandards nahe der Bestimmungsgrenze LOQ dotiert. Material D2 war Weizen, gemischt mit Mutterkorn-Sklerotien und dotiert mit einem Aceton-Extrakt aus Stechapfelsamen. Material E war Roggen, gemischt mit Mutterkorn-Sklerotien und dotiert mit einer Mischung aus Tropanalkaloid-Standards. Material F war Ergänzungsfuttermittel für Rinder, gemischt mit gemahlenen Mutterkorn-Sklerotien und gemahlenen Stechapfelsamen. Material G war ein Mischfutter für Schweine, gemischt mit gemahlenen Mutterkorn-Sklerotien und dotiert mit einer Mischung aus Tropanalkaloid-Standards. Material H2 war Geflügelfutter mit einem Aceton-Extrakt aus gemahlenen Mutterkorn-Sklerotien und mit einem Aceton-Extrakt aus gemahlenen Stechapfelsamen. Für die Herstellung der Materialien E und F wurden die gemahlenen Mutterkorn-Sklerotien wärmebehandelt, um die Epimerisierung der Mutterkorn-Alkaloide zu induzieren.

Vierzehn Laboratorien nahmen am Hauptringversuch teil. Dreizehn Laboratorien legten Ergebnisse vor. Ein Datensatz wurde verworfen, da die vorgelegten Daten unvollständig waren und sich die Empfindlichkeit der Geräte als unzureichend, die Mindestanforderungskriterien zu erfüllen, erwies. Die akzeptierten Datensätze wurden anhand robuster Statistiken ausgewertet. In der Datenauswertung wurden nur Datenpunkte entfernt, die als fehlerhaft galten (z. B. nicht berichtete Ergebnisse oder Wiederholungsdaten, bei denen einer der Datenpunkte einen negativen Wert aufwies). Die im Ringversuch erhaltenen Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle A.1 bis Tabelle A.14 aufgeführt.

Eine grafische Darstellung der erhaltenen relativen Vergleichsstandardabweichung (RSDR) für die Analyten im Hauptringversuch ist in Bild A.1 abgebildet. Aus Bild A.1 geht hervor, dass die meisten der erhaltenen RSDR-Werte kleiner als 33 % sind. Die höheren RSDR-Werte um 10 µg/kg beziehen sich alle auf Buchweizenmaterial (C2), das möglicherweise eine schwieriger zu analysierende Matrix ist, da für alle anderen Matrizen bei dieser Konzentration niedrigere RSDR-Werte erhalten wurden. Buchweizen ist jedoch auch keine bedeutende Futtermittelkomponente. Bei Analytkonzentrationen über etwa 250 µg/kg sind die RSDR-Werte in der Regel höher als bei niedrigeren Konzentrationen, dies deutet darauf hin, dass die Präzision dieses Verfahrens auf etwa den angewendeten Grad der Standardaddition (250 µg/kg) begrenzt ist. Es ist sehr plausibel, dass der Arbeitsbereich des Verfahrens erweitert werden kann, wenn eine Standardaddition in einer höheren Konzentration erfolgt. Dies wurde im Ringversuch jedoch nicht geprüft.

Tabelle A.1 — Präzisionsdaten für Ergocornin

	Gerste	Buchweizen	Weizen	Roggen	Futter- mittel für Rinder	Futter- mittel für Schweine	Futter- mittel für Geflügel
Beschreibung	(B)	(C2)	(D2)	(E)	(F)	(G)	(H2)
Jahr des Ringversuchs	2016	2016	2016	2016	2016	2016	2016
Anzahl der Laboratorien	13	13	13	13	13	13	13
Anzahl der Ausreißer (Laboratorien)	1	1	1	2	1	2	1
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	12	12	12	11	12	11	12
Mittelwert, $\bar{x}$, µg/kg	77,6	12,4	61,9	221,2	71,2	139,7	11,8
Standardabweichung der Wiederholpräzision, s_r , µg/kg	14,6	3,2	14,1	44,1	18,5	17,6	2,2
Relative Standardabweichung der Wiederholpräzision, RSD_r	18,8 %	25,7 %	22,9 %	20,0 %	25,9 %	12,6 %	18,7 %
Wiederholgrenze r ($= 2,8 s_r$), µg/kg	40,8	8,9	39,6	123,6	51,7	49,4	6,2
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_r und x	$s_r = 0,179 \bar{x} + 1,15$ $R = 0,951$						
Standardabweichung der Vergleichpräzision, s_R , µg/kg	18,2	5,1	14,1	73,0	18,5	25,7	2,2
Relative Standardabweichung der Vergleichpräzision, RSD_R	23,4 %	41,4 %	22,9 %	33,0 %	25,9 %	18,4 %	18,7 %
Vergleichgrenze R ($= 2,8 s_R$), µg/kg	51,0	14,3	39,6	204,4	51,7	72,0	6,2
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_R und x	$s_R = 0,306 \bar{x} - 3,63$ $R = 0,955$						
HorRat	1,1	1,9	1,0	1,6	1,2	0,9	0,9

Tabelle A.2 — Präzisionsdaten für Ergocorninin

	Gerste	Buchweizen	Weizen	Roggen	Futter- mittel für Rinder	Futter- mittel für Schweine	Futter- mittel für Geflügel
Beschreibung	(B)	(C2)	(D2)	(E)	(F)	(G)	(H2)
Jahr des Ringversuchs	2016	2016	2016	2016	2016	2016	2016
Anzahl der Laboratorien	13	13	13	13	13	13	13
Anzahl der Ausreißer (Laboratorien)	1	1	1	1	1	1	1
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	12	12	12	12	12	12	12
Mittelwert, $\bar{x}$, µg/kg	48,4	9,0	22,4	195,9	48,7	50,3	12,7
Standardabweichung der Wiederholpräzision, s_r , µg/kg	7,7	2,2	3,0	31,4	11,2	5,8	2,5
Relative Standardabweichung der Wiederholpräzision, RSD_r	15,9 %	24,2 %	13,5 %	16,0 %	22,9 %	11,5 %	20,0 %
Wiederholgrenze r (= $2,8 s_r$), µg/kg	21,6	6,1	8,4	88,0	31,3	16,2	7,1
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_r und x	$s_r = 0,159 \bar{x} + 0,34$ $R = 0,987$						
Standardabweichung der Vergleichpräzision, s_R , µg/kg	10,9	3,5	3,2	41,5	11,2	8,9	2,5
Relative Standardabweichung der Vergleichpräzision, RSD_R	22,5 %	38,8 %	14,2 %	21,2 %	22,9 %	17,7 %	20,0 %
Vergleichgrenze R (= $2,8 s_R$), µg/kg	30,5	9,8	8,9	116,3	31,3	25,0	7,1
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_R und x	$s_R = 0,211 \bar{x} - 0,02$ $R = 0,996$						
HorRat	1,0	1,8	0,6	1,0	1,0	0,8	0,9

Tabelle A.3 — Präzisionsdaten für Ergocristin

	Gerste	Buchweizen	Weizen	Roggen	Futter- mittel für Rinder	Futter- mittel für Schweine	Futter- mittel für Geflügel
Beschreibung	(B)	(C2)	(D2)	(E)	(F)	(G)	(H2)
Jahr des Ringversuchs	2016	2016	2016	2016	2016	2016	2016
Anzahl der Laboratorien	13	13	13	13	13	13	13
Anzahl der Ausreißer (Laboratorien)	1	1	2	2	2	1	1
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	12	12	11	11	11	12	12
Mittelwert, $\bar{x}$, µg/kg	146,9	14,1	312,4	329,1	368,5	553,0	41,3
Standardabweichung der Wiederholpräzision, s_r , µg/kg	31,1	3,7	56,5	155,0	265,8	463,5	7,3
Relative Standardabweichung der Wiederholpräzision, RSD_r	21,2 %	26,5 %	18,1 %	47,1 %	72,1 %	83,8 %	17,6 %
Wiederholgrenze r (= $2,8 s_r$), µg/kg	87,2	10,4	158,3	434,0	744,3	1 297,9	20,4
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_r und $\bar{x}^a$)	$s_r = 0,180 \bar{x} + 1,47$ $R = 0,996$						
Standardabweichung der Vergleichpräzision, s_R , µg/kg	40,6	4,8	70,6	155,0	265,8	463,5	7,8
Relative Standardabweichung der Vergleichpräzision, RSD_R	27,6 %	33,8 %	22,6 %	47,1 %	72,1 %	83,8 %	18,8 %
Vergleichgrenze R (= $2,8 s_R$), µg/kg	113,5	13,3	197,7	434,0	744,3	1 297,9	21,8
Funktionaler Zusammenhang zwischen s_R und $\bar{x}^a$	$s_R = 0,228 \bar{x} + 1,63$ $R = 0,992$						
HorRat	1,3	1,5	1,2	2,5	3,9	4,8	0,9
^a Daten für Proben E, F und G ausgenommen.							