

DIN EN 15637



ICS 67.050

**Pflanzliche Lebensmittel –
LC-MS/MS-Verfahren zur Bestimmung von Pestizidrückständen mit
Methanolextraktion und Reinigung an Diatomeenerde;
Deutsche Fassung EN 15637:2008**

Foods of plant origin –

Determination of pesticide residues using LC-MS/MS following methanol extraction and
clean-up using diatomaceous earth;

German version EN 15637:2008

Aliments d'origine végétale –

Détermination des résidus des pesticides par LC-MS/MS après extraction méthanolique et
purification sur terre de diatomées;

Version allemande EN 15637:2008

Gesamtumfang 62 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 15637:2008) ist vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Europäischen Komitees für Normung (CEN) nach eingehenden Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 4 „Pestizide in pflanzlichen Lebensmitteln“ erarbeitet worden.

Das zuständige deutsche Arbeitsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-08 AA „Pestizide“ des Normenausschusses „Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte“ (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

Gemeinschaftsweit gültige Höchstmengen für Pflanzenschutzmittel in pflanzlichen Lebensmitteln sind in der europäischen Verordnung 396/2005 festgelegt. Daher muss auch deren Gehalt gemeinschaftsweit harmonisiert nachgewiesen und bestimmt werden können. Hierzu soll diese Norm dienen.

Diese Norm enthält neben den gesetzlichen Einheiten auch die Einheit „psi“, die im Deutschen Normenwerk nicht zugelassen ist. Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Anwendung dieser Einheit im nationalen amtlichen und geschäftlichen Verkehr aufgrund des Gesetzes über Einheiten im Messwesen nicht zulässig ist.

Umrechnung:

1 psi = 6 894,757 Pa

Für die in den Literaturhinweisen zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 5725 (alle Teile) siehe DIN ISO 5725 (alle Teile)

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725 (alle Teile), *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen*

Deutsche Fassung

Pflanzliche Lebensmittel —
LC-MS/MS-Verfahren zur Bestimmung von Pestizidrückständen
mit Methanolextraktion und Reinigung an Diatomeenerde

Foods of plant origin —
Determination of pesticide residues using LC-MS/MS
following methanol extraction and clean-up using
diatomaceous earth

Aliments d'origine végétale —
Détermination des pesticides par MC-MS/MS
après extraction méthanolique et purification
sur terre de diatomées

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 13. September 2008 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 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, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B- 1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Kurzbeschreibung	4
3 Chemikalien.....	4
4 Geräte.....	6
5 Durchführung	7
6 Auswertung	12
7 Absicherung.....	16
8 Präzision	16
9 Untersuchungsbericht	16
Anhang A (informativ) Beispiel für geeignete experimentelle Bedingungen.....	17
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	20
Literaturhinweise	60

Vorwort

Dieses Dokument (EN 15637:2008) 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 2009, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2009 zurückgezogen werden.

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

WARNUNG — Bei der Anwendung dieser Norm ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Diese Norm erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung festzulegen, welche einschränkenden Vorschriften gelten.

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

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm beschreibt ein Verfahren für die Analyse von Pestizidrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln, wie Früchten, Gemüse, Getreide, Nüssen, als auch verarbeiteten Erzeugnissen, wie beispielsweise getrockneten Früchten. Das Verfahren wurde gemeinsam mit einer großen Anzahl an Erntegüter/Pestizid-Kombinationen überprüft.

2 Kurzbeschreibung

Die Probe wird nach der Zugabe von etwas Wasser mit Methanol extrahiert. Nach der Verteilung in Dichlormethan wird die organische Phase verdampft und der Rückstand in Methanol vollständig gelöst. Die quantitative Bestimmung der Pestizidrückstände erfolgt durch Flüssigchromatographie mit tandem-massenspektrometrischer Detektion unter Verwendung der Elektrospray-Ionisation. Um die erforderliche Selektivität zu erreichen, wird das Massenspektrometer in dem „Selected reaction monitoring“ (SRM)-Modus betrieben.

3 Chemikalien

3.1 Allgemeines und Sicherheitshinweise

Soweit nicht anders angegeben, werden analysenreine Chemikalien verwendet. Es muss auf alle Fälle verhindert werden, dass Wasser, Lösemittel, anorganische Salze usw. verunreinigt werden.

3.2 Ammoniumformiat

3.3 Natriumchlorid

3.4 Wasser, zur HPLC

3.5 Dichlormethan, für die Rückstandsanalyse

3.6 Methanol, zur HPLC

3.7 Lösung des internen Standards (ISTD) in Methanol, $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$ bis $50 \mu\text{g/ml}^{1)}$

Tabelle 1 zeigt eine Aufstellung möglicher interner Standards, die in diesem Verfahren verwendet werden dürfen. Die aufgelisteten Konzentrationen beziehen sich auf die ISTD-Lösungen, die beim ersten Extraktionsschritt (5.2) und den Standardlösungen hinzugefügt werden sollten.

Tabelle 1 — Mögliche interne Standards (ISTDs) oder Qualitätskontroll-(QC-)Standards

Bezeichnung der Verbindung	log P (Octanol-Wasser- Verteilungskoeffizient)	Chloratome	Konzentration C_{ISTD} $\mu\text{g/ml}$
Triphenylphosphat	4,59	–	20
Tris-(1,3-dichlorisopropyl)-phosphat	3,65	6	50
Bis-nitrophenylharnstoff (Nicarbazin)	3,76	–	10

1) ρ = Massenkonzentration

3.8 Pestizid-Stammlösung

Einzelne Stammlösungen von analytischen Standards mit Konzentrationen, die ausreichend hoch sind, um die Herstellung von komplexen Pestizidgemischen zu ermöglichen, werden hergestellt. Das Lösemittel sollte keine negative Wirkung auf die Stabilität der verwendeten Pestizide haben.

ANMERKUNG In der Regel werden die Lösungen bei $\leq -18\text{ °C}$ gelagert. Die Stabilität der Stammlösungen wird während der Lagerung regelmäßig kontrolliert. In einigen Fällen kann die Zugabe von Säuren oder Basen hilfreich für eine erhöhte Stabilität sein und die akzeptable Lagerdauer verlängern.

3.9 Pestizidgemische

Wegen der umfassenden Anwendbarkeit dieses Verfahrens und weil die Pestizide unterschiedlich pH-stabil sind, können Analytgemische von unterschiedlicher Zusammensetzung benötigt werden. Diese werden durch Vorlage definierter Volumina der erforderlichen Analyt-Stammlösungen (3.8) und nachfolgendes Auffüllen der Mischung mit Methanol hergestellt. Die Analytkonzentrationen in diesen Gemischen sollten ausreichend sein, um die Herstellung der erforderlichen Standards in Matrix (siehe 3.10.3) mit einer angemessenen Verdünnung des Blindprobenextraktes (z. B. weniger als 20 %) zu ermöglichen.

In der Regel werden die Pestizidgemische bei $\leq -18\text{ °C}$ gelagert. Weil die Stabilität der Pestizide in dem Gemisch niedriger als die in den Stammlösungen sein kann, wird die Stabilität regelmäßig kontrolliert. In einigen Fällen kann die Zugabe von Säuren oder Basen hilfreich für eine erhöhte Stabilität sein und die akzeptable Lagerzeit verlängern.

3.10 Standardlösungen

3.10.1 Standardlösungen, hergestellt in reinen Lösemitteln (Standards in Lösemitteln)

Standards in Lösemitteln werden hergestellt, indem bekannte Anteile der Pestizidgemische (3.9) mit bestimmten Methanolvolumina verdünnt werden. Die Herstellung von mehreren Standards mit unterschiedlichen Pestizidkonzentrationen dient dazu, einen breiten Kalibrierbereich abzudecken.

ANMERKUNG Eine Analytkonzentration von 1 µg/ml entspricht einem Rückstandsniveau von $0,4\text{ mg/kg}$, wenn 10 g Probe verwendet wurden (z. B. Proben mit einem Wassergehalt $> 30\%$) oder $0,8\text{ mg/kg}$, wenn 5 g Probe verwendet wurden (z. B. Getreide).

3.10.2 Standardlösungen mit internem Standard, hergestellt in reinem Lösemittel

Standards in reinem Lösungsmittel mit ISTD werden hergestellt, indem bekannte Volumina der Pestizidgemische (3.9) mit einem konstanten Volumen der ISTD-Lösung (3.7) gemischt und mit Methanol verdünnt werden. Die verwendeten Mengen an ISTD-Lösung und Methanol müssen die gleiche ISTD-Konzentration ergeben, die in den Probenmesslösungen nach der Probenextraktion und der Reinigung (siehe 5.2 und 5.3) erhalten wurde. Die Konzentration des ISTD in der Probenmesslösung ($C_{\text{ISTD}}^{\text{sample}}$) kann nach Gleichung (1) berechnet werden. Die Herstellung von mehreren Standards mit unterschiedlichen Pestizidkonzentrationen und konstanter ISTD-Konzentration dient dazu, einen breiten Kalibrierbereich abzudecken.

$$C_{\text{ISTD}}^{\text{sample}} = \frac{V_{\text{ISTD}} \times C_{\text{ISTD}} \times (V_2 - V_1) \times V_3}{V_2 \times V_{\text{ex}} \times V_{\text{end}}} \quad (1)$$

Dabei ist

V_{ISTD} das zu der Einwaage gegebene Volumen der Lösung des ISTD (3.7);

C_{ISTD} die Konzentration der Lösung des ISTD (3.7);

V_1	das Volumen der NaCl-Lösung (2,5 ml);
V_2	das Volumen des in 5.2 verwendeten Messkolbens (10 ml);
V_3	das für die SLE (en: solid supported liquid/liquid extraction) verwendete Volumen (5 ml);
V_{ex}	das Gesamtvolumen der Extraktionslösemittel und des natürlichen Wassers (30 ml);
V_{end}	das Endvolumen des nach der Reinigung erhaltenen Extraktes (0,5 ml).

ANMERKUNG Der ISTD kann die Abweichungen von dem richtigen Extraktionsvolumen, eine falsche Einschätzung des Wassergehaltes der Proben, Verluste von Methanol während der Herstellung des Endextraktes und Schwankungen der Empfindlichkeit der Geräte während einer Charge von Messungen ausgleichen. Jedoch wurden die Validierungsergebnisse in Anhang B ohne ISTDs ermittelt.

3.10.3 Standardlösungen, hergestellt in Blindwert-Matrix-Extrakten (Standards in Matrix)

„Standards in Matrix“ werden auf dem gleichen Weg wie die Standards in reinem Lösungsmittel hergestellt, jedoch werden an Stelle von reinem Methanol die Extrakte von Blindwertproben verwendet (Herstellung wie in 5.2 beschrieben, aber ohne eine ISTD-Zugabe). Um Unterschiede in den durch die Matrix hervorgerufenen Effekten während der Chromatographie möglichst gering zu halten, ist es am besten, gleichartige Erntegüter auszuwählen (z. B. Apfel für Apfelproben, Mohrrübe für Mohrrübenproben usw.).

Die Stabilität der Pestizide im „Standard in Matrix“ kann geringer sein, als die der Standards in reinem Acetonitril und sie muss sorgfältiger überprüft werden.

3.11 5 ml Flüssig-Flüssig-Extraktions-(SLE-)Kartusche mit Diatomeenerde, 5 ml Probenvolumen, zum Beispiel ChemElut CE 1005²⁾

3.12 20 ml Flüssig-Flüssig-Extraktions-(SLE-)Kartusche mit Diatomeenerde, 20 ml Probenvolumen, zum Beispiel ChemElut CE 1020²⁾

4 Geräte

Übliche Laborgeräte und insbesondere die folgenden:

4.1 Hackbrett und -messer, zum Zerkleinern der Lebensmittelproben für die Analysen

4.2 Homogenisator oder Hochgeschwindigkeitsmischer, mit Becher

4.3 Laborwaage

4.4 Messkolben, 10 ml und 20 ml

4.5 Ultraschallbad

4.6 Zentrifugenröhrchen, 80 ml

2) ChemElut ist ein Produkt von Varian, Inc. (Palo Alto, CA, USA). Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu den gleichen Ergebnissen führen.

4.7 Zentrifuge, für eine relative Zentrifugalbeschleunigung (RCF) von mindestens 3 000 *g* (am Boden der Röhrrchen)

4.8 Rundkolben, 50 ml und 250 ml

4.9 Glasspritze, 2 ml Mindestvolumen

4.10 Mikroliter-Spritzen, für die Dotierung von Proben

4.11 Rotationsverdampfer, mit einem temperaturgeregelten Wasserbad

4.12 Spritzenfilter, 0,45 µm Porengröße, 4 mm Durchmesser, Polytetrafluorethylen-(PTFE-)Membran

4.13 Glasfläschchen und -deckel, 1,8 ml Volumen, geeignet für einen Autosampler

4.14 LC-MS/MS-System, Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer mit einem Elektrospray-Interface

5 Durchführung

5.1 Vorbereitung und Lagerung der Proben

5.1.1 Allgemeines

Probenverarbeitungs- und -lagerungsverfahren sollten nachweislich keinen signifikanten Einfluss auf die in der Untersuchungsprobe (manchmal auch „Analysenprobe“ genannt) vorhandenen Rückstände haben. Die weitere Probenbehandlung sollte auch sicherstellen, dass die Untersuchungsprobe ausreichend homogen ist, damit keine Fehler bei der Probenteilung entstehen. Wenn es unwahrscheinlich ist, dass eine einzelne Einwaage die Untersuchungsprobe repräsentiert, müssen größere Mengen oder mehrere einzelne Einheiten analysiert werden, um den wirklichen Wert besser beurteilen zu können. Ein hoher Zerkleinerungsgrad unterstützt eine quantitative Extraktion der Rückstände.

5.1.2 Laborprobe

Eine Laborprobe, die völlig oder stark verdorben oder schlecht ist, sollte nicht analysiert werden. Wenn möglich, wird die Laborprobe unmittelbar nach dem Eintreffen im Labor und auf jeden Fall, bevor irgendwelche merklichen physikalischen oder chemischen Veränderungen stattfinden, untersucht. Falls die Laborprobe nicht ohne Verzögerung bearbeitet werden kann, sollte sie unter geeigneten Bedingungen gelagert werden, um sie frisch zu halten und um ihren Verfall zu verhindern. Im Allgemeinen sollten Laborproben nicht länger als 3 Tage vor der weiteren Bearbeitung gelagert werden. Getrocknete oder ähnlich behandelte Proben sollten innerhalb ihrer angegebenen Haltbarkeitsdauer untersucht werden.

5.1.3 Partiiell vorbereitete Untersuchungsprobe

Für die Herstellung der teilweise vorbereiteten Untersuchungsproben wird nur der Anteil der Laborprobe verwendet, auf den sich der Höchstwert bezieht. Weitere Pflanzenteile dürfen nicht entfernt werden.

Die Untersuchungsprobe muss so reduziert werden, dass sich daraus repräsentative Einwaagen ergeben (z. B. durch Teilen in vier Teile und Auswahl von gegenüberliegenden Vierteln). Bei kleinstückigen Untersuchungsmaterialien (z. B. kleine Früchte, wie Beeren, Hülsenfrüchte, Getreide) wird die Untersuchungsprobe gut durchgemischt und daraus die Einwaage entnommen. Bei großstückigen Untersuchungsmaterialien werden keilförmige Segmente (z. B. bei Melonen) oder Scheiben (z. B. bei Gurken) herausgeschnitten, die die Haut (Oberfläche) jedes Stückes einschließen [1].

5.1.4 Untersuchungsprobe

Aus jeder partiell vorbereiteten Untersuchungsprobe sollten solche Teile entfernt werden, die bei dem Homogenisierungsprozess stören könnten. So müssen bei Steinfrüchten die Steine entfernt werden. Es muss dokumentiert werden, welche Pflanzenteile entfernt worden sind. Es sollte darauf geachtet werden, dass kein Fruchtsaft oder Fruchtfleisch verloren geht. Die Berechnung des Rückstandes muss sich auf die Masse der ursprünglichen Untersuchungsprobe (einschließlich der Steine) beziehen.

Wenn die Untersuchungsprobe für die Extraktion der Rückstände nicht ausreichend homogen ist, weil größere noch enthaltene Stücke nicht ausreichend extrahiert werden können, sollte die Untersuchungsprobe mit geeigneten Mitteln intensiv zerkleinert werden. Das ist bei Raumtemperatur möglich, wenn Fleisch und Saft nicht getrennt werden oder die Pestizide nicht signifikant abgebaut werden. Die Zerkleinerung der Proben im gefrorenen Zustand kann Verluste von chemisch instabilen Analyten signifikant reduzieren und ergibt meistens kleinere Partikelgrößen, und damit wird ein höherer Grad an Homogenität erzielt. Das grobe (z. B. 3 cm × 3 cm) Zerschneiden der Proben mit einem Messer und die Lagerung in einem Gefrierschrank (z. B. über Nacht bei -18 °C) vor der Zerkleinerung vereinfacht die weitere Bearbeitung. Die Verarbeitung kann auch durch Tieftemperatur-Mahlen (mit Trockeneis oder flüssigem Stickstoff) bei konstanten 0 °C unterstützt und verbessert werden. Besonders im Falle von Früchten und Gemüsesorten, die eine harte Schale haben (z. B. Tomaten oder Weinbeeren), ist Tieftemperatur-Mahlen viel effektiver für die Homogenisierung als das Mahlen bei Raumtemperatur. Tieftemperatur-Mahlen reduziert signifikant die Variabilität zwischen unterschiedlichen Untersuchungsproben, da nicht-systemische Pestizide häufig überwiegend auf der Oberfläche der Proben vorkommen. Wenn die Untersuchungsproben bei niedrigen Temperaturen verarbeitet werden, sollte eine Kondensation von Feuchtigkeit verhindert werden. Übriggebliebenem Kohlendioxid sollte ermöglicht werden, ausreichend zu entweichen, damit dessen Anteil am Gewicht der Probe unbedeutend wird.

5.1.5 Einwaage

Einzelne Einwaagen, die jeweils groß genug für eine Untersuchung sind, werden von der zerkleinerten Untersuchungsprobe entnommen. Diese Einwaagen sollten sofort untersucht werden. Falls die Einwaagen nicht direkt untersucht werden können, müssen die Untersuchungsprobe oder die Einwaagen bis zum Gebrauch eingefroren werden. Falls Untersuchungsproben gefroren gelagert wurden, müssen sie vor der Entnahme der Einwaagen zunächst gemischt werden, damit eine ausreichende Homogenität sichergestellt wird.

5.2 Extraktion

Eine repräsentative Einwaage von $m_A = 10$ g wird in ein Zentrifugenröhrchen (4.6) überführt. Bei trockenen Untersuchungsmaterialien, wie Getreideerzeugnissen, wird ein homogenisierter Anteil von 5 g (m_A) in das Zentrifugenröhrchen eingewogen. Ausreichend Wasser wird hinzugefügt, damit ein Gesamtvolumen (zugesetzt und natürlich vorhanden) von 10 ml Wasser erhalten wird. Für den typischen Wassergehalt von Feldfrüchten und Getreide, siehe Tabelle 2. Im Fall von trockenem Untersuchungsmaterial wird nach der Zugabe des Wassers 10 min gewartet. 20 ml Methanol (3.6) werden zu dem Gemisch hinzugefügt und dieses wird 2 min unter Verwendung des Hochgeschwindigkeitsmischers (4.2) homogenisiert. Mindestens 10 ml des erhaltenen Extraktes von 30 ml ($= V_{ex}$) werden bei etwa 3 000 g zentrifugiert. 2,5 ml der NaCl-Lösung (20 %, m/m) ($= V_1$) werden in einen 10-ml-Messkolben ($= V_2$) (4.4) pipettiert, mit der überstehenden Lösung des Zentrifugierens wird bis zur Marke aufgefüllt und diese Lösung wird gemischt.

Optional kann zusätzlich ein ISTD verwendet werden. In diesem Fall wird ein kleines Volumen (< 1 % von V_{ex}) der ISTD-Lösung ($= V_{ISTD}$) nach der Zugabe von 20 ml Methanol zur Einwaage hinzugefügt.

Tabelle 2 — Wassergehalt ausgewählter Lebensmittel und Wasseranteil, der zugegeben wird

Lebensmittelgruppe	Lebensmittel	Typischer Wassergehalt g/100 g	Zugegebener Wasseranteil zu 10 g Einwaage g	Zugegebener Wasseranteil zu 5 g Einwaage g
Früchte				
Zitrusfrüchte	Zitronensaft	90	1,0	
	Pampelmuse	90	1,0	
	Limone	90	1,0	
	Orange	85	1,5	
	Orangenschale	75	2,5	
	Mandarine	90	1,0	
Kernobstfrüchte	Apfel	85	1,5	
	Apfel, getrocknet	30		8,5
	Apfelsauce	80	2,0	
	Apfelsaft	90	1,0	
	Birne	85	1,5	
	Quitte	85	1,5	
Steinfrüchte	Aprikose	85	1,5	
	Aprikose, getrocknet	30		8,5
	Aprikosennektar	85	1,5	
	Kirsche	85	1,5	
	Mirabelle	80	2,0	
	Nektarine	85	1,5	
	Pfirsich	90	1,0	
	Pfirsich, getrocknet	20		9,0
	Pflaume	85	1,5	
	Pflaume, getrocknet	20		9,0
Weiche und kleine Früchte	Brombeere	85	1,5	
	Blaubeere	85	1,5	
	Korinthe	85	1,5	
	Holunderbeere	80	2,0	
	Stachelbeere	90	1,0	
	Weinbeeren	80	2,0	
	Himbeere	85	1,5	
	Rosine	20		9,0
	Erdbeere	90	1,0	

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Lebensmittelgruppe	Lebensmittel	Typischer Wassergehalt g/100 g	Zugegebener Wasseranteil zu 10 g Einwaage g	Zugegebener Wasseranteil zu 5 g Einwaage g
Andere Früchte	Ananas	85	1,5	
	Banane	75	2,5	
	Feige, getrocknet	20		9,0
	Kiwi	85	1,5	
	Mango	80	2,0	
	Papaya	90	1,0	
Gemüse				
Wurzel- und Knollengemüse	Rote Bete	90	1,0	
	Mohrrübe	90	1,0	
	Knollensellerie	90	1,0	
	Meerrettich	75	2,5	
	Petersilienwurzel	90	1,0	
	Rettich	95	0,5	
	Schwarzwurzel	80	2,0	
	Schalotte	80	2,0	
Zwiebeln	Knoblauch	60		7,0
	Zwiebel	90	1,0	
Fruchtgemüse	Aubergine	90	1,0	
	Gurke	95	0,5	
	Melone	90	1,0	
	Paprika, süß	90	1,0	
	Kürbis	95	0,5	
	Tomate	95	0,5	
	Zucchini (Courgette)	95	0,5	
Kohlsorten	Brokkoli	90	1,0	
	Rosenkohl	85	1,5	
	Blumenkohl	90	1,0	
	Chinakohl	95	0,5	
	Grünkohl	90	1,0	
	Kohlrabi	90	1,0	
	Rotkohl	90	1,0	
	Wirsingkohl	90	1,0	
	Weißkohl	90	1,0	

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Lebensmittelgruppe	Lebensmittel	Typischer Wassergehalt g/100 g	Zugegebener Wasseranteil zu 10 g Einwaage g	Zugegebener Wasseranteil zu 5 g Einwaage g
Blattgemüse und Kräuter	Kopfsalat	95	0,5	
	Schnittlauch	85	1,5	
	Kresse	90	1,0	
	Endivie	95	0,5	
	Eisbergsalat	95	0,5	
	Feldsalat	85	1,5	
	Petersilie	80	2,0	
	Spinat	90	1,0	
	Chicorée	95	0,5	
Stielgemüse	Artischocke	85	1,5	
	Spargel	95	0,5	
	Sellerie	95	0,5	
	Porree	85	1,5	
	Rhabarber	95	0,5	
Bohnen, Erbsen (frisch)	Bohnen	90	1,0	
	Erbsen mit Schalen	80	2,0	
Bohnen, Erbsen (getrocknet)	Bohnen, Erbsen, Linsen	10		9,5
Andere				
	Bier	90	1,0	
	Getreide (Korn, Mehl usw.)	10		9,5
	Kaffee (roh)	10		9,5
	Pilze	90	1,0	
	Most (Weintraube)	90	1,0	
	Kartoffel	80	2,0	
	Tee	10		9,5
	Wein	90	1,0	

5.3 Reinigung

5 ml des verdünnten Zentrifugates (= V_3) von 5.2 werden auf eine 5 ml-SLE-Kartusche (3.11) appliziert. Nach 5 Minuten wird unter Verwendung von 12,5 ml Dichlormethan (3.5) in einen 50 ml-Rundkolben (4.8) eluiert. Die Elution wird mit weiteren 12,5 ml Dichlormethan wiederholt. Die vereinigten Eluate werden mit dem Rotationsverdampfer (4.11) bis fast zur Trockne eingedunstet. Das verbleibende Dichlormethan sollte mit einem Stickstoffstrom entfernt werden.

500 µl Methanol (3.6) werden zu dem Rundkolben hinzugefügt und dieser wird zusammen mit dem Stopfen gewogen. Der Rückstand wird vorsichtig durch Umschwenken des Kolbens in dem Ultraschallbad (4.5) aufgelöst, wobei ein Methanolverlust zu verhindern ist. Falls jedoch bei diesem Schritt Methanol verdampft worden ist (Rückwaage), wird Methanol hinzugefügt, um das vorherige Gesamtgewicht wiederherzustellen. Die erhaltene Probenmesslösung mit einem Volumen von 0,5 ml (= V_{end}) wird durch einen PTFE-Filter (4.12) in ein Probenfläschchen (4.13) für die Injektion filtriert.

Um einen größeren Anteil der Probenmesslösung für die Herstellung der Standards in Matrix (3.10.3) zu erhalten, kann eine 20 ml-SLE-Kartusche (3.12) verwendet werden. In diesem Fall sind 400 % aller oben erwähnten Volumina zu verwenden.

ANMERKUNG Die Probenmesslösung enthält die extrahierten Bestandteile von 2,5 g Probe je Milliliter (oder 1,25 g/0,5 ml).

5.4 Bestimmung

Die Probenmesslösung (5.3) und die Kalibrierlösungen (3.10.1, 3.10.2 oder 3.10.3) werden in das LC-MS/MS-Gerät in einer geeigneten Reihenfolge eingespritzt. Dabei hat sich eine Injektion von Kalibrierlösungen vor und nach den Proben bewährt. Die Probenmesslösung sollte in der Einspritznadel des HPLC-Systems mit Eluent A verdünnt werden. Das LC-MS/MS-Gerät muss im „Selected reaction monitoring“ (SRM)-Modus mit Übergängen betrieben werden, die die zu bestimmenden Pestizide selektiv nachweisen können. Für geeignete Versuchsbedingungen siehe CEN/TR 15641 [4]. Ein erneutes Tunen der Verbindungen mit dem für die Messung verwendeten Gerät liefert allerdings gewöhnlich bessere Empfindlichkeiten.

Die Messung kann mit verschiedenen Geräten, Geräteparametern und Säulen durchgeführt werden. Einige Geräteparameter und Säulen sind in Anhang A aufgeführt. Diese Bedingungen haben gezeigt, dass sie zufrieden stellende Ergebnisse erzielen.

ANMERKUNG Die meisten der in Anhang B aufgeführten Validierungsergebnisse wurden nach dem Mischen der Probenmesslösung mit Wasser in einem LC-Fläschchen und nicht in dem Injektor des HPLC-Systems ermittelt. In diesem Fall wurde ein Verhältnis zwischen methanolischem Extrakt und Wasser von 1 : 4 (*V/V*) verwendet. Auch wurde die Standardlösung mit Wasser in einem Verhältnis von 1 : 4 (*V/V*) verdünnt. Die meisten Proben enthalten geringe Anteile an mitextrahierten Bestandteilen, die nicht in dem entstandenen Methanol-/Wassergemisch löslich sind. Als Ergebnis entstand eine trübe Emulsion (oder Suspension). Es hat sich gezeigt, dass die Wiederfindung einiger weniger polarer Pestizide verringert war, wenn diese Emulsionen gebildet wurden.

5.5 Prüfung auf Störungen und Wiederfindung

Es werden Reagenzienblindwertproben hergestellt und Wiederfindungsversuche mit Aufstockungen durchgeführt, die den Rückstandshöchstgehalten entsprechen. Das Chromatogramm des Reagenzienblindwertes sollte keinen nennenswerten störenden Peak (z. B. 10 % des relevanten Rückstandshöchstgehaltes) bei der Retentionszeit der Analyten aufweisen.

6 Auswertung

6.1 Identifizierung und quantitative Bestimmung

Zur Identifizierung der Analyten werden die mit den Probenmesslösungen erhaltenen Retentionszeiten mit denen aus den Kalibrierlösungen verglichen. Zur Absicherung positiver Befunde werden die für den Analyten gefundenen Intensitätsverhältnisse aus erstem und zweitem *m/z*-Übergang mit denen bei den Standards gefundenen Intensitätsverhältnissen verglichen. Wenn das Peakverhältnis für einen Analyten mehr als 20 % von dem erwarteten Intensitätsverhältnis abweicht, werden die EU-Qualitätskontrollrichtlinien, die in dem SANCO/2007/3131-Dokument [2] beschrieben sind, herangezogen. Eine andere LC-Säule, ein anderes Elutionsmittel oder ein weiterer *m/z*-Übergang dürfen verwendet werden, falls zusätzliche Messungen notwendig sind.

Standardlösungen (3.10.1 oder 3.10.2) oder „Standards in Matrix“ (3.10.3) werden verwendet, um die Linearität zu überprüfen und die Kalibrierfunktionen für jeden Analyten zu bestimmen. Dazu werden die Peakflächen oder -höhen (wenn kein ISTDs verwendet wurde) oder die Quotienten aus der Intensität von Analyt und ISTD (wenn ISTDs verwendet wurden) getrennt für jeden SRM-Übergang gegen die Analytkonzentration [ng/ml] aufgetragen.

Für eine erste Einschätzung des Rückstandsniveaus der Pestizide in dem Lebensmittel oder um deren Abwesenheit zu zeigen, können die Standardlösungen (3.10.1 oder 3.10.2) in reinem Methanol verwendet werden. Sie können auch für die quantitative Bestimmung verwendet werden, falls vorausgehende Versuche gezeigt haben, dass Matrixeffekte die Ergebnisse nicht signifikant beeinflussen. Sobald jedoch relevante Rückstandskonzentrationen nachgewiesen werden (z. B. eine vermutete Überschreitung von Rückstandshöchstgehalten), sollte eine genauere Bestimmung mit „Standards in Matrix“ (3.10.3) oder über das Standard-Additionsverfahren bevorzugt werden.

ANMERKUNG 1 Verglichen mit der Intensität der Analyte in Standardlösungen in reinem Lösemittel beeinflussen Matrixeffekte die Intensität der gesuchten Analyte in den Probenextrakten.

ANMERKUNG 2 Der kalibrierte Konzentrationsbereich sollte den zu bestimmenden Rückstandskonzentrationen entsprechen. Deshalb kann es erforderlich sein, mehr als eine Kalibriergerade aus den Ergebnissen der Kalibriermessungen zu berechnen.

Wenn ISTDs verwendet werden, ist zu beachten, dass alle Fehler bei der Messung des ISTD-Signals direkt die berechnete Konzentration der Analyten beeinflussen. Idealerweise sollte das ISTD-Signal nur aufgrund von Volumendifferenzen abweichen und dadurch die Genauigkeit der Messung verbessern. Jedoch gibt es auch andere, unerwünschte Faktoren, die ebenfalls die Signale des ISTD beeinflussen und somit Fehler in die quantitative Bestimmung des Analyten einbringen können. Verluste des ISTD während der Reinigung werden eine Überschätzung der Analytkonzentration zur Folge haben. Diese Verluste sollten somit gering sein. Eine eventuelle spezifische Unterdrückung des ISTD-Signals bei der LC-MS-Messung, verursacht durch Matrix-Bestandteile, bewirkt ebenfalls eine Überschätzung des Analyten. Solche Matrixeffekte hängen davon ab, ob der Probenextrakt mitextrahierte Bestandteile enthält, die gemeinsam mit dem ISTD eluieren und dessen Ionisationsprozess beeinflussen.

In jedem Fall ist es schwierig, Qualitätskontrollen einzuführen, die sicherstellen, dass etwaige Fehler durch den ISTD insignifikant bleiben. Maßnahmen zur Qualitätskontrolle dürfen die Verwendung von Hilfs-ISTDs und von Qualitätskontrollstandards einbeziehen, die in späteren Phasen des analytischen Verfahrens zugegeben werden (z. B. zur Probenmesslösung) und die helfen können, etwaige nicht volumenbezogene Abweichungen des ISTD-Signals zu erkennen. Die Beobachtung der Signalintensität des ISTD in jeder Probe innerhalb einer Sequenz ist für eine Qualitätskontrolle sehr hilfreich. Sollte eine signifikante Signalabweichung auftreten, sollte eine quantitative Bestimmung mit einem Hilfs-ISTD oder ohne Verwendung eines ISTD durchgeführt werden. Im letzteren Fall sind genaue Flüssigkeitsüberführungen und ein Abgleich der Volumen der Standardlösungen und der Probenextrakte vorgeschrieben.

6.2 Berechnung der Rückstandskonzentrationen ohne Standardaddition

Falls das Standard-Additionsverfahren nicht angewendet wurde, wird das Rückstandsniveau, w_R , eines Pestizids in der Lebensmittelprobe aus der erhaltenden Peakfläche (oder -höhe) nach Gleichung (2) berechnet:

$$w_R = \frac{A - c}{b} \times \frac{V_{ex}}{m_a} \times \frac{V_{end} \times V_2}{(V_2 - V_1) \times V_3} \times 1000 \quad \text{in} \quad \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \quad (2)$$

Dabei ist

- A die Peakfläche, die Peakhöhe oder das Peakverhältnis für einen gemessenen SRM-Übergang, in willkürlichen Einheiten (a. u.; en: arbitrary units) oder dimensionslos;
- c der Abschnitt auf der entsprechenden Kalibriergeraden, in a. u. oder dimensionslos;

- b die Steigung der entsprechenden Kalibriergeraden, in a. u. $\times$ ml/ng (ohne ISTD) oder ml/ng (mit ISTD);
- V_{ex} das Gesamtvolumen der Extraktionslösemittel und des in der Probe enthaltenen Wassers (30 ml);
- m_{a} die Einwaage, in Gramm;
- V_1 das Volumen der NaCl-Lösung (2,5 ml);
- V_2 das Volumen des in 5.2 verwendeten Messkolbens (10 ml);
- V_3 das für die SLE verwendete Volumen (5 ml);
- V_{end} das Endvolumen des nach der Reinigung erhaltenen Extrakts (0,5 ml);
- 1 000 der Umwandlungsfaktor.

Falls die Ergebnisse anzeigen, dass der Rückstand den Rückstandshöchstgehalt erreicht oder überschreitet, muss mindestens eine weitere Einwaage untersucht werden.

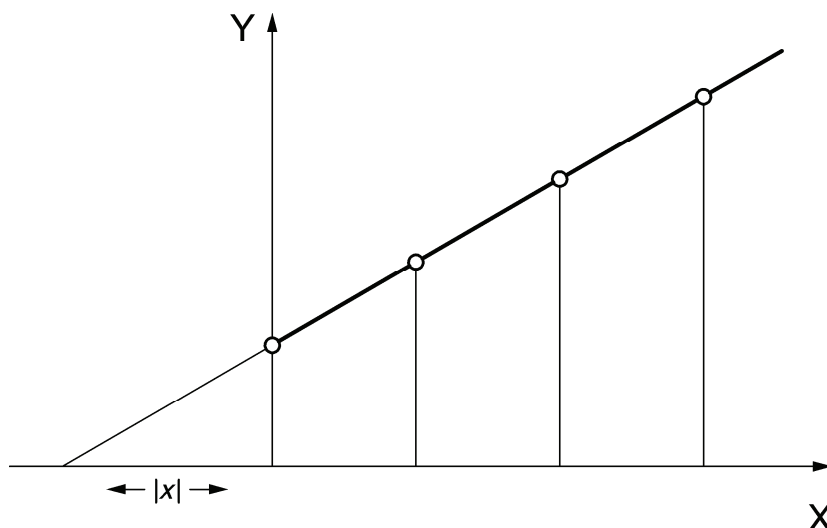
6.3 Berechnung der Rückstandskonzentrationen mit Standardaddition

Im Falle von Rückständen, die vermutlich den Höchstwert überschreiten, oder für Verbindungen, die dafür bekannt sind, dass sie stark durch matrix-verursachte Verstärkungs- oder Unterdrückungserscheinungen beeinflusst werden, wird das Verfahren der Standardaddition empfohlen. Hierfür muss die Funktion zwischen Response und Konzentrationen im betreffenden Konzentrationsbereich linear sein. In diesem Fall werden mehrere Aliquote der Probenmesslösung mit unterschiedlich (bekannten) Konzentrationen des betreffenden Analyten dotiert. Dieses Verfahren erfordert die Kenntnis des ungefähren Rückstandsniveaus, w_{R} , aus der vorhergehenden Analyse.

Die Standardlösungen für die Standardaddition müssen, verglichen mit der Probenmesslösung aus 5.3, eine nahezu identische Lösemittelzusammensetzung aufweisen. Unter der Annahme, dass für eine Probe (angenommene Einwaage 10 g) ein Rückstand von $w_{\text{R}} = 0,8$ mg/kg gefunden wurde, kann das folgende Pipettierschema geeignet sein. (Im Falle von anderen Rückstandsniveaus, w_{R} , werden eine angegliche Konzentration der Analytstandardlösung und/oder besser geeignete Volumen der Analytstandardlösung und Lösemittel benötigt.) Der Anteil des Analyten in der Probe wird mit einer graphischen Darstellung der resultierenden Response-Daten, wie in Bild 1 dargestellt, durch lineare Regression berechnet.

Tabelle 3 — Pipettierschema für Standard-Additionsverfahren

Zugaben	Fläschchen 1	Fläschchen 2	Fläschchen 3	Fläschchen 4
Volumen des Probenextraktes V_{aliqu}	100 μl (= 0,25 g Probe)	100 μl (= 0,25 g Probe)	100 μl (= 0,25 g Probe)	100 μl (= 0,25 g Probe)
Volumen der Analytstandardlösung (20 $\mu\text{g/ml}$)	0 μl	5 μl	10 μl	15 μl
Erhaltene Masse des zugegebenen Analyten	0 μg	0,1 μg	0,2 μg	0,3 μg
Volumen des Lösemittels	15 μl	10 μl	5 μl	0 μl
Endvolumen	115 μl	115 μl	115 μl	115 μl



Legende

Y Peakfläche des Analyten

X Zugegebene absolute Masse des Analyten, in μg

$|x|$ Absolute Masse des Analyten in dem Probenextrakt (in μg) vor der Standardaddition ($y = 0$)

$$x = \frac{y - \text{Abschnitt } (c)}{\text{Anstieg der Kurve } (b)}$$

Bild 1 — Interne Kalibrierung mit dem Verfahren der Standardaddition, schematisiert

Falls das Standard-Additionsverfahren angewendet wurde, wird das Rückstandsniveau, w_R , eines Pestizids in der Lebensmittelprobe aus der erhaltenden Peakfläche (oder -höhe) nach Gleichung (3) berechnet:

$$w_R = \frac{c}{b} \times \frac{V_{\text{ex}}}{m_a} \times \frac{V_2 \times V_{\text{end}}}{(V_2 - V_1) \times V_3 \times V_{\text{aliquot}}} \quad \text{in } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \quad (3)$$

Dabei ist

c der y -Abschnitt auf der Kalibriergeraden des betreffenden Analyten, in willkürlichen Einheiten (a. u.);

b die Steigung der Kalibriergeraden des betreffenden Analyten (a. u./ μg);

V_{ex} das Gesamtvolumen der Extraktionslösemittel und des in der Probe enthaltenen Wassers (30 ml);

m_a die Anfangsmasse der Probe (5 g oder 10 g);

V_1 das Volumen der NaCl-Lösung (2,5 ml);

V_2 das Volumen des in 5.2 verwendeten Messkolbens (10 ml);

V_3 das für die SLE verwendete Volumen (5 ml);

V_{end} das Endvolumen des nach der Reinigung erhaltenen Extrakts (0,5 ml);

V_{aliquot} der Aliquot des nach der Reinigung erhaltenen Endvolumens des Extraktes (0,1 ml).

7 Absicherung

Eine quantitative Überprüfung erfolgt durch die Analyse einer zweiten Einwaage aus der Untersuchungsprobe und wird durchgeführt, wenn die erste Analyse Rückstände anzeigt, die vermutlich den Höchstwert überschreiten. Für mehr Informationen über die Absicherung der Identität wird auf die in dem SANCO/2007/3131-Dokument beschriebenen EU-Qualitätskontrollrichtlinien hingewiesen [2].

8 Präzision

Einzelheiten über den Ringversuch zur Ermittlung der Präzision des Verfahrens nach ISO 5725-1 und ISO 5725-2 [3] sind im Anhang B zusammengefasst. Die aus dem Ringversuch abgeleiteten Werte sind nicht unbedingt auf andere Konzentrationsbereiche und andere Matrices anwendbar als im Anhang B beschrieben.

9 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe;
- eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- das Datum und die Art der Probenahme (wenn bekannt);
- das Datum des Probeneingangs;
- das Datum der Untersuchung;
- die Ergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben werden;
- alle Besonderheiten, die während der Untersuchung festgestellt wurden;
- alle Arbeitsschritte, die nicht in diesem Verfahren festgelegt sind, wahlweise vorgenommen wurden und das Ergebnis möglicherweise beeinflusst haben.

Anhang A (informativ)

Beispiel für geeignete experimentelle Bedingungen

Die folgenden LC-MS/MS-Betriebsbedingungen haben sich als zufrieden stellend erwiesen.

A.1 HPLC-System 1

Für die meisten mit LC analysierbaren Verbindungen:

HPLC-Pumpe	HP1100 Binary Pump (G1312A)
Autosampler	HP1100 (G1313A))
Injektorprogramm	Aufziehen von 3 µl Eluent A, Aufziehen von 2 µl Probe, Waschen der Nadel mit Methanol Aufziehen von 2 µl Eluent A Aufziehen von 2 µl Probe, Waschen der Nadel mit Methanol Aufziehen von 2 µl Eluent A Aufziehen von 2 µl Probe, Waschen der Nadel mit Methanol Aufziehen von 2 µl Eluent A Aufziehen von 2 µl Probe, Waschen der Nadel mit Methanol Aufziehen von 3 µl Eluent A
Säule	Phenomenex Aqua 5µ C18 125 Å, 50 mm × 2 mm
Mobile Phase A	Methanol/Wasser 2+8 (V/V) mit 5 mmol/l Ammoniumformiat (3.2)
Mobile Phase B	Methanol/Wasser 9+1 (V/V) mit 5 mmol/l Ammoniumformiat
Säulentemperatur	20 °C

Tabelle A.1 — Durchfluss und Elutionsgradient

Zeit min	Durchfluss µl/min	Mobile Phase A %	Mobile Phase B %
0	200	100	0
11	200	0	100
23	200	0	100
25	200	100	0
33	200	100	0