

**Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden (PA) und
Tropanalkaloiden (TA) in Mehl mittels LC-MS/MS**

Methodenbeschreibung

BfR-PA+TA-Mehl-2.0/2018

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. Probenaufarbeitung	7
5.1 Probenvorbereitung und –homogenisierung	7
5.2 Extraktion der Proben.....	7
5.3 SPE	8
5.4 Rekonstitution der Probe	8
6. HPLC-MS/MS-Analyse	8
6.1 Chromatographische Trennung.....	8
6.2 Massenspektrometrische Bestimmung.....	8
6.3 Identifizierung der Analyten (Qualitativer Nachweis).....	9
6.4 Bestimmung des PA und TA-Gehaltes (Quantifizierung)	9
6.5 Aufbau der Messequenz für die quantitative Analyse	9
6.6 Herstellung der Kalibrierlösungen/Durchführung der Standardaddition.....	10
6.7 Maßnahmen zur Qualitätskontrolle.....	11
7. Berechnungen	12
7.1 Kalibrierfunktion/Standardadditionsfunktion	12
7.2 Quantifizierung	12
7.3 Angabe der Ergebnisse	12
8. Anhang.....	14
8.1 LC-MS/MS Messung	14
8.2 Ergebnisse der inhouse-Validierung.....	18
8.3 Beispielchromatogramm.....	22
8.4 Anbieter von PA- und TA-Standardsubstanzen.....	23
8.5 Fließschema zur Probenaufarbeitung	25

1. Anwendungsbereich

Pyrrolizidinalkaloide (PA) und Tropanalkaloide (TA) sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die aufgrund ihres gesundheitsschädigenden Potenzials in Lebensmitteln nicht erwünscht sind. Derzeit sind etwa 600 PA bekannt, die hauptsächlich in den Pflanzengattungen der Boraginaceae, Asteraceae und Fabaceae gebildet werden. TA werden vornehmlich von den Pflanzenfamilien der Nachtschattengewächse (Solanaceae) und Windengewächse (Convolvulaceae) produziert. Auf Grund der weltweiten Verbreitung dieser Pflanzen, kann es leicht zu Kontaminationen von pflanzlichen Lebens- und Genussmitteln, Phytopharmaka oder auch pflanzlichen Futtermitteln kommen (EFSA 2013, BfR 2016, Mulder 2016, EFSA 2017).

Die Methode beschreibt die Bestimmung folgender Verbindungen 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), Trichodesmin (Td), Atropin (Atr) und Scopolamin (Sco).

Die Bestimmungsgrenzen liegen zwischen 0,2 - 1,0 µg/kg und entsprechen den Empfehlungen der Kommission zum Monitoring von Tropanalkaloiden (EU Rec 2015/679).

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 und TA werden aus dem Mehl mittels schwefelsauren Methanols 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 basisch-methanolischer Elution der Analyten, 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 Massenspektrometrie detektiert. Die Konzentration der Analyten wird über eine Matrix-Standardreihe (Matrix-Matched-Calibration) bestimmt oder gegebenenfalls über eine andere zur Kompensation von Matrixeffekten geeignete Methode quantifiziert.

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	Atropin	(Atr)
3.2.30	D ₅ -Atropin	(Atr-IS)
3.2.31	Scopolamin	(Sco)
3.2.32	¹³ C-D ₃ -Scopolamin	(Sco-IS)
3.2.33	Ameisensäure 98 – 100%, z.B. Sigma-Aldrich	
3.2.34	Methanol (MeOH), LC-MS Qualität, z.B. Merck LiChrosolv®	
3.2.35	Schwefelsäure 98%, z.B. Merck	
3.2.36	Ammoniak 32%, z.B. Merck	
3.2.37	Ammoniumformiat, LC-MS Qualität, z.B. Fluka	
3.2.38	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 (3.2.35) 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 (3.2.36) mit Methanol (3.2.34) auf 100 ml aufgefüllt.

Hinweis: Die Lösung ist arbeitstäglich frisch anzusetzen.

3.3.3 Eluenten für die Chromatographie:

Eluent A:

315 mg Ammoniumformiat (3.2.37) werden in 5 ml Wasser gelöst, 1 ml Ameisensäure (3.2.33) 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 (3.2.37) werden in 5 ml Wasser gelöst, 1 ml Ameisensäure (3.2.33) wird hinzugefügt und mit Methanol (3.2.34) auf 1 L aufgefüllt.

3.3.4 Standardlösung zur Kalibration

Stammlösung (0,1 mg/ml):

Zur Herstellung einer Stammlösung wird 1 mg eines Pyrrolizidinalkaloid- bzw. Tropaalkaloid-Standards auf einer Präzisionswaage (4.2) eingewogen, gemäß der Angabe des Lieferanten im Messkolben gelöst und auf 10 ml aufgefüllt. Die Konzentration der Stammlösung beträgt 0,1 mg/ml je Analyt.

Standard-Arbeitslösung (1) des Multi-Mixes mit je 1,0 µg/ml pro Substanz:

Zur Herstellung der Standard-Arbeitslösung (1) wird ein definiertes Volumen der Stammlösung (0,1 mg/ml) in einen Messkolben pipettiert und mit Acetonitril (3.2.38) 1:100 verdünnt, sodass die Konzentration der Standard-Arbeitslösung (1) 1 µg/ml je Analyt beträgt.

Standard-Arbeitslösung (2) des Multi-Mixes mit je 0,1 µg/ml pro Substanz:

Zur Herstellung der Standard-Arbeitslösung (2) wird ein definiertes Volumen der Standard-Arbeitslösung (1) (1 µg/ml) in einen Messkolben pipettiert und mit Acetonitril (3.2.38) 1:10 verdünnt, sodass die Konzentration der Standard-Arbeitslösung (2) 0,1 µg/ml je Analyt beträgt.

Standard-Arbeitslösung (3) des Multi-Mixes mit je 0,01 µg/ml pro Substanz:

Zur Herstellung der Standard-Arbeitslösung (3) wird ein definiertes Volumen der Standard-Arbeitslösung (2) (0,1 µg/ml) in einen Messkolben pipettiert und mit Acetonitril (3.2.38) 1:10 verdünnt, sodass die Konzentration der Standard-Arbeitslösung (3) 0,01 µg/ml je Analyt beträgt.

3.3.5 5%iges Methanol

Zur Herstellung des 5%igen Methanols werden 5 ml Methanol (3.2.34) mit 95 ml Wasser vermischt und kräftig geschüttelt.

3.3.6 Lösungen des internen Standards (Quantifizierung der Tropanalkaloide: Atr, Sco)

Stammlösung des internen Standards (0,1 mg/ml):

Zur Herstellung einer Stammlösung wird 1 mg Standardsubstanz auf einer Präzisionswaage (4.2) eingewogen und in einem 10 ml Messkolben und mittels Acetonitril (3.2.38) gelöst bzw. aufgefüllt. Die Konzentration der Stammlösung beträgt 0,1 mg/ml.

IS (1) Arbeitslösung des internen Standards (0,1 µg/ml):

Zur Herstellung der IS (1) Arbeitslösung des internen Standards werden die jeweilig benötigten Volumina der Stammlösung (0,1 mg/ml) in ein Messkolben pipettiert und mit Acetonitril (3.2.38) 1 zu 1000 verdünnt, sodass man eine Konzentration von (0,1 µg/ml) erhält. Diese Verdünnung kann ggf. in mehreren Schritten erfolgen.

4. Geräte

Allgemein Neben der normalen Laborausrüstung werden folgende Geräte verwendet:

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

4.2 Präzisionswaage

4.3 Mühle z.B. ZM-1000 Retsch

4.4 Präzisionswaage, Genauigkeit: 0,0001 g

4.5 50 ml Zentrifugenröhrchen aus PP

4.6 250 ml Zentrifugenflaschen aus PP

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

4.8 Ultraschallbad

4.9 Vortex Mischer

4.10 Überkopfschüttler

4.11 Verdampfungsstation TurboVap

4.12 Schraubflaschen 30 oder 50 ml

4.13 Reagenzgläser 15 ml

4.14 Diverse Messzylinder

4.15 Messkölbchen, 10, 20 und 100 ml

4.16 Faltenfilter, z.B. Munktell

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

4.18 SPE-Vakuumkammer

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

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

- 4.21 1,5 ml Reaktionsgefäße, z.B. Eppendorf
- 4.22 2 ml HPLC-Probenvials
- 4.23 250 µl konische Glaseinsätze für 2 ml Probenvials
- 4.24 Alu-Bördelkappe 11 mm für Probenvials PTFE/Silikon/PTFE-Septum
- 4.25 HPLC-Säule: Fa. Thermo, Hypersil Gold® C18; 150 x 2,1 mm; Korngröße: 1,9 µm
- 4.26 LC-MS/MS System

5. Probenaufarbeitung

5.1 Probenvorbereitung und –homogenisierung

Um für die Gesamtprobe repräsentative Analysenergebnisse zu erhalten, wird diese vor der Analyse durch Schütteln im Überkopfschüttler (4.10) homogenisiert. Gegebenenfalls kann die Probe auch zusätzlich vermahlen werden, wenn beispielsweise offensichtlich unterschiedliche Partikelgrößen vorliegen. Dazu wird die gesamte Probe portionsweise mit Trockeneis im Verhältnis 2:1 gemischt, unter Verwendung eines von 0,5 mm Siebes gemahlen (4.3) und anschließend im Überkopfschüttler (4.10) für 30 Minuten homogenisiert.

Zu Qualitätssicherungszwecken wird ein PA- und TA-freies Mehl mit 20 µL der Standard-Arbeitslösung (2) dotiert (Dotierlevel entspricht 1 µg/kg Mehl) und wie die unbekanntesten Proben aufgearbeitet (dies beinhaltet auch das Dotieren des internen Standards, siehe Kapitel 3.3.6). Die Akzeptanzkriterien bezüglich der Präzision und Wiederfindung für die Anwendung von Multianalytmethoden in der Routine sind in der SANTE/11813/2017 beschrieben.

Des Weiteren wird PA und TA-freies Material als Blankprobe aufgearbeitet und für die Herstellung der Matrix-Standardreihe (siehe 6.6.1) verwendet.

5.2 Extraktion der Proben

Für die Extraktion werden $20,0 \pm 0,1$ g Mehl in ein geeignetes Zentrifugengefäß (4.6) eingewogen. Bei nachweislich homogenen Proben kann die Probeneinwaage reduziert werden. Das Verhältnis von Probe zu Extraktionsvolumen muss konstant gehalten werden.

Extraktion	Auf die komplette Probe werden 100 ml der 0,05 M H ₂ SO 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 (4.8) durchgeführt.
Zentrifugation	Die Probe wird für 10 min ± 2 min mit 3800 x g (3000 U/min) zentrifugiert (4.7).
Filtration	Der Überstand wird über einen Faltenfilter (4.16) filtriert und das Filtrat in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (4.5) aufgefangen Sollte das Filtrat noch größere Mengen an Partikeln enthalten, kann dieses zusätzlich zentrifugiert werden um ein Verstopfen der SPE-Kartuschen zu verhindern.

Ein 10 ml Aliquot des Filtrates wird mit jeweils 40 µl IS (1) Arbeitslösung des internen Standards (D₅-Atropin und ¹³C-D₃-Scopolamin = 4 ng absolut je IS) dotiert, mittels Vortex-Mischer geschüttelt und für die SPE verwendet.

5.3 SPE

Die Probenextrakte werden mittels SPE-Kartuschen Bond Elut Plexa PCX, 500 mg/ 6 ml (4.17) gereinigt und angereichert. Die SPE wird mit Hilfe einer Vakuumkammer (4.18) durchgeführt.

Konditionierungsschritt 1	5 ml Methanol (3.2.34)
Konditionierungsschritt 2	5 ml schwefelsaures Methanol (3.3.1)
Probenaufgabe	2 x 5 ml Probe
Waschschritt	5 ml Wasser, 5 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 (4.11). Der Anreicherungsfaktor der Festphasenextraktion ist 10.

5.4 Rekonstitution der Probe

Der Rückstand wird in 1 ml Methanol/Wasser (5/95, v/v) aufgenommen und durch Schütteln auf dem Reagensglasschüttler (4.9) gelöst.

Die Probe wird durch einen geeigneten Filter mit einer Porengröße von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ filtriert (4.19). Falls ein Zentrifugalfilter verwendet wird, werden $500\text{ }\mu\text{l}$ der Probe bei 20000 x g für 10 min zentrifugiert. $200\text{ }\mu\text{l}$ des Filtrats werden zur Messung in ein HPLC-Vial (4.22) mit Glasinsert (4.23) überführt.

6. HPLC-MS/MS-Analyse

6.1 Chromatographische Trennung

Die Messungen können mit verschiedenen Flüssigkeitschromatographen (LC) und Trennsäulen durchgeführt werden. Die chromatographischen Bedingungen können frei gewählt werden. Die akzeptable Mindestretentionszeit beträgt das Doppelte der Retentionszeit für das Totvolumen der Säule (SANTE/11813/2017). Die im Anhang (8.1) aufgeführten Bedingungen unter Verwendung einer C18-Säule (8.1) und den unter den in Kapitel 3.3.3 angegebenen Fließmitteln haben sich in Vorversuchen als geeignet erwiesen, sind jedoch nur als Beispiel zu verstehen.

6.2 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 Fragment-Ionen gewählt.

Gegebenenfalls kann auch mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) analysiert werden. Zur Identifikation sind die Kriterien der SANTE/11813/2017 einzuhalten. Im Anhang (8.1) sind beispielhaft die exakten Massen des zu detektierenden protonierten Molekül-Ions bzw. Produkt-Ions aufgeführt, die sich für die Detektion als geeignet erwiesen haben.

6.3 Identifizierung der Analyten (Qualitativer Nachweis)

Die Identifizierung der Analyten mittel Tandem-Massenspektrometrie erfolgt durch den Vergleich der Retentionszeit und des Ionenverhältnisses der spezifischen Übergänge (mindestens 2) eines Analyten in der Probe mit dem entsprechenden Signal im Matrixstandard. Die maximal erlaubte Abweichung der Retentionszeiten und der Ionenverhältnisse haben die Kriterien der SANTE/11813/2017 zu erfüllen.

Bei der Analyse mittels hochauflösender Massenspektrometrie müssen das protonierte Molekül-Ion und das Fragment der MS2 Messung mit mindestens 5 ppm Massengenauigkeit bestimmt werden (SANTE/11813/2017).

6.4 Bestimmung des PA und TA-Gehaltes (Quantifizierung)

Für die quantitative Analyse mittels LC-MS/MS müssen Matrixeffekte (unterschiedlicher Response des Analyten in Lösungsmittel bzw. in der Matrix) kompensiert werden. Das kann anhand einer Matrix-Standardreihe erfolgen (6.6.1). Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit geeigneter unbelasteter Proben.

Andere geeignete Verfahren, wie z.B. Standardaddition oder die Verringerung von Matrixeffekten durch Verdünnung sind ebenfalls anwendbar.

6.5 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 Pyrrolizidin- und Tropanalkaloide 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)

6.6 Herstellung der Kalibrierlösungen/Durchführung der Standardaddition

Für die quantitative Analyse mittels LC-MS/MS müssen Matrixeffekte (unterschiedlicher Response des Analyten in Lösungsmittel bzw. in der Matrix) kompensiert werden. Das kann anhand einer Matrix-Standardreihe erfolgen (6.6.1). Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit geeigneter unbelasteter Proben.

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

Andere geeignete Verfahren, wie z. B. Standardaddition (6.6.2) oder die Verringerung von Matrixeffekten durch Verdünnung sind ebenfalls anwendbar.

Hinweis: Die Linearität des gewählten Kalibrierbereiches ist geräteabhängig und ist in der jeweiligen Analyse/Messung sicherzustellen. Die Überprüfung der Linearität erfolgt durch das Rekalkulieren der eingesetzten Kalibrierlevel anhand der ermittelten Kalibrierfunktion. Dabei muss die Abweichung der rekalkulierten Konzentration von der wahren Konzentration kleiner 20% sein (SANTE/11813/2017).

6.6.1 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 PA- und TA-freies Mehl wie unter Kapitel 5.2 beschrieben extrahiert. Anschließend werden **zweimal** 10 ml Extrakt über zwei separate SPE-Kartuschen aufgereinigt. Daraus resultieren 2 ml rekonstituierter Blank-Extrakt zur Herstellung der MMS. In Tabelle 1 ist das Pipettierschema zur Herstellung der Matrix-Standardreihe aufgelistet.

Tabelle 1: Pipettierschema zur Herstellung der Matrix-Standardreihe mit internem TA-Standard

Level	Konzentration der Matrix-Kalibration ng/ml	Aliquot-volumen [µl]	Aliquot entnommen aus	Aliquot-volumen [µl] aus IS (1)	Volumen des Blank-Extraktes [µl]	Endvolumen des MMS [µl]
7	10	20	Arbeitslsg (2) [100 ng/ml]	8	172	200
6	7,5	15	Arbeitslsg (2) [100 ng/ml]	8	177	200
5	5	10	Arbeitslsg (2) [100 ng/ml]	8	182	200
4	2,5	5	Arbeitslsg (2) [100 ng/ml]	8	187	200
3	1	20	Arbeitslsg (3) [10 ng/ml]	8	172	200
2	0,5	10	Arbeitslsg (3) [10 ng/ml]	8	182	200
1	0,1	2	Arbeitslsg (3) [10 ng/ml]	8	190	200

6.6.2 Standardaddition

Zur Quantifizierung von PA und TA in Mehlen von denen keine Blankmatrix vorhanden ist und mittels Verdünnung die Matrixeffekte nicht minimiert werden können, kann eine Standardaddition durchgeführt werden. Dieses Verfahren bietet sich nur an, wenn von einer Mehlmatrix geringe Probenzahlen vorhanden sind.

Anhand einer Weizenmehl-Matrix-matched Kalibrierung wird zunächst die in der Probe enthaltene Analyt-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.

6.7 Maßnahmen zur Qualitätskontrolle

Qualität der MS-Messung

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

Eine Überprüfung des Responstdrifts muss während jeder Sequenz/Messreihe vorgenommen werden. Die kann entweder a) durch eine regelmäßige Injektion einer Qualitätskontrollprobe (mindestens alle 40 Injektionen) geprüft werden oder b) durch einen Vergleich der Steigungsdifferenz der Matrixkalibrierfunktionen innerhalb einer Sequenz vorgenommen werden.

Probenaufarbeitung (Wiederfindung innerhalb einer Serie)

Da kein zertifiziertes Referenzmaterial pyrrolizidin- bzw. tropanalkaloidhaltiger Mehle zur Verfügung steht, sollte die Wiederfindung anhand von dotiertem Leermaterial überprüft werden. Die Akzeptanzkriterien bezüglich der Präzision und Wiederfindung für die Anwendung von Multianalytmethoden in der Routine sind in der SANTE/11813/2017 beschrieben.

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

7.2 Quantifizierung

Gleichung 2: Berechnung des Gehaltes an PA (Analysengleichung)

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

Legende:

β	Massenkonzentration [ng/ml]
DF	Umrechnungsfaktor von ng/ml auf $\mu\text{g/kg}$
y	Peakfläche des Zielanalyten/Peakfläche des internen Standards
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 der Einheit „ $\mu\text{g/kg}$ “ mit zwei signifikanten Stellen. Zur Umrechnung der Konzentration in Mehl von ng/ml liegt bei Einhaltung des unter Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** beschriebenen Probenaufbereitungsverfahrens der Faktor zur Berechnung des Gehalts in $\mu\text{g/kg}$ bei 0,5.

Referenzen

- BfR (2016). "Pyrrolizidinalkaloide: Gehalte in Lebensmitteln sollen nach wie vor so weit wie möglich gesenkt werden." Stellungnahme Nr. 030/2016.
- EC, Commission Recommendation (EU) 2015/976 on the monitoring of the presence of tropane alkaloids in food, Official Journal of the European Union, L 157/97 (2015).
- EFSA (2013). "Tropane alkaloids in food and feed." EFSA Journal 2013.
- EFSA (2017). "Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements."
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2017.4908/epdf>.
- 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
- SANTE/11813/2017 Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, implemented 01/01/2018
- Mulder, P., de Nijs, M., Castellari, M., Hortos, M., MacDonald, S., Crews, C., Hajslova, J., Stranska, M. (2016). "Occurrence of tropane alkaloids in food." EFSA - EXTERNAL SCIENTIFIC REPORT.
- 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

Tandem-Massenspektrometer (z. B. Thermo TSQ Quantiva)

HPLC-Anlage Ultimate 3000, bestehend aus einer binären 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 2 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	98
10,1	0	98
10,2	95	5
15,0	95	5

MS-Geräteeinstellungen

Ionisation Elektrospray positiv (ESI +)
Ion Spray Voltage [V] 3500 (positive polarity)
Ion Transfer Tube Temperature [°C] 333
Vaporizer Temperature [°C] 350
Sheath Gas Pressure [Arb] 45.0
Ion Sweep Gas Pressure [Arb] 1
Aux Valve Flow 10

Substanzspezifische Parameter

Die Analyten werden mittels Tandem-Massenspektrometrie im Selected Reaction Monitoring (SRM) bestimmt. Gegebenenfalls kann auch mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) analysiert werden. Zur Identifikation sind die Kriterien der SANTE/11813/2017 einzuhalten. Im MRM Modus werden die spezifischen Übergänge eines Vorläufer-Ions auf mindestens zwei Produkt-Ionen gemessen. Die Massen der Vorläufer- und Produkt-Ionen der entsprechenden Übergänge und die Kollisionsenergie (CE) sind aus Tabelle 3 zu entnehmen. Ebenso ist dort die Retentionszeit je Analyt aufgeführt. Ein Beispielchromatogramm ist in Kapitel 8.3 gezeigt.

Mittels HRMS werden hochaufgelöste Messdaten im Full MS sowie im MS2 Modus aufgenommen. Die exakten Massen des zu detektierenden protonierten Vorläufer-Ions bzw. Produkt-Ions sind in Tabelle 4 aufgeführt.

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

Analyt	Vorläufer-Ion (amu)	RF-Lens Spannung (V)	Produkt-Ion (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
		112	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
		95	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	
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	138,2	27	7,26
			1202	27	
			308,2	26	
Sc	336,2	135	138,2	27	7,33
			1202	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
		112	220,3	14	
			336,2	16	
EmN	414,2	129	254,1	32	8,01
			352,1	27	

Analyt	Vorläufer-Ion (amu)	RF-Lens Spannung (V)	Produkt-Ion (amu)	CE (V)	Retentionszeit (min)
			396,2	24	
Sk	366,2	106	150,3 168,2 122,3	24 28 31	8,19
Lc	412,2	94	120,2 336,3 220,2	30 17 18	8,99
LcN	428,1	110	136,1 253,9 352,3	33 27 21	9,33
Sco	304,1	91	103,1 138,1 156,1	30 30 30	6,45
¹³ C-D ₃ -Sco	308,1	91	103,1 142,1 160,1	30 30 30	6,45
Atr	290,1	100	93,1 124,1	29 29	7,57
D ₅ -Atr	295,1	122	93,1 124,1	30 30	7,57

Tabelle 4: Summenformeln sowie exakte Massen der Vorläufer- und Produktionen für die Bestimmung mittels LC-HRMS Methode

Analyt	Summenformel	exakte Masse	
		Vorläufer-Ion [M+H] ⁺ (amu)	Produkt-Ion (amu)
Atropin	C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	290,17507	124,11214 93,06988
D ₅ -Atropin	C ₁₇ H ₁₈ d ₅ NO ₃	295,20645	124,11214 138,09130
Echimidin	C ₂₀ H ₃₁ NO ₇	398,21733	120,08078 138,09130
Echimidin-NO	C ₂₀ H ₃₁ NO ₈	414,21224	120,08078 138,09130
Erucifolin	C ₁₈ H ₂₃ NO ₆	350,15981	120,08078 138,09130
Erucifolin-NO	C ₁₈ H ₂₃ NO ₇	366,15473	120,08078 138,09130
Europin	C ₁₆ H ₂₇ NO ₆	330,19111	120,08078 138,09130
Europin-NO	C ₁₆ H ₂₇ NO ₇	346,18603	120,08078 138,09130
Heliotrin	C ₁₆ H ₂₇ NO ₅	314,1962	120,08078 138,09130
Heliotrin-NO	C ₁₆ H ₂₇ NO ₆	330,19111	120,08078 138,09130
Intermedin	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	300,18055	120,08078 138,09130
Intermedin-NO	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	316,17546	120,08078 138,09130
Jacobin	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352,17546	120,08078 138,09130
Jacobin-NO	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	368,17038	120,08078 138,09130
Lycopsamin	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	300,18055	120,08078 138,09130
Lycopsamin-NO	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	316,17546	120,08078 138,09130
Lasiocarpin	C ₂₁ H ₃₃ NO ₇	412,23298	120,08078 138,09130
Lasiocarpin-NO	C ₂₁ H ₃₃ NO ₈	428,22789	120,08078 138,09130
Monocrotalin	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	326,15981	120,08078 138,09130
Monocrotalin-NO	C ₁₆ H ₂₃ NO ₇	342,15473	120,08078 138,09130
Retrorsin	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352,17546	120,08078 138,09130
Retrorsin-NO	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	368,17038	120,08078 138,09130

Retronecin-NO	C8H13NO3	172,09682	111,06787 136,07569
Senecionine Senecivernine	C18H25NO5	336,18055	120,08078 138,09130
Senecionine-NO Senecivernine-NO	C18H25NO6	352,17546	120,08078 138,09130
Scopolamin	C17H21NO4	304,15433	138,09130 156,10191
¹³ C-D ₃ -Scopolamin	C17H18d3NO4	307,17316	120,08078 138,09130
Senkirkin	C19H27NO6	366,19111	168,10191 150,09134
Seneciphyllin	C18H23NO5	334,16490	120,08078 138,0913
Seneciphyllin-NO	C18H23NO6	350,15981	120,08078 138,09130
Trichodesmin	C18H27NO6	354,19111	120,08078 138,09130

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

Tabelle 6: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen unter Wiederholbedingungen in dotiertem Weizenmehl (50, 5 und 0,5 µg/kg)

Analyt	Weizenmehl (n=3)		Weizenmehl (n=3)		Weizenmehl (n=3)	
	50 µg/kg		5 µg/kg		0,5 µg/kg	
	WFR (%)	RSD (%)	WFR (%)	RSD (%)	WFR (%)	RSD (%)
Atr	98,9	1,4	106,6	1,4	72,5	3,9
Em	99,3	0,7	92,4	1,7	88,0	2,8
EmN	92,3	1,5	95,1	1,2	71,3	1,5
Er	72,7	0,9	81,2	2,0	76,3	2,2
ErN	67,3	1,4	70,1	2,1	63,1	9,7
Eu	100,2	1,2	100,0	2,5	73,0	1,9
EuN	100,9	1,3	101,0	1,6	61,9	7,6
Hn	101,8	1,5	106,3	1,4	82,9	3,1
HnN	99,5	0,6	103,3	0,6	68,7	3,7
Im	101,8	0,9	109,9	2,1	77,6	5,7
ImN	99,6	2,0	97,1	1,7	83,9	8,9
Jb	65,5	1,7	82,2	0,8	81,7	2,6
JbN	58,1	3,0	57,2	2,1	61,8	5,0
La	103,0	1,5	103,7	1,7	84,1	7,3
LaN	97,9	0,2	99,9	0,7	67,1	1,6
Lc	98,1	1,0	104,7	1,5	88,9	2,2
LcN	95,7	0,9	102,6	1,2	74,2	3,2
Mc	94,9	3,4	115,2	1,4	81,9	6,3
McN	95,6	1,4	103,0	2,9	70,1	3,9
Re	97,1	2,5	105,7	2,0	88,3	7,5
ReN	98,6	1,3	106,8	1,9	81,0	6,4
Sc	96,5	1,2	104,5	1,5	90,4	2,9
ScN	96,6	1,7	104,8	0,5	81,7	8,2
Sco	101,9	1,6	98,8	2,1	86,9	8,3
Sk	99,0	0,8	107,8	1,1	87,2	0,8
Sp	100,0	1,5	95,0	1,8	105,2*	4,5
SpN	90,9	1,5	94,2	1,6	67,9	7,9
Td	96,9	1,6	99,8	1,8	87,1	3,9

*Dotierlevel 1 µg/kg

Tabelle 7: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen unter Wiederholbedingungen in dotiertem Roggenmehl (50, 5 und 0,5 µg/kg)

Analyt	Roggenmehl (n=3)		Roggenmehl (n=3)		Roggenmehl (n=3)	
	50 µg/kg		5 µg/kg		0,5 µg/kg	
	WFR (%)	RSD (%)	WFR (%)	RSD (%)	WFR (%)	RSD (%)
Atr	94,8	1,5	88,0	2,7	73,9	0,5
Em	94,9	2,1	75,3	4,7	87,7	1,6
EmN	83,1	4,1	80,2	1,3	64,7	5,1
Er	82,8	2,6	90,5	6,7	82,9	3,0
ErN	91,7	0,6	99,1	6,9	79,3	7,4
Eu	97,1	1,7	91,9	3,9	77,1	0,5
EuN	86,0	3,0	86,8	2,5	51,3	3,3
Hn	97,8	1,8	98,6	1,9	80,6	0,7
HnN	83,1	3,5	85,4	1,2	58,0	1,9
Im	99,7	2,3	100,0	1,5	92,5	2,7
ImN	81,4	4,8	74,1	5,0	51,3	11,5
Jb	82,1	2,3	85,9	5,2	80,8	9,2
JbN	83,2	1,9	82,3	5,3	72,5	1,9
La	95,0	1,7	97,1	4,1	80,4	4,0
LaN	88,6	2,0	86,8	5,9	61,1	2,6
Lc	97,8	1,7	92,9	3,5	91,7	1,2
LcN	91,5	3,3	93,3	0,7	70,3	1,2
Mc	86,7	3,5	98,0	7,1	85,3	7,0
McN	90,6	2,7	99,0	8,0	76,8	8,8
Re	87,9	3,4	90,2	7,3	83,6	0,8
ReN	96,6	2,9	100,6	1,2	82,9	14,3
Sc	89,5	2,6	93,3	4,0	89,6	4,7
ScN	96,2	2,2	102,1	3,0	83,8	0,4
Sco	94,8	0,6	91,3	3,1	83,8	0,4
Sk	96,7	1,5	101,4	0,6	87,8	1,0
Sp	88,6	1,7	84,7	4,1	95,8*	2,1
SpN	91,9	2,0	92,9	3,3	82,8	6,7
Td	90,7	1,8	90,0	5,0	89,1	3,7

*Dotierlevel 1 µg/kg

8.2.3 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

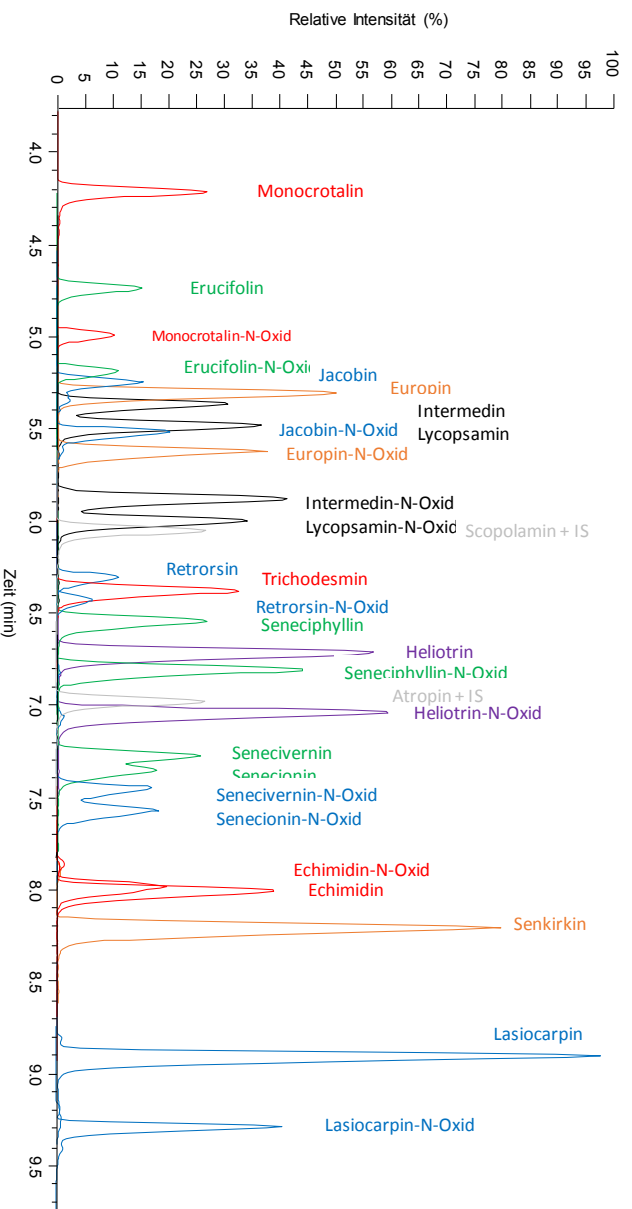


Abbildung 1: Chromatogramm eines Mischstandards [c = 1 ng/ml], SRM

8.4 Anbieter von PA- und TA-Standardsubstanzen

Analyt	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
Intermedin	299,37	10285-06-0	PhytoLab	83235
			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

Analyt	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
Atropin	289,3	51-55-8	Sigma Aldrich	A0132-5g
D ₅ -Atropin	294,3	NA	TRC Biozol	A794627
Scopolamin	303,3	138-12-5	TRC Biozol	S200000
¹³ C-D ₃ -Scopolamin	307,3	NA	TRC Biozol	S200003

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

8.5 Fließschema zur Probenaufarbeitung

