

## DIN EN 12393-2



ICS 67.050

Ersatz für  
DIN EN 12393-2:2014-01

**Pflanzliche Lebensmittel –  
Multiverfahren zur Bestimmung von Pestizidrückständen mit GC oder  
LC-MS/MS –  
Teil 2: Verfahren zur Extraktion und Reinigung;  
Deutsche Fassung EN 12393-2:2013**

Foods of plant origin –  
Multiresidue methods for the determination of pesticide residues by GC or LC-MS/MS –  
Part 2: Methods for extraction and cleanup;  
German version EN 12393-2:2013

Aliments d'origine végétale –  
Méthodes multirésidus de détermination de résidus de pesticides par CPG ou  
CL-SM/SM –  
Partie 2: Méthodes d'extraction et de purification;  
Version allemande EN 12393-2:2013

Gesamtumfang 44 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

## **Nationales Vorwort**

Dieses Dokument (EN 12393-2:2013) wurde vom CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) nach eingehenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 4 „Pestizide in pflanzlichen Lebensmitteln“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) erarbeitet.

Deutsche Experten aus dem Arbeitsausschuss NA 057-01-08 AA „Pestizide“ des Normenausschusses „Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte“ (NAL) haben maßgeblich an diesem Papier mitgewirkt.

Alle in den Beispielen verwendeten Begriffe der Einstellungen am LC-MS/MS-Gerät sind herstellerspezifisch und werden in der englischen Sprache, die in der üblichen Gerätebeschreibung benutzt wird, wiedergegeben.

### **Änderungen**

Gegenüber DIN EN 12393-2:2009-01 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Verfahren L: Extraktion mit Aceton, Flüssig/flüssig-Verteilung mit Dichlormethan und Reinigung an einer Kieselgel/Aktivkohle-Säule wurde aus der Norm gestrichen;
- b) die Verfahren N und P erlauben nun auch die Trennung der Analyten mit Flüssig-Flüssigchromatographie mit MS/MS-Detektion;
- c) der Anwendungsbereich des Verfahrens N ist bezüglich der Anzahl der Pestizide und ihrer Validierungsdaten erweitert worden;
- d) Informationen zum GC-MS/MS Verfahren wurden eingefügt;
- e) die Norm wurde bezüglich Verweisungen usw. redaktionell überarbeitet.

Gegenüber DIN EN 12393-2:2014-01 wurden folgende Korrekturen vorgenommen:

- a) Vorwort, 4. Absatz, 1. Zeile: „EN 12393-3:2008“ wurde in „EN 12393-2:2008“ geändert.
- b) In 6.6, 5. Absatz letzter Satz (i.e. vor der Anmerkung) wurde die Zahl „2“ in „4“ geändert: „... Endvolumen von 4 ml ...“.
- c) 6.8 Tabelle 4: Der Text „Tabelle 4 (fortgesetzt)“ erscheint auch am Kopf der folgenden Seiten der Tabelle.
- d) 6.9, Zeile 1: Die Zahl „4“ wurde in „3“ geändert: „Die Pestizide, die mit diesem Verfahren bestimmt werden können, sind in Tabelle 3 aufgeführt.“

### **Frühere Ausgaben**

DIN EN 12393-2: 1998-12, 2009-01, 2014-01

Deutsche Fassung

Pflanzliche Lebensmittel - Multiverfahren zur Bestimmung von  
Pestizidrückständen mit GC oder LC-MS/MS - Teil 2: Verfahren  
zur Extraktion und Reinigung

Foods of plant origin - Multiresidue methods for the  
determination of pesticide residues by GC or LC-MS/MS -  
Part 2: Methods for extraction and clean-up

Aliments d'origine végétale - Méthodes multirésidus de  
détermination de résidus de pesticides par CPG ou CL-  
SM/SM - Partie 2: Méthodes d'extraction et de purification

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 21. September 2013 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG  
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

## Inhalt

|                                                                                                                                                                                                       | Seite     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Vorwort .....</b>                                                                                                                                                                                  | <b>3</b>  |
| <b>Einleitung.....</b>                                                                                                                                                                                | <b>4</b>  |
| <b>1 Anwendungsbereich .....</b>                                                                                                                                                                      | <b>5</b>  |
| <b>2 Normative Verweisungen .....</b>                                                                                                                                                                 | <b>5</b>  |
| <b>3 Kurzbeschreibung .....</b>                                                                                                                                                                       | <b>5</b>  |
| <b>4 Allgemeines: Zusammenfassung der Extraktions- und Reinigungsverfahren .....</b>                                                                                                                  | <b>6</b>  |
| <b>5 Verfahren M: Extraktion mit Aceton und Flüssig/Flüssig-Verteilung mit<br/>Dichlormethan/Petroleumbenzin, falls erforderlich, Reinigung an Florisil® .....</b>                                    | <b>7</b>  |
| <b>6 Verfahren N: Extraktion mit Aceton, Flüssig/Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan oder<br/>Cyclohexan/Ethylacetat und Reinigung durch Gelpermeations- und<br/>Kieselgel-Chromatographie .....</b> | <b>10</b> |
| <b>7 Verfahren P: Extraktion mit Ethylacetat und, falls erforderlich, Reinigung durch<br/>Gelpermeations-Chromatographie .....</b>                                                                    | <b>35</b> |
| <b>Anhang A (informativ) Durchschnittlicher Wassergehalt von Erntegütern und Lebensmitteln .....</b>                                                                                                  | <b>41</b> |
| <b>Literaturhinweise .....</b>                                                                                                                                                                        | <b>42</b> |

## Vorwort

Dieses Dokument (EN 12393-2:2013) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 2014, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2014 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN 12393-2:2008 mit den folgenden wichtigen Änderungen:

- a) Einführung der Flüssigchromatographie in Kombination mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) zur Quantifizierung und/oder Bestätigung von Pestizidrückständen;
- b) Einarbeitung von Informationen zur GC-MS/MS;
- c) Streichung des Verfahrens L, da es nicht länger verwendet wird;
- d) redaktionelle Überarbeitung des Dokumentes bezüglich der Verweisungen, usw.;
- e) Erweiterung des Anwendungsbereiches des Verfahrens N bezüglich der Anzahl der Pestizide und derer Validierungsdaten.

EN 12393 *Pflanzliche Lebensmittel — Multiverfahren zur Bestimmung von Pestizidrückständen mit GC oder LC-MS/MS* besteht aus drei Teilen:

- Teil 1: „*Allgemeines*“ enthält allgemeine Hinweise zu Chemikalien, Geräten, Gaschromatographie usw. bei jedem der ausgewählten Verfahren
- Teil 2: „*Verfahren zur Extraktion und Reinigung*“ enthält die Verfahren M, N und P zur Extraktion und zur Reinigung mit Flüssig/Flüssig-Verteilung, Adsorptions-Säulenchromatographie oder Gelpermeations-Chromatographie
- Teil 3: „*Verfahren zur Bestimmung und Absicherung*“ enthält einige empfohlene Techniken zur qualitativen und quantitativen Ermittlung der Rückstände und Absicherung der Ergebnisse

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

## **Einleitung**

Diese Europäische Norm umfasst eine Reihe von Verfahren von gleicher Bedeutung: Kein einzelnes Verfahren kann als vorrangig angesehen werden, weil sich die Verfahren auf diesem Gebiet stetig weiterentwickeln. Die für diese Europäische Norm ausgewählten Verfahren sind in Ringversuchen erfolgreich geprüft worden und/oder werden in ganz Europa weithin angewandt.

Diese Verfahren, die unterschiedliche Arbeitsweisen zur Bestimmung vorsehen, können für besonders viele Pestizide und Lebensmittel angewendet werden. Deshalb ist es in bestimmten Fällen angebracht, von den beschriebenen Geräten und Bedingungen zur Extraktion, Reinigung und Chromatographie abzuweichen, um bessere Ergebnisse zu erhalten, siehe Abschnitt 3.

## 1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt Verfahren für die Extraktion und Reinigung pflanzlicher Lebensmittel zur Bestimmung von Pestizidrückständen fest.

Zu diesem Zweck können verschiedene Lösemittel verwendet werden. Die Pestizidrückstände liegen im Allgemeinen gemeinsam mit mitextrahierten Begleitstoffen vor, die bei der Analyse stören können. Zur Reinigung dieser rohen Extrakte können unterschiedliche Verfahren angewendet werden.

Diese Europäische Norm enthält die folgenden Extraktions- und Reinigungsverfahren, die in Ringversuchen erfolgreich geprüft worden und/oder in ganz Europa anerkannt sind:

- Verfahren M: Extraktion mit Aceton und Flüssig/Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan/Petroleumbenzin, falls erforderlich, Reinigung an Florisil®<sup>1)</sup> [1], [2], [3];
- Verfahren N: Extraktion mit Aceton, Flüssig/Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan oder Cyclohexan/Ethylacetat und Reinigung durch Gelpermeations- und Kieselgel-Chromatographie [4], [5];
- Verfahren P: Extraktion mit Ethylacetat und, falls erforderlich, Reinigung durch Gelpermeations-Chromatographie [6].

Diese Europäische Norm legt Einzelheiten der Verfahren M, N und P zur Extraktion und Reinigung von Proben pflanzlicher Lebensmittel fest. Zur Extraktion werden mehrere Lösemittel in unterschiedlichen Mengen verwendet. Als Reinigungsverfahren werden z. B. die Flüssig/Flüssig-Verteilung, die Flüssigkeitschromatographie an verschiedenen Adsorptionsmitteln und die Gelpermeations-Chromatographie aufgeführt.

Soweit möglich, ist in jedem Verfahren der jeweilige Anwendungsbereich beschrieben, und die Pestizid/Matrix-Kombinationen, die in Ringversuchen getestet wurden, sind tabellarisch aufgelistet, siehe Tabelle 3.

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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 12393-1:2013, *Pflanzliche Lebensmittel — Multiverfahren zur Bestimmung von Pestizidrückständen mit GC oder LC-MS/MS — Teil 1: Allgemeines*

EN 12393-3:2013, *Pflanzliche Lebensmittel — Multiverfahren zur Bestimmung von Pestizidrückständen mit GC oder LC-MS/MS — Teil 3: Verfahren zur Bestimmung und Absicherung*

## 3 Kurzbeschreibung

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist es in bestimmten Fällen möglich, bessere Ergebnisse zu erhalten, wenn von den beschriebenen Geräten und Bedingungen zur Extraktion, Reinigung und Chromatographie abgewichen wird. Solche Abweichungen müssen immer eindeutig dokumentiert und daraufhin geprüft werden, dass sie zu verlässlichen Ergebnissen führen.

Die Extraktion der Rückstände aus der Probenmatrix mit geeigneten Lösemitteln hat das Ziel, die Rückstände möglichst vollständig zu extrahieren und gleichzeitig möglichst wenig Begleitstoffe mitzulösen, die bei der Bestimmung stören können. Bei der Reinigung werden störende Stoffe so weit wie möglich aus dem Probenextrakt entfernt, so dass die extrahierten Pestizidrückstände schließlich in einer Lösung vorliegen, die zur quantitativen Bestimmung geeignet ist.

---

<sup>1)</sup> Florisil® ist ein Beispiel für ein geeignetes Produkt, erhältlich von U.S. Silica Company. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch CEN.

## 4 Allgemeines: Zusammenfassung der Extraktions- und Reinigungsverfahren

### 4.1 Extraktion

Die Extraktionsverfahren sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1 — Extraktionsverfahren**

| Verfahren                                                                    | Einwaage ( $M$ )<br>g | Volumen des Lösemittels ( $V_L$ )<br>ml | Verhältnis ( $M/V_L$ )<br>g/ml |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|
| M                                                                            | 100                   | Aceton: 200                             | $\frac{1}{2}$                  |
| N                                                                            | 100 <sup>a</sup>      | Aceton: 200                             | $\frac{1}{2}$                  |
| P                                                                            | 10                    | Ethylacetat: 20                         | $\frac{1}{2}$                  |
| <sup>a</sup> Nur relevant, wenn der Wassergehalt der Matrix über 70 % liegt. |                       |                                         |                                |

### 4.2 Reinigung

#### 4.2.1 Flüssig/Flüssig-Verteilung

Die Verfahren zur Flüssig/Flüssig-Verteilung sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2 — Flüssig/Flüssig-Verteilung**

| Verfahren                                          | Aliquoter Anteil des<br>Extraktes ( $A_E$ )<br>ml | Volumen des<br>Wasserzusatzes ( $V_W$ )<br>ml | Volumen des<br>Lösemittels ( $V_L$ )<br>ml | Verhältnis<br>( $A_E/V_W$ ) |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|
| M                                                  | 80                                                | 0                                             | 200                                        | — <sup>a</sup>              |
| N                                                  | 200                                               | x <sup>a</sup>                                | 100                                        | — <sup>a</sup>              |
| <sup>a</sup> Hängt vom Wassergehalt der Matrix ab. |                                                   |                                               |                                            |                             |

Zwei Techniken zur Flüssig/Flüssig-Verteilung werden vorgeschlagen:

- mit Wasserzusatz (Verfahren N);
- ohne Wasserzusatz (Verfahren M).

#### 4.2.2 Adsorptions-Säulenchromatographie

Verfahren M, N mit unterschiedlichen Adsorptionsmitteln: Kieselgel, Aktivkohle, Florisil®, die allein oder in Gemischen verwendet werden.

#### 4.2.3 Gelpermeations-Chromatographie mit BioBeads® S-X3-Harz<sup>2)</sup>

Verfahren N oder, falls erforderlich, Verfahren P.

<sup>2)</sup> BioBeads® S-X3-Harz ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch CEN.

## 5 Verfahren M: Extraktion mit Aceton und Flüssig/Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan/Petroleumbenzin, falls erforderlich, Reinigung an Florisil®

### 5.1 Kurzbeschreibung

Die zerkleinerte Probe wird mit Aceton homogenisiert und der Extrakt filtriert. Ein aliquoter Anteil des Filtrates wird mit einem Gemisch aus Petroleumbenzin und Dichlormethan und dann mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organische Phase kann direkt ohne Reinigung in einen Gaschromatographen mit einem dafür geeigneten Detektor eingespritzt oder an einer Florisil®-Säule gereinigt werden. Die Analyten werden von der Florisil®-Säule mit Mischungen aus Diethylether und Petroleumbenzin (Verfahren M<sub>1</sub>) oder mit Mischungen aus Dichlormethan, Petroleumbenzin und Acetonitril (Verfahren M<sub>2</sub>) eluiert. Die Eluate werden eingeeengt und gaschromatographisch untersucht.

### 5.2 Chemikalien

#### 5.2.1 Allgemeines

Alle Chemikalien müssen zur Pestizid-Rückstandsanalyse geeignet sein und EN 12393-1:2013, Abschnitt 4, entsprechen.

#### 5.2.2 Aceton

#### 5.2.3 Petroleumbenzin, Siedebereich 40 °C bis 60 °C

#### 5.2.4 Natriumchlorid, mindestens 4 h auf 500 °C erhitzt, abgekühlt und in einer verschlossenen Flasche aufbewahrt

#### 5.2.5 Dichlormethan

#### 5.2.6 Acetonitril

#### 5.2.7 Natriumsulfat, mindestens 4 h auf 500 °C erhitzt, abgekühlt und in einer verschlossenen Flasche aufbewahrt

#### 5.2.8 Florisil® (oder eine entsprechende Qualität), 150 µm bis 250 µm (60 mesh bis 100 mesh).

Florisil® wird mindestens 5 h auf 130 °C bis 135 °C erhitzt, in einem Exsikkator abgekühlt und in einer luftdicht verschlossenen Flasche aufbewahrt. Es behält seine Aktivität 4 Tage, kann aber auf die gleiche Weise wieder aktiviert werden. Die Aktivität sollte von Zeit zu Zeit durch Eluieren von Standardsubstanzen nach dem beschriebenen Verfahren überprüft werden.

#### 5.2.9 Diethylether, peroxidfrei, mit 2 % (V/V) Ethanol stabilisiert

#### 5.2.10 Elutionsmischung A: Diethylether : Petroleumbenzin 6+94 (V/V)

#### 5.2.11 Elutionsmischung B: Diethylether : Petroleumbenzin 15+85 (V/V)

#### 5.2.12 Elutionsmischung C: Diethylether : Petroleumbenzin 50+50 (V/V)

#### 5.2.13 Elutionsmischung D: Dichlormethan : Petroleumbenzin 20+80 (V/V)

#### 5.2.14 Elutionsmischung E: Dichlormethan : Petroleumbenzin : Acetonitril 50+49,65+0,35 (V/V/V)

#### 5.2.15 Elutionsmischung F: Dichlormethan : Petroleumbenzin : Acetonitril 50+48,5+1,5 (V/V/V)

### 5.3 Geräte

Übliche Laborgeräte in Übereinstimmung mit EN 12393-1 und insbesondere die folgenden:

**5.3.1 Hochgeschwindigkeitsmischer oder Homogenisierstab** mit geeignetem Mischgefäß

**5.3.2 Chromatographierohr** mit PTFE-Hahn, 22 mm Innendurchmesser, 300 mm lang.

**5.3.3 Lösemittelverdampfer** Kuderna Danish<sup>3)</sup> oder ähnliches.

### 5.4 Durchführung

#### 5.4.1 Vorbereitung der Probe

Die Probe wird in kleine Stücke zerkleinert und sorgfältig gemischt, damit sich homogene Einwaagen ergeben.

Wenn der Wassergehalt der Probe unter 30 % liegt, wird er durch Wasserzugabe auf etwa 80 % eingestellt.

ANMERKUNG Der übliche Wassergehalt einiger Lebensmittel und Erntegüter ist in Tabelle A.1 angegeben.

#### 5.4.2 Extraktion und Verteilung

100 g ( $m$ ) der vorbereiteten Probe werden in ein Mischgefäß (5.3.1) eingewogen, mit 200 ml ( $V_{\text{ex}}$ ) Aceton versetzt und 3 min mit hoher Geschwindigkeit gemischt. Das Gemisch wird in einen Büchnertrichter überführt, der ein mit Aceton angefeuchtetes Filtrierpapier enthält, und unter Unterdruck in den Büchnerkolben filtriert. Das Volumen des Filtrates wird gemessen.

80 ml ( $V_{R1}$ ) Filtrat werden in einen 1-l-Scheidetrichter überführt, der 100 ml Dichlormethan und 100 ml Petroleumbenzin (5.2.3) enthält. Die Mischung wird 3 min geschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die untere wässrige Phase in einen zweiten 1-l-Scheidetrichter überführt. Die obere organische Phase aus dem ersten Scheidetrichter wird durch einen 10-cm-Trichter, der einen gewaschenen Glaswollebausch und eine 3 cm hohe Natriumsulfat-Schicht (5.2.7) enthält, gegeben und in einem Rundkolben aufgefangen.

7 g Natriumchlorid (5.2.4) werden zur wässrigen Phase zugegeben, und die Mischung wird 30 s geschüttelt, bis sich das Natriumchlorid gelöst hat. 100 ml Dichlormethan werden zugefügt, und die Mischung wird 3 min geschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die wässrige Phase in einen dritten Scheidetrichter überführt und die organische Phase wiederum über demselben Natriumsulfat getrocknet. Zum Inhalt des dritten Scheidetrichters werden 100 ml Dichlormethan zugefügt; dieser wird 3 min geschüttelt, die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase verworfen; die organische Phase wird wieder über demselben Natriumsulfat getrocknet. Das Natriumsulfat wird mit 50 ml Dichlormethan gewaschen, und alle organischen Phasen werden auf 2 ml eingeeengt. 100 ml Petroleumbenzin werden zugegeben. Die Lösung wird erneut auf etwa 2 ml eingeeengt und dies solange wiederholt, bis das gesamte Dichlormethan verschwunden ist. 20 ml Aceton werden zugegeben und die Lösung wird wieder auf 2 ml eingeeengt ( $V_{\text{end}}$ ). Dieses Konzentrat darf direkt in einen Gaschromatographen eingespritzt werden, der mit einem HECD (Hall-Detektor), NPD oder FPD ausgestattet ist (Verfahren M).

In einigen Fällen wird für die Bestimmung mit dem Elektroneneinfang-Detektor (ECD) eine Reinigung durch Verfahren M<sub>1</sub> oder Verfahren M<sub>2</sub> empfohlen. Dazu wird die Analysenlösung auf 1 ml Aceton (anstatt auf 2 ml) eingeeengt und mit Petroleumbenzin auf 10 ml aufgefüllt.

---

3) Kuderna Danish Verdampfer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch CEN.

### 5.4.3 Reinigung

#### 5.4.3.1 Verfahren M<sub>1</sub>

Das Chromatographierohr (5.3.2) wird am unteren Ende mit einem Wattebausch versehen und nacheinander 20 cm hoch mit Petroleumbenzin (5.2.3) und mit 20 g Florisil® (5.2.8) gefüllt. Dabei wird gegen die Säulenwand geklopft, damit sich die Füllung besser absetzt. Die Säulenfüllung wird mit 1 cm bis 2 cm Natriumsulfat (5.2.7) abgedeckt und mit etwa 30 ml Petroleumbenzin gewaschen. Das Verdampfergefäß wird zum Auffangen des Eluates unter die Säule gestellt. Der Extrakt aus 5.4.2 wird aufgegeben und mit einer Geschwindigkeit von nicht mehr als 5 ml/min eluiert. Das Gefäß wird zweimal mit jeweils 5 ml Petroleumbenzin gespült, die ebenfalls auf die Säule gegeben werden; die innere Wand des Chromatographierohrs wird mit zusätzlichen kleinen Anteilen Petroleumbenzin gespült. Die Säulenfüllung wird mit 200 ml Elutionsmischung A (5.2.10) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 ml/min eluiert.

Anschließend wird die Säule mit 200 ml Elutionsmischung B (5.2.11) und schließlich mit 200 ml Elutionsmischung C (5.2.12) eluiert. Jedes Eluat wird in einer getrennten Vorlage aufgefangen und zur gaschromatographischen Untersuchung auf ein geeignetes, definiertes Volumen, z. B. 2 ml ( $V_{\text{end}}$ ) eingeeengt.

#### 5.4.3.2 Verfahren M<sub>2</sub>

Das Chromatographierohr (5.3.2) wird am unteren Ende mit einem Wattebausch versehen und nacheinander 20 cm hoch mit Petroleumbenzin (5.2.3) und mit 20 g Florisil® (5.2.8) gefüllt. Dabei wird gegen die Säulenwand geklopft, damit sich die Füllung besser absetzt. Die Säulenfüllung wird mit 1 cm bis 2 cm Natriumsulfat (5.2.7) abgedeckt.

Das Adsorbens wird mit etwa 30 ml Petroleumbenzin gewaschen. Das Verdampfergefäß wird zum Auffangen des Eluates unter die Säule gestellt. Der Extrakt aus 5.4.2 wird aufgegeben und mit einer Geschwindigkeit von nicht mehr als 5 ml/min eluiert. Das Gefäß wird zweimal mit jeweils 5 ml Petroleumbenzin gespült, die ebenfalls auf die Säule gegeben werden; die innere Wand des Chromatographierohrs wird mit zusätzlichen kleinen Anteilen Petroleumbenzin gespült. Die Säulenfüllung wird mit 200 ml Elutionsmischung D (5.2.13) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 ml/min eluiert.

Anschließend wird die Säule mit 200 ml Elutionsmischung E (5.2.14) und schließlich mit 200 ml Elutionsmischung F (5.2.15) eluiert. Jedes Eluat wird in einer getrennten Vorlage aufgefangen und zur gaschromatographischen Untersuchung auf ein geeignetes, definiertes Volumen z. B. 2 ml ( $V_{\text{End}}$ ) eingeeengt.

### 5.5 Gaschromatographie

Zur Bestimmung von Organohalogen-, Organophosphor- und Organostickstoff-Pestizidrückständen wird ein geeignetes gaschromatographisches System nach EN 12393-3 angewendet.

Ein aliquoter Anteil ( $V_i$ ) der nach 5.4.2, 5.4.3.1 oder 5.4.3.2 erhaltenen Eluate wird in den Gaschromatographen eingespritzt.

### 5.6 Berechnung der Rückstände

Der Rückstand R, ausgedrückt in Milligramm je Kilogramm, eines identifizierten Analyten wird nach Gleichung (1) berechnet:

$$R = \frac{(V_{\text{Ex}} + f_1 \times V_{\text{Wasser}}) \times V_{\text{End}} \times W_{\text{St}} \times F_A}{V_{\text{R1}} \times V_i \times m \times F_{\text{St}}} \quad (1)$$

Dabei ist

- $V_{\text{Ex}}$  das Volumen an im Extraktionsschritt 5.4.2 zugegebenen Aceton;
- $f_1$  der Faktor für die Volumenkontraktion beim Mischen von Aceton mit dem in der Einwaage vorhandenen Wasser ( $V_{\text{Wasser}}$ ). Ein üblicher Wert für  $f_1$  ist 0,90;
- $V_{\text{Wasser}}$  das Volumen des in der Probeneinwaage enthaltenen Wassers, in Milliliter. Der durchschnittliche Wassergehalt von Lebensmitteln ist der Literatur zu entnehmen. Beispiele für mittlere Wassergehalte von einigen Gemüsen und Erntegütern sind in Tabelle A.1 angegeben;

|                  |                                                                                          |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| $V_{\text{End}}$ | das Volumen der nach 5.4.2, 5.4.3.1 oder 5.4.3.2 erhaltenen Eluate;                      |
| $W_{\text{St}}$  | die Masse des mit der Standardlösung injizierten Analyten;                               |
| $F_A$            | die sich aus der Injektion von $V_i$ ergebende Peakfläche der Probe;                     |
| $V_{\text{R1}}$  | der Anteil am Volumen $V_{\text{Ex}}$ , das für die Verteilung in 5.4.2 eingesetzt wird; |
| $V_i$            | der Anteil am Volumen $V_{\text{end}}$ , der in den Gaschromatographen injiziert wird;   |
| $m$              | die Masse der Probeneinwaage, in Gramm;                                                  |
| $F_{\text{St}}$  | die sich aus der Injektion von $W_{\text{St}}$ ergebende Peakfläche des Standards.       |

## 6 Verfahren N: Extraktion mit Aceton, Flüssig/Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan oder Cyclohexan/Ethylacetat und Reinigung durch Gelpermeations- und Kieselgel-Chromatographie

### 6.1 Kurzbeschreibung

Die zerkleinerte Probe wird mit Aceton homogenisiert. Dabei wird so viel Wasser zugegeben, dass unter Berücksichtigung des natürlichen Wassergehaltes der Probe das Verhältnis Aceton:Wasser während der Extraktion jeweils 2 + 1 Volumenteile (V/V) beträgt. Das Homogenat wird filtriert. Ein aliquoter Anteil des Filtrates wird mit Natriumchlorid gesättigt und mit Dichlormethan verdünnt, wodurch sich das überschüssige Wasser abscheidet. Alternativ wird Natriumchlorid und eine Mischung aus Cyclohexan und Ethylacetat zum Homogenat zugegeben, und anschließend wird die Mischung intensiv gemischt.

Der Abdampfrückstand der organischen Phase wird durch Gelpermeations-Chromatographie (GPC) an Bio-Beads® S-X3-Harz (Polystyrolgel) mit einem Gemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat als Elutionsmittel gereinigt. Die Fraktion mit den Rückständen wird eingeeengt und direkt gaschromatographisch mit einem phosphor-/stickstoffselektiven Detektor, einem flammenphotometrischen Detektor oder einem Massenspektrometer untersucht. Nach Austausch des Lösemittels kann dieselbe Fraktion für die Bestimmung mit LC-MS/MS verwendet werden. Bei der Untersuchung mit dem Elektroneneinfang-Detektor und in manchen Fällen auch mit dem stickstoffselektiven Detektor kann eine zusätzliche Reinigung an einer kleinen Kieselgelsäule erforderlich sein. Bei diesem Reinigungsschritt werden die Pestizide in mehrere Fraktionen aufgetrennt, so dass sich daraus zusätzliche Hinweise für die Identifizierung ergeben.

### 6.2 Chemikalien

#### 6.2.1 Allgemeines

Alle Chemikalien müssen zur Pestizid-Rückstandsanalyse geeignet sein und EN 12393-1:2013, Abschnitt 4, entsprechen.

#### 6.2.2 Aceton

#### 6.2.3 Dichlormethan

#### 6.2.4 Ethylacetat

#### 6.2.5 Cyclohexan

#### 6.2.6 GPC-Elutionsmischung: Cyclohexan/Ethylacetat 1+1 (V/V)

#### 6.2.7 n-Hexan

#### 6.2.8 Isooctan

#### 6.2.9 Toluol

#### 6.2.10 Wasser, für Chromatographie

#### 6.2.11 Methanol

**6.2.12 Eisessig**, zur Herstellung einer 0,1 %igen wässrigen Essigsäurelösung

**6.2.13 Elutionsmittel 1:** *n*-Hexan : Toluol 65 + 35 (V/V)

**6.2.14 Elutionsmittel 2:** Toluol

**6.2.15 Elutionsmittel 3:** Toluol : Aceton 95 + 5 (V/V)

**6.2.16 Elutionsmittel 4:** Toluol : Aceton 80 + 20 (V/V)

**6.2.17 Elutionsmittel 5:** Aceton

**6.2.18 Natriumchlorid**, mindestens 4 h auf 500 °C erhitzt, abgekühlt und in einer verschlossenen Flasche aufbewahrt.

**6.2.19 Natriumsulfat**, Pulver, mindestens 4 h auf 500 °C erhitzt, abgekühlt und in einer verschlossenen Flasche aufbewahrt.

**6.2.20 Salzmischung**, Natriumsulfat + Natriumchlorid 1 + 1 (w/w)

**6.2.21 Celite® 545<sup>4)</sup>**

**6.2.22 Kieselgel 60**, für die Säulenchromatographie, 63 µm bis 200 µm (70 mesh bis 230 mesh), mit 1,5 % Wasser deaktiviert.

Das Kieselgel wird mindestens 5 h auf 130 °C erhitzt, in einem Exsikkator abgekühlt und in einem dicht verschlossenen Gefäß im Exsikkator aufbewahrt. In einem 300-ml-Erlenmeyerkolben (mit Schliffstopfen) werden zu 98,5 g getrocknetem Kieselgel tropfenweise 1,5 ml Wasser aus einer Bürette unter laufendem Umschwenken zugegeben. Der Erlenmeyerkolben wird sofort mit dem Stopfen verschlossen, 5 min kräftig geschüttelt, bis keine Klumpen mehr sichtbar sind, und anschließend 2 h auf einer mechanischen Schüttelvorrichtung geschüttelt. Das Adsorptionsmittel wird in einem dicht verschlossenen Gefäß aufbewahrt.

**6.2.23 Glaswolle**, erschöpfend mit Aceton extrahiert

**6.2.24 Watte**, aus Baumwolle, erschöpfend mit Aceton extrahiert

**6.2.25 BioBeads® S-X3-Harz**, 38 µm bis 75 µm (200 mesh bis 400 mesh) 3 % quervernetztes Styroldivinylbenzolharz für Größenausschlusschromatographie, Ausschlussgrenze 2000 Da

**6.2.26 Filtrierpapier**, 6 cm und 13,5 cm Durchmesser, Schnellfilterqualität, erschöpfend mit Aceton extrahiert

### 6.3 Geräte

Übliche Laborgeräte in Übereinstimmung mit EN 12393-1 und insbesondere die folgenden:

**6.3.1 Hochgeschwindigkeitsmischer** oder **Homogenisierstab** mit geeignetem Mischgefäß

**6.3.2 Lösemittelverdampfer**, z. B. Rotationsverdampfer zum Einengen der Probenextrakte und zur Herstellung der Extrakte für die LC-MS/MS, oder Ähnliches.

**6.3.3 Ultraschallbad**

---

4) Celite 545 (hochreines calciniertes Kieselgur [Diatomeenerde] für die Chromatographie) ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch CEN.

**6.3.4 Gerät für die GPC**, z. B. GPC Autoprep® 1001 oder 1002<sup>5)</sup> mit Chromatographierohr, 25 mm Innendurchmesser, 50 cm lang und mit 5-ml-Probenschleifen ( $V_{R3}$ ), Säulenfüllung 50 g Bio-Beads® S-X3-Harz, über Nacht in der GPC-Elutionsmischung vorgequollen, Füllhöhe etwa 32 cm; Herstellung der Säulenfüllung siehe 6.4.3.2

**6.3.5 Chromatographierohr**, 7 mm Innendurchmesser, 230 mm lang, mit ausgezogener Spitze.

## 6.4 Durchführung

### 6.4.1 Extraktion

#### 6.4.1.1 Allgemeines

Der durchschnittliche Wassergehalt einiger Erntegüter und Lebensmittel ist im Anhang A aufgeführt.

#### 6.4.1.2 Pflanzenmaterial und andere Lebensmittel mit einem Wassergehalt über 70 g/100 g

100 g ( $m$ ) zerkleinertes Untersuchungsmaterial mit einem Wassergehalt von  $x$  g/100 g werden mit  $(100 - x)$  g Wasser und 200 ml Aceton 3 min in einem Mischgerät (6.3.1) homogenisiert.

#### 6.4.1.3 Pflanzenmaterial mit niedrigem Wassergehalt

10 g bis 50 g ( $m$ ) trockenes oder getrocknetes Pflanzenmaterial mit einem Wassergehalt von  $x$  g/100 g (z. B. 25 g bis 50 g bei Trockenobst und Trockengemüse, 10 g bis 20 g bei Gewürzen und Tee, 50 g bei Getreide) werden eingewogen. Dann wird so viel Wasser zugegeben, dass insgesamt 100 g Wasser vorliegen <sup>6)</sup> Die zuzugebende Wassermenge ( $W$ ) wird nach der Gleichung  $W = 100 - (m \times x)/100$  berechnet. Die Einwaage und das Wasser werden gemischt und 10 min bis 20 min stengelassen. Anschließend werden 200 ml Aceton zugefügt, und die Mischung wird 3 min homogenisiert.

### 6.4.2 Verteilung

#### 6.4.2.1 Verteilung mit Dichlormethan

10 g Celite® 545 werden zugegeben und die Mischung wird erneut 10 s homogenisiert.

Das nach 6.4.1.2 oder 6.4.1.3 gewonnene Homogenat wird in einem Büchnertrichter durch ein Filtrierpapier (6.2.26) bei schwach angelegtem Unterdruck filtriert, bis mehr als 200 ml Filtrat aufgefangen sind.

Um Verluste durch verdampfendes Aceton bei zu starkem Unterdruck zu vermeiden, wird empfohlen, nur geringen Unterdruck anzulegen. Der Filterkuchen darf nicht völlig trocken werden.

200 ml Filtrat ( $V_{R1}$ ) werden in einem Messzylinder abgemessen und in einen 500-ml-Scheidetrichter überführt. 20 g Natriumchlorid (6.2.18) werden zugefügt, und die Mischung wird 3 min kräftig geschüttelt. 100 ml Dichlormethan (6.2.3) werden hinzugefügt, die Mischung wird 2 min geschüttelt und dann etwa 10 min zur Phasentrennung stengelassen. Die untere wässrige Phase wird verworfen. Die organische Phase wird in einem Kolben mit etwa 25 g Natriumsulfat (6.2.19) versetzt, etwa 30 min unter gelegentlichem Umschwenken stengelassen und dann durch einen Trichter mit einem Wattebausch (6.2.24) filtriert, der mit einer 3 cm dicken Natriumsulfatschicht bedeckt ist. Das Filtrat wird in einem 500-ml-Rundkolben aufgefangen, und der Scheidetrichter und der Filter werden zweimal mit je 20 ml Ethylacetat (6.2.4) ausgespült. Die Lösung wird im Rotationsverdampfer (6.3.2) auf 2 ml eingeengt. Die letzten Lösemittelanteile werden durch Überleiten eines schwachen Stickstoffstromes entfernt.

<sup>5)</sup> GPC-Autoprep® 1001 oder 1002 sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch CEN.

<sup>6)</sup> Der durchschnittliche Wassergehalt von Lebensmitteln ist der Literatur zu entnehmen. Beispiele für mittlere Wassergehalte von einigen Gemüsen und Erntegütern sind in Tabelle A.1 angegeben.