

DIN EN 15662



ICS 67.050

**Pflanzliche Lebensmittel –
Bestimmung von Pestizidrückständen mit GC-MS und/oder LC-MS/MS
nach Acetonitril-Extraktion/Verteilung und Reinigung mit dispersiver
SPE –
QuEChERS-Verfahren;
Deutsche Fassung EN 15662:2008**

Foods of plant origin –
Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile
extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE –
QuEChERS-method;
German version EN 15662:2008

Aliments d'origine végétale –
Méthode polyvalente de détermination des résidus des pesticides par CG-SM et
SL/SM(SM) avec extraction/partition avec de l'acétonitrile et nettoyage par SPE
dispersés –
Méthode QuEchERS;
Version allemande EN 15662:2008

Gesamtumfang 84 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 15662:2008) 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 Höchstgehalte 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.

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 —
Bestimmung von Pestizidrückständen mit GC-MS und/oder
LC-MS/MS nach Acetonitril-Extraktion/Verteilung und
Reinigung mit dispersiver SPE —
QuEChERS-Verfahren

Foods of plant origin —
Determination of pesticide residues using GC-MS and/or
LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and
clean-up by dispersive SPE —
QuEChERS-method

Aliments d'origine végétale —
Méthode polyvalente de détermination des résidus des
pesticides par CG-SM et SL/SM/SM avec
extraction/partition avec de l'acétonitrile et nettoyage par
SPE dispersés —
Méthode QuEChERS

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.....	9
5 Durchführung	10
6 Auswertung	17
7 Bestätigung	22
8 Präzision	22
9 Untersuchungsbericht	23
Anhang A (informativ) Beispiele für experimentelle Bedingungen.....	24
Anhang B (informativ) Präzisionsdaten	27
Anhang C (informativ) Schematische Darstellung des Verfahrens (für 10 g Probe).....	76
Anhang D (informativ) Ergänzende Angaben	77
Literaturhinweise	82

Vorwort

Dieses Dokument (EN 15662:2008) 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 die Anwendbarkeit einschränkender Vorschriften zu bestimmen.

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 z. B. Früchten (einschließlich Trockenfrüchten), Gemüse, Getreide und verarbeiteten Erzeugnissen davon. Das Verfahren wurde von verschiedenen Laboratorien an einer großen Anzahl an Lebensmittel/Pestizid-Kombinationen getestet.

2 Kurzbeschreibung

Die homogene Probe wird mit Acetonitril extrahiert. Proben mit einem geringen Wassergehalt (< 80 %) erfordern vor der anfänglichen Extraktion die Zugabe von Wasser, damit eine Gesamtmenge von etwa 10 g Wasser vorliegt. Nach der Zugabe von Magnesiumsulfat, Natriumchlorid und puffernden Citratsalzen wird die Mischung intensiv geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Ein aliquoter Anteil der organischen Phase wird mit dispersiver Festphasenextraktion (D-SPE) aufgereinigt, wobei loses Sorbens sowie Magnesiumsulfat zur Entfernung des Restwassers eingesetzt werden. Nach einer Reinigung mit Aminosorbentien (z. B. Sorbens mit primären und sekundären Aminogruppen, PSA) werden die Extrakte durch Zugabe einer geringen Menge an Ameisensäure angesäuert, um die Lagerstabilität von bestimmten basenempfindlichen Pestiziden zu verbessern. Der resultierende Extrakt kann direkt zur Bestimmung mit GC und LC eingesetzt werden. Die quantitative Bestimmung erfolgt unter Anwendung eines internen Standards, der nach der anfänglichen Zugabe von Acetonitril dem Extrakt zugesetzt wird. Eine schematische Darstellung des Verfahrens ist im Fließdiagramm in Anhang C dargestellt.

3 Chemikalien

3.1 Allgemeine und Sicherheitsaspekte

Soweit nicht anders festgelegt, werden Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit verwendet. Es muss auf alle Fälle verhindert werden, dass Wasser, Lösemittel, Sorbentien, anorganische Salze usw. verunreinigt werden.

HAFTUNGSAUSSCHLUSSEKKLÄRUNG — In dieser Norm werden verschiedenen Produkte und Geräte mit Herstellerbezeichnung angeführt, die handelsüblich und für das beschriebene Verfahren geeignet sind. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

3.2 Wasser, HPLC-Reinheitsgrad

3.3 Acetonitril, HPLC-Reinheitsgrad

3.4 Methanol, HPLC-Reinheitsgrad

3.5 Ammoniumformiat

3.6 Magnesiumsulfat, wasserfrei, gekörnt, z. B. Fluka Nr. 63135

Phthalate dürfen in einem Muffelofen durch Erhitzen auf 550 °C (z. B. über Nacht) entfernt werden.

3.7 Magnesiumsulfat, wasserfrei, Pulver

Phthalate dürfen in einem Muffelofen durch Erhitzen auf 550 °C (z. B. über Nacht) entfernt werden.

3.8 Natriumchlorid

3.9 Dinatriumhydrogencitrat-Sesquihydrat

3.10 Trinatriumcitrat-Dihydrat

3.11 Natriumhydroxid-Lösung, Stoffmengenkonzentration $c = 5 \text{ mol/l}$

2 g Natriumhydroxid werden in etwa 5 ml Wasser gelöst und auf 10 ml verdünnt.

3.12 Puffersalz-Mischung für die zweite Extraktion und Verteilung:

$4 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$ wasserfreies Magnesiumsulfat (3.6), $1 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ Natriumchlorid, $1 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ Trinatriumcitrat-Dihydrat und $0,5 \text{ g} \pm 0,03 \text{ g}$ Dinatriumhydrogencitrat-Sesquihydrat werden in einen Becher (4.11) eingewogen. Diese Mengen beziehen sich auf etwa 10 ml Wasser in der Probe.

Bei stark sauren Proben (mit einem pH-Wert < 3) liegt der nach der Zugabe der Puffersalze erreichte pH-Wert gewöhnlich unterhalb von 5. Zum besseren Schutz von säureempfindlichen Verbindungen kann der pH-Wert durch Zugabe von Natriumhydroxid-Lösung mit 5 mol/l (3.11) erhöht werden: bei Zitronen, Limetten und Johannisbeeren werden $600 \mu\text{l}$ und bei Himbeeren $200 \mu\text{l}$ Natriumhydroxid-Lösung direkt zu der Salzmischung gegeben.

ANMERKUNG Es wird angeraten, eine hinreichende Anzahl an Puffersalz-Mischungen im Voraus vorzubereiten, damit die Extraktionsreihe schnell und ohne Unterbrechungen durchgeführt werden kann. Die Herstellung der Salzmischungen kann durch die Anwendung eines Probenteilers (4.12) erheblich erleichtert werden. Die oben angegebenen Salzmengen werden bei Probenmengen verwendet, die etwa 10 g Wasser enthalten.

3.13 Ameisensäure-Lösung in Acetonitril, Volumenanteil $\phi = 5 \text{ ml}$ Ameisensäure/100 ml

$0,5 \text{ ml}$ Ameisensäure (Massenanteil $w > 95 \%$) werden mit Acetonitril (3.3) auf 10 ml aufgefüllt.

3.14 Sorbens mit primären und sekundären Aminogruppen

Zum Beispiel Bondesil-PSA[®] 40 μm Varian Nr. 12213023¹⁾.

Andere Aminosorbentien dürfen verwendet werden, es sind jedoch möglicherweise Untersuchungen erforderlich, um die Gleichwertigkeit insbesondere bezüglich Analytverlusten und des pH-Wertes der Endextrakte nachzuweisen.

3.15 Sorbens aus graphitisiertem Kohlenstoff (en: graphitised carbon black, GCB), z. B. Supelco Supelclean Envi-Carb[®] SPE-Bulk Packing, Nr. 57210U.

Andere Sorbentien aus graphitisiertem Kohlenstoff dürfen verwendet werden, es sind jedoch möglicherweise Untersuchungen erforderlich, um die Gleichwertigkeit insbesondere bezüglich Analytverlusten nachzuweisen.

3.16 Sorptionsmischung 1: Mischung aus GCB (3.15) und wasserfreiem Magnesiumsulfat, Pulver (3.7), (1 + 59) Massenanteile.

Die beiden Bestandteile werden intensiv vermischt, um eine optisch homogene Mischung zu erhalten.

3.17 Sorptionsmischung 2: Mischung aus GCB (3.15) und wasserfreiem Magnesiumsulfat, Pulver (3.7), (1 + 19) Massenanteile.

Die beiden Bestandteile werden intensiv vermischt, um eine optisch homogene Mischung zu erhalten.

1) Bondesil-PSA[®] ist ein Produkt, das von Varian, Inc. (Palo Alto, CA, USA) geliefert wird. Envi-Carb[®] ist ein Produkt, das von Supelco geliefert wird. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

ANMERKUNG Es wird sehr empfohlen, die Sorptionsmischungen 1 (3.16) und 2 (3.17) im Voraus herzustellen und in verschließbaren Gefäßen aufzubewahren. Für die Reinigung des Extraktes nach 5.4.3 werden die vorgemischten Sorptionsmischungen 1 oder 2 in die Zentrifugenröhrchen (4.4) eingewogen.

3.18 C-18-Sorbens Octadecyl-silyl-modifiziertes Kieselgel, loses Material 50 µm

3.19 Lösungen des internen Standards und des Qualitätskontrollstandards in Acetonitril, $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$ bis 50 µg/ml

In Tabelle 1 ist eine Reihe möglicher interner Standards (ISTD) und Qualitätskontroll-(QC-)Standards aufgelistet, die in diesem Verfahren angewendet werden dürfen. Die vorgeschlagenen Konzentrationswerte (C_{ISTD}) beziehen sich auf die ISTD-Lösungen, die bei dem ersten Extraktionsschritt (5.2) hinzugefügt werden sollten. Eine geeignete Verdünnung dieser Lösung ($C_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$) sollte für die Herstellung der Standardlösungen hergestellt werden. Weitere Einzelheiten siehe unter 3.22.

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

Bezeichnung der Verbindung	Log P (Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient)	Chloratome	Vorge-schlagene Konzen-tration C _I STD [µg/ml] ^a	GC				LC	
				ECD	NPD	MSD EI (+)	MSD CI (-)	MS/MS ESI (+)	MS/MS ESI (-)
Mögliche interne Standards									
PCB 18	5,55	3	50	+++	–	++	+++	–	–
PCB 28	5,62	3	50	+++	–	++	+++	–	–
PCB 52	6,09	4	50	+++	–	++	+++	–	–
Triphenylphosphat	4,59	–	20	–	+++	+++	–	+++	–
Tris-(1,3-dichloriso-propyl)-phosphat	3,65	6	50	+++	+++	+++	+++	+++	+
Triphenylmethan	5,37	–	10	–	–	+++	–	–	–
Bis-nitrophenylharnstoff (Nicarbazin)	3,76	–	10	–	–	–	–	–	+++
Mögliche Qualitätskontrollstandards (dürfen in derselben Mischung enthalten sein wie die anderen verwendeten ISTD oder auf einer anderen Stufe der Analyse hinzugefügt werden, um Fehlerquellen festzustellen und zu lokalisieren)									
PCB 138 ^b	6,83	6	50	+++	–	++	+++	–	–
PCB 153 ^b	7,75	6	50	+++	–	++	+++	–	–
Anthracen (oder dessen d10-Analog) ^c	4,45	–	100	–	–	++	–	–	–

^a Beispielkonzentrationen der ISTD-Lösungen, die zu Untersuchungsproben in 5.2 hinzugefügt werden, wobei als Lösemittel Acetonitril verwendet wird.

^b Die Wiederfindungsraten von PCB 138 und PCB 153 nehmen mit steigender Lipidmenge in der Probe ab; Wiederfindungsraten dieser beiden Verbindungen, die oberhalb von 70 % liegen, weisen darauf hin, dass selbst bei den lipophilsten Pestiziden keine nicht annehmbaren Verluste bei der Verteilung aufgetreten sind.

^c Wiederfindungsraten von Anthracen, die 70 % überschreiten, weisen darauf hin, dass keine nicht annehmbaren Verluste von Pestiziden mit hoher Kohlenstoffaffinität bei der dispersiven SPE mit GCB aufgetreten sind.

3.20 Pestizid-Stammlösungen

Es werden einzelne Stammlösungen von analytischen Standards mit Konzentrationen hergestellt, die ausreichend sind, um die Herstellung von komplex zusammengesetzten Pestizid-Arbeitslösungen (3.21) zu ermöglichen, die für die Herstellung von Standardlösungen verwendet werden.

In der Regel werden die Stammlösungen bei $\leq -18^\circ\text{C}$ gelagert. Die Stabilität der Stammlösungen wird während der Lagerung regelmäßig kontrolliert [2]. In einigen Fällen kann die Zugabe von Säuren oder Basen hilfreich für eine erhöhte Stabilität sein und die zulässige Lagerdauer verlängern. Vor der Entnahme eines Aliquots werden alle evtl. entstandenen Ausfällungen gelöst.

3.21 Pestizid-Arbeitslösungen

Wegen der ausgedehnten Anwendbarkeit dieses Verfahrens und infolge der zum Teil abweichenden pH-Stabilität der Pestizide können Arbeitslösungen benötigt werden, die ein oder mehrere Pestizide enthalten, um das Gesamtspektrum der zu untersuchenden Pestizide abzudecken. Diese werden durch Zusammenmischen definierter Volumina der erforderlichen Pestizid-Stammlösungen (3.20) und entsprechende Verdünnung dieser mit Acetonitril hergestellt. Die Pestizidkonzentrationen in diesen Mischungen sollten ausreichend sein, um die Herstellung der erforderlichen matrix-angepassten Standards (siehe 3.22.2) mit einer nicht allzu starken Verdünnung des Extrakts der Blindwertprobe (z. B. weniger als 20 %) zu ermöglichen.

In der Regel werden die Pestizid-Arbeitslösungen bei $\leq -18^\circ\text{C}$ gelagert. Die Stabilität der Pestizide in diesen Mischungen wird während der Lagerung regelmäßig kontrolliert [2]. In einigen Fällen kann die Zugabe von Säuren oder Basen hilfreich für eine erhöhte Stabilität sein und die zulässige Lagerdauer verlängern.

3.22 Standardlösungen (Kalibriermischungen)

3.22.1 Standards hergestellt in reinen Lösemitteln (Standards in Lösemitteln)

Standards in Lösemitteln werden durch Mischen von bekannten Volumina der Pestizid-Arbeitslösungen ($V_{\text{pest}}^{\text{cal mix}}$, siehe 3.21) und der ISTD-Lösung ($V_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$, siehe 3.19) und Auffüllen mit Acetonitril hergestellt.

Das zu verwendende Volumen an ISTD-Lösung ($V_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$) hängt vom Volumen der herzustellenden Standardlösung ($V^{\text{cal mix}}$) ab und sollte sicherstellen, dass eine ISTD-Konzentration erreicht wird, die der Konzentration in den Probenmesslösungen (5.3, 5.4) ähnlich ist.

BEISPIEL Wenn 1 ml Standard in Lösemittel hergestellt wird, sollte das hinzuzufügende Volumen an ISTD-Lösung eine Masse an ISTD ($m_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}} = C_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}} \times V_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$) enthalten, die ein Zehntel der Masse des ISTD beträgt, die den Einwaagen in 5.2.3 zugegeben wird (diese werden mit 10 ml Acetonitril versetzt). Es ist somit angezeigt, die Konzentration der Lösung des internen Standards auf geeignete Weise zu verdünnen (in diesem Fall $C_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}} = 0,1 \times C_{\text{ISTD}}$). Anschließend kann das gleiche Pipettenvolumen zum Aufstocken der Untersuchungsproben mit ISTD und zur Herstellung der Standardlösungen verwendet werden. In Tabelle 2 sind Beispiele für das Verhältnis der ISTD-Massenanteile angeführt, die zu den Untersuchungsproben (5.2.3) und den Standardlösungen (3.22) hinzugefügt werden sollten.

Die Herstellung von multiplen Standardlösungen, die einen breiten Konzentrationsbereich umfassen, ermöglicht die Erstellung einer Kalibrierkurve (siehe 6.2).

ANMERKUNG Eine Pestizidkonzentration von 1 µg/ml entspricht einer Rückstandskonzentration von 1 mg/kg, wenn 10 g Probe verwendet wurden (z. B. Proben mit einem Wassergehalt > 30 %) oder 2 mg/kg, wenn 5 g Probe verwendet wurden (z. B. Getreide).

3.22.2 Matrix-angepasste Standards (Standards in Matrix)

Standards in Matrix werden auf die gleiche Weise wie die Standards in Lösemittel hergestellt, jedoch werden an Stelle von reinem Acetonitril Extrakte von Blindwertproben (wie in 5.1 bis 5.4 beschrieben hergestellt, aber ohne eine ISTD-Zugabe) verwendet. Um Fehler, die durch matrixbedingte Effekte während der Chromatographie verursacht werden, möglichst gering zu halten, ist es am besten, gleichartige Lebensmittel auszuwählen (z. B. Apfel für Apfelproben, Mohrrübe für Mohrrübenproben usw.). Sollte die Verdünnung der Extrakte von Blindwertproben nach der Zugabe der Pestizid-Arbeitslösungen mehr als 20 % betragen, ist möglicherweise eine Volumen Anpassung notwendig, um Fehler zu vermeiden, die durch die Unterschiede in der matrixbedingten Signalbeeinflussung zwischen Probenextrakt und Standard in Matrix hervorgerufen werden.

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

Tabelle 2 — Verhältnisse der Massen des ISTD, die zur Einwaage und zur Standardlösung hinzugefügt werden (Kalibriermischung)

Volumen der Standardlösung $V_{\text{cal mix}}$ ml	$\frac{m_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}}{m_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}} = \frac{C_{\text{ISTD}} \times V_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}}{C_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}} \times V_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}}$
1	10
2	5
5	2
10	1

ANMERKUNG Die in dieser Tabelle angeführten Werte beziehen sich auf Volumina der Extrakte von Proben und Blindwertproben von etwa 10 ml (d. h. nach der Zugabe von 10 ml Acetonitril in 5.2.3). Die für die Herstellung des Standards in Matrix verwendete Blindwertprobe sollte auf die gleiche Weise wie die Probe extrahiert werden.

3.23 Kaltes Wasser (< 4 °C)

3.24 Trockeneis

3.25 Mobile Phase A₁: Ammoniumformiat-Lösung in Wasser, $c = 5 \text{ mmol/l}$

3.26 Mobile Phase B₁: Ammoniumformiat-Lösung in Methanol, $c = 5 \text{ mmol/l}$

3.27 Mobile Phase A₂: Essigsäure-Lösung in Wasser, $\varphi = 0,1 \text{ ml konz. Essigsäure/l}$

3.28 Mobile Phase B₂: Essigsäure-Lösung in Acetonitril, $\varphi = 0,1 \text{ ml konz. Essigsäure/l}$

3.29 Mobile Phase A₃: Methanol/Wasser (2+8) (V/V) mit 5 mmol/l Ammoniumformiat

3.30 Mobile Phase B₃: Methanol/Wasser (9+1) (V/V) mit 5 mmol/l Ammoniumformiat

4 Geräte

Übliche Laborgeräte und insbesondere die folgenden:

4.1 Einrichtung zur Probenaufbereitung, z. B. Stephan UM 5 universal

4.2 Hochgeschwindigkeitsdispergiergerät

Der Durchmesser der Dispergierelemente sollte in die Öffnung der verwendeten Zentrifugenröhrchen (4.4) passen.

4.3 Automatische Pipetten, geeignet für die Handhabung von Volumina von 10 µl bis 100 µl, 200 µl bis 1 000 µl und 1 ml bis 10 ml

ANMERKUNG Anstelle letzterer dürfen als Alternative 10-ml-Messpipetten aus Glas verwendet werden.

4.4 Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss, 50 ml

BEISPIELE a) 50-ml-Zentrifugenröhrchen aus Polytetrafluorethylen mit Schraubverschluss, oder

b) 50-ml-Einwegzentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss

4.5 Einwegzentrifugenröhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss, 10 ml oder 12 ml

4.6 10-ml-Lösemittelspender für Acetonitril, zur Verwendung in 5.2.3

4.7 Zentrifugen, die für die im Verfahren verwendeten Zentrifugenröhrchen (4.4 und 4.5) geeignet sind und mindestens 3 000 g erreichen können

4.8 Pulvertrichter, der in die Öffnung der Zentrifugenröhrchen passt

4.9 Injektionsfläschchen, 1,5 ml, geeignet für GC- und LC-Autosampler, bei Bedarf mit Mikroeinsätzen

4.10 Glasfläschchen mit Schraubverschluss, z. B. 20 ml, zur Aufbewahrung überschüssiger Mengen des Endextrakts, falls erforderlich

4.11 Kunststoffbecher (stapelbar), 25 ml, zur Aufbewahrung von Portionen der Puffersalz-Mischung (3.12)

4.12 Probenteiler, zur automatischen Teilung von Salzen und Sorbentien

Zum Beispiel von Retsch/Haan®, PT 100, Fritsch/Idar-Oberstein, Laborette 27 oder Bürkle/Lörrach, Hochpräzisions-Probenteiler Repro²⁾. Die Anwendung eines Probenteilers ist wahlfrei, wird jedoch sehr empfohlen, wenn große Probenmengen zu bearbeiten sind.

ANMERKUNG Die ersten beiden eignen sich besser für die Teilung der Puffersalz-Mischung (3.12), während der Repro von Bürkle für kleinere Mengen von Feststoffen ausgelegt und viel besser für die Teilung der für die „dispersive SPE“ (5.4.2) notwendigen Mischung aus PSA (3.14)/Magnesiumsulfat (3.6) ist. Die 10-ml-Röhrchen aus Polypropylen von Simport, Kanada, 17 mm × 84 mm, Artikel-Nr. T550-10AT²⁾ (4.5) passen ideal in den Repro von Bürkle.

4.13 Schüttelvorrichtung, z. B. Vortex (zur Verwendung bei Wiederfindungsversuchen)

4.14 LC-MS/MS-System, ausgestattet mit Elektrospray-Ionisations-(ESI-)Interface (siehe Anhang A)

4.15 GC-MS, ausgestattet mit geeigneten Detektoren, z. B. MS, MS/MS, TOF und mit PTV-Injektor mit Lösemittel-Abblasverfahren („Solvent-Vent-Modus“) (siehe in Anhang A beschriebene GC-MS-Einrichtung)

2) PT 100, Laborette 27, Hochpräzisions-Probenteiler Repro und TT550-10AT sind Beispiele 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 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 Verarbeitung 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 zersetzt ist, sollte nicht analysiert werden. Wenn möglich, werden die Laborproben unmittelbar nach dem Eintreffen im Labor und auf jeden Fall vor dem Eintreten irgendwelcher merklichen physikalischen oder chemischen Veränderungen 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 vermeiden. 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 partiiell vorbereiteten Untersuchungsprobe wird nur der Anteil der Laborprobe verwendet, für den der Rückstandshöchstgehalt gilt. Weitere Pflanzenteile dürfen nicht entfernt werden.

Die Laborprobe muss so reduziert werden, dass sich daraus repräsentative Einwaagen ergeben (z. B. durch Teilen in vier Teile und Auswahl von gegenüberliegenden Vierteln). Bei kleinstückigen Proben (z. B. kleine Früchte, wie z. B. Beeren, Hülsenfrüchte, Getreide) wird die partiiell vorbereitete Untersuchungsprobe vor dem Auswägen unbedingt gut durchgemischt. Bei großstückigen Proben werden keilförmige Segmente (z. B. bei Melonen) oder Scheiben (z. B. bei Gurken) herausgeschnitten, die die Haut/Schale (Oberfläche) jedes Stückes einschließen [2].

5.1.4 Untersuchungsprobe

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

Wenn die Untersuchungsprobe nicht hinreichend homogen ist oder die Extraktion der Rückstände durch große Stücke wesentlich beeinträchtigt wird, sollte die Untersuchungsprobe mit geeigneten Mitteln intensiv zerkleinert werden. Das ist bei Raumtemperatur möglich, wenn Fleisch und Saft nicht getrennt werden oder die zu untersuchenden Pestizide nicht signifikant abgebaut werden. Die Zerkleinerung der Proben im gefrorenen Zustand kann Verluste von chemisch instabilen Pestiziden signifikant reduzieren und ergibt meistens kleinere Partikelgrößen und somit einen höheren Grad an Homogenität. 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 unterstützt die nachfolgende Zerkleinerung. Die Verarbeitung kann auch durch Tieftemperatur-Mahlen (mit Trockeneis oder flüssigem Stickstoff) unterstützt und verbessert werden, wobei die Temperatur unterhalb von 0 °C gehalten wird. Besonders im Falle von Früchten und Gemüse, die eine feste Schale haben (z. B. Tomaten oder Weinbeeren), ist Tieftemperatur-Mahlen viel effektiver für die Homogenisierung als das Mahlen bei Raumtemperatur. Da nicht-systemische Pestizide häufig überwiegend auf der Haut vorkommen, reduziert Tieftemperatur-Mahlen signifikant die Variabilität der Probenteilung. Wenn die Untersuchungsproben bei niedrigen Temperaturen verarbeitet werden, sollte eine Kondensation von Feuchtigkeit vermieden werden. Übriggebliebenem Kohlendioxid sollte ermöglicht werden, ausreichend zu entweichen, damit dessen Anteil an der Masse der Probe vernachlässigbar ist.

5.1.5 Einwaage

Einzelne Einwaagen, die jeweils groß genug für eine Untersuchung sind, sollten von der zerkleinerten Untersuchungsprobe entnommen werden. 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, um die Wiederherstellung der Homogenität sicherzustellen.

5.1.6 Homogenisierung von Trockenfrüchten und ähnlichen Lebensmitteln (< 30 % Wassergehalt)

850 g kaltes Wasser (3.23) werden zu 500 g gefrorenen Trockenfrüchten hinzugefügt, und die Mischung wird homogenisiert (wenn möglich unter Zugabe von Trockeneis).

5.2 Erster Extraktionsschritt

5.2.1 Einwägen

Eine repräsentative Einwaage (m_a) der zerkleinerten homogenen Probe wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (4.4) überführt. Im Fall von Früchten und Gemüse werden $10 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ (m_a) in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen. Bei nach 5.1.6 homogenisierten Trockenfrüchten werden 13,5 g eingewogen, die 5 g (m_a) Probe entsprechen. Bei trockenen Untersuchungsmaterialien, wie z. B. Getreideprodukten und Honig, wird eine homogenisierte Einwaage von $5 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ (m_a) eingewogen. Bei fermentierten Produkten und extraktreichen Gewürzen werden $2 \text{ g} \pm 0,03 \text{ g}$ (m_a) eingewogen.

5.2.2 Zugabe von Wasser

Bei Proben mit einem Wassergehalt von weniger als 80 % wird ausreichend kaltes Wasser (3.23) hinzugefügt, damit der Gesamtwassergehalt im Röhrchen etwa 10 g beträgt. Hinsichtlich des typischen Wassergehalts und der Menge des zu der entsprechenden Einwaage hinzuzufügenden Wassers siehe Tabelle 3.

ANMERKUNG Zu den in 5.1.6 hergestellten Homogenaten braucht kein Wasser zugegeben zu werden.

5.2.3 Zugabe von Lösemittel und ISTD

10 ml Acetonitril und ein definiertes kleines Volumen an ISTD-Lösung ($V_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}$, z. B. 100 μl), das eine oder mehrere der in Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen in den beispielhaft angeführten Konzentrationen (C_{ISTD}) enthält, werden zugegeben.

5.2.4 Extraktion

Das Röhrchen wird verschlossen und 1 min gründlich geschüttelt. Wenn der Zerkleinerungsgrad der Probe nicht hinreichend oder die Extraktion aus der Matrix noch nicht erfolgt ist, darf die Extraktion verlängert werden (z. B. 20 min bei Verwendung eines mechanischen Schüttlers), oder durch ein Hochgeschwindigkeits-dispergiergerät (z. B. Ultra-Turrax) unterstützt werden. Das Dispergiererelement wird in die Proben-Acetonitril-Mischung eingetaucht und das Zerkleinern erfolgt etwa 2 min bis 5 min bei hoher Geschwindigkeit. In jedem Fall muss sichergestellt werden, dass kein signifikanter Abbau der zu untersuchenden Pestizide erfolgt. Wenn die ISTD-Lösung bereits zugegeben wurde, ist ein Spülen des Dispergiererelementes nicht erforderlich. Dennoch ist es vor der Anwendung bei der nächsten Probe gründlich zu reinigen, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

Es ist sicherzustellen, dass Dispergiererelemente eingesetzt werden, die durch die Öffnung der Zentrifugenröhrchen (4.4) passen.

Die Proben sollten im gefrorenen Zustand oder während des Auftauvorgangs extrahiert werden (ausgenommen trockene Proben mit einem Wassergehalt < 20 %). Wenn Proben bei Umgebungstemperatur extrahiert werden, muss sichergestellt sein, dass kein signifikanter Abbau der zu untersuchenden Pestizide auftritt.

Tabelle 3 — Wassergehalt ausgewählter Lebensmittel und die hinzuzufügende Menge an Wasser

Lebensmittel- gruppe	Lebensmittel	Typischer Wasser- gehalt g/100 g	Zu 10 g Ein- waage zu- gegebene Menge an Wasser g	Zu 5 g Einwaage zugegebene Menge an Wasser g	Bemerkungen
Früchte					
Zitrusfrüchte	Zitrussäfte	90			Zugabe von 600 µl 5 mol/l NaOH-Lösung zu den Puffer- salzen, wie in 3.12 angegeben (gilt ausschließlich für Zitrone und Limette)
	Grapefruit	90			
	Zitrone/Limette	85			
	Orange	85			
	Orangenschale	75	2,5		
	Tangerine	90			Wahlfrei wird ein Ausfrier- schritt zum Entfernen von Wachsen durchgeführt, siehe 5.4.1 (gilt für alle Zitrusfrüchte)
Kernobst	Apfel	85			
	Apfel, getrocknet	30		8,5 (siehe 5.1.6)	
	Apfelkompott	80			
	Apfelsaft	90			
	Birne	85			
	Quitte	85			
Steinobst	Aprikose	85			
	Aprikose, getrocknet	30		8,5 (siehe 5.1.6)	
	Aprikosennektar	85			
	Kirsche	85			
	Mirabelle	80			
	Nektarine	85			
	Pfirsich	90			
	Pfirsich, getrocknet	20		8,5 (siehe 5.1.6)	
	Pflaume	85			
	Pflaume, getrocknet	20		8,5 (siehe 5.1.6)	
Weich-/Kleinobst (Beerenobst)	Brombeere	85			
	Heidelbeere	85			
	Johannisbeere	85			Zugabe von 600 µl 5 mol/l NaOH-Lösung zu den Puffersalzen, wie in 3.12 angegeben
	Holunderbeere	80			
	Stachelbeere	90			

Tabelle 3 (fortgesetzt)

Lebensmittel- gruppe	Lebensmittel	Typischer Wasser- gehalt g/100 g	Zu 10 g Ein- waage zu- gegebene Menge an Wasser g	Zu 5 g Einwaage zugegebene Menge an Wasser g	Bemerkungen
Weich-/Kleinobst (Beerenobst)	Weinbeeren	80			
	Himbeere	85			Zugabe von 200 µl 5 mol/l NaOH-Lösung zu den Puffersalzen, wie in 3.12 angegeben
	Rosine	20		8,5 (siehe 5.1.6)	
	Erdbeere	90			
Andere Früchte	Ananas	85			
	Banane	75	2,5		
	Feige, getrocknet	20		8,5 (siehe 5.1.6)	
	Kiwi	85			
	Mango	80			Verwendung von GCB bei dispersiver SPE, wie in 3.16 und 5.4.3 angegeben (Mischung 1)
	Papaya	90			
Gemüse					
Wurzel- und Knollengemüse	Rote Beete	90			
	Mohrrübe	90			Verwendung von GCB bei dispersiver SPE, wie in 3.16 und 5.4.3 angegeben (Mischung 1)
	Knollensellerie	90			
	Meerrettich	75	2,5		
	Petersilienwurzel	90			
	Rettich	95			
	Schwarzwurzel	80			
	Kartoffel	80			
Lauchgewächse	Knoblauch	60		7,0	
	Zwiebel	90			
	Porree	85			
	Schalotte	80			
	Schnittlauch	85			Verwendung von GCB bei dispersiver SPE, wie in 3.17 und 5.4.3 angegeben (Mischung 2)

Tabelle 3 (fortgesetzt)

Lebensmittel- gruppe	Lebensmittel	Typischer Wasser- gehalt g/100 g	Zu 10 g Ein- waage zu- gegebene Menge an Wasser g	Zu 5 g Einwaage zugegebene Menge an Wasser g	Bemerkungen
Fruchtgemüse	Aubergine	90			
	Gurke	95			
	Melone	90			
	Paprika	90			bei rotem Paprika wird bei dispersiver SPE GCB verwendet, wie in 3.17 und 5.4.3 angegeben (Mischung 2)
	Gartenkürbis	95			bei stark gefärbten Sorten wird bei dispersiver SPE GCB verwendet, wie in 3.16 und 5.4.3 angegeben (Mischung 1)
	Tomate	95			
	Zucchini	95			
Kohlgemüse	Brokkoli	90			
	Rosenkohl	85			
	Blumenkohl	90			
	Chinakohl	95			
	Grünkohl	90			
	Kohlrabi	90			
	Rotkohl	90			
	Wirsingkohl	90			
	Weißkohl	90			
Blattgemüse und Kräuter	Kopfsalat-Sorten	95			bei stark gefärbten Sorten wird bei dispersiver SPE GCB verwendet, wie in 3.16 und 5.4.3 angegeben (Mischung 1)
	Endivie	95			
	Kresse	90			Verwendung von GCB bei dispersiver SPE, wie in 3.17 und 5.4.3 angegeben (Mischung 2)
	Feldsalat	85			
	Petersilie	80			
	Ruccola	85			
	Spinat	90			
Sprossgemüse	Spargel	95			
	Sellerie	95			
	Porree	85			
	Rhabarber	95			
	Artischocke	85			

Tabelle 3 (fortgesetzt)

Lebensmittel- gruppe	Lebensmittel	Typischer Wasser- gehalt g/100 g	Zu 10 g Ein- waage zu- gegebene Menge an Wasser g	Zu 5 g Einwaage zugegebene Menge an Wasser g	Bemerkungen
Hülsenfrüchte	Bohnen, Erbsen, Linsen (getrocknet)	<10		10	
	Grüne Bohnen (frisch)	75	2,5		
Andere					
Getreide	Getreide (Korn, Mehl usw.)	10		10	wahlweise wird ein Aus- frierschritt durchgeführt oder 25 mg C18-Sorbens je ml Extrakt werden bei dem Schritt der disper- siven SPE hinzugefügt, um Lipide zu entfernen (siehe 5.4.1)
	Kaffeebohnen	<10		10 (Verwendung von 2 g bei fermentierten Proben)	bei fermentierten Produk- ten werden 75 mg PSA- Sorbens je ml Extrakt bei dem Schritt der disper- siven SPE hinzugefügt
	Tee	<10			
	Trockene Kräuter und Gewürze	<10		10 (Verwendung von 2 g bei extraktreichen Proben)	
	Pilze	90			
	Wein	90			

5.3 Zweiter Extraktionsschritt und Verteilung

Zu der Suspension von 5.2 wird die vorbereitete Puffersalz-Mischung (3.12) hinzugefügt. Das Röhrchen wird verschlossen und sofort kräftig 1 min geschüttelt und 5 min bei $> 3\,000\text{ g}$ zentrifugiert.

ANMERKUNG Bei stark sauren Lebensmitteln, wie Zitronen, Limetten, Johannis- und Himbeeren, werden Puffersalz-Mischungen verwendet zu denen NaOH gegeben wurde, wie in 3.12 angegeben.

In Gegenwart von Wasser neigt Magnesiumsulfat zur Bildung von Klumpen, die schnell hart werden können. Das kann vermieden werden, indem das Zentrifugenröhrchen unmittelbar nach der Zugabe der Salzmischung einige Sekunden kräftig geschüttelt wird. Die einminütige Extraktion des gesamten Satzes kann nach der Zugabe der Salze zu sämtlichen Proben parallel durchgeführt werden.

Pestizide mit sauren Gruppen (z. B. Phenoxyalkansäure) treten in Wechselwirkung mit Aminosorbentien, wie z. B. PSA. Deshalb sollte die bestimmende Analyse (vorzugsweise durch LC-MS/MS, ESI-negativ) derartiger Pestizide, wenn sie in den Anwendungsbereich der Analyse fallen, direkt an dem Rohextrakt nach dem Zentrifugieren, jedoch vor dem Reinigen (5.4) durchgeführt werden. Dazu wird ein aliquoter Anteil des Rohextrakts in ein Fläschchen gefüllt und mit LC-MS/MS analysiert. Typische LC-MS/MS-Bedingungen für saure Pestizide sind in Anhang A angeführt.

5.4 Reinigung

5.4.1 Entfernung von mitextrahierten Fetten, Wachsen, Zuckern (z. B. bei Getreide, Zitrusfrüchten)

Ein aliquoter Anteil der Acetonitril-Phase (5.3) von 8 ml wird in ein Zentrifugenröhrchen (4.5) überführt und über Nacht in einem Gefrierapparat (bei Mehl sind 2 h hinreichend) aufbewahrt, wobei ein Großteil der Fette und Wachse sich verfestigt und ausfällt. Im Anschluss an ein kurzzeitiges Zentrifugieren (bei Bedarf) werden 6 ml des noch kalten Extrakts für die dispersive SPE nach 5.4.2 entnommen.

ANMERKUNG Das Ausfrieren ermöglicht auch das teilweise Abtrennen einiger zusätzlicher, mitextrahierter Stoffe aus der Probe mit begrenzter Löslichkeit in Acetonitril, wie z. B. Zucker. Mitextrahierte Fette und Wachse, die die Robustheit der GC-Analyse beeinträchtigen können, können alternativ auch mit Umkehrphasensorbentien auf Kieselgelbasis (ODS-, C18-Typ) wirksam entfernt werden. Dazu werden beim Schritt der dispersiven SPE 25 mg ODS zusammen mit 25 mg PSA und 150 mg Magnesiumsulfat je Milliliter Extrakt eingesetzt. Die Pestizide und die vorgeschlagenen internen und QC-Standards (siehe Tabelle 1) werden durch diese Behandlungen nicht beeinträchtigt.

5.4.2 Reinigung mit Aminosorbens („Dispersive SPE“ mit PSA)

Ein aliquoter Anteil der Acetonitril-Phase aus 5.3 oder 5.4.1 von 6 ml wird in ein Einwegzentrifugenröhrchen aus PP (4.5) überführt, das bereits 150 mg PSA (3.14) und 900 mg Magnesiumsulfat (3.6) enthält. Das Röhrchen wird verschlossen, 30 s kräftig geschüttelt und zentrifugiert (5 min bei > 3 000 g). Der klare Extrakt wird sofort isoliert und angesäuert, wie in 5.4.4 beschrieben.

Für 1 ml Extrakt sind 150 mg Magnesiumsulfat und 25 mg PSA erforderlich.

ANMERKUNG Es ist hilfreich, die Zentrifugenröhrchen, die für einen Satz Proben benötigt werden, vor Beginn des Extraktionsvorgangs mit Sorbentien für die dispersive SPE zu befüllen. Die Anwendung eines Probenteilers (4.12) erleichtert dieses Verfahren erheblich.

5.4.3 Reinigung mit einer Mischung aus Aminosorbens + GCB („Dispersive SPE“ mit PSA und GCB)

Bei Proben mit einem hohen Gehalt an Carotinoiden (z. B. roter Paprika, Mohrrüben) oder Chlorophyll (z. B. Spinat, Feldsalat, Ruccola, Grünkohl, Weinblätter und *Lactuca*-Sorten, außer Eisbergsalat und Salatherzen) wird die dispersive SPE mit einer Kombination aus PSA und GCB durchgeführt.

Ein 6-ml-Anteil der Acetonitril-Phase aus 5.3 wird in ein Zentrifugenröhrchen (4.5) überführt, das bereits 150 mg PSA (3.14) und bei Extrakten aus Mohrrüben, *Lactuca*-Sorten, 900 mg Sorptionsmischung 1 (3.16) sowie bei Extrakten aus rotem Paprika, Spinat, Feldsalat oder Ruccola 900 mg Sorptionsmischung 2 (3.17) enthält. Das Röhrchen wird verschlossen, 2 min kräftig geschüttelt und zentrifugiert (z. B. 5 min bei > 3 000 g). Der klare Extrakt wird sofort isoliert und angesäuert, wie in 5.4.4 beschrieben.

Für 1 ml Extrakt sind 25 mg PSA und, in Abhängigkeit von der Probe, 150 mg Sorptionsmischung 1 oder 2 erforderlich.

ANMERKUNG Es ist hilfreich, die Zentrifugenröhrchen, die für einen Satz Proben benötigt werden, vor Beginn des Extraktionsvorgangs mit Sorbentien für die dispersive SPE zu befüllen. Die Anwendung eines Probenteilers (4.12) erleichtert dieses Verfahren erheblich.

5.4.4 Stabilisierung des Extrakts

Ein aliquoter Anteil des aufgereinigten Extrakts aus 5.4.2 oder 5.4.3 von 5 ml wird in ein Vorratsfläschchen mit Schraubverschluss (4.10) überführt, wobei darauf zu achten ist, dass keine Sorbenteilchen übertragen werden, und durch Zugabe von 50 µl einer 5%igen Ameisensäure-Lösung in Acetonitril (3.13) leicht angesäuert. Der Extrakt mit eingestelltem pH-Wert wird in Fläschchen für Autosampler gefüllt und für die gas- und flüssigkeitschromatographische Analyse verwendet. Bei Bedarf wird der verbliebene Extrakt bis zum Gebrauch in einem Kühlschrank aufbewahrt.

Für 1 ml Extrakt sind 10 µl Ameisensäure-Lösung (3.13) erforderlich.

5.5 Bestimmung

Die in 5.4.4 erhaltenen Probenextrakte (im Fall von sauren Pestiziden werden die Rohextrakte aus 5.3 verwendet) und die Standardlösungen (3.22) werden in einer geeigneten Reihenfolge in das GC- oder LC-Gerät eingespritzt. Das kann die Messung der Probenextrakte zwischen den Kalibrierlösungen (bracketing Verfahren) einschließen.

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 zufriedenstellende Ergebnisse erzielen.

Zu geeigneten Versuchsbedingungen der LC-MS/MS-Messung siehe den Fachbericht CEN/TR 15641 [5] „Bestimmung von Pestizidrückständen mit LC-MS/MS — Sammlung der Parameter für die Massenspektrometrie“. Für passende Versuchsbedingungen für GC-MS-Messungen siehe [3]. Dennoch ergibt eine individuelle Abstimmung der Verbindungen auf das für die Messung verwendete Gerät gewöhnlich bessere Empfindlichkeiten.

5.6 Prüfung auf Störungen und Wiederfindung

Es werden Reagenzienblindwertproben hergestellt und Wiederfindungsversuche mit Aufstockungen durchgeführt. Das Chromatogramm der Reagenzienblindwertprobe sollte keinen nennenswerten störenden Peak bei der Retentionszeit der Analyten aufweisen.

6 Auswertung

6.1 Identifizierung und quantitative Bestimmung

Zur Identifizierung eines im Probenextrakt vorliegenden Analyten kann eine Reihe von Parametern verwendet werden. Dazu gehören:

- 1) Die Retentionszeit des zu untersuchenden Analyten (R_t) oder, besser, das Verhältnis der Retentionszeit bezogen auf den ISTD ($R_{t(A)}/R_{t(ISTD)}$) aus demselben Versuchsdurchlauf;
- 2) die Peakform des Analyten;
- 3) bei einer MS- oder MS/MS-Detektion die relative Häufigkeit der aufgezeichneten Massen (im Allgemeinen sind bei MS/MS 2 SRM-Übergänge und bei MS-Anwendungen 3 Ionen erforderlich).

Die Parameter zur Identifizierung der Analyten im Probenextrakt werden mit den Parametern verglichen, die für die Pestizide in der (den) Kalibrierlösung(en) erhalten wurden. Ist zur Identifizierung der Analyten eine weitere Absicherung erforderlich, sind möglicherweise zusätzliche Maßnahmen notwendig, wie z. B. die Anwendung anderer chromatographischer Trennbedingungen oder das Miteinbeziehen zusätzlicher m/z - oder SRM-Übergänge. Weitere Kriterien zur Absicherung werden in der EU-Leitlinie zur Qualitätskontrolle SANCO/2007/3131-Dokument [1] beschrieben. In Tabelle 1 ist eine Liste der ISTD angegeben, die verwendet werden können. Der Einsatz von mehr als einem ISTD liefert einige zusätzliche Informationen.

Die Standardlösungen (3.22.1 oder 3.22.2) werden verwendet, um Linearität zu überprüfen und die Kalibrierfunktionen für jede aktive Substanz wie in 6.2 beschrieben zu bestimmen. Die Verwendung von Standards in Matrix wird bevorzugt. Für eine erste Abschätzung der Rückstandsmenge von Pestiziden im Lebensmittel oder um die Abwesenheit von Pestiziden zu ermitteln, können Standardlösungen in reinem Lösemittel (3.22.1) verwendet werden. Sie können auch für die quantitative Bestimmung verwendet werden, wenn Vorversuche darauf schließen lassen, dass sämtliche festgestellten Unterdrückungs- oder Verstärkungseffekte die erhaltenen Ergebnisse nicht signifikant beeinflussen. Sobald relevante Rückstandskonzentrationen nachgewiesen werden (z. B. Verdacht auf Rückstandshöchstgehaltüberschreitung), sollte eine genauere Bestimmung mit Standards in Matrix (3.22.2) erfolgen oder das Standard-Additionsverfahren (6.3) angewendet werden.

ANMERKUNG 1 Matrixeffekte beeinflussen den Response der zu untersuchenden Analyten in den Probenextrakten, verglichen mit dem Response der Standardlösungen in reinem Lösemittel.

ANMERKUNG 2 Der Kalibrierbereich sollte sich für den Konzentrationsbereich der zu bestimmenden Rückstände eignen. Deshalb kann es erforderlich sein, mehr als eine Kalibriergerade aus den Ergebnissen der Kalibriermessungen zu erstellen.

Diese Norm schreibt die Verwendung eines internen Standards für die quantitative Bestimmung und Identifizierung vor. Dennoch ist es möglich, die quantitative Bestimmung ohne ISTD durchzuführen. Ohne ISTD wird davon ausgegangen, dass das Volumen der Acetonitril-Phase (5.3) gleich dem Volumen an Acetonitril ist, das der Probe in 5.2.3 hinzugefügt wurde (10 ml).

Wenn interne Standards verwendet werden, ist es wichtig zu wissen, dass jede Veränderung im ISTD-Signal sich direkt auf die berechnete Konzentration der Analyten auswirkt. Idealerweise sollte sich das ISTD-Signal nur aufgrund der Volumenunterschiede verändern und dadurch die Genauigkeit der Messung verbessern. Jedoch gibt es auch andere, unerwünschte Faktoren, die ebenfalls die Signale des ISTD beeinflussen und somit zu Fehlern in der quantitativen Bestimmung des Analyten führen können. Verluste des ISTD während der Verteilung oder Reinigung führen zu einer Überschätzung der Analytkonzentration. Derartige Verluste sollten deshalb minimiert werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Wiederfindungsrate des ISTD sehr hoch ist. Der Fehler, der durch Verluste des ISTD in die Ergebnisse eingebracht wird, ist im Vergleich zu anderen Fehlerquellen daher unbedeutend. Eine spezifische Unterdrückung des ISTD-Signals, die möglicherweise bei LC-MS-Anwendungen aufgrund von gemeinsam eluierten Matrixbestandteilen auftritt, bewirkt ebenfalls Überschätzungen des Analyten, während eine Verstärkung des ISTD-Signals, wie es bei GC-Anwendungen aufgrund des Vorliegens von gleichzeitig extrahierten Matrixbestandteilen typisch ist, zu einer Unterschätzung der Analytkonzentrationen führt. Bei GC-Anwendungen verwendete ISTD sollten deshalb Verbindungen sein, die durch matrixbedingte Verstärkungserscheinungen praktisch nicht beeinflusst werden. Bei LC-MS-Anwendungen hängen die Matrixeffekte davon ab, ob der Extrakt des Lebensmittels spezifische Bestandteile enthält, die gemeinsam mit dem ISTD eluieren und dessen Ionisierungsprozess beeinflussen.

In jedem Fall ist es entscheidend, Qualitätssicherungsmaßnahmen einzuführen, um sicherzustellen, dass etwaige durch den ISTD eingebrachte Fehler insignifikant bleiben. Qualitätssicherungsmaßnahmen können die Verwendung von mehreren ISTD und Qualitätskontrollstandards einbeziehen, die auf anderen Stufen des analytischen Verfahrens (z. B. zum Endextrakt) dazugegeben werden können und die möglicherweise helfen, etwaige nicht volumenbezogene Veränderungen des ISTD-Signals zu erkennen. Die Beobachtung der Signalintensität des ISTD in jeder Probe innerhalb einer Sequenz ist für eine Qualitätssicherung sehr hilfreich. Sollte eine signifikante Signalveränderung auftreten, sollte eine quantitative Bestimmung mit einem zusätzlichen ISTD oder ohne Verwendung eines ISTD durchgeführt werden. Letzterer Fall setzt ein genaues Pipettieren und einen Abgleich der Volumina der Standardlösungen und der Probenextrakte voraus.

6.2 Berechnung der Rückstandskonzentration ohne Standardaddition

Verwendete Variablen:

— Konzentration des ISTD in der ISTD-Lösung	C_{ISTD}	µg/ml
— Konzentration des Pestizids in der Kalibriermischung	$C_{\text{pest}}^{\text{cal mix}}$	µg/ml
— Konzentration des ISTD in der Kalibriermischung	$C_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$	µg/ml
— Konzentration des Pestizids im Endextrakt	$C_{\text{pest}}^{\text{Probe}}$	µg/ml
— Konzentration des ISTD im Endextrakt	$C_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}$	µg/ml
— Masse der Einwaage	m_a	g
— Volumen des zur Einwaage hinzugefügten ISTD	$V_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}$	ml

— Peakfläche des Pestizids, erhalten aus der Kalibrier Mischung	$A_{\text{pest}}^{\text{cal mix}}$	(Impulsanzahl)
— Peakfläche des ISTD, erhalten aus der Kalibrier Mischung	$A_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$	(Impulsanzahl)
— Peakfläche des Pestizids, erhalten aus dem Endextrakt	$A_{\text{pest}}^{\text{Probe}}$	(Impulsanzahl)
— Peakfläche des ISTD, erhalten aus dem Endextrakt	$A_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}$	(Impulsanzahl)
— Peakverhältnis, erhalten aus der Kalibrier Mischung	$PR^{\text{cal mix}}$	(dimensionslos)
— Peakverhältnis, erhalten aus dem Endextrakt	PR^{Probe}	(dimensionslos)
— Anstieg der Kalibrierkurve	a_{cal}	(dimensionslos)
— y-Achsenabschnitt der Kalibrierkurve	b_{cal}	(dimensionslos)
— Massenanteil des Pestizids in der Probe	w_{R}	mg/kg

Außerdem im Text:

— Masse des (der) für die Herstellung der Standardlösung zu verwendenden ISTD	$m_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$
— Gesamtmasse des zu jedem Fläschchen zugegebenen Pestizids (bei der Standardaddition)	$m_{\text{pest}}^{\text{std add}}$
— Volumen der Standardlösung (Standard in Lösemittel oder matrix-angepasster Standard)	$V^{\text{cal mix}}$
— Volumen der ISTD-Lösung, die für die Herstellung der Kalibrier Mischung verwendet wird	$V_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$
— Volumen der Pestizidarbeitslösung, die zur Herstellung der Kalibrier Mischung verwendet wird	$V_{\text{pest}}^{\text{cal mix}}$
— Zugegebenes Volumen einer geeigneten Verdünnung der Pestizid-Stammlösung (bei der Standardaddition)	$V_{\text{pest}}^{\text{std add}}$

Die Kalibrierfunktionen werden für jede aktive Substanz durch Auftragen des Peakverhältnisses $PR^{\text{cal mix}}$ ($A_{\text{pest}}^{\text{cal mix}} / A_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$) von jeder Kalibrierkonzentration in Abhängigkeit vom dimensionslosen Konzentrationsverhältnis ($C_{\text{pest}}^{\text{cal mix}} / C_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$) der Standardlösung bestimmt. Aus der entsprechenden Kalibrierkurve, beschrieben durch Gleichung (1):

$$PR^{\text{cal mix}} = a_{\text{cal}} \times \frac{C_{\text{pest}}^{\text{cal mix}}}{C_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}} + b_{\text{cal}} \quad (1)$$

kann jedes erwartete Konzentrationsverhältnis ($C_{\text{pest}}^{\text{cal mix}} / C_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$) mit Gleichung (2) berechnet werden:

$$\frac{C_{\text{pest}}^{\text{cal mix}}}{C_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}} = \frac{PR^{\text{cal mix}} - b_{\text{cal}}}{a_{\text{cal}}} \quad (2)$$

Das Konzentrationsverhältnis $C_{\text{pest}}^{\text{Probe}} / C_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}$ im Endextrakt hängt von dem Massenanteil w_R des Pestizids in der Einwaage m_a , der Konzentration des internen Standards C_{ISTD} und dessen zur Einwaage hinzugefügtem Volumen $V_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}$ ab.

$$\frac{C_{\text{pest}}^{\text{Probe}}}{C_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}} = \frac{w_R \times m_a}{C_{\text{ISTD}} \times V_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}} \quad (3)$$

Wenn das vom Endextrakt erhaltene Peakverhältnis $PR^{\text{sample}} = A_{\text{pest}}^{\text{Probe}} / A_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}$ mit dem aus der Kalibrierung erhaltenen Peakverhältnis $PR^{\text{cal mix}}$ identisch ist, sind die Konzentrationsverhältnisse $C_{\text{pest}}^{\text{Probe}} / C_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}$ und $C_{\text{pest}}^{\text{cal mix}} / C_{\text{ISTD}}^{\text{cal mix}}$ identisch und der Massenanteil w_R (Rückstandskonzentration in der Untersuchungsprobe) wird wie folgt berechnet:

$$w_R = \frac{(PR^{\text{Probe}} - b_{\text{cal}}) \times C_{\text{ISTD}} \times V_{\text{ISTD}}^{\text{Probe}}}{a_{\text{cal}} \times m_a} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \quad (4)$$

ANMERKUNG Eine vereinfachte und praxisorientierte Gleichung für die Berechnung der Ergebnisse, die die ISTD-Konzentration nicht enthält, die jedoch die Erfüllung bestimmter Voraussetzungen erfordert, ist in Anhang D angegeben.

6.3 Berechnung der Rückstandskonzentration nach dem Standard-Additionsverfahren

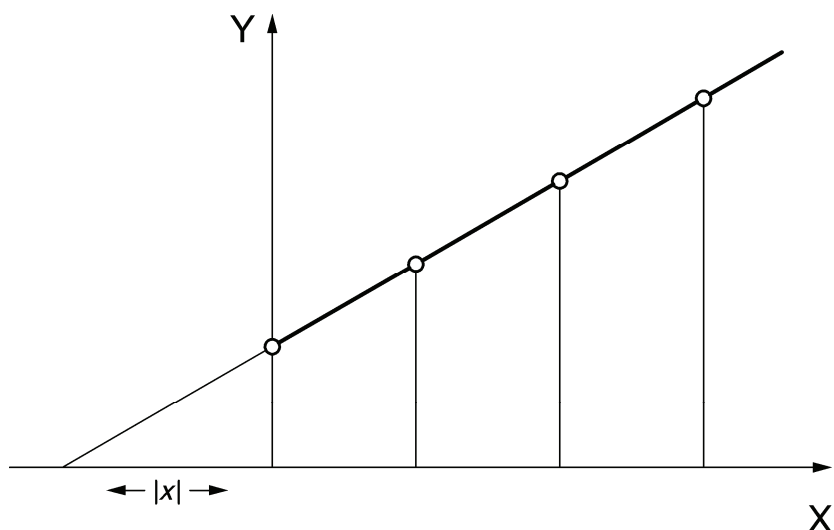
Bei Verdacht auf Überschreitungen an Rückstandshöchstgehalten, oder bei Verbindungen, die dafür bekannt sind, dass sie stark durch matrix-bedingte Verstärkungs- oder Unterdrückungserscheinungen beeinflusst werden, wird das Verfahren der Standardaddition empfohlen, vorausgesetzt, die Funktion zwischen Response und Konzentrationen ist im betreffenden Konzentrationsbereich linear. In diesem Fall werden mehrere aliquote Anteile des Endextrakts der Probe mit zunehmenden Volumina ($V_{\text{pest}}^{\text{std add}}$) einer geeigneten Verdünnung der Pestizid-Stammlösungen (3.20) aufgestockt, gefolgt von einem Lösemittelausgleich wie in Tabelle 4 beschrieben. Dieses Verfahren erfordert die Kenntnis der ungefähren Rückstandsmenge, w_R , aus der vorhergehenden Analyse.

Für eine Probe (verwendete Probenmenge: 10 g) mit einer geschätzten Rückstandsmenge von $w_R = 0,8 \text{ mg/kg}$, kann das Pipettierschema in Tabelle 4 angewendet werden. Die Menge des Analyten in der Probe wird unter Anwendung einer graphischen Darstellung, wie in Bild 1 dargestellt, durch lineare Regression berechnet.

ANMERKUNG Im Falle von anderen Rückstandsmengen, w_R , werden die Konzentration der Analytstandardlösung und/oder die Volumina von Analytstandardlösung und Lösemitteln entsprechend angepasst.

Tabelle 4 — Beispiel für ein Pipettierschema für ein Standardadditions-Verfahren

Zugaben	Fläschchen 1	Fläschchen 2	Fläschchen 3	Fläschchen 4
Volumen des Probenextrakts	500 µl (= 0,5 g Probe)	500 µl (= 0,5 g Probe)	500 µl (= 0,5 g Probe)	500 µl (= 0,5 g Probe)
ISTD	bereits enthalten	bereits enthalten	bereits enthalten	bereits enthalten
Zugegebenes Volumen ($V_{\text{pest}}^{\text{std add}}$) einer geeigneten Verdünnung der Pestizid- Stammlösung, (z. B. 4 µg/ml)	—	50 µl	100 µl	150 µl
Gesamtmasse ($m_{\text{pest}}^{\text{std add}}$) des zu jedem Fläschchen zugegebenen Pestizids		0,2 µg	0,4 µg	0,6 µg
Volumen des Lösemittels	150 µl	100 µl	50 µl	—
Endvolumen	650 µl	650 µl	650 µl	650 µl



Legende

Y Quotient aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des ISTD

X Zugegebene Gesamtmasse des Analyten ($m_{\text{pest}}^{\text{std add}}$) in µg

$|x|$ Gesamtmasse des Analyten im Probenextrakt (in µg) vor der Standardaddition ($y = 0$)

$$x = \frac{y - \text{Achsenabschnitt } (c)}{\text{Anstieg der Kurve } (b)} \quad (5)$$

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

Die Berechnung wird nach Gleichung (6) unter Anwendung der in Bild 1 dargestellten Regressionsgeraden durchgeführt:

$$w_R = \frac{c}{b} \times \frac{V}{V_{al} \times m_a} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \quad (6)$$

Dabei ist

- c der Abschnitt auf der Y -Achse der Kalibriergeraden des betreffenden Analyten;
- b der Anstieg der Kalibriergeraden des betreffenden Analyten ($1/\mu\text{g}$);
- V das in 5.2.3 zugegebene Volumen an Acetonitril (ml);
- V_{al} das Volumen der aliquoten Anteile, die für das Verfahren der Standardaddition verwendet wurden (ml);
- m_a die Einwaage (g).

6.4 Zuverlässigkeit des Verfahrens

Im Rahmen von koordinierten Ringversuchen zur Verfahrensvalidierung wurden unter Anwendung dieses Verfahrens mehrere Wiederfindungsversuche (Konzentrationen der Standardzusätze von 0,01 mg/kg bis 0,25 mg/kg) mit repräsentativen Lebensmitteln durchgeführt. Die erhaltenen Wiederfindungsraten lagen üblicherweise zwischen 70 % und 110 % und die relativen Standardabweichungen von Wiederholungen unterhalb von 10 %. Die Ergebnisse dieser Verfahrensvalidierung sind in Anhang B, Tabelle B.1 dargestellt.

Tabelle B.2 in Anhang B enthält eine Zusammenstellung der Ergebnisse von Wiederfindungsversuchen, die im Rahmen der Verfahrensvalidierung und routinemäßigen Qualitätssicherung in verschiedenen Laboratorien individuell durchgeführt wurden.

Die mit diesem Verfahren erhaltenen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen hängen stark von einer Reihe von Parametern ab. Diese schließen die Art des Pestizids und die zu untersuchende Probe sowie die unter den angewendeten Bedingungen mit der Geräteausrüstung erreichte Empfindlichkeit und Selektivität ein. Wenn eine Geräteausrüstung eingesetzt wird, die dem Stand der Technik entspricht, ist die Quantifizierung von Pestiziden bei Mengen von etwa 0,01 mg/kg (entspricht gewöhnlich den niedrigsten Höchstgehalten) in den meisten Fällen einfach.

7 Bestätigung

Eine Bestätigung des Gehaltes umfasst die Analyse einer zweiten Einwaage und wird durchgeführt, wenn bei der ersten Analyse der Verdacht einer Überschreitung des zulässigen Rückstandshöchstgehaltes besteht. Für mehr Informationen über die Absicherung der Identität wird auf die in dem SANCO/2007/3131-Dokument beschriebene EG-Leitlinie zur Qualitätskontrolle hingewiesen [1].

8 Präzision

Einzelheiten über den Ringversuch zur Ermittlung der Präzision des Verfahrens nach ISO 5725-1 und ISO 5725-2 sind in Anhang B zusammengefasst. Die aus dem Ringversuch abgeleiteten Werte sind nicht unbedingt auf andere als die in Anhang B angegebenen Konzentrationsbereiche der Pestizide und Matrices anwendbar.

9 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- alle notwendigen Informationen zur Identifizierung der Probe;
- eine Verweisung auf diese Europäische Norm;
- die Ergebnisse und die Einheiten, in denen die Ergebnisse angegeben werden;
- das Datum und die Art des Probenahmeverfahrens (falls möglich);
- das Datum des Eingangs der Probe im Laboratorium;
- das Datum der Untersuchung;
- alle Besonderheiten, die während der Untersuchung festgestellt wurden;
- alle Arbeitsschritte, die nicht in diesem Verfahren festgelegt sind oder als wahlfrei angesehen wurden und das Ergebnis möglicherweise beeinflusst haben.

Anhang A (informativ)

Beispiele für experimentelle Bedingungen

Die folgenden GC- oder LC-MS-Betriebsbedingungen haben sich als zufriedenstellend erwiesen.

A.1 GC-MSD-System

Säule:	DB 5 MS, vernetzt, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, 5 % Phenyl-Methyl-Polysiloxan
Trärgas:	Helium, konstanter Durchfluss 2 ml/min
GC-Temperaturprogramm:	2 min bei 40 °C anschließend mit 30 °C/min auf 220 °C anschließend mit 5 °C/min auf 260 °C anschließend mit 20 °C/min auf 280 °C (15 min)
Temperatur der Übertragungsleitung:	280 °C
Injektionsvolumen:	3 µl (PTV, Solvent-Vent-Modus)
PTV-Temperaturprogramm:	0,8 min bei 50 °C anschließend mit 720 °C/min auf 300 °C, 5 min isotherm anschließend abkühlen auf 280 °C, 10 min isotherm
PTV-Gasdurchfluss:	Splitfluss 20 ml/min bis 0,5 min Spülgasdurchfluss 47,4 ml/min, Beginn bei 2 min reduzierter Gasdurchfluss 20 ml/min, Beginn bei 6 min

A.2 HPLC-System 1

Für die meisten mit LC analysierbaren Verbindungen:

Säule	Zorbax XDB C18, Länge 150 mm, Innendurchmesser 2,1 mm, Teilchengröße 3,5 µm
Mobile Phase A ₁ (3.25)	Ammoniumformiat-Lösung in Wasser, <i>c</i> = 5 mmol/l
Mobile Phase B ₁ (3.26)	Ammoniumformiat-Lösung in Methanol, <i>c</i> = 5 mmol/l
Säulentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	5 µl

Tabelle A.1 — Durchfluss und Elutionsgradient

Zeit min	Durchfluss µl/min	Mobile Phase A ₁ %	Mobile Phase B ₁ %
0	300	50	50
20	300	0	100
25	300	0	100
26	300	50	50
30	300	50	50