

DIN EN 17425

ICS 67.050; 67.060

Einsprüche bis 2019-09-26

Entwurf

**Lebensmittel –
Bestimmung von Ergotalkaloiden in Getreiden und Getreideerzeugnissen
mit dSPE-Reinigung und LC-MS/MS;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17425:2019**

Foodstuffs –

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

German and English version prEN 17425:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-07-26 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 90 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17425:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

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

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.

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

Foodstuffs — Determination of ergot alkaloids in cereals and cereal products by dSPE clean-up and LC-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	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Chemikalien	7
6 Geräte und Ausrüstung	9
7 Durchführung	10
7.1 Probenvorbereitung	10
7.2 Extraktion der Ergotalkaloide	10
7.2.1 Vorsichtsmaßnahmen	10
7.2.2 Untersuchungsprobe	10
7.2.3 Probenextraktion	11
7.2.4 Aufstocken	11
7.2.5 Reinigung	11
8 LC-MS/MS Analyse	11
8.1 Allgemeines	11
8.2 Aufbau der Messserien und Analysensequenz	12
8.3 Identifizierung	12
8.4 Kalibrierung	12
9 Berechnung	12
9.1 Berechnung der einzelnen Ergotalkaloidkonzentrationen	12
9.2 Berechnung der Konzentration an Gesamtergotalkaloiden	13
10 Präzision	13
10.1 Allgemeines	13
10.2 Wiederholpräzision	13
10.3 Vergleichpräzision	13
11 Prüfbericht	14
Anhang A (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme	15
A.1 Systemeinstellungen für Waters® Xevo® TQ-S Mass Spectrometer	15
A.1.1 Einstellungen für Chromatographie	15
A.1.2 Detektorparameter	16
A.2 Systemeinstellungen für Micromass® Quattro Ultima Pt Mass Spectrometer	18
A.2.1 Einstellungen für Chromatographie	18
A.2.2 Detektorparameter	18
A.3 Systemeinstellungen für SCIEX API 5500 Mass Spectrometer	20
A.3.1 Einstellungen für Chromatographie	20
A.3.2 Detektorparameter	21
A.4 Andere LC-Bedingungen	23
Anhang B (informativ) Typische Chromatogramme	24

Anhang C (informativ) Präzisionsdaten.....	29
Anhang D (informativ) Datenvergleich.....	43
Literaturhinweise.....	44

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17425:2019) 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 wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Einleitung

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

Die Isomere jeder dieser Verbindungen sind üblicherweise benannt als „-inine“.

WARNUNG 1— Sofern Arbeitsschritte mit gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden, sind geeignete Vorsichts- und Schutzmaßnahmen zu treffen. Die EU-Chemikalienverordnung hinsichtlich gefährlicher Stoffe, (EU) Nr. 1907/2006 [3] in ihrer aktuellen Version sowie geeignete nationale Mitteilungen sollten berücksichtigt werden.

WARNUNG 2— Bei der Anwendung dieses Dokumentes 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— Ergotalkaloide können gefäßverengende, neurotoxische sowie reproduktions- und entwicklungstoxische Wirkungen haben, und können akut und chronisch toxisch sein [4].

1 Anwendungsbereich

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

Dieses Verfahren wurde für Getreide und Lebensmitteln auf Getreidebasis validiert.

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

Das Verfahren erbrachte zufriedenstellende Ergebnisse im Bereich von 24,1 µg/kg bis 168 µg/kg, allerdings betrugen die RSD_R -Werte bei den niedrigeren Konzentrationen mehr als 44 % und die HorRat-Werte überschritten 2,0, was darauf hinweist, dass das Verfahren möglicherweise als nicht zufriedenstellend bei Konzentrationen unter 24 µg/kg für die Summe der Ergotalkaloide zu bewerten ist, obwohl sich das Verfahren bei diesen Konzentrationen doch zum Screening eignet. Die Leistungsfähigkeit des Verfahrens kann durch Verwendung eines isotope-markierten internen Standards verbessert werden, dieser war jedoch zur Zeit der Verfahrensvalidierung nicht erhältlich.

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:

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

4 Kurzbeschreibung

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

5 Chemikalien

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

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

- 5.1 **Ergocornin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.2 **Ergocorninin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.3 **Ergocristin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.4 **Ergocristinin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.5 **α -Ergocryptin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.6 **α -Ergocryptinin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.7 **Ergometrin (Maleat)**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.8 **Ergometrinin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.9 **Ergosin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.10 **Ergosinin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.11 **Ergotamin (Tartrat)**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.12 **Ergotaminin**, z. B. kristallin, als Film oder zertifizierte Standardlösung.
- 5.13 **Acetonitril**, LC-MS Reinheitsgrad.
- 5.14 **Methanol**, LC Reinheitsgrad.
- 5.15 **Wasser**, geeignet für LC-MS/MS.
- 5.16 **Festphasen-Extraktionsmaterial**, primäre sekundäre Amine (PSA) loses Material 40 μ m, 10 g; z. B. Bondesil^{TM,1}.
- 5.17 **Natriumhydroxid (NaOH)**, analytischer Reinheitsgrad.
- 5.18 **Natriumhydroxid-Lösung**, Stoffmengenkonzentration $c(\text{NaOH}) = 1,0 \text{ mol/l}$.

4 g NaOH (5.17) werden in Wasser (5.15) gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

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

5.19 Salzsäure (HCl), analytischer Reinheitsgrad, Volumenanteil $\varphi(\text{HCl}) = 37\%$ (acidimetrisch), Dichte $1,18 \text{ g/cm}^3$ (20 °C).

5.20 Salzsäure-Lösung, $c(\text{HCl}) = 1,0 \text{ mol/l}$.

8,3 ml HCl (5.19) werden in Wasser (5.15) gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

5.21 Ammoniumcarbonat ((NH₄)₂CO₃), LC-MS Reinheitsgrad.

5.22 Ammoniumcarbonat-Lösung, Massenkonzentration $\rho((\text{NH}_4)_2\text{CO}_3) = 200 \text{ mg/l}$; $\text{pH} = 8,9 \pm 0,3$.

200 mg Ammoniumcarbonat (5.21) werden auf 2 mg eingewogen und in eine 1 l-Laborglasflasche mit Drehverschluss überführt. 500 ml Wasser (5.15) werden zugegeben und die Flasche wird kräftig geschüttelt, um sicherzustellen, dass alle Feststoffe gelöst sind.

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

Diese Lösung kann 3 Monate bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Alternativ darf eine gebrauchsfertige Ammoniumcarbonat-Lösung [$c((\text{NH}_4)_2\text{CO}_3) = 3,03 \text{ mmol/l}$] von korrekter analytischer Reinheit verwendet werden, um den pH-Wert von $\text{pH} = 8,9 \pm 0,3$ sicherzustellen.

5.23 Extraktionslösemittel.

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

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

Das Auflösen der einzelnen Ergotalkaloide als Filme (5.1 bis 5.12) erfolgt nach den Herstelleranweisungen. Bei Verwendung der Standardsubstanzen in kristalliner Form werden 5 mg der einzelnen Substanzen auf 0,2 mg jeweils in Wägeschiffchen aus Glas eingewogen, quantitativ in einzelne 50 ml-Messkolben überführt und diese bis zur Marke mit Acetonitril (5.13) aufgefüllt. .

5.25 Gemischte Standardlösungen $\rho = 0,5 \text{ µg/ml}$.

50 µl jeder einzelnen Stammlösung (5.24) wird in denselben 10 ml-Messkolben pipettiert (6.5), und dieser bis zur Marke mit Acetonitril (5.13) aufgefüllt.

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

5.26 Kalibrierlösungen.

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

Tabelle 1 — Beispiele geeigneter Kalibrierlösungen

Kalibrier- lösung	Gemischte Standardlösung (5.25) µl	Endvolumen ml	Massen- konzentration an Alkaloiden ng/ml	entspricht Massenanteil an Alkaloiden µg/kg
1	10	50	0,1	0,5
2	20	50	0,2	1
3	10	5	1	5
4	20	5	2	10
5	40	5	4	20
6	100	5	10	50

6 Geräte und Ausrüstung

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

6.1 Laborwaage, Fehlergrenze: 0,01 g.

6.2 Analysenwaage, Fehlergrenze: 0,01 mg.

6.3 Einstufige oder mehrstufige Mühle.

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

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

6.6 Laborschüttler, für die Lösemittlextraktion von 100 ml-Flaschen.

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

6.8 Gefäße, 40 ml, aus Braunglas, mit Verschluss.

6.9 Gefäße, 4,0 ml, aus Braunglas, mit Verschluss.

6.10 Kunststoff Luer-Lock-Spritze, 1 ml.

6.11 Polytetrafluoroethylen (PTFE) Kunststoffspritzenfilter, 13 mm × 0,22 µm.

6.12 Gefäß mit Verschluss, 2,0 ml aus Braunglas.

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

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

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

6.14.2 Injektionssystem, das ein geeignetes Volumen der Injektionslösung mit ausreichender Genauigkeit einspritzt.

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

ANMERKUNG Unter den gegebenen Bedingungen können α - und β -Ergocryptin getrennt werden. Dies ist für die Anwendung des Verfahrens unkritisch, da die Ergebnisse für Gesamt-Ergocryptin angegeben werden, wobei mit α -Ergocryptin quantifiziert wird. Wenn α - und β -Ergocryptinin unter den gegebenen Bedingungen nicht getrennt werden können, wird ein einzelner Peak gemessen, der mit dem α -Ergocryptinin-Standard quantifiziert wird.

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

6.14.5 Säulenofen, der eine konstante Temperatur aufrechterhalten kann.

6.14.6 Tandem-Massenspektrometer (MS/MS), geeignet zur Ionisierung der Ergotalkaloide (im positiven Modus), mit „Selected Reaction Monitoring“ (SRM) mit einem ausreichend großen dynamischen Bereich

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

6.14.7 Datenauswertesystem

7 Durchführung

7.1 Probenvorbereitung

Die Laborprobe wird vor der Untersuchung mit einer Mühle mit einer Siebgröße von 0,5 mm oder kleiner fein gemahlen.

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

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

7.2 Extraktion der Ergotalkaloide

7.2.1 Vorsichtsmaßnahmen

Ergotalkaloide epimerisieren leicht durch Lichteinfluss, und daher muss – wenn möglich- immer Braunglas verwendet werden. Die Proben müssen direkt nach der Extraktion analysiert werden. Nur, wenn es absolut erforderlich ist, dürfen die Extrakte über Nacht bei 4 °C aufbewahrt werden.

7.2.2 Untersuchungsprobe

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

Es darf auch eine größere Probenmenge gewählt werden. In diesem Falle muss die Menge an Extraktionslösemittel (7.2.3) entsprechend angepasst werden.

7.2.3 Probenextraktion

50 ml Extraktionslösemittel (5.23) werden mit einem Messzylinder in das Gefäß (6.4) gegeben.

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

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

Wenn das Schütteln der Proben beendet wurde, wird jeder Kolben einzeln etwa 10 s manuell geschüttelt und der Inhalt durch die Glastrichter und Faltenfilter (6.7) in die 40 ml-Braunglasgefäße (6.8) filtriert.

7.2.4 Aufstocken

10 g $\pm$ 0,05 g „Blind“probe werden mit 200 μ l gemischter Standardlösung (5.25) versetzt. Die aufgestockten Proben werden trocknen gelassen. Mindestens eine Blindprobe und eine geeignete aufgestockte Probe müssen in jeder Sequenz enthalten sein. Die Proben werden nach 7.2.3 extrahiert. Wenn eine größere Untersuchungsprobe verwendet wird, wird das Aufstockvolumen entsprechend angepasst.

7.2.5 Reinigung

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

Jedes fest verschlossene Probengefäß wird etwa 45 s mit dem Laborschüttler (6.6) bei hoher Geschwindigkeit geschüttelt.

Mit einer Kunststoff-Luer-lock-Spritze (6.10) wird so viel wie möglich von der Probe aufgenommen. Ein 13 mm-PTFE 0,22 μ m-Spritzenfilter (6.11) wird aufgesetzt und die Spritze senkrecht gehalten, wobei das Festphasenmaterial auf den Boden der Spritze absinkt. Die Flüssigkeit wird durch den Filter in ein 2 ml-Braunglasgefäß (6.12) gedrückt.

8 LC-MS/MS Analyse

8.1 Allgemeines

Die analytischen Parameter (Auswahl der Massen von Vorläufer- und Produkt-Ionen, Konusspannungen und Kollisionsenergien) werden durch Infusion und Injektion der einzelnen Ergotalkaloid-Standardlösungen optimiert. Dazu wird ein Tandem-Massenspektrometer oder gleichwertiges im positiven Electrospray-Ionisationsmodus (ESI⁺) verwendet. Der Aufnahmemodus wird auf „Multiples Reaktionsmonitoring“ (MRM) eingestellt, wobei mindestens zwei Produktionen betrachtet werden [6]. Beispiele sind in Tabelle A.3 angegeben.

Eine ausreichende Trennung von Ergotalkaloid-Epimeren kann mit einer mobilen Phase eines pH-Wertes von > 7 erhalten werden. Die Verwendung einer mobilen Phase mit pH > 7 erfordert eine Trennsäule mit einer stationären Phase, die gegenüber hohen pH-Werten unempfindlich ist.

Beispiele für Geräteeinstellungen und Übergänge sind in Anhang A aufgeführt. Beispiele typischer Chromatogramme sind in Anhang B aufgeführt.

8.2 Aufbau der Messserien und Analysensequenz

Ein Beispiel ist wie folgt: Die erste Injektion jeder Analysensequenz (nach einer Prüf- oder Vorbereitungs-injektion) ist üblicherweise ein Aliquot des Extraktionsmittels für die Probe (5.23). Dann werden die Kalibrierlösungen, gefolgt vom Extraktionslösemittel injiziert, um auf mögliche Verschleppungen hin zu prüfen. Anschließend werden die Probenmesslösungen injiziert, wobei eine Kalibrierlösung in regelmäßigen Abständen injiziert wird, z. B. eine Kalibrierlösung nachdem 5 bis 10 Probenmesslösungen injiziert worden sind. Am Ende der Sequenz wird erneut die Kalibrierreihe eingespritzt.

8.3 Identifizierung

Jedes Mykotoxin wird durch Vergleichen der Retentionszeiten der Kalibrierlösungen mit denen der Probenmesslösung identifiziert. Ferner wird der Analyt auf Basis von zwei Massenübergängen identifiziert. Außerdem müssen die Retentionszeiten (Peaks in beiden Massenspuren) und das Flächenverhältnis der beiden Peaks mit denen der Vergleichssubstanz übereinstimmen [6].

So lange β -Ergocryptin und β -Ergocryptinin nicht erhältlich sind, werden α -Ergocryptin und α -Ergocryptinin verwendet, um sowohl α - und β -Ergocryptin als auch α - und β -Ergocryptinin zu quantifizieren und der Wert wird für die Summe an α - und β -Ergocryptin als auch α - und β -Ergocryptinin angegeben.

8.4 Kalibrierung

Für jedes Ergotalkaloid werden die Peakflächen des Quantifier-Ions (y-Achse) aller einzelnen Kalibrierlösungen (5.26, Kalibrierlösungen 1 bis 6) gegen den entsprechenden Massenanteil ($\mu\text{g/kg}$) (x-Achse) aufgetragen. Der Quantifier ist der Übergang, der insgesamt das beste Signal-Rausch-Verhältnis (S/N, en: signal/noise) ergibt. Eine Kalibriergerade mit der (eventuell gewichteten) Regression wird mit allen einzelnen Daten erstellt und die Steigung und der mögliche Achsenabschnitt jeder einzelnen Kalibriergerade werden abgeschätzt. Wenn höhere Abweichungen oder eine Nichtlinearität beobachtet werden, muss die Ursache identifiziert und die Analysen, wenn erforderlich, wiederholt werden.

9 Berechnung

9.1 Berechnung der einzelnen Ergotalkaloidkonzentrationen

Unter Verwendung der Kalibriergerade (8.4) für jeden Analyt wird der Massenanteil w jedes Ergotalkaloids in der Probe, angegeben in $\mu\text{g/kg}$, nach Gleichung (1) berechnet:

$$w = \frac{A - b}{a} \quad (1)$$

Dabei ist

- A die Peakfläche im Probenchromatogramm;
- a die Steigung der linearen Funktion;
- b der Schnittpunkt der Kalibrierfunktion mit der y-Achse.

Die Wiederfindungsrate der Aufstockung, (en: recovery rate, RR), angegeben in %, wird nach Gleichung (2) berechnet:

$$RR = \frac{w_s - w_{Cu}}{w_L} \times 100 \quad (2)$$

Dabei ist

w_s er gemessene Massenanteil der aufgestockten Probe, in $\mu\text{g/kg}$;

w_u der Massenanteil der nicht aufgestockten Probe, in $\mu\text{g/kg}$;

w_L der Massenanteil, der der aufgestockten Probe zugesetzt wurde, in $\mu\text{g/kg}$ (hier: $10 \mu\text{g/kg}$).

9.2 Berechnung der Konzentration an Gesamtergotalkaloiden

Für die Konzentration an Gesamtalkaloiden in der Probe wird der Massenanteil jedes einzelnen aus den Kalibriergeraden ermittelten Ergotalkaloids aufsummiert. Wenn ein Ergebnis unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ, en, limit of quantitation) liegt [7], wird dieser Analyt in der Berechnung der Summenkonzentration gleich Null gesetzt.

10 Präzision

10.1 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 Konzentrationsbereiche und Matrices anwendbar.

10.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Ergebnissen, 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, siehe Tabelle 2.

10.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Ergebnissen, die zwei Laboratorien für identisches Untersuchungsmaterial erhalten, überschreitet die Vergleichsgrenze R nicht häufiger als in 5 % der Fälle, siehe Tabelle 2.

Tabelle 2 — Präzisionsdaten für die Summe (12) an Ergotalkaloiden

Probe	$\bar{x}$ $\mu\text{g/kg}$	r $\mu\text{g/kg}$	R $\mu\text{g/kg}$
Roggenmehl	150	44,9	84,0
Roggenmehl	168	82,4	111
Frühstückscerealien	72,0	58,0	74,7
Frühstückscerealien für Kleinkinder	18,7	16,4	26,5
Knäckebröt	13,2	10,1	18,2
Roggenbröt	110	15,6	86,6
Vollkornmehl	24,1	5,94	14,7
Gerste- und Roggenmehl	73,5	90,4	90,4

11 Prüfbericht

Der Prüfbericht sollte den Anforderungen von EN ISO/IEC 17025 entsprechen und muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe (Art, Herkunft, Bezeichnung der Probe);
- b) eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- c) das Datum und die Art des Probenahmeverfahrens (wenn bekannt);
- d) das Datum des Probeneingangs;
- e) das Datum der Untersuchung;
- f) die Untersuchungsergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- g) alle Besonderheiten, die während der Untersuchung festgestellt wurden;
- h) alle Arbeitsschritte, die nicht in diesem Verfahren festgelegt sind oder als wahlfrei angesehen wurden und die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben.

Anhang A (informativ)

Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme

A.1 Systemeinstellungen für Waters® Xevo® TQ-S Mass Spectrometer²

A.1.1 Einstellungen für Chromatographie

Arbeitsbedingungen:

LC-System:	Waters® Acquity UPLC™, ² oder ähnlich
Säule:	Waters® ACQUITY UPLC® BEH ² , C18, 130 Å, 1,7 µm (100 × 2,1 mm) (6.14.3) mit Filter (6.14.4)
Durchfluss:	0,5 ml/min
Mobile Phase A:	Acetonitril (5.13)
Mobile Phase B:	Ammoniumcarbonat-Lösung (5.22)
Säulentemperatur:	(40 ± 5) °C
Injektionsvolumen:	10 µl
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle A.1
Autosamplertemperatur:	(10 ± 5) °C
Spüllösung für Dichtungen:	entgastes Wasser (5.15) + Methanol (5.14) (50 + 50, v + v)
Nadelspüllösung:	Acetonitril (5.13)

Tabelle A.1 — Gradientenprogramm

Zeit	Mobile Phase A	Mobile Phase B
min	%	%
0,0	5	95
1,5	45	55
3,5	50	50
6,0	70	30
9,0	99	1
12,0	5	95

² Waters® Xevo® TQ-S, Waters® Acquity UPLC™ und Waters® ACQUITY UPLC® BEH sind Beispiele. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

A.1.2 Detektorparameter

Die folgenden Detektoreinstellungen können als Richtwerte betrachtet werden. Die genauen Messbedingungen hängen jeweils vom Gerät ab und dürfen daher leicht abweichen. Durch Messen von Standardlösungen muss sichergestellt werden, dass das Analysensystem geeignet ist.

Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, Waters® Xevo® TQ-S³.

Software, MassLynx™ einschließlich TargetLynx™ (Waters®, Version 4.1 oder später)³.

Ionisationsmodus, Electrospray im positiven Ionisationsmodus (ESI⁺).

Aufnahmemodus, selected reaction monitoring (SRM).

Im Analysenlauf muss immer die aktuelle Kalibrierfunktion verwendet werden und das Gerät muss regelmäßig gewartet werden. Übergänge, die unter den optimierten Bedingungen detektiert werden, sind in Tabelle A.2 angegeben. Diese Bedingungen sind jedoch gerätespezifisch.

Tabelle A.2 — Detektierte Übergänge unter optimierten Bedingungen

Ergotalkaloid	Vorläufer-Ion m/z	Produkt-Ion m/z	Dwelltime s	Konus- spannung V	Kollisions- energie eV
Ergometrin und Ergometrinin	326	208	0,122	30	27
	326	223	0,122	30	24
Ergosin und Ergosinin	548	208	0,059	30	40
	548	223	0,059	30	30
Ergocornin	562	268	0,038	30	23
	562	223	0,038	30	35
Ergocorninin	562	223	0,038	30	35
	562	277	0,038	30	25
Ergocryptin	576	223	0,038	30	35
	576	268	0,038	30	24
Ergocryptinin	576	223	0,038	30	35
	576	305	0,038	30	28
	576	558	0,038	30	14
Ergotamin	582	208	0,059	30	40
	582	223	0,059	30	32
Ergotaminin	582	223	0,059	30	32

³ Waters® Xevo® TQ-S und MassLynx™ einschließlich TargetLynx™ (Waters®, Version 4.1 oder später) sind Beispiele. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

Ergotalkaloid	Vorläufer-Ion m/z	Produkt-Ion m/z	Dwelltime s	Konus- spannung V	Kollisions- energie eV
	582	277	0,038	30	250
	582	564	0,038	30	14
Ergocristin	610	223	0,038	30	35
	610	208	0,038	30	45
Ergocristinin	610	223	0,038	30	35
	610	305	0,038	30	26
	610	592	0,038	30	13

Die für die Quantifizierung einer jeden Verbindung ausgewählten Übergänge aus dem MRM sind die ersten (Quantifier)-Ionen in Tabelle A.3 für jede Verbindung zusammen mit den entsprechenden Qualifizierungsionen (Qualifier) angegeben.

Tabelle A.3 — Ergotalkaloide im LC-MS/MS Verfahren mit Waters® Xevo® TQ-S LC-MS/MS

Verbindung	Retentionszeit min	MRM Quantifier	MRM Qualifier
Ergometrin	1,65	326 → 223	326 → 208
Ergometrinin	2,05	326 → 208	326 → 223
Ergosin	2,70	548 → 223	548 → 208
Ergosinin	4,20	548 → 223	548 → 208
Ergotamin	2,85	582 → 223	582 → 208
Ergotaminin	4,60	582 → 564	582 → 223
Ergocornin	3,30	562 → 268	562 → 223
Ergocorninin	5,00	562 → 544	562 → 223
Ergocryptin	3,70	576 → 268	576 → 223
Ergocryptinin	5,45	576 → 558	576 → 223
Ergocristin	3,85	610 → 223	610 → 208
Ergocristinin	5,65	610 → 592	610 → 223

A.2 Systemeinstellungen für Micromass® Quattro Ultima Pt Mass Spectrometer⁴

A.2.1 Einstellungen für Chromatographie

Arbeitsbedingungen:

LC-System:	Waters® Alliance 2695 HPLC ⁴
Säule:	Phenomenex® Gemini® ⁴ 5 µm C18 150 × 2,0 mm, 110 Å (6.14.3) mit Filter (6.14.4)
Durchfluss:	0,5 ml/min
Mobile Phase A:	Acetonitril (5.13)
Mobile Phase B:	Ammoniumcarbonat-Lösung (5.22)
Säulentemperatur:	(30 ± 5) °C
Injektionsvolumen:	10 µl
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle A.4
Autosamplertemperatur:	(15 ± 5) °C

Tabelle A.4 — Gradientenprogramm

Zeit min	Mobile Phase A %	Mobile Phase B %
0,0	5	95
1,0	17	83
2,0	47	53
10,0	54	46
15,0	80	20
16,0	5	95
21,0	5	95

A.2.2 Detektorparameter

Die Detektoreinstellungen in Tabellen A.5 bis A.7 können als Richtwerte betrachtet werden. Die genauen Messbedingungen hängen jeweils von der Laborausstattung bzw. dem Gerät ab und dürfen daher leicht abweichen. Durch Messen von Standardlösungen muss sichergestellt werden, dass das Analysensystem geeignet ist.

⁴ Micromass® Quattro Ultima Pt, Waters® Alliance 2695 HPLC and Phenomenex® Gemini® sind Beispiele. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

Tabelle A.5 — MS-Einstellungen

Quellenparameter	Einstellung	Source Parameter	Setpoint
Polarität	ESI ⁺	LM 1 Resolution	13,5
Kapillarspannung (kV)	3,00	HM 1 Resolution	13,5
RF Lens 1 (V)	40,0	Ion Energy 1 (V)	0,5
Aperture (V)	0,0	Entrance	-2
RF Lens 2 (V)	0,2	Exit	2
Quellentemperatur (°C)	120	LM 2 Resolution	15,0
Desolvationstemperatur (°C)	350	HM 2 Resolution	15,0
Konusgasfluss (l/h)	102	Ion Energy 2 (V)	0,5
Desolvationsgasfluss (l/h)	712	Multiplier (V)	650

Tabelle A.6 — Detektierte Übergänge unter optimierten Bedingungen

Ergotalkaloid	Vorläufer-Ion m/z	Produkt-Ion m/z	Dwelltime s	Konus- spannung V	Kollisions- energie eV
Ergometrin und Ergometrinin	326	208	0,10	35	20
	326	223	0,10	35	15
Ergosin und Ergosinin	548	208	0,05	40	35
	548	223	0,05	40	25
Ergocornin und Ergocorninin	562	208	0,05	35	40
	562	223	0,05	35	30
Ergocryptin und Ergocryptinin	576	223	0,05	35	32
	576	268	0,05	35	18
Ergotamin und Ergotaminin	582	208	0,05	45	40
	582	223	0,05	45	30
Ergocristin und Ergocristinin	610	223	0,05	40	35
	610	268	0,05	40	20

**Tabelle A.7 — Ergotalkaloid-Retentionszeiten (RT) und
MRM Übergänge zur Quantifizierung und Bestätigung**

Verbindung	Retentionszeit min	MRM-Quantifier	MRM-Qualifier
Ergometrin	1,62	326 → 223	326 → 208
Ergometrinin	2,00	326 → 208	326 → 223
Ergosin	2,66	548 → 223	548 → 208
Ergosinin	4,17	548 → 223	548 → 208
Ergotamin	2,82	582 → 223	582 → 208
Ergotaminin	4,55	582 → 564	582 → 223
Ergocornin	3,27	562 → 268	562 → 223
Ergocorninin	4,94	562 → 544	562 → 223
Ergocryptin	3,66	576 → 268	576 → 223
Ergocryptinin	5,38	576 → 558	576 → 223
Ergocristin	3,83	610 → 223	610 → 208
Ergocristinin	5,56	610 → 592	610 → 223

A.3 Systemeinstellungen für SCIEX API 5500 Mass Spectrometer⁵

A.3.1 Einstellungen für Chromatographie

Arbeitsbedingungen:

LC-System:	Agilent 1290 Infinity™ LC-System ⁵
Säule:	Waters® ACQUITY UPLC® BEH5, C18, 130 Å, 1,7 µm (100 × 2,1 mm)
Guard Column:	Waters® ACQUITY UPLC® BEH VanGuard5, 2,1 mm × 5 mm, 1,7 µm
Durchfluss:	0,5 ml/min
Mobile Phase A:	Acetonitril (5.13)
Mobile Phase B:	Ammoniumcarbonat-Lösung (5.22)
Säulentemperatur:	(30 ± 5) °C
Injektionsvolumen:	1 µl
Nadelspüllösung:	Wasser + Acetonitril (1 ± 1, v ± v)
Autosamplertemperatur:	(8 ± 4) °C
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle A.8

⁵ SCIEX API 5500, Agilent 1290 Infinity™ LC system, Waters® ACQUITY UPLC® BEH, und Waters® ACQUITY UPLC® BEH VanGuard sind Beispiele. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

Tabelle A.8 — Gradientenprogramm

Zeit min	Mobile Phase A %	Mobile Phase B %
0,0	5	95
1,5	45	55
3,5	50	50
6,0	70	30
6,1	99	1
9,0	99	1
9,1	5	95
12,0	5	95

A.3.2 Detektorparameter

Die folgenden Detektoreinstellungen und die Einstellungen in Tabelle A.9, können als Richtwerte betrachtet werden. Die genauen Messbedingungen hängen jeweils von der Laborausstattung bzw. dem Gerät ab und dürfen daher leicht abweichen.

Massenspektrometer:	Sciex API 5500
Ionisationsmodus:	Electrospray positiv (ESI)
Spray Voltage:	3 000 V
Quellentemperatur:	550 °C
Curtain Gas:	20 psi
Ion Source Gas 1:	50 psi
Ion Source Gas 2:	40 psi
Entrance Potential:	+10 V
Collision exit potential:	+15 V
CAD gas pressure:	Medium
Resolution:	Unit on each quadrupole
Pause zwischen Massenbereichen:	5 ms
Schedule MRM:	Detektionsfenster: 60 s Target scan time: 0,40 s

Tabelle A.9 — Individuelle MS-Parameter

Ergot alkaloid	Vorläufer-Ion m/z	Produkt-Ion m/z	Declustering potential	Kollisions- energie	Retentions- zeit min
Ergometrin	326	223	100	33	1,88
		208	100	41	
Ergometrinin	326	208	100	37	2,23
		207	100	56	
Ergosin	548	223	100	42	2,95
		268	100	34	
Ergotamin	582	223	90	41	3,15
		208	90	51	
Ergocornin	562	268	100	34	3,63
		223	100	46	
Ergocryptin	576	268	100	34	4,05
		223	100	46	
Ergocristin	610	268	90	36	4,25
		223	90	45	
Ergosinin	548	223	90	42	4,67
		208	90	65	
Ergotaminin	582	223	90	42	5,10
		277	90	35	
Ergocorninin	562	305	100	36	5,45
		277	100	37	
Ergocryptinin	576	305	90	37	5,88
		223	90	45	
Ergocristinin	610	305	90	39	6,10
		223	90	46	

A.4 Andere LC-Bedingungen

Die folgenden Säulen und Bedingungen haben sich als geeignet erwiesen:

LC-Säule	Phenomenex® Kinetex® Phenyl-Hexyl ⁶ ; (100 × 4,6) mm, 2,6 µm
Mobile Phase A	NH ₄ HCO ₃ , c = 1 mmol/l in Wasser
Mobile Phase B	Acetonitril (5.13)
Durchfluss	0,6 ml/min
Säulentemperatur	35 °C
Injektionsvolumen	10 µl

LC-Säule	YMC-Triart C18 ⁶ , (150 × 2) mm, 3 µm, 120 Å
Mobile Phase A	Ammoniumcarbonat-Lösung (5.22)
Mobile Phase B	Acetonitril (5.13)
Durchfluss	0,5 ml/min
Säulentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 µl

LC-Säule	Waters Acquity UPLC® XBridge BEH C18 ⁶ , (150 × 2,1) mm, 1,7 µm
Mobile Phase A	Ammoniumcarbonat-Lösung (5.22)
Mobile Phase B	Acetonitril (5.13)
Durchfluss	0,5 ml/min
Säulentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 µl

LC-Säule	Gemini® C6-Phenyl 110 Å ⁶ ; (150 × 2) mm, 3 µm
Mobile Phase A	Wasser/Ammoniumcarbamat ($\rho = 4 \text{ g/l}$)/Methanol (85 + 5 + 10, v + v + v)
Mobile Phase B	Wasser/Ammoniumcarbamat ($\rho = 4 \text{ g/l}$)/Methanol (5 + 5 + 90, v + v + v)
Durchfluss	0,2 ml/min
Säulentemperatur	30 °C
Injektionsvolumen	10 µl

6 Phenomenex® Kinetex® Phenyl-Hexyl, YMC-Triart C18, Waters® Acquity UPLC® Bridge BEH C18 und Gemini® C6-Phenyl 110 Å sind Beispiele. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

Anhang B (informativ)

Typische Chromatogramme

Die Bilder B.1 bis B.5 sind alle mit den Einstellungen nach A.1 Waters® Xevo® TQ-S mit Acquity LC-System aufgenommen worden. Die Retentionszeiten der Ergotalkaloide sind in Tabelle A.3 angegeben.

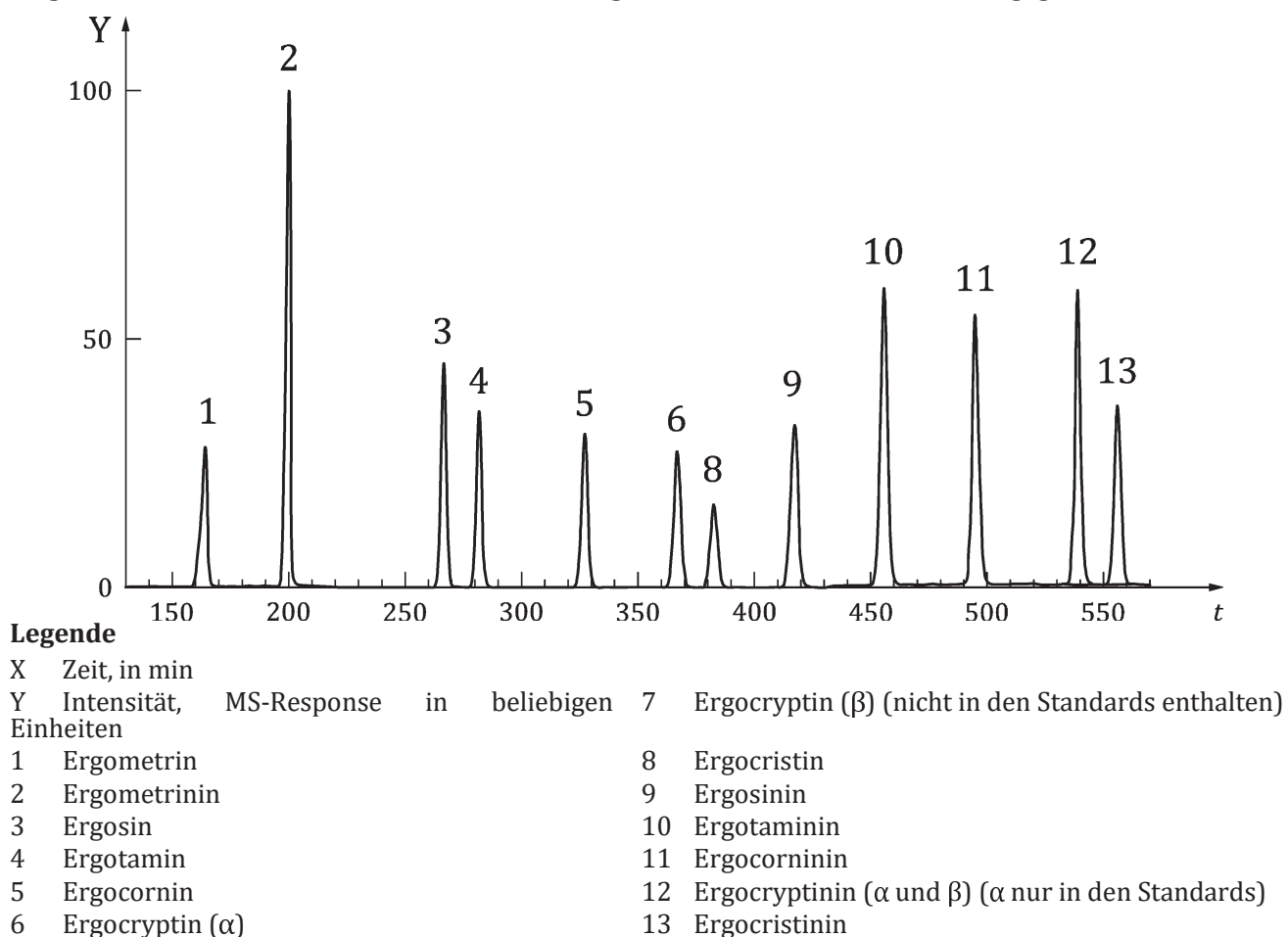
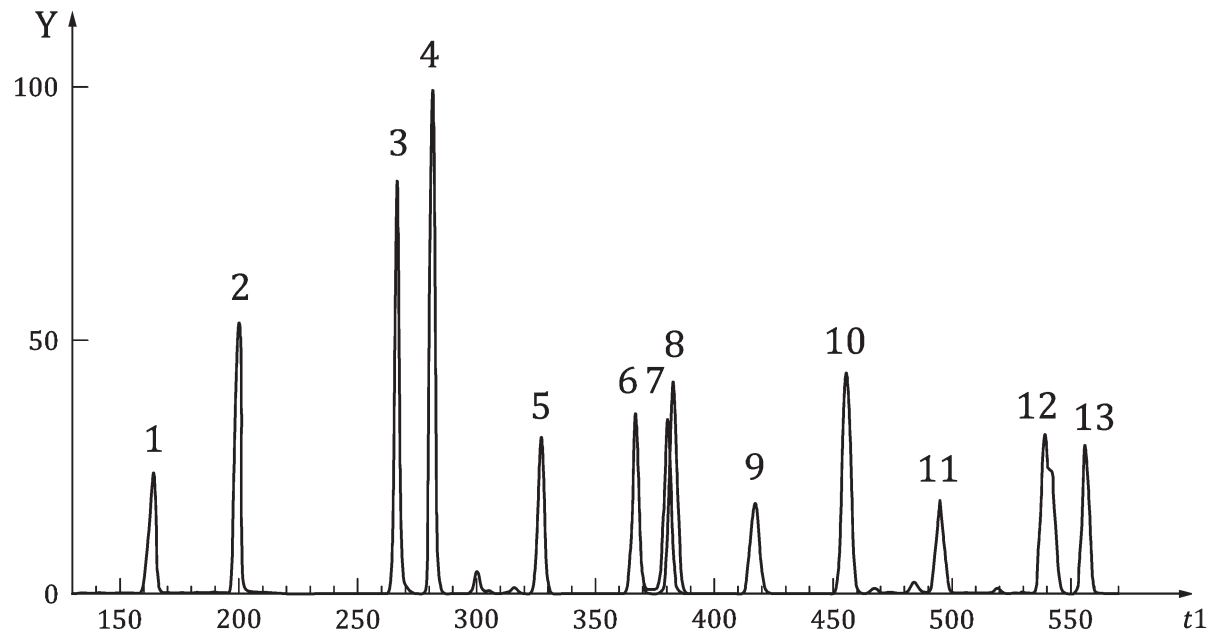


**Bild B.1 — Typisches Chromatogramm der Kalibrierlösung 6 mit 10 ng/ml je Ergotalkaloid
(entspricht 50 μ g/kg je Alkaloid)**



Legende

X Zeit, in min

Y Intensität, MS-Response in beliebigen Einheiten

1 Ergometrin

2 Ergometrinin

3 Ergosin

4 Ergotamin

5 Ergocornin

6 Ergocryptin (α)

7 Ergocryptin (β) (nicht in den Standards enthalten)

8 Ergocristin

9 Ergosinin

10 Ergotaminin

11 Ergocorninin

12 Ergocryptinin (α und β) (α nur in den Standards)

13 Ergocristinin

Bild B.2 — Typisches Chromatogramm von Roggenmehl mit 168 $\mu\text{g/kg}$ Gesamt-Ergotalkaloide