

**Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden (PA)
in Mehl mittels SPE-LC-MS/MS**

Methodenbeschreibung

BfR-PA-Mehl-1.0/2014

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Anwendungsbereich	3
2.	Kurzbeschreibung	3
3.	Chemikalien und Lösungen	3
3.1	Allgemein	3
3.2	Chemikalien	4
3.3	Lösungen	5
4.	Geräte	6
5.	Durchführung	7
5.1	Probenvorbereitung und –homogenisierung	7
5.2	Extraktion der Proben	7
5.3	SPE	7
5.4	Rekonstitution der Probe	8
6.	HPLC-MS/MS	8
6.1	Chromatographische Trennung	8
6.2	Tandem-Massenspektrometrische Bestimmung	8
6.3	Aufbau der Messsequenz für die quantitative Analyse	9
6.4	Herstellung der Kalibrierlösungen/Durchführung der Standardaddition	9
7.	Berechnungen	11
7.1	Kalibrierfunktion/Standardadditionsfunktion	11
7.2	Quantifizierung	11
7.3	Angabe der Ergebnisse	11
8.	Anhang	13
8.1	LC-MS/MS Messung	13
8.2	Ergebnisse der inhouse-Validierung	16
8.3	Beispielchromatogramm	20
8.4	Anbieter von PA-Standardsubstanzen	21
8.5	Fließschema zur Probenaufarbeitung	23

1. Anwendungsbereich

Pyrrolizidinalkaloide (PA) sind sekundäre Pflanzenstoffwechselprodukte, denen karzinogene und genotoxische Eigenschaften zugeschrieben werden. Derzeit sind etwa 600 dieser Verbindungen bekannt, die hauptsächlich in den Pflanzengattungen der Boraginaceae, Asteraceae und Fabaceae gebildet werden. Auf Grund der weltweiten Verbreitung dieser Pflanzen, kann es leicht zu Kontaminationen von pflanzlichen Lebens- und Genussmitteln, Phytopharmaka oder auch Futtermitteln kommen (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) 2011).

Die Methode beschreibt die Bestimmung folgender Pyrrolizidinalkaloiden in Mehl: Echimidin (Em), Echimidin-N-oxid (EmN), Erucifolin (Er), Erucifolin-N-oxid (ErN), Europin (Eu), Europin-N-oxid (EuN), Heliotrin (Hn), Heliotrin-N-oxid (HnN), Intermedin (Im), Intermedin-N-oxid (ImN), Jacobin (Jb), Jacobin-N-oxid (JbN), Lasiocarpin (Lc), Lasiocarpin-N-oxid (LcN), Lycopsamin (La), Lycopsamin-N-oxid (LaN), Monocrotalin (Mc), Monocrotalin-N-oxid (McN), Retrorsin (Re), Retrorsin-N-oxid (ReN), Senecionin (Sc), Senecionin-N-oxid (ScN), Seneciphyllin (Sp), Seneciphyllin-N-oxid (SpN), Senecivernin (Sv), Senecivernin-N-oxid (SvN), Senkirkin (Sk) und Trichodesmin (Td).

Die Methode wurde für Weizen- und Roggenmehl inhouse validiert. Des Weiteren wurde die Anwendbarkeit der Methode für weitere Matrices (Dinkel-, Buchweizen-, Mais-, Reis-, Hirsemehl und diverse Pseudocerealienmehle) getestet.

2. Kurzbeschreibung

Die PA werden aus dem Mehl mittels schwefelsaurem Methanol unter Verwendung eines Ultraschallbads extrahiert. Die Proben werden anschließend zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstands wird zur Festphasenextraktion (SPE) unter Verwendung von Kationenaustauscher-Materialien eingesetzt. Nach methanolischer Elution der PA, wird das Eluat zur Trockne gebracht und wieder in Methanol/Wasser (HPLC-Anfangsbedingungen) aufgenommen.

Zur chromatographischen Trennung wird eine RP-HPLC-Säule mit einem binären Gradienten verwendet. Die Analyten werden mittels Triple Stage Quadrupole Massenspektrometrie detektiert. Die Konzentration der Pyrrolizidinalkaloide wird über eine Matrix-Standardreihe (Matrix-Matched-Calibration) oder gegebenenfalls über eine Standardaddition bestimmt.

3. Chemikalien und Lösungen

3.1 Allgemein

Hinweis: Die in dieser Methode vorgesehenen Arbeiten mit gesundheitsschädlichen Chemikalien sind unter geeigneten Vorsichts- und Schutzmaßnahmen, wie Vermeidung des Hautkontaktes und Benutzung des Abzuges durchzuführen. Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien und für die HPLC-MS/MS geeignete Lösungsmittel zu verwenden. Das verwendete Wasser muss in Glasgeräten destilliert oder entmineralisiert bzw. von entsprechender Reinheit sein.

3.2 Chemikalien

- | | | |
|--------|---|-------|
| 3.2.1 | Senecionin | (Sc) |
| 3.2.2 | Senecionin-N-oxid | (ScN) |
| 3.2.3 | Seneciphyllin | (Sp) |
| 3.2.4 | Seneciphyllin-N-oxid | (SpN) |
| 3.2.5 | Monocrotalin | (Mc) |
| 3.2.6 | Monocrotalin-N-oxid | (McN) |
| 3.2.7 | Retrorsin | (Re) |
| 3.2.8 | Heliotrin | (Hn) |
| 3.2.9 | Heliotrin-N-oxid | (HnN) |
| 3.2.10 | Trichodesmin | (Td) |
| 3.2.11 | Retrorsin-N-oxid | (ReN) |
| 3.2.12 | Echimidin | (Em) |
| 3.2.13 | Intermedin | (Im) |
| 3.2.14 | Lycopsamin | (La) |
| 3.2.15 | Senkirkin | (Sk) |
| 3.2.16 | Lasiocarpin | (Lc) |
| 3.2.17 | Lasiocarpin-N-oxid | (LcN) |
| 3.2.18 | Europin-N-Oxid | (EuN) |
| 3.2.19 | Europinhydrochlorid | (Eu) |
| 3.2.20 | Echimidin-N-oxid | (EmN) |
| 3.2.21 | Erucifolin | (Er) |
| 3.2.22 | Erucifolin-N-Oxid | (ErN) |
| 3.2.23 | Intermedin-N-Oxid | (ImN) |
| 3.2.24 | Jacobin | (Jc) |
| 3.2.25 | Jacobin-N-Oxid | (JcN) |
| 3.2.26 | Lycopsamin-N-Oxid | (LaN) |
| 3.2.27 | Senecivernin | (Sv) |
| 3.2.28 | Senecivernin-N-Oxid | (SvN) |
| 3.2.29 | Ameisensäure 98 – 100%, z.B. Sigma-Aldrich | |
| 3.2.30 | Methanol (MeOH), LC-MS Qualität, z.B. Merck LiChrosolv® | |
| 3.2.31 | Schwefelsäure 98%, z.B. Merck | |
| 3.2.32 | Ammoniak 32%, z.B. Merck | |
| 3.2.33 | Ammoniumformiat, LC-MS Qualität, z.B. Fluka | |
| 3.2.34 | Acetonitril, z.B. Merck LiChrosolv® | |

3.3 Lösungen

3.3.1 Extraktionsmittel (0,05 M H₂SO₄ in MeOH):

Zur Herstellung des Extraktionsmittels werden 2,665 ml H₂SO₄ (3.2.31) mit Methanol auf 1 L aufgefüllt. Die Endkonzentration der Lösung beträgt 0,05 M.

3.3.2 2,5% Ammoniak in Methanol (zur SPE-Elution)

Zur Herstellung der ammoniakalischen Methanol-Lösung werden 7,8 ml 32% Ammoniak (3.2.32) mit Methanol (3.2.30) auf 100 ml aufgefüllt.

Hinweis: Die Lösung ist arbeitstäglich frisch anzusetzen.

3.3.3 Eluenten für die Chromatographie:

Eluent A:

315 mg Ammoniumformiat (3.2.33) werden in 5 ml Wasser gelöst, 1 ml Ameisensäure (3.2.29) wird hinzugefügt und mit Wasser auf 1 L aufgefüllt.

Hinweis: Eluent A sollte nicht länger als 1 Woche verwendet werden, da lagerungsbedingte Veränderungen der Lösung zu Retentionszeitschwankungen führen können.

Eluent B:

315 mg Ammoniumformiat (3.2.33) werden in 5 ml Wasser gelöst, 1 ml Ameisensäure (3.2.29) wird hinzugefügt und mit Methanol (3.2.30) auf 1 L aufgefüllt.

3.3.4 Standardlösung zur Kalibration

Stammlösung (0,1 mg/ml):

Zur Herstellung einer Stammlösung wird 1 mg eines Pyrrolizidinalkaloidstandards auf einer Präzisionswaage (4.3) eingewogen und mit Acetonitril (3.2.34) im Messkolben auf 10 ml aufgefüllt. Die Konzentration der Stammlösung beträgt 0,1 mg/ml.

Standard-Arbeitslösung 1 µg/ml (PA-Mix):

Für die Standard-Arbeitslösung werden jeweilige Volumina der einzelnen PA-Stammlösung (0,1 mg/ml) in ein Messkolben pipettiert und mit Acetonitril (3.2.34) bis zur Messmarke aufgefüllt, sodass man eine Konzentration von 1 µg/ml PA erhält.

3.3.5 5%iges Methanol

Zur Herstellung des 5%igen Methanols werden 5 ml Methanol (3.2.30) mit 95 ml Wasser vermischt und kräftig geschüttelt.

4. Geräte

4.1 Allgemein

Neben der normalen Laborausstattung werden folgende Geräte verwendet:

4.2 Kolbenhubpipetten, Mehrfachdispenser, z.B. Fa. Brand

4.3 Präzisionswaage

4.4 Mühle z.B. ZM-1000 Retsch

4.5 Präzisionswaage, Genauigkeit: 0,0001 g

4.6 50 ml Zentrifugenröhrchen aus PP

4.7 250 ml Zentrifugenflaschen aus PP

4.8 Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor für 50 ml bzw. 250 ml Gefäße

4.9 Ultraschallbad

4.10 Vortex Mischer

4.11 Überkopfschüttler

4.12 Verdampfungsstation TurboVap

4.13 Schraubflaschen 30 oder 50 ml

4.14 Reagenzgläser 15 ml

4.15 Diverse Messzylinder

4.16 Messkölbchen, 10, 20 und 100 ml

4.17 Faltenfilter, z.B. Munktell

4.18 SPE-Kartuschen: Bond Elut Plexa PCX, 500 mg / 6 ml (Varian)

4.19 SPE-Vakuumkammer

4.20 Zentrifugalfilter 0,5 ml Nylon, modifiziert, 0,2 µm, z.B. von VWR

4.21 Zentrifuge für Reaktionsgefäße, z.B. Microfuge RV Fa. Beckman

4.22 1,5 ml Reaktionsgefäße, z.B. Eppendorf

4.23 2 ml HPLC-Probenvials

4.24 250 µl konische Glaseinsätze für 2 ml Probenvials

4.25 Alu-Bördelkappe 11 mm für Probenvials PTFE/Silikon/PTFE-Septum

4.26 HPLC-Säule: Fa. Thermo, Hypersil Gold[®] C18; 150 x 2,1 mm; Korngröße: 1,9 µm

4.27 LC-MS/MS System

5. Durchführung

5.1 Probenvorbereitung und –homogenisierung

Um für die Gesamtprobe repräsentative Analysenergebnisse zu erhalten, wird diese vor der Analyse durch Schütteln im Überkopfschüttler (4.11) für 30 min homogenisiert. Sollte das zu analysierende Mehl offensichtlich keine einheitliche Partikelgröße aufweisen, so sollte die Probe zusätzlich gemahlen werden. Dazu wird die gesamte Probe portionsweise mit Trockeneis im Verhältnis 2:1 vermengt und unter Verwendung einer Zentrifugalmühle (4.4) mit Distanzsieb (Siebgröße 0,5 mm) gemahlen sowie anschließend im Überkopfschüttler (4.11) für 30 Minuten homogenisiert.

5.2 Extraktion der Proben

Für die Extraktion werden $20,0 \pm 0,1$ g Mehl in ein geeignetes Zentrifugengefäß (4.7) eingewogen.

Extraktion	Auf die komplette Probe werden 100 ml der 0,05 M H_2SO_4 in Methanol (3.3.1) gegeben. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das komplette Probenmaterial mit dem Lösungsmittel benetzt ist. Die Extraktion wird dann für 15 min bei Raumtemperatur in einem Ultraschallbad (4.9) durchgeführt.
Zentrifugation	Die Probe wird für $10 \text{ min} \pm 2 \text{ min}$ mit $3800 \times g$ (3000 U/min) zentrifugiert (4.8).
Filtration	Der Überstand wird über einen Faltenfilter (4.17) filtriert und das Filtrat in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (4.6) aufgefangen Ein Aliquot von 10 ml des Filtrates wird für die SPE verwendet. Sollte das Filtrat noch größere Mengen an Partikeln enthalten, kann dieses zusätzlich zentrifugiert werden um ein Verstopfen der SPE-Kartuschen zu verhindern.

5.3 SPE

Die Probenextrakte werden mittels SPE-Kartuschen Bond Elut Plexa PCX, 500 mg/ 6 ml gereinigt und angereichert. Die SPE wird mit Hilfe einer Vakuumkammer (4.19) durchgeführt.

Konditionierungsschritt 1	5 ml Methanol (3.2.30)
Konditionierungsschritt 2	5 ml schwefelsaures Methanol (3.3.1)
Probenaufgabe	2 x 5 ml Probe
Waschschrift	6 ml Wasser, 6 ml Methanol
Trocknung	15 min (hierbei wird Vakuum angelegt)
Elution	2 x 5 ml ammoniakalisches MeOH (3.3.2)

Im Anschluss wird das Eluat unter Stickstoffstrom bei $50 \text{ °C} \pm 5 \text{ °C}$ zur Trockne gebracht (4.12).

5.4 Rekonstitution der Probe

Der Rückstand wird in 1 ml Methanol/Wasser (5/95, v/v) aufgenommen und durch Schütteln auf dem Reagensglasschüttler (4.10) gelöst.

Die Probe wird durch einen geeigneten Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert (4.20). Falls ein Zentrifugalfilter verwendet wird, werden 500 µl der Probe bei 20000 x g für 10 min zentrifugiert. 200 µl des Filtrats werden zur Messung in ein HPLC-Vial (4.23) mit Glasinsert (4.24) überführt.

6. HPLC-MS/MS

6.1 Chromatographische Trennung

Die Messungen können mit verschiedenen Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) und Trennsäulen durchgeführt werden. Die chromatographischen Bedingungen können frei gewählt werden. Die akzeptable Mindestretentionszeit beträgt das Doppelte der Retentionszeit für das Totvolumen der Säule. Analyten, die nicht massenspektrometrisch unterschieden werden können, müssen chromatographisch getrennt vorliegen (z.B. Intermedin und Lycopsamin). Die im Anhang (8.1) aufgeführten Bedingungen unter Verwendung einer C18-Säule (4.26) und den unter 3.3.3 angegebenen Fließmitteln haben sich in Vorversuchen als geeignet erwiesen, sind jedoch nur als Beispiel zu verstehen.

6.2 Tandem-Massenspektrometrische Bestimmung

Die Messungen im SRM-Modus können mit MS/MS-Geräten verschiedener Hersteller durchgeführt werden. Im Anhang (8.1) sind beispielhaft die gerätespezifischen Bedingungen eines Messsystems aufgeführt, die sich als geeignet erwiesen haben. Die Analyten werden im Selected Reaction Monitoring (SRM) Modus detektiert. Zur Identifikation wurden drei spezifische Übergänge auf drei Tochterionen (*Fragmentionen*) gewählt.

6.2.1 Identifizierung von PA (Qualitativer Nachweis)

Die Identifizierung der PA erfolgt durch den Vergleich der Retentionzeit und des Ionenverhältnisses der spezifischen Übergänge (mindestens 2) eines PA in der Probe mit dem entsprechenden Signal im Matrixstandard. Für die maximal erlaubte Abweichung der Retentionszeiten und Ionenverhältnisse werden die Kriterien der Entscheidung 2002/657/EG Abschnitt 2.3.3.1 und 2.3.3.2 herangezogen.

Bei Proben anderer Mehlsorten als Weizen- und Roggenmehl sollte eine zusätzliche Bestätigung des detektierten PA-Signals erfolgen, indem Produktionenspektren des PA von einem Matrixstandard und der Probe aufgenommen werden. Entsprechende massenspektrometrische Bedingungen sind im Anhang beispielhaft aufgeführt. Die Retentionszeit und die Fragmentation der PA sollten im Matrixstandard und in der Probe übereinstimmen. Zur Orientierung der maximal erlaubten prozentualen Abweichung der Ionenverhältnisse dienen, wie für die Messungen im SRM-Modus, die Kriterien der Entscheidung 2002/657/EG Abschnitt 2.3.3.2.

6.2.2 Bestimmung des PA-Gehaltes (Quantifizierung)

Die quantitative Analyse erfolgt anhand einer Matrix-Standardreihe bzw. Standardaddition nach DIN 32633.

6.3 Aufbau der Messsequenz für die quantitative Analyse

Für die quantitative Analyse werden folgende Kriterien festgelegt.

- Injektion:
Alle Proben und Matrix-Standards (MMS) werden doppelt injiziert, um die Wiederholbarkeit der MS-Detektion sowie einen möglichen Responsedrift innerhalb der Sequenz zu prüfen.
- Sequenz
Für die Bestimmung der Pyrrolizidinalkaloide wird die folgende Reihenfolge der Analysen in einer Sequenz festgelegt.
 1. Kalibrationslösungen (0,1 – 10 ng/ml)
 2. Lösungsmittelblindwert
 3. Proben (erste Injektion)
 4. Lösungsmittelblindwert
 5. Kalibrationslösungen (0,1 – 10 ng/ml)
 6. Lösungsmittelblindwert
 7. Proben (zweite Injektion)

6.4 Herstellung der Kalibrierlösungen/Durchführung der Standardaddition

Um Matrixeffekte zu kompensieren wird eine Matrix-Standardreihe verwendet. Um hierbei die gleiche Matrixstärke in der Kalibration wie in den Proben zu erreichen, wird zweimal ein unbelastetes (Blank-) Mehl in gleicher Weise wie die Proben aufgearbeitet (Kapitel 5). Die MMS-Level werden, wie in Tabelle 1 beschrieben, pipettiert.

Hinweis: Vorversuche haben gezeigt, dass eine Quantifizierung von PA in Dinkelmehl über eine Weizenmehl-Matrix-Standardreihe möglich ist.

Proben anderer Mehlsorten können ebenfalls mit dieser Methode analysiert werden, wobei die PA-Gehalte zunächst über eine Weizen-/Roggen-Matrix-matched Kalibrierung abgeschätzt werden (Screening). Die eigentliche Quantifizierung erfolgt dann über eine Standardaddition nach DIN 32633, bei der die Probe durch mehrmaligen Standardzusatz im Bereich der abgeschätzten Konzentration aufgestockt wird (siehe 6.4.2).

6.4.1 Matrix-Standardreihe (matrix-matched Kalibration 7 Punkte bis 10 ng/ml)

Um ausreichend Blank-Matrix-Extrakt für die Herstellung der MMS zu erhalten, werden 20,0 g eines PA-freies Mehl wie unter 5.2 beschrieben extrahiert. Anschließend werden zweimal 10 ml Extrakt über zwei separate SPE-Kartuschen aufgereinigt. Dies ergibt 2 ml rekonstituierten Blank-Extraktes zur Herstellung der MMS. In Tabelle 1 ist das Pipettierschema zur Herstellung der Matrix-Standardreihe aufgelistet.

Tabelle 1: Pipettierschema zur Herstellung der Matrix-Standardreihe

Level	Konzentration des Matrix-Standards		Aliquot entnommen aus	Aliquot-volumen (µl)	Volumen des Blank-Extraktes [µl]
	(ng/ml)	ng/200µl			
7	10	2	StdMix (100 ng/ml)	20	180
6	7,5	1,5	StdMix (100 ng/ml)	15	185
5	5	1	StdMix (100 ng/ml)	10	190
4	2,5	0,5	StdMix (100 ng/ml)	5	195
3	1	0,2	Level 7	20	180
2	0,5	0,1	Level 5	20	180
1	0,1	0,02	Level 3	20	180

6.4.2 Standardaddition

Zur Quantifizierung von PA in Mehlen, von denen keine Blankmatrix vorhanden ist, muss eine Standardaddition durchgeführt werden. Dieses Verfahren sollte auch für andere Matrices außer Weizen- und Roggenmehl gewählt werden, solange die Analysenmethode für diese nicht validiert ist.

Die Standardaddition wird für die Proben und Analyten durchgeführt, die im Screening ein Signal geliefert haben, welches eindeutig als PA identifiziert wurde und dessen geschätzte Konzentration über der Nachweisgrenze im Weizenmehl liegt.

Anhand einer Weizenmehl-Matrix-matched Kalibrierung wird zunächst die in der Probe enthaltene PA-Konzentration abgeschätzt, um den Konzentrationsbereich für die Standardaddition festzulegen. Nach DIN 32633 sollte die Probe mit der einfachen, zweifachen und dreifachen Menge der abgeschätzten Konzentration des PA aufgestockt werden. Die Konzentration der Dotierlösung muss individuell berechnet werden. Tabelle 2 zeigt ein mögliches Pipettierschema zur Herstellung der Standardadditionsreihe mit 4 Punkten, einschließlich des undotierten Probenextraktes ("Nullpunkt").

Tabelle 2: Pipettierschema zu Herstellung einer Standardadditionsreihe

	Vial 1 (Nullpunkt)	Vial 2 (Level 1)	Vial 3 (Level 2)	Vial 4 (Level 3)
Volumen Probelösung [μ l]	140	140	140	140
Volumen der Dotierlösung [μ l]	0	20	40	60
Volumen Lösungsmittel [μ l]	60	40	20	0
Gesamtvolumen [μ l]	200	200	200	200

Die Standardadditionsfunktion wird aus den dotierten Konzentrationen und den zugehörigen ermittelten Peakflächen (wie in 7.1 beschrieben, analog zur Kalibrierfunktion) ermittelt.

6.4.3 Maßnahmen zur Qualitätskontrolle

Generell sollten Maßnahmen zur Überprüfung der Performance des LC-MS/MS-Gerätes und der Probenaufarbeitung für jede Probenserie vorgenommen werden.

Da kein zertifiziertes Referenzmaterial pyrrolizidinalkaloidhaltigen Mehls zur Verfügung steht, sollte die Wiederfindung anhand von dotiertem Leermaterial überprüft werden.

Eine zusätzliche Überprüfung auf Verluste während der Aufarbeitung unbekannter Proben kann Trichodesmin (aufgrund des seltenen Vorkommens) als Wiederfindungskontrollstandard eingesetzt werden.

Dazu wird vor der Probenaufarbeitung eine definierte Menge an Trichodesmin-Standardlösung zur Probe gegeben. Die Menge wird so gewählt, dass die resultierende Konzentration im mittleren Bereich der Matrixstandardreihe liegt. Die Konzentration von Trichodesmin wird dann anhand der Matrixstandardreihe bestimmt und die Wiederfindungsrate wird berechnet.

Bei starker Abweichung (z. B. $> \pm 25\%$) von der im Rahmen der inhouse-Validierung ermittelten Wiederfindungsrate für Trichodesmin, sollte die Analyse der unbekannt Probe wiederholt werden.

7. Berechnungen

Die quantitative Bestimmung erfolgt mittels einer Matrix-Standardreihe (MMS). Die Berechnung erfolgt durch Einsetzen der Peakflächen der Proben in die Kalibrierfunktion.

7.1 Kalibrierfunktion/Standardadditionsfunktion

Gleichung 1: Kalibrierfunktion/Standardadditionsfunktion

$$f_{(x)} = y = ax + b$$

Legende:

y	Fläche unter dem Peak des Zielanalyten
a	Steigung der Kalibrierfunktion
x	(dotierte) Konzentration des Zielanalyten [ng/ml] = β (Massenkonzentration)
b	Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion

7.2 Quantifizierung

Gleichung 2: Berechnung des Gehaltes an PA (Analysegleichung)

$$\text{Gehalt PA} = \beta \times DF = \left[(y - b) \times \frac{1}{a} \right] \times \frac{V_{\text{Extrakt}}}{m_{\text{Einwaage}}} \times \frac{1}{V_{\text{Auftrag}}} \times V_{\text{Probe}}$$

Legende:

β	Massenkonzentration [ng/ml]
DF	Umrechnungsfaktor von ng/ml auf $\mu\text{g/kg}$
y	Peakfläche des Zielanalyten
b	Achsenabschnitt aus Matrixkalibrierung
a	Steigung aus Matrixkalibrierung
V_{Extrakt}	Volumen des Extraktionsmittels [ml]
m_{Einwaage}	Masse der eingewogenen Probe [g]
V_{Auftrag}	Volumen des auf die SPE aufgetragenen Extrakts [ml]
V_{Probe}	Endvolumen der Probe [ml]

Gleichung 3: Berechnung des Gehaltes an PA anhand der Standardaddition ($y=0$)

$$\text{Gehalt PA} = \beta \times DF = \left[|(-b)| \times \frac{1}{a} \right] \times \frac{V_{\text{Extrakt}}}{m_{\text{Einwaage}}} \times \frac{1}{V_{\text{Auftrag}}} \times V_{\text{Probe}}$$

7.3 Angabe der Ergebnisse

Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in $\mu\text{g/kg}$ mit zwei signifikanten Nachkommastellen. Zur Umrechnung der Konzentration in der Messlösung in ng/ml in die Konzentration im Pflanzmaterial in $\mu\text{g/kg}$ liegt bei Einhaltung des unter Kapitel 5 beschriebenen Probenaufbereitungsverfahrens der Faktor bei 2.

Referenzen

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2011) Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *The EFSA Journal* 9, 1-135

DIN 32645 „Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung“. Deutsches Institut für Normung, Berlin 1994

DIN 32633:2013-05 “Chemische Analytik - Verfahren der Standardaddition - Verfahren, Auswertung”, Deutsches Institut für Normung, Berlin 2013

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION 2002/657/EG (12. August 2002) zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. *Amtsblatt der Europäischen Union* L 221, 8-36

VERORDNUNG (EG) NR. 401/2006 (23. Februar 2006) zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle des Mykotoxingehalts von Lebensmitteln. *Amtsblatt der Europäischen Union* L70, 12-34

8. Anhang

8.1 LC-MS/MS Messung

LC-MS/MS System bestehend aus

Triple-Quadrupole-Massenspektrometer (z. B. Thermo TSQ Vantage)

HPLC-Anlage z. B. Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific)
bestehend aus UHPLC-Pumpe, Degasser,
Autosampler und Säulenofen

HPLC-Einstellungen

Eluent A siehe 3.3.3
Eluent B siehe 3.3.3
Temperatur Säule 40 °C
Flussrate 300 µl/min
Injektionsvolumen 10 µL
Säule z. B. Thermo Hypersil Gold ® C18; 150 x 2,1 mm, 1,9 µm
Gesamtlaufzeit 15 Minuten

Gradient

Zeit [min]	% A	% B
0,0	95	5
0,5	95	5
7,0	50	50
7,5	20	80
7,6	0	100
9,0	0	100
9,1	95	5
15,0	95	5

MS-Geräteeinstellungen

Ionisation Elektrospray positiv (ESI +)
Ion Spray Voltage (V) 4000 (positive polarity)
Capillary Temperature (°C) 275
Vaporizer Temperature (°C) 350
Sheath Gas Pressure (psi) 45.0
Ion Sweep Gas Pressure (psi) 2.0
Aux Gas Pressure (psi) 10

Substanzspezifische Parameter

Die Analyten werden im Selected Reaction Monitoring (SRM) Modus detektiert. Zur Identifikation wurden drei spezifische Übergänge auf drei Tochterionen (*Fragmentionen*) gewählt. Die entsprechenden Übergänge und die Kollisionsenergie (CE) sind Tabelle 3 zu entnehmen. Ebenso ist dort die unter den beschriebenen Bedingungen vorliegende Retentionszeit jedes Analyten aufgeführt.

Tabelle 3: Substanzspezifische Parameter der LC-MS/MS Methode (SRM-Modus)

Kurzbezeichnung	Vorläuferion (amu)	S-Lens Spannung (V)	Fragmention (amu)	CE (V)	Retentionszeit (min)
Mc	326,2	129	120,1	36	4,25
			194,1	29	
			280,2	23	
Er	350,2	110	120,3	32	4,87
			138,1	30	
			136,3	32	
McN	342,1	90	118,3	37	4,99
			120,2	34	
			136,2	37	
ErN	366,1	129	136,1	30	5,16
			120,1	33	
			118,1	34	
Jb	352,1	120	120,1	36	5,25
			155,2	29	
			280,1	22	
Im	300,1	112	120,2	24	5,40
			138,3	18	
			156,3	28	
Eu	330,1	89	138,1	20	5,34
			156,2	28	
			254,1	16	
JbN	368,1	110	120,1	32	5,51
			296,1	23	
			324,0	26	
EuN	346,1	91	111,2	41	5,63
			172,1	31	
			328,1	37	
La	300,1	112	138,3	18	5,53
			156,3	28	
			156,3	28	
ImN	316,1	95	111,2	37	5,91
			138,1	26	
			172,1	26	
LaN	316,1	95	111,2	37	6,02
		9	138,1	26	
			172,1	26	
Re	352,2	120	120,3	36	7,54
			138,3	28	
			324,2	27	
Td	354,2	109	120,3	35	6,37
			222,3	28	
			308,3	22	

Kurzbezeichnung	Vorläuferion (amu)	S-Lens Spannung (V)	Fragmention (amu)	CE (V)	Retentionszeit (min)
ReN	368,2	110	136,2	31	6,41
			118,2	29	
			120,1	32	
Sp	334,2	100	120,3	26	6,56
			138,4	26	
			306,2	26	
Hn	314,2	91	138,3	19	6,72
			156,3	28	
			120,3	32	
SpN	350,2	110	118,2	36	6,79
			136,3	32	
			120,3	32	
HnN	330,2	110	136,1	30	7,03
			172,1	26	
			111,2	39	
Sv	336,2	135	120,2	27	7,26
			138,2	27	
			308,2	26	
Sc	336,2	135	120,2	27	7,33
			138,2	27	
			308,2	26	
SvN	352,1	110	118,1	30	7,42
			120,1	36	
			136,3	27	
ScN	352,2	110	118,1	30	7,54
			120,1	36	
			136,3	27	
Em	398,2	112	120,3	21	8,02
			220,3	14	
			336,2	16	
EmN	414,2	129	254,1	32	8,01
			352,1	27	
			396,2	24	
Sk	366,2	106	150,3	24	8,19
			168,2	28	
			122,3	31	
Lc	412,2	94	120,2	30	8,99
			336,3	17	
			220,2	18	
LcN	428,1	110	136,1	33	9,33
			253,9	27	
			352,3	21	

Tabelle 4: LC-MS/MS-Parameter zur Aufnahme von Produktionenspektren

Parameter	Wert
Vorläuferion	entsprechend SRM-Methode
Kollisionsernergie	anhand Standardlösung auf max. Intensität optimieren oder Mittelwert aus 3 SRM-Übergängen (siehe Tabelle 3)
Scanzeit	1 s
Kollisionsgasdruck	1 mTorr
Declustering Voltage	10 V
HPLC-Gradient	siehe 8.1
Injektionsvolumen	Ggf. erhöhen auf 25 µl

8.2 Ergebnisse der inhouse-Validierung

8.2.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Tabelle 5: Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenze (BG) in Weizen- und Roggenmehl bestimmt im Rahmen der in-house Validierung*

Kurzbezeichnung	Weizenmehl		Roggenmehl	
	NG (µg/kg)	BG (µg/kg)	NG (µg/kg)	BG (µg/kg)
Mc	0,09	0,30	0,10	0,30
Er	0,16	0,48	0,14	0,45
McN	0,22	0,66	0,15	0,47
ErN	0,23	0,71	0,19	0,60
Jb	0,21	0,65	0,24	0,77
Im	0,11	0,35	0,08	0,26
Eu	0,09	0,28	0,09	0,28
JbN	0,28	0,85	0,13	0,40
EuN	0,18	0,55	0,19	0,60
La	0,16	0,48	0,08	0,25
ImN	0,16	0,50	0,10	0,33
LaN	0,17	0,52	0,12	0,38
Re	0,20	0,62	0,34	1,03
Td	0,07	0,23	0,11	0,34
ReN	0,33	1,07	0,21	0,66
Sp	0,16	0,52	0,10	0,32
SpN	0,20	0,62	0,12	0,39
Hn	0,08	0,25	0,07	0,23
HnN	0,17	0,53	0,11	0,34
Sv	0,21	0,66	0,17	0,51
Sc	0,19	0,60	0,21	0,63
SvN	0,22	0,69	0,16	0,49
ScN	0,27	0,87	0,19	0,57
Em	0,08	0,26	0,09	0,29
EmN	0,20	0,61	0,11	0,34
Sk	0,10	0,32	0,08	0,26
Lc	0,07	0,22	0,08	0,25
LcN	0,09	0,29	0,06	0,20

* NG und BG bestimmt gemäß DIN EN ISO 32645 Kalibriergeradenmethode (DIN ISO 32645 1994)

8.2.2 Wiederfindung und Präzision

Die Wiederfindungsraten (WFR) und die Präzision unter Wiederholbedingungen bzw. Unter laborinternen Vergleichsbedingungen wurden anhand der fünffach-Analyse dotierter Leermaterialien an einem bzw. zwei verschiedenen Tagen ermittelt.

Tabelle 6: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen unter Wiederholbedingungen in dotiertem Weizen- und Roggenmehl (2 ng/ml bzw. 1 µg/kg)

Kurzbezeichnung	Weizenmehl (n=5)		Roggenmehl (n=5)	
	WFR (%)	RSD (%)	WFR (%)	RSD (%)
Mc	104,5	2,2	98,9	0,8
Er	95,2	2,5	90,1	3,0
McN	82,0	4,3	90,9	4,6
ErN	69,2	14,6	94,3	4,2
Eu	97,3	5,9	91,4	1,3
Jb	103,3	1,3	102,9	1,6
Im	102,6	3,8	93,9	2,2
JbN	76,1	7,9	87,5	3,9
EuN	100,3	3,5	89,3	3,5
La	105,4	3,9	97,5	3,8
ImN	91,4	2,5	88,5	2,0
LaN	94,4	2,9	91,7	1,9
Re	101,3	2,2	95,6	3,8
Td	99,7	0,8	94,0	3,6
ReN	85,1	8,0	96,1	4,2
Sp	105,2	4,5	95,8	2,1
SpN	70,7	8,0	83,5	3,0
Hn	100,9	2,4	96,2	1,5
HnN	92,1	1,8	90,6	2,1
Sv	97,2	2,6	92,7	2,1
Sc	112,4	6,7	96,4	3,9
SvN	80,5	6,9	93,3	1,3
ScN	83,3	6,5	96,3	3,6
Em	96,7	1,2	94,8	1,3
EmN	87,0	3,8	87,9	1,2
Sk	98,6	2,4	92,5	1,1
Lc	99,6	2,1	94,7	1,8
LcN	91,6	1,8	87,4	2,4

RSD...relative Standardabweichung unter Wiederholbedingungen

Tabelle 7: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen für die 5fach-Analyse von dotiertem Weizen- und Roggenmehl (2 ng/ml bzw. 1 µg/kg) an 2 Tagen im Abstand von 3 Wochen

Kurzbezeichnung	Weizen (n=5)		Roggen (n=5)	
	WFR (%)	RSD (%)	WFR (%)	RSD (%)
Mc	100,7	4,7	97,0	2,3
Er	97,8	4,5	94,3	5,5
McN	87,3	7,4	92,2	3,8
ErN	74,4	13,5	90,1	6,8
Eu	96,8	5,3	95,2	4,7
Jb	104,3	2,5	103,4	1,7
Im	103,5	2,7	98,2	4,9
JbN	79,1	8,8	90,9	5,1
EuN	99,6	2,9	90,3	3,0
La	103,7	4,6	100,3	4,7
ImN	94,0	4,6	90,1	3,0
LaN	93,4	2,7	90,7	2,3
Re	106,5	11,9	101,2	7,1
Td	98,9	1,5	97,2	4,5
ReN	85,9	5,5	95,9	4,7
Sp	107,2	4,9	98,2	3,6
SpN	75,6	9,5	87,6	5,4
Hn	102,4	2,8	99,0	3,1
HnN	95,1	4,0	89,5	2,3
Sv	98,5	5,6	92,0	2,8
Sc	110,9	7,7	92,8	17,0
SvN	84,3	8,0	94,3	3,2
ScN	86,1	6,4	96,6	3,5
Em	98,9	2,8	98,2	3,8
EmN	89,1	5,3	89,9	2,9
Sk	100,6	2,7	94,4	2,5
Lc	100,5	2,0	96,6	2,5
LcN	92,9	3,6	88,0	1,9

RSD...relative Standardabweichung unter laborinternen Vergleichsbedingungen

8.2.3 Einfluss der Probenmatrix

Der Einfluss verschiedener Mehlmatrices auf das Analytsignal, wurde anhand von Matrix-Standardreihen in verschiedenen Mehlsorten untersucht. Abbildung 1 zeigt drei Standardreihen von Trichodesmin in Weizen-, Roggen- und Buchweizenmehl. Der Unterschied zwischen den Steigungen zeigt der ‚Kalibrierfunktionen‘ zeigt den unterschiedlichen Einfluss der Matrices auf das Signal von Trichodesmin. Die Signalunterdrückung ist im Buchweizenmehl am stärksten.

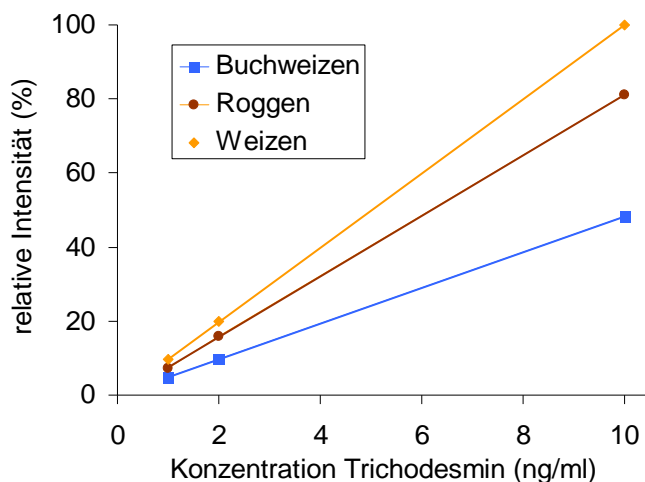


Abbildung 1: Matrix-Standardreihen von Trichodesmin in Weizen-, Roggen- und Buchweizenmehl. Die unterschiedlichen Steigungen zeigen den Einfluss der Matrix auf das Analytsignal.

Die Unterschiede verdeutlichen auch die Notwendigkeit von entsprechenden Matrixstandard-Reihen bzw. Standardadditionsreihen zur Quantifizierung von PA in einer Mehlsorte.

8.2.4 Linearität des Arbeitsbereiches 0,1 – 10 ng/ml (0,05 – 5 µg/kg Weizen-/Roggenmehl)

Die Linearität des Arbeitsbereiches wurde mit Hilfe des Anpassungstests nach Mandel (DIN 38402, Teil 51) geprüft.

Aus den beiden Reststandardabweichungen der Funktion 1. und 2. Grades wird die Differenz der Abweichungsvarianzen berechnet und anschließend ein F-Test durchgeführt.

$$PW = \frac{(n-2) \cdot S_{y1}^2 - (n-3) \cdot S_{y2}^2}{S_{y2}}$$

Ist der errechnete Prüfwert (PW) kleiner als der F-Tabellenwert (1; n-3; Signifikanzniveau 99%), wird durch die Kalibrierfunktion 2. Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht, die Kalibrierfunktion ist linear.

Kurzbezeichnung	Weizenmehl			Roggenmehl		
	PW	F-Wert	Bestimmtheitsmaß	PW	F-Wert	Bestimmtheitsmaß
Mc	13,2	98,5	0,9999	32,3	98,5	0,9996
Er	0,4	98,5	1,0000	32,7*	4052,2	0,9998
McN	15,9	98,5	0,9998	8,0	98,5	0,9999
ErN	34,1	98,5	0,9998	7,9	98,5	0,9999
Jb	3,1	98,5	0,9998	0,0	98,5	0,9999
Im	0,2	98,5	1,0000	8,9	98,5	0,9999
Eu	37,3*	4052,2	0,9999	47,8*	4052,2	0,9996
JbN	11,1	98,5	0,9997	0,3	98,5	0,9994
EuN	28,7	98,5	0,9994	15,7	98,5	0,9999
La	5,9*	4052,2	0,9999	25,6	98,5	0,9999
ImN	15,2*	4052,2	0,9997	0,5	98,5	1,0000
LaN	1,1	98,5	1,0000	20,8	98,5	0,9998

Kurzbezeichnung	Weizenmehl			Roggenmehl		
	PW	F-Wert	Bestimmtheitsmaß	PW	F-Wert	Bestimmtheitsmaß
Re	7,8	98,5	0,9995	0,6	98,5	0,9998
Td	8,5	98,5	0,9996	8,5	98,5	0,9999
ReN	52,6	98,5	0,9994	12,6	98,5	0,9985
Sp	38,3	98,5	0,9998	11,2*	4052,2	1,0000
SpN	30,7	98,5	0,9985	19,8	98,5	0,9997
Hn	24,3*	4052,2	0,9996	24,3	94,9	0,9997
HnN	7,3	98,5	0,9999	13,1*	4052,2	0,9999
Sv	0,9	98,5	0,9998	1,2	98,5	0,9993
Sc	2,9	98,5	0,9998	5,4	98,5	0,9999
SvN	75,2	98,5	0,9998	17,4	98,5	0,9994
ScN	51,1	98,5	1,0000	0,1	98,5	1,0000
Em	0,0*	4052,2	0,9997	19,3*	4052,2	0,9999
EmN	28,3	98,5	0,9998	15,4	98,5	0,9997
Sk	16,5	98,5	0,9999	15,8	98,5	0,9999
Lc	71,1	98,5	0,9997	28,5	98,5	0,9998
LcN	10,8	98,5	0,9999	6,9	98,5	0,9999

Vergleichswert F (1; n=5; 99%)=98,5; F(1; n=4; 99%)=4052,2

* laut Mandel Anpassungstest Arbeitsbereich linear von 0,05 – 2,5 µg/kg, aber auch von 0,05 – 5 µg/kg sehr gute Anpassung an lineare Funktion ($R^2 > 0,998$)

8.3 Beispielchromatogramm

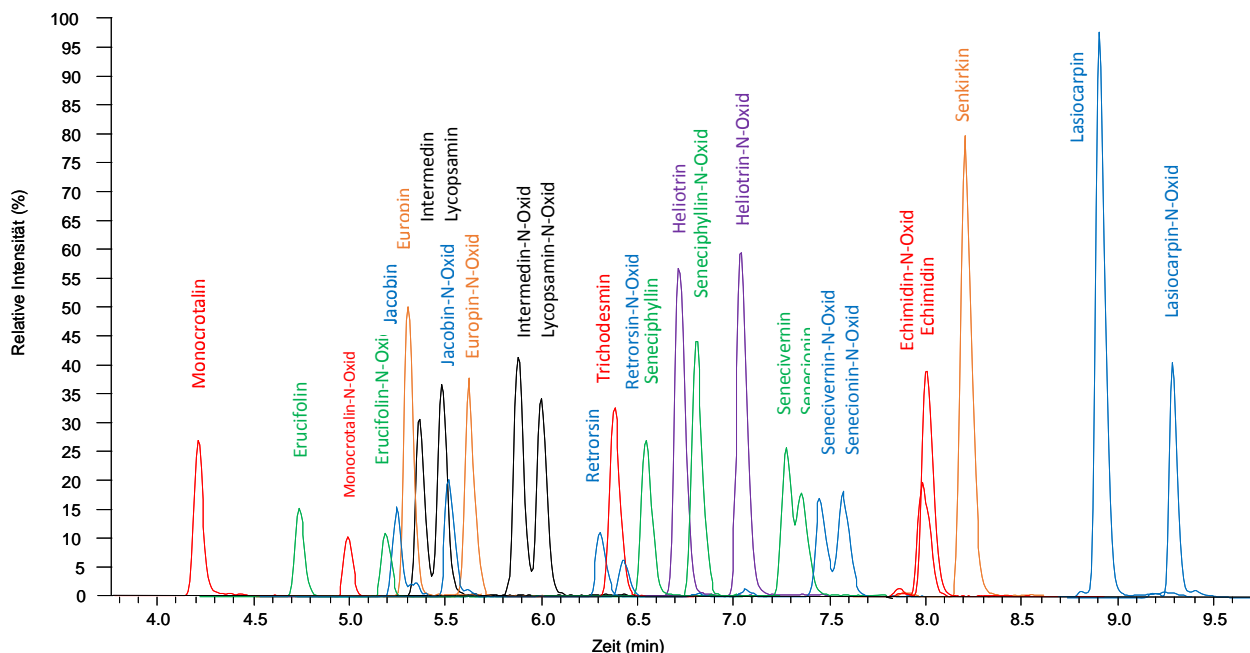


Abbildung 2: Chromatogramm eines Mischstandards [c = 1 ng/ml], SRM

8.4 Anbieter von PA-Standardsubstanzen

Pyrrrolizidinalkaloid	Molekülmasse	CAS	Hersteller/Vertreiber	Bestellnummer
Echimidin	397,47	520-68-3	Oskar Tropitsch	7550006
			PhytoLab*	89553
			PlantaAnalytica	-
Erucifolin	349,38	40158-95-0	PhytoLab*	83446
Erucifolin-N-oxid	365,37	123864-94-8	PhytoLab*	83434
Europin-hydrochlorid	365,86	570-19-4	PhytoLab*	83237
Europin-N-oxid	345,39	65582-53-8	AppliChem	A9574,0010
			PhytoLab*	83238
Heliotrin	313,40	303-33-3	AppliChem	A9583,0020
			Latoxan*	L6007
			Oskar Tropitzsch	7550511
			PhytoLab	80403
Heliotrin-N-oxid	329,39	6209-65-0	AppliChem	A9590,0010
			Oskar Tropitzsch*	755054
Indicin-hydrochlorid	335,83	1195140-94-3	PhytoLab	83236
			PhytoLab	83234
Indicine-N-oxid	315,36	41708-76-3	AppliChem	A9593,0010
			PhytoLab	83235
Intermedin	299,37	10285-06-0	PhytoLab*	82424
Intermedin-N-oxid	315,36	95462-14-9	PhytoLab*	83434
Lasiocarpin	411,49	303-34-4	AppliChem	A9596,0010
			Oskar Tropitzsch*	7500019
			PhytoLab	80412
Lasiocarpin-N-oxid	457,5	127-30-0	AppliChem	A9600,0010
			Oskar Tropitzsch*	7501284
			PhytoLab	83220
Lycopsamin	299,37	10285-07-1	Oskar Tropitzsch	7501080
			PlantaAnalytica	-
			PhytoLab*	89726
Lycopsamin-N-oxid	315,36	95462-15-0	PhytoLab*	83447
Monocrotalin	325,35	315-22-0	Carl Roth	3418.1
			Fluka	37024
			Sigma	C2401
			Oskar Tropitzsch	7550522
			PhytoLab*	89251
			R&D Chemicals	7351
Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-211921			
Monocrotalin-N-oxid	341,36	35337-98-5	PhytoLab*	82629
Retrorsin	351,40	480-54-6	AppliChem	A4922,0020
			Fluka	37025
			Oskar Tropitzsch	7550659
			PhytoLab	89775
			Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-215805
			Sigma*	R0382

Pyrrrolizidinalkaloid	Molekülmasse	CAS	Hersteller/Vertreiber	Bestellnummer
Retrorsin-N-oxid	367,40	15503-86-3	AppliChem	A8668,0010
			PhytoLab*	82630
Senecionin	335,40	130-01-8	AppliChem	A2071,0020
			Carl Roth*	2261.1
			Fluka	37031
			Oskar Tropitzsch	7550292
			PhytoLab*	89789
			R&D Chemicals	1828
			Sigma	17806
Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-286770			
Senecionin-N-oxid	351,40	13268-67-2	AppliChem	A8678,0010
			Oskar Tropitzsch	7500301
			PhytoLab*	82631
Seneciphyllin	333,39	480-81-9	AppliChem	A2072,0020
			Carl Roth*	6414.1
			Fluka	37033
			R&D Chemicals	1850
			Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-229697
			ABCR GmbH	AB167974
PhytoLab*	89275			
Seneciphyllin-N-oxid	349,38	38710-26-8	AppliChem	A8684,0010
			Oskar Tropitzsch	7500573
			PhytoLab*	82632
Senecivernin	335,40	72755-25-0	PhytoLab*	83436
Senecivernin-N-oxid	351,39	101687-28-9	PhytoLab*	83437
Senkirkin	365,43	2318-18-5	AppliChem	A6765,0010
			Fluka	37032
			Oskar Tropitzsch	7500441
			PhytoLab*	89274
Trichodesmin	353,41	548-90-3	Latoxan*	L6049

*wurden vom BfR für die in-house-Validierung verwendet

8.5 Fließschema zur Probenaufarbeitung

