

DIN EN 16215

ICS 65.120

Futtermittel –**Bestimmung von Dioxinen und dioxin-ähnlichen PCBs mittels GC/HRMS
und von Indikator-PCBs mittels GC/HRMS;
Deutsche Fassung EN 16215:2012**

Animal feeding stuffs –

Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC/HRMS and of indicator PCBs by
GC/HRMS;

German version EN 16215:2012

Aliments des animaux –

Dosage des dioxines, des PCB de type dioxine et des PCB indicateurs par GC/HRMS;

Version allemande EN 16215:2012

Gesamtumfang 54 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16215:2012) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN (Niederlande) gehalten wird.

Die Mitarbeit des DIN beim Europäischen Komitee für Normung (CEN) wird für den Bereich des CEN/TC 327 über das nationale Spiegelgremium, den Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), wahrgenommen.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Deutsche Fassung

**Futtermittel - Bestimmung von Dioxinen und dioxin-ähnlichen
PCBs mittels GC/HRMS und von Indikator-PCBs mittels
GC/HRMS**

Animal feeding stuffs - Determination of dioxins and dioxin-
like PCBs by GC/HRMS and of indicator PCBs by
GC/HRMS

Aliments des animaux - Dosage des dioxines, des PCB de
type dioxine et des PCB indicateurs par GC/HRMS

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 9. März 2012 angenommen.

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

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

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



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

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

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien	7
6 Geräte	8
7 Probenahme	8
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	8
9 Durchführung	8
10 Extraktion	9
11 Reinigung	12
12 Modul D: Gaschromatographie mit hochauflösender Massenspektrometrie (GC/HRMS)	26
13 Berechnung und Auswertung	28
14 Präzision	33
15 Prüfbericht	35
Anhang A (informativ) Beschreibung des PTV-Injektionssystems	36
Anhang B (informativ) Beschreibung der Standards und der Konzentration der Standardlösungen	38
Anhang C (informativ) Beispiel des automatisierten Verfahrens	45
Anhang D (informativ) Massenspektrometer (MS)	47
Anhang E (informativ) Anwendung der zusätzlichen Reinigung nach der Fraktionierung mit einer kurzen mehrschichtigen Kieselgelsäule	51
Literaturhinweise	52

Vorwort

Dieses Dokument (EN 16215:2012) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2012, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2012 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.

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, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm ist anwendbar für die Bestimmung von polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen (PCDD), polychlorierten Dibenzofuranen (PCDF) [zusammen als „Dioxine“ bezeichnet (PCDD/F)] und dioxin-ähnlicher PCBs und nicht dioxin-ähnlicher PCBs (dl-PCB und ndl-PCB) in Futtermitteln. Ringversuche wurden durchgeführt. Das Verfahren ist für die Bestimmung von Dioxinen, dl-PCBs und ndl-PCBs bei der entsprechenden MRL in Mischfutter und Inhaltsstoffen, z. B. Öl, Tonmineral, geeignet. Das Verfahren ist auf Proben anwendbar, die Rückstände von einem oder mehreren der folgenden Dioxine, dioxin-ähnlichen PCBs und Indikator-PCBs enthalten. Die Bestimmungsgrenze (LOQ) beträgt für die relevanten einzelnen Kongeneren der Dioxine/Furane 0,05 pg/g (OCDD/F = 0,1 pg/g), für non-ortho PCBs 0,05 pg/g, für mono-ortho PCBs 10 pg/g und 100 pg/g für Indikator-PCBs.

Für die Bestimmung von Dioxinen und dioxin-ähnlichen PCB kann das Verfahren, wie in der Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 152/2009 für Dioxine und dl-PCB in Futtermitteln [6] festgelegt, als Bestätigungsverfahren angewendet werden. Die Bestätigungsverfahren sind Verfahren mit hochauflösender Gaschromatographie/hochauflösender Massenspektrometrie (HRGC/HRMS). Ist nur die Analyse der Indikator-PCBs erforderlich, kann ein GC/LRMS-Verfahren (z. B. EN 15741, Futtermittel — Bestimmung der OC-Pestizide und PCBs mittels GC/MS-Verfahren [1] und EN 15742, Futtermittel — Bestimmung der OC-Pestizide und PCBs mittels GC/ECD-Verfahren [2]) angewendet werden, vorausgesetzt, dass für die zu untersuchende Matrix im relevanten Bereich die entsprechenden analytischen Leistungskriterien erfüllt werden.

Diese Europäische Norm ist in vier Module aufgeteilt, die jeweils einen Teil des gesamten Verfahrens (siehe Bild 1 und Bild 2) wie folgt beschreiben:

- a) Modul A: Beschreibung der Normen, die angewendet werden können;
- b) Modul B: Beschreibung der Extraktionsverfahren;
- c) Modul C: Beschreibung der Reinigungsverfahren;
- d) Modul D: GC/HRMS-Bestimmung.

Jedes Modul beschreibt einen Teil des gesamten Verfahrens sowie, falls anwendbar, Alternativen, die gleichwertig sein sollten. Jedes Modul muss als ein Beispiel betrachtet werden. Kombinierbare Module und/oder Alternativen ergeben ein hochflexibles Verfahren, das „leistungsbezogen“ ist. Es ist zulässig, das Verfahren zu verändern, wenn sämtliche Leistungskriterien entsprechend der Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 152/2009 [6] erfüllt werden.

Jede Abweichung vom beschriebenen Verfahren und die Kombination der Module müssen als Teil der QA/QC-Verfahren von anerkannten Laboratorien aufgezeichnet werden und sollten auf Anfrage verfügbar sein.

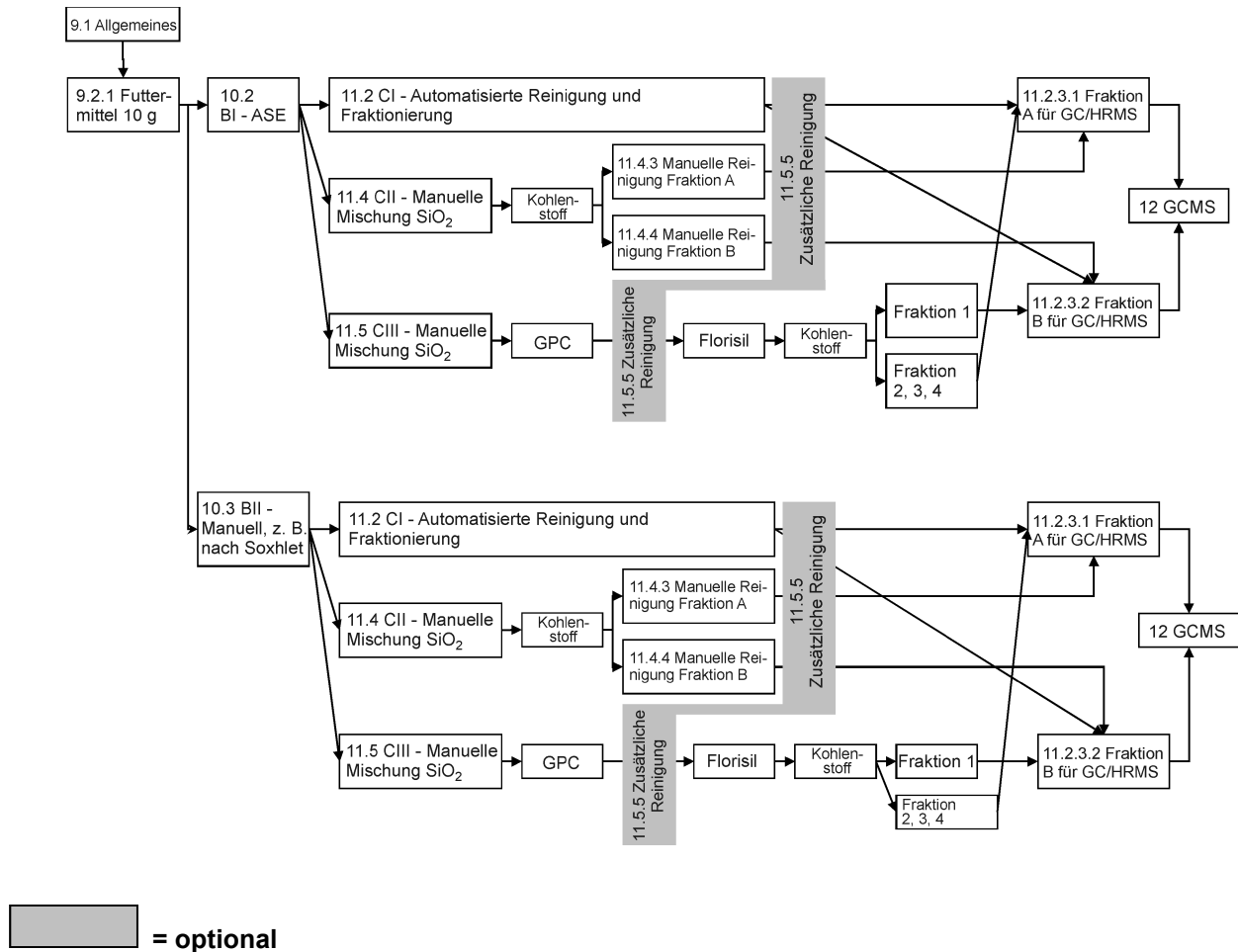


Bild 1 — Fließschema für die Bestimmung von Dioxinen, dl-PCBs und Indikator-PCBs in Futtermitteln

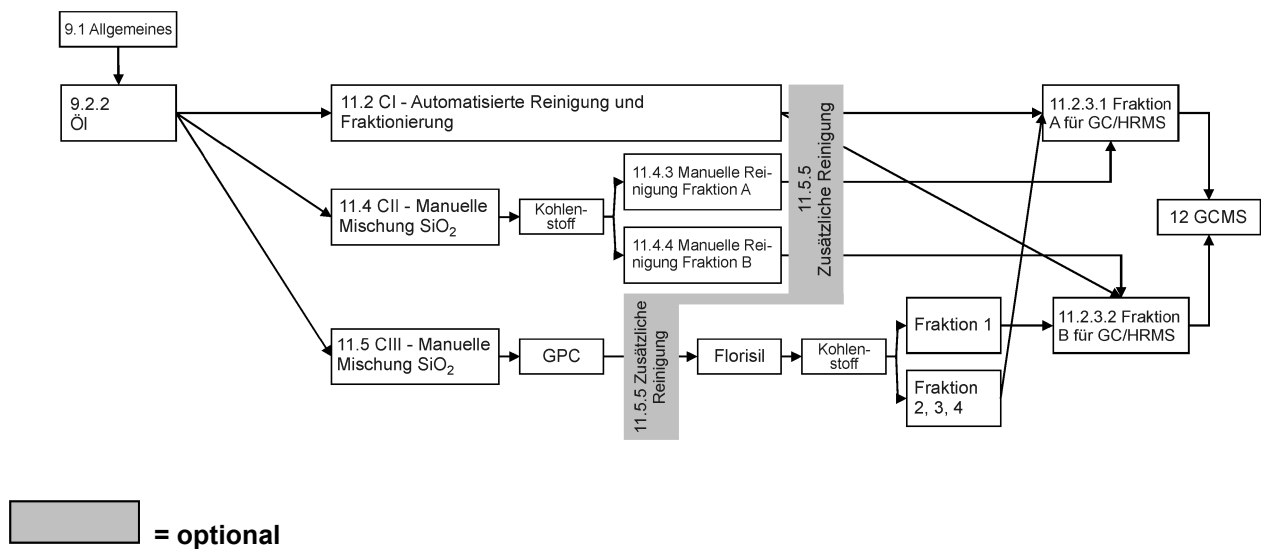


Bild 2 — Fließschema für die Bestimmung von Dioxinen, dl-PCBs und Indikator-PCBs in Öl/Fett

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

prEN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung (ISO/DIS 6498)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Nachweisgrenze

LOD

(en: limit of detection)

geringster gemessener Gehalt, aus dem mit einer annehmbaren statistischen Sicherheit das Vorliegen des Analyten abgeleitet werden kann

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Nachweisgrenze ist numerisch gleich dem Dreifachen der Standardabweichung des Mittelwertes der Blindwertbestimmungen ($n > 10$).

3.2

Bestimmungsgrenze

LOQ

(en: limit of quantification)

niedrigster Gehalt des Analyten, der mit einer annehmbaren statistischen Sicherheit gemessen werden kann.

Anmerkung 1 zum Begriff: Wenn sowohl Richtigkeit als auch Präzision in einem Konzentrationsbereich um die Nachweisgrenze konstant sind, dann ist die Bestimmungsgrenze numerisch gleich dem Sechsfachen der Standardabweichung des Mittelwertes der Blindwertbestimmungen ($n > 10$).

Anmerkung 2 zum Begriff: Bei dl-PCBs und PCDD/F: Die richtige Definition für die Bestimmungsgrenze für jeden Kongener ist entsprechend der Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 152/2009 [6] anzuwenden.

Anmerkung 3 zum Begriff: Die Bestimmungsgrenze sollte sich im Bereich von etwa einem Fünftel des zu untersuchenden Niveaus befinden.

3.3

Futtermittel-Zusatzstoffe

Futtermittel-Zusatzstoffe sind Substanzen, die der in der Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 [7] angeführten Definition von Futtermittel-Zusatzstoffen entsprechen

3.4

oberer, mittlerer und unterer Grenzwert

Obergrenze, Mittelwert, Untergrenze

Ergebnisse des oberen, mittleren und unteren Grenzwerts für den WHO-PCDD/F-TEQ und den WHO-PCB-TEQ werden wie folgt festgelegt: die Konzentrationen am oberen Grenzwert werden in der Annahme berechnet, dass sämtliche Werte der verschiedenen Kongenere unter der Bestimmungsgrenze gleich der Bestimmungsgrenze sind. Beim unteren Grenzwert ist $LOQ = 0$ und beim mittleren Grenzwert wird $1/2 LOQ$ angewendet

4 Kurzbeschreibung

Eine Prüfmenge des Futtermittels oder Futtermittelbestandteils wird mit ^{13}C -markierten internen Standards (Dioxine, Furane, dioxin-ähnliche PCBs und Indikator-PCBs) angereichert und mit einem manuellen oder einem automatisierten Verfahren extrahiert.

Nach der automatisierten oder manuellen Reinigung wird ein Aliquot des Extrakts eingeeengt und mit einem splitlosen Injektor in ein GC/HRMS-Gerät injiziert (eine Alternative ist die PTV-Injektion (en: Programmed Temperature Vaporizer injection), siehe ANMERKUNG).

Die Quantifizierung beruht auf der Isotopenverdünnung. Falls nur Indikator-PCBs gefordert werden, dann können diese mittels GC/LRMS bestimmt werden (z. B. EN 15741, Futtermittel — Bestimmung der OC-Pestizide und PCBs mittels GC/MS-Verfahren [1] und EN 15742, Futtermittel — der OC-Pestizide und PCBs mittels GC/ECD-Verfahren [2]).

Vorbedingungen von kombinierbaren Modulen für die Extraktion und Reinigung sind wie folgt:

- a) Für jedes Extraktionsmodul ist bei Futtermitteln oder Futtermittelbestandteilen eine gleiche Probenmenge von 10 g mit einem Fettgehalt $\leq 25\%$ oder 2,5 g Fett oder Öl erforderlich;
- b) Um die geforderte LOD für Dioxine zu erreichen, ist ein Endvolumen von 10 μl in Kombination mit einem Injektionsvolumen von 2 μl erforderlich. Wird ein anderes Injektionsvolumen angewendet, muss das Endvolumen direkt proportional angepasst werden.

ANMERKUNG Wird eine höhere Empfindlichkeit erforderlich oder wird eine geringere Volumenreduktion gewünscht, ist die Injektion eines größeren Volumens mit PTV (in Anhang A ist ein Beispiel beschrieben) oder eine größere Probenmenge möglich (siehe auch 9.2.2, ANMERKUNG).

5 Reagenzien

Es sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und mit einer für die Dioxin- und PCB-Rückstandsanalyse geeigneten Reinheit zu verwenden. Mit der Durchführung eines Blindwertversuchs unter den gleichen Bedingungen wie für das Verfahren angewendet, ist die Reinheit der Reagenzien und der Referenzmaterialien (z. B. Standardlösungen) zu überprüfen. Das Chromatogramm sollte keine störenden Verunreinigungen während der Retentionszeit der zu untersuchenden Verbindungen zeigen.

WARNUNG — Die Anwendung dieser Europäischen Norm kann mit der Anwendung gefährlicher Stoffe, Verfahrensschritte und Ausrüstungsgegenstände verbunden sein. 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.

5.1 Dioxine, Furane, non-ortho PCBs, mono-ortho PCBs und Indikator-PCBs und deren markierte Analoge

- ^{13}C -Aufstocklösung für PCDD/F (interner Standard);
- ^{13}C -Aufstocklösung für PCB (interner Standard);
- PCDD/F-Kalibrierlösungen;
- PCB-Kalibrierlösungen;
- PCDD/F-Wiederfindungsstandard;
- PCB-Wiederfindungsstandard.

Siehe Anhang B: Beschreibung der Standards und der Konzentrationen der Standardlösungen.

6 Geräte

Sämtliche technischen Beschreibungen sind Beispiele für mögliche Systemeinstellungen und -parameter und müssen an die Ausrüstung des Anwenders angepasst oder für diese übernommen werden.

6.1 Verdampfer, geeignet für Volumina bis zu 200 ml und Einlassöffnung für Stickstoffgas.

6.2 Verdampfungsröhrchen, Endpunkt ungefähr 0,5 ml.

6.3 Homogenisator.

6.4 Pasteurpipette, Borosilikatglas, 150 mm.

6.5 Vortexmischer.

6.6 Messzylinder, Borosilikatglas, 100 ml, Teilung: 2 ml mit einer Messgenauigkeit von $\pm 0,5$ ml.

6.7 Messzylinder, Borosilikatglas mit Glasstopfen, 25 ml, Teilung: 1 ml mit einer Messgenauigkeit von $\pm 0,5$ ml und 50 ml, Teilung: 2 ml mit einer Messgenauigkeit von $\pm 0,5$ ml.

7 Probenahme

Die Probe sollte tatsächlich repräsentativ sein und während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert werden. Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in dieser Europäischen Norm festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 6497 [3] angeführt.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe ist nach prEN ISO 6498 vorzubereiten.

Trockene Produkte oder Produkte mit einem geringen Feuchtegehalt, wie z. B. Getreide und Getreideprodukte, Futtermischungen und Heu, sollten sorgfältig zerkleinert werden, sodass sie vollständig durch ein Sieb mit 1-mm-Maschenweite hindurchgehen. Es ist gründlich zu mischen.

Produkte mit hohem Feuchtegehalt, wie z. B. Gräser und Silagen und flüssige Futtermittel sollten (gefrier-) getrocknet und anschließend sorgfältig zerkleinert werden, sodass sie vollständig durch ein Sieb mit 1-mm-Maschenweite hindurchgehen. Es ist gründlich zu mischen.

Öl oder Fett ist direkt in n-Hexan zu lösen.

9 Durchführung

9.1 Allgemeines

Die folgenden Proben sind in jeder Reihe zu analysieren:

- Verfahrensblindprobe ($n = 1$);
- (zertifiziertes) Referenzmaterial bei geeignetem Niveau oder eine im Laboratorium selbst hergestellte Referenzprobe;
- alle Proben (Maximum = 20).

Die Verfahrensblindprobe sollte frei von Verunreinigungen nahe oder oberhalb der Bestimmungsgrenzen sein.

9.2 Futtermittelprobe und Öl- oder Fettprobe

9.2.1 10 g Futtermittelprobe (12 % Feuchtegehalt)

Eine geeignete Menge, z. B. 10,0 g ($\pm 0,10$ g) der vorbereiteten Untersuchungsprobe sind in eine 100-ml-Glasflasche einzuwiegen. Die Probemenge basiert auf einem Feuchtegehalt von 12 %. Wird die Extraktion mittels druckunterstützter Flüssigextraktion (PFE, en: Pressurized Fluid Extraction) durchgeführt, sind 3 g Kieselgur (Diatomeenerde) hinzuzugeben; es ist gründlich zu mischen. Die Probe ist mit 500 μl ^{13}C -DIOXNOP-2 (Anhang B, B.2.31) und 500 μl ^{13}C -MOPIP-2 (Anhang B, B.2.33) anzureichern und zu inkubieren, bis das Lösemittel verdunstet ist; es ist weiter nach 10.2 (Modul BI) oder 10.3 (Modul BII) zu verfahren. Bei Proben mit mehr als 25 % Fett muss die Probenmenge proportional reduziert werden.

9.2.2 2,5 g Öl- oder Fettprobe

Eine entsprechende Menge, z. B. 2,5 g ($\pm 0,10$ g) der Öl- oder Fettprobe sind in einen 25-ml-Messzylinder (6.7) einzuwiegen. Die Probe ist mit 500 μl ^{13}C -DIOXNOP-2 (Anhang B, B.2.31) und 500 μl ^{13}C -MOPIP-2 (Anhang B, B.2.33) anzureichern. Der Messzylinder ist bis zur Marke (25 ml) mit n-Hexan aufzufüllen. Der Messzylinder ist mit dem Glasstopfen zu verschließen, und es ist gründlich zu mischen. Das Reinigungsverfahren der Probe ist weiter nach 11.2 (Modul CI) oder 11.3 (Modul CII) oder 11.5 (Modul CIII) durchzuführen.

ANMERKUNG Die Berechnung in 13.4 beruht auf einer Probenmenge von 10 g bei einem Futtermittel mit einem Fettgehalt ≤ 25 % und von 2,5 g bei Fett und Öl. Abweichungen von der Probenmenge sollten in den Gleichungen in 13.4 (M = Probenmenge in Gramm) berücksichtigt werden.

10 Extraktion

10.1 Allgemeines

Die für die Extraktion verwendete Probenmenge kann abhängig vom erwarteten Kontaminationsniveau zwischen 5 g und 50 g variieren. Die Berechnung in 13.4 beruht jedoch auf einer Probenmenge von 10 g bei einem Futtermittel mit einem Fettgehalt ≤ 25 % und von 2,5 g bei Fett und Öl. Abweichungen von der Probenmenge sollten in den Gleichungen in 13.4 (M = Probenmenge in Gramm) berücksichtigt werden.

Der aus den in Anhang B, Tabelle B.1, aufgelisteten ^{13}C -markierten Kongeneren bestehende interne Standard muss vor der Extraktion direkt auf die Probe oder vor der Reinigung auf die Ölprobe gegeben werden.

Das Extraktionsverfahren wird unter Anwendung der druckunterstützten Flüssigextraktion (PFE) nacheinander mit Toluol und einem Gemisch aus Toluol/Ethanol (Modul BI) oder der Extraktion nach Soxhlet (Modul BII) durchgeführt. Die Dauer der Extraktion sollte entsprechend der Art und Menge der verwendeten Probe angepasst werden. Die Mindestanforderung an die Extraktion nach Soxhlet sind 50 Extraktionszyklen.

Andere Extraktionsverfahren, wie z. B. die mikrowellenunterstützte Extraktion, können ebenfalls angewendet werden; jedoch müssen sie die gleiche Leistungsfähigkeit nachweisen.

10.2 Modul BI: Extraktion mit automatisiertem druckunterstützten Flüssigextraktions- (PFE) System

10.2.1 Reagenzien und Materialien

10.2.1.1 Kieselgur (Diatomeenerde).

10.2.1.2 n-Hexan, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

10.2.1.3 Toluol, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

10.2.1.4 Ethanol, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

10.2.1.5 Toluol/Ethanol, in Volumenanteilen von 9:1

900 ml Toluol (10.2.1.3) sind mit 100 ml Ethanol (10.2.1.4) gründlich zu mischen. Die Lösung ist bei Raumtemperatur in einer dicht verschlossenen Flasche aufzubewahren. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Jahr haltbar.

10.2.1.6 Wasserfreies Natriumsulfat, für mindestens 24 h bei 160 °C erhitzt.

10.2.1.7 Stickstoff.

10.2.1.8 Silanisierte Glaswolle.

10.2.2 Geräte

10.2.2.1 Gerät für die druckunterstützte Flüssigextraktion

Das Gerät muss die Proben bei 100 °C und 10 MPa extrahieren können.

10.2.2.2 Extraktionszelle für die druckunterstützte Flüssigextraktion, z. B. 30 ml – 40 ml.

10.2.2.3 Messzylinder, Borosilikatglas, 25 ml, Teilung: 1 ml mit einer Messgenauigkeit von $\pm 0,5$ ml.

10.2.2.4 Trichter.

10.2.2.5 Verdampfer, geeignet für Volumina bis zu 200 ml und Einlassöffnung für Stickstoffgas.

10.2.2.6 Verdampfungsröhrchen, 0,5 ml Endpunkt.

10.2.3 Durchführung

Die Probe (9.2.1) ist in eine Extraktionszelle für die druckunterstützte Flüssigextraktion (10.2.2.2) zu geben und mit Kieselgur (10.2.1.1) aufzufüllen; die Extraktionszelle ist im Gerät für die druckunterstützte Flüssigextraktion (10.2.2.1) unterzubringen. Für die Extraktion könnten die folgenden Parameter angewendet werden:

— Temperatur	100 °C;
— Druck	10 MPa;
— Vorheizen	0 min;
— Erhitzen	5 min;
— Ruhephase	15 min;
— Spülen	40 % Volumenanteil der Extraktionszelle, z. B. bei einer 33-ml-Extraktionszelle = 13,2 ml;
— Reinigen	300 s;
— Zyklen	3;
— Lösemittel Zyklus 1	Toluol (10.2.1.3);
— Lösemittel Zyklus 2 und 3	Toluol/Ethanol in Volumenanteilen von 9:1 (10.2.1.5).

Die mit jedem Zyklus erhaltenen Lösemittelextrakte sind zusammenzumischen und über einen Trichter (10.2.2.4) mit einem Glaswollepfropfen (10.2.1.8) und mit 5 g vorgetrocknetem Natriumsulfat (10.2.1.6) zu filtrieren. Mit einem Verdampfer (10.2.2.5) ist das Filtrat einzuengen, bis ein Endvolumen von 0,5 ml erreicht ist. Der Probenextrakt ist aus dem Verdampfungsröhrchen zu entnehmen und in einen 25-ml-Messzylinder mit Glasstopfen (6.7) zu geben; das Verdampfungsröhrchen ist 5-mal mit je 4 ml n-Hexan zu waschen (d. h. mit 20 ml gesamt) (10.2.1.2). Das n-Hexan ist in den Messzylinder zu geben, der den Probenextrakt enthält. Mit n-Hexan (10.2.1.2) ist bis zur Marke (25 ml) aufzufüllen; der Messzylinder ist mit dem Glasstopfen zu verschließen und die Lösung gründlich zu mischen. Das Probenreinigungsverfahren ist mit dem automatisierten Verfahren (Modul CI, 11.2) oder bei dem Abschnitt, der das manuelle Verfahren anwendet (Modul CII, 11.3 oder CIII, 11.5), fortzusetzen.

ANMERKUNG Unter der Voraussetzung, dass die Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 152/2009 [6] eingehalten wird, können vergleichbare Verfahren in Kombination mit geeigneten Parametern angewendet werden.

10.3 Modul BII: Manuelles Extraktionsverfahren

10.3.1 Reagenzien und Materialien

10.3.1.1 DCM, Dichlormethan, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

10.3.1.2 Toluol, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

10.3.1.3 Ethanol, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

10.3.1.4 n-Hexan, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

10.3.1.5 Toluol/Ethanol, in Volumenanteilen von 9:1

900 ml Toluol (10.2.1.3) sind mit 100 ml Ethanol (10.2.1.4) gründlich zu mischen. Die Lösung ist bei Raumtemperatur in einer dicht verschlossenen Flasche aufzubewahren. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Jahr haltbar.

10.3.1.6 Wasserfreies Natriumsulfat, für mindestens 24 Stunden bei 160 °C erhitzt.

10.3.1.7 Messzylinder, Borosilikatglas, 25 ml, Teilung: 1 ml mit einer Messgenauigkeit von $\pm 0,5$ ml.

10.3.1.8 Silanisierte Glaswolle.

10.3.2 Geräte

10.3.2.1 Extraktionshülsen, gereinigt durch Extrahieren in der Apparatur nach Soxhlet für 2 h mit DCM (10.3.1.1).

10.3.2.2 Umlaufkühler.

10.3.2.3 Apparatur nach Soxhlet.

10.3.2.4 Heizgerät, z. B. Mantel.

10.3.2.5 Siedesteinchen.

10.3.2.6 Rundkolben, (RBF, en: round bottom flask), Borosilikatglas, 500 ml.

10.3.2.7 Trichter, Standard, 150 mm, Durchmesser 80 mm, Borosilikatglas.

10.3.2.8 Verdampfer, geeignet für Volumina bis zu 200 ml und Einlassöffnung für Stickstoffgas.

10.3.2.9 Verdampfungsröhrchen, 0,5 ml Endpunkt.

10.3.3 Durchführung

Die Apparatur nach Soxhlet (10.3.2.3) einschließlich der Rundkolben (RBF) (10.3.2.6) ist anschließend mit Toluol (10.3.1.2) und Dichlormethan (DCM) (10.3.1.1) zu waschen. Der Umlaufkühler (10.3.2.2) ist einzuschalten und die Kühlung laufen zu lassen. Die Probe (9.2.1) ist in die vorbereitete Extraktionshülse (10.3.2.1) einzubringen, und die mit silanisierter Glaswolle (10.3.1.8) verschlossenen Hülsen (10.3.2.1) sind in der Apparatur nach Soxhlet (10.3.2.3) unterzubringen. 200 ml Toluol (10.3.1.2) und 3 bis 6 Siedesteinchen (10.3.2.5) sind in den RBF (10.3.2.6) zu geben und dieser im Heizmantel (10.3.2.4) unterzubringen. Sämtliche Ausrüstungen der Apparatur nach Soxhlet sind einschließlich des Kühlers miteinander zu verbinden, und alle Dichtungen sind auf ihre Dichtheit zu überprüfen. Der Durchlauf der Apparatur nach Soxhlet ist auf eine Geschwindigkeit von 5 Zyklen je Stunde bis 7 Zyklen je Stunde einzustellen. Die Extraktion nach Soxhlet ist für 4 h laufen zu lassen.

Die Heizmntel sind abzuschalten, die Apparatur ist abkühlen zu lassen und der RBF mit dem Toluol aus der Apparatur nach Soxhlet zu entfernen. 200 ml Toluol/Ethanol (10.3.1.5) und 3 Siedesteinchen bis 6 Siedesteinchen (10.3.2.5) sind in einen neuen RBF (10.3.2.6) zu geben und im Heizmantel (10.3.2.4) unterzubringen. Sämtliche Ausrüstungen der Apparatur nach Soxhlet sind einschließlich des Kondensators miteinander zu verbinden, und alle Dichtungen sind auf ihre Dichtheit zu überprüfen. Der Durchlauf der Apparatur nach Soxhlet ist auf eine Geschwindigkeit von 5 Zyklen je Stunde bis 7 Zyklen je Stunde einzustellen. Die Extraktion nach Soxhlet ist für 16 h bis 20 h oder über Nacht aufrecht zu erhalten.

Die Heizmntel sind abzuschalten, die Apparatur ist abzukühlen zu lassen und Toluolextrakt und Toluol/Ethanol-Extrakt sind zusammenzumischen. Der Extrakt nach Soxhlet ist durch einen mit einem Pfropfen aus silanisierter Glaswolle (10.3.1.8) und 5 g wasserfreiem Natriumsulfat (10.3.1.6) ausgestatteten Trichter zu filtrieren. Mit einem Verdampfer (6.1) ist das Filtrat einzuengen, bis das Lösemittel verdampft ist (auf etwa 0,5 ml). Der Probenextrakt ist aus dem Verdampfungsröhrchen zu entnehmen und in einen 25-ml-Messzylinder mit Glasstopfen (6.7) zu geben; das Verdampfungsröhrchen ist 5-mal mit je 4 ml n-Hexan zu waschen (d. h. mit 20 ml gesamt) (10.3.1.4). Das n-Hexan ist in den Messzylinder zu geben, der den Probenextrakt enthält. Mit n-Hexan (10.3.1.4) ist bis zur Marke (25 ml) aufzufüllen, der Messzylinder mit dem Glasstopfen zu verschließen und die Lösung gründlich zu mischen. Das Probenreinigungsverfahren ist mit dem automatisierten Verfahren (Modul CI, 11.2) oder bei dem Abschnitt, der das manuelle Verfahren anwendet (Modul CII, 11.3 oder CIII, 11.5), fortzusetzen.

ANMERKUNG Unter der Voraussetzung, dass die Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 152/2009 [6] eingehalten wird, können vergleichbare Verfahren, z. B. nach Twisselmann (Heißextraktion), in Kombination mit geeigneten Parametern angewendet werden. Außerdem kann das azeotrope Gemisch von Toluol/Ethanol in Volumenanteilen von 3:7 angewendet werden.

11 Reinigung

11.1 Allgemeines

Reinigungsverfahren müssen den Probenextrakt in geeigneter Weise für die nachfolgende quantitative Bestimmung vorbereiten. Die Reinigungsverfahren müssen die Aufgabe erfüllen, PCDD/PCDF und dioxin-ähnliche PCBs in den Extrakten zu konzentrieren und störende, im Rohextrakt auftretende Matrixkomponenten zu entfernen.

Nachfolgend sind die Prinzipien der häufig angewendeten Reinigungstechniken kurz beschrieben.

— Gelpermeations-Chromatographie

Der zu untersuchende Molekularmassebereich für PCDD/PCDF und dioxin-ähnliche PCBs von 200 g/mol bis 500 g/mol kann von groeren Molekülen, wie z. B. Fett/Öl und Polymeren, die möglicherweise andere Reinigungsverfahren überladen, getrennt werden.

— Mehrschichtige Säule

Flüssigkeitschromatographie mit mehrschichtiger Säule auf Kieselgel verschiedener Aktivitätsstufen und Oberflächenmodifikationen. Verbindungen mit anderen chemischen Eigenschaften als PCDD/PCDF und dioxin-ähnliche PCBs können entfernt werden.

— Behandlung mit Schwefelsäure

Eine direkte Behandlung des Probenextraktes zum Entfernen oxidierbarer Koextrakte mit Schwefelsäure ist möglich, wird jedoch aus Sicherheitsgründen nicht empfohlen. Außerdem muss diese Behandlung sehr sorgfältig durchgeführt werden, um Verluste an PCDD/PCDF und dioxin-ähnlichen PCBs auf den sich bildenden kohlenstoffhaltigen Oberflächen zu vermeiden. Dieses Verfahren ist in der vorliegenden Norm nicht beschrieben; es könnte jedoch für die Anfangsbehandlung von stark verschmutzten Öl- oder Fettproben, z. B. Frittieröl, angewendet werden.

— Aktivkohlesäule

Die Sulenadsorptions-Chromatographie mit Aktivkohle kann zur Trennung planarer PCDD/PCDF und coplanarer PCB-Molekülen von mono-ortho PCB und anderen störenden nichtplanaren Molekülen angewendet werden. Zusätzlich kann die Aktivkohle ebenfalls zur Reinigung der PCDD/PCDF-Fraktion oder einzelner non-ortho PCBs, mono-ortho PCBs und Indikator-PCBs verwendet werden.

— Aluminiumoxidsäule

Säulenflüssigkeitschromatographie auf Aluminiumoxid verschiedener Aktivitätsstufen und unterschiedlicher Acidität oder Basizität. Störende Verbindungen mit geringen Unterschieden in der Polarität oder Struktur, verglichen mit den PCDD/PCDF und dioxin-ähnlichen PCBs, können entfernt werden.

Zusätzliche Aluminiumoxidsäulen können zur Trennung der PCDD/PCDF von den dioxin-ähnlichen PCBs angewendet werden.

— Florisilsäule

Die Säulenflüssigkeitschromatographie auf Florisil verschiedener Aktivitätsstufen kann zur Trennung der PCDD/PCDF von den PCBs, ebenso von dioxin-ähnlichen PCBs und anderen störenden Verbindungen mit geringen Unterschieden in der Polarität oder Struktur im Vergleich zu den PCDD/PCDF angewendet werden.

— Probenreinigungsverfahren

Bewährte Reinigungsverfahren müssen üblicherweise zwei oder mehr der vorstehend beschriebenen Techniken enthalten, die in unterschiedlicher Reihenfolge kombiniert werden können. Eine ausführliche Beschreibung der automatisierten Reinigungsverfahren ist in Modul CI (automatisiertes Verfahren) aufgeführt. In Modul CII und Modul CIII sind manuelle Verfahren beschrieben. Während Modul CII die Reinigung über eine gemischte Kieselgelsäule, gefolgt von einer Aktivkohlesäule beschreibt, dabei werden non-ortho PCBs und PCDD/PCDF von mono-ortho PCBs und Indikator-PCBs getrennt. Modul CIII beschreibt ein Reinigungsverfahren mit gemischtem Kieselgel, gefolgt von GPC oder Florisil. Andere Verfahren können ebenfalls angewendet werden, müssen aber erwiesenermaßen die gleiche Leistungsfähigkeit haben wie die in den Modulen C beschriebenen Verfahren.

11.2 Modul CI: Automatisierte Reinigung

11.2.1 Allgemeines

Das Reinigungsverfahren besteht aus einem umfangreichen automatisierten System. Die Extrakte werden mit einer Pumpe in das System überführt und nacheinander an einer sauren Kieselgelsäule, einer neutralen Kieselgelsäule, einer basischen Kieselgelsäule und an einer Aktivkohle/Celit-Säule gereinigt. Zur Elution der Säulen werden kundenspezifisch hergestellte Lösemittel und Gemische verwendet: n-Hexan, n-Hexan/Dichlormethan in Volumenanteilen von 1:1, Ethylacetat/Toluol in Volumenanteilen von 1:1 und Toluol. Das Programm kann von <http://www.rikilt.wur.nl/UK/services/Analyses/Dioxine+analysis/> [11] heruntergeladen werden.

Nach dem automatisierten Verfahren werden zwei Fraktionen erhalten: mono-ortho-substituierte PCBs und Indikator-PCBs (Fraktion A) und planare PCDD/F und non-ortho-substituierte PCBs (Fraktion B). Besonders bei verschmutzten komplexen Proben (oxidiertes Fett/Öl) kann möglicherweise für die zusätzliche Reinigung eine Säule mit dünner Kieselgelschicht angewendet werden.

11.2.2 Reagenzien und Materialien

11.2.2.1 Toluol, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

11.2.2.2 n-Hexan, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

11.2.2.3 Dichlormethan, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

11.2.2.4 Ethylacetat, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

11.2.2.5 Ethylacetat/Toluol, in Volumenanteilen von 1:1

1 l Ethylacetat (11.2.2.4) ist mit 1 l Toluol (11.2.2.1) gründlich zu mischen. Die Lösung ist bei Raumtemperatur in einer dicht verschlossenen Flasche aufzubewahren. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Jahr haltbar.

11.2.2.6 Dichlormethan/n-Hexan, in Volumenanteilen von 1:1

1 l Dichlormethan (11.2.2.3) ist mit 1 l n-Hexan (11.2.2.2) gründlich zu mischen. Die Lösung ist bei Raumtemperatur in einer dicht verschlossenen Flasche aufzubewahren. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 5 Jahre haltbar, wenn die Masse durch Zugabe von Lösemittel zum Ersetzen der Verdampfungsverluste sorgfältig kontrolliert wird.

11.2.2.7 Isooctan, Reinheitsgrad für HPLC.

11.2.2.8 Schwefelsäure H_2SO_4 , 96%ig, spezifische Dichte 1,84.

11.2.2.9 Kieselgel 63–200 (Silicagel), Porengröße 63 µm bis 200 µm.

11.2.2.10 NaOH-Pellets.

11.2.2.11 NaOH, 1 mol/l

40,0 g NaOH-Pellets (11.2.2.10) sind in 1 l Wasser zu lösen.

11.2.2.12 Säulen auf saurem Kieselgel mit hoher Adsorptionsfähigkeit (Hochleistungs-Kieselgel) zum Einmalgebrauch (gepackt mit 45 g saurem Kieselgel)

Saures Kieselgel mit hoher Adsorptionsfähigkeit zum Einmalgebrauch wird hergestellt durch Mischen konzentrierter H_2SO_4 (11.2.2.8) mit Kieselgel 63-200 (11.2.2.9) in Volumen-/Massenanteilen von 11:25 und anschließendes Schütteln, bis das Gemisch frei fließend und frei von Klumpen ist. Vor dem Ansäuern wird das Kieselgel für 5 h bei 500 °C wärmebehandelt.

11.2.2.13 Neutrales Kieselgel

Neutrales Kieselgel wird hergestellt durch Mischen von DI-Wasser mit Kieselgel 63–200 (11.2.2.9) in Volumen-/Massenanteilen von 1:19 und anschließendes Schütteln, bis das Gemisch frei fließend und frei von Klumpen ist.

11.2.2.14 Basisches Kieselgel

Basisch modifiziertes Kieselgel wird hergestellt durch Mischen von 1 mol/l NaOH (11.2.2.11) mit Kieselgel 63–200 l (11.2.2.9) in Volumen-/Massenanteilen von 3:10 und anschließendes Schütteln, bis das Gemisch frei fließend und frei von Klumpen ist.

11.2.2.15 Aktivkohle AX-21.

11.2.2.16 Celit (Kieselgur).

11.2.2.17 Methanol, in einer Glasapparatur destilliert.

11.2.3 Geräte

11.2.3.1 Automatisiertes Probenreinigungssystem

Das System muss in der Lage sein, Proben mit unterschiedlichen Lösemitteln automatisch jeweils an einer Kieselgel-, Aluminiumoxid- und Aktivkohlesäule zu reinigen.

11.2.3.2 Säule auf saurem Kieselgel mit hoher Adsorptionsfähigkeit (Hochleistungs-Kieselgel) zum Einmalgebrauch, z. B. Fluid Management System, Watertown, USA (siehe 11.2.4.3 ANMERKUNG 1).

11.2.3.3 Lineare (Mixed-Bed-) Kieselgelsäule.

11.2.3.4 Aluminiumoxidsäule, 11 g basisches Aluminiumoxid

Aluminiumoxid wird für 12 h bei 1 000 °C aktiviert.

11.2.3.5 **Aktivkohlesäule**, 0,34 g Gemisch aus Aktivkohle AX-21/Celit

Aktivkohle AX-21 (11.2.2.15) wird mit Methanol (11.2.2.17) gewaschen, trocknen gelassen und anschließend für 72 h bei 130 °C wärmebehandelt. Das Gemisch ist in Aktivkohle/Celit-Massenanteilen von 2:23 herzustellen.

11.2.3.6 Verbindungsstück, für Säule mit saurem Kieselgel mit hoher Adsorptionsfähigkeit zum Einmalgebrauch.

11.2.3.7 Verbindungsstück, für Mixed-Bed-, Aluminiumoxid- und Aktivkohlesäulen.

11.2.3.8 Gläschen für den automatischen GC-Probengeber (GC-Autosampler), etwa 2 ml.

11.2.3.9 Mikroeinsätze mit flachem Boden, etwa 0,2 ml.

11.2.3.10 Verdampfer, geeignet für Volumina bis zu 200 ml und Einlassöffnung für Stickstoffgas.

11.2.3.11 Verdampfungsröhrchen, 0,5 ml Endpunkt

11.2.4 Durchführung

11.2.4.1 Ein automatisiertes Reinigungssystem ist anzuwenden, das zur Extraktion und Reinigung von toxischen Verbindungen aus Umwelt-, Lebensmittel- und Futtermittelproben, wie z. B. Dioxine, Furane, dioxin-ähnliche PCBs und Indikator-PCBs, gestaltet ist.

Zu den Probenextrakten von 25 ml (hergestellt nach 9.2.2 oder 10.2 oder 10.3) werden 50 µl ³⁷Cl₄-2,3,7,8-TCDD-Reinigungsstandard (Anhang B, Abschnitt B.2.3) hinzugefügt, und die Lösung wird homogenisiert (6.3). Der Messzylinder, der den in n-Hexan verdünnten Probenextrakt enthält, wird im automatisierten Probenreinigungssystem (11.2.3.1) untergebracht. In 24 automatisierten Schritten wird die Probe gereinigt und die mono-ortho PCBs und die Indikator-PCBs werden in der Fraktion „A“ und die Dioxine/Furane und die non-ortho PCBs in der Fraktion „B“ gesammelt. In Tabelle C.1 sind die 24 automatisierten Schritte beschrieben, siehe Anhang C.

In den ersten 13 Schritten wird das System (Säulen und Schlauchverbindungen) mit dem Lösemittel gewaschen. In den Schritten 1 bis 4 wird n-Hexan (11.2.2.2) zum Waschen und im Schritt 5 zur Konditionierung der Verbindung von der Säule auf saurem Kieselgel mit hoher Adsorptionsfähigkeit zum Einmalgebrauch (11.2.3.2) und der linearen (Mixed-Bed-) Kieselgelsäule (11.2.3.3) verwendet. In den Schritten 6 und 7 wird Toluol (11.2.2.1) für die Reinigung der Schlauchverbindung und der Aktivkohlesäule verwendet. Weiterhin werden in den Schritten 8 und 9 sowie 10 und 11 die Schlauchverbindung und die Aktivkohlesäule mit Gemischen von Lösemitteln mit abnehmender Polarität gespült, um mit n-Hexan (11.2.2.2) in den Schritten 12 und 13 zu enden. Schritt 14 umfasst die Überführung des Probenextrakts durch die kombinierten Kieselgelsäulen zur Aluminiumoxidsäule (11.2.3.4). Schritt 15 eluiert die kombinierten Kieselgel- und die Aluminiumoxidsäulen mit n-Hexan (11.2.2.2). Die Verunreinigungen werden in der Aluminiumoxidsäule adsorbiert. In Schritt 16 wird die Schlauchverbindung mit Dichlormethan/n-Hexan (11.2.2.6) gespült. Anschließend (Schritt 17) wird die Aluminiumoxidsäule mit Dichlormethan/n-Hexan (11.2.2.6) eluiert. Die eluierten Verbindungen werden direkt zur Aktivkohlesäule (11.2.3.5) geführt. Mono-ortho PCBs und Indikator-PCBs gehen durch die Aktivkohlesäule und werden in der Fraktion „A“ gesammelt. Die Schritte 18 und 19 sind zum Spülen der Schlauchverbindung und der Aktivkohlesäule mit Ethylacetat/Toluol (11.2.2.5) vorgesehen. Anschließend (Schritte 20 und 21) werden die gleiche Schlauchverbindung und die Säule mit n-Hexan (11.2.2.2) gespült. Schritt 22 beinhaltet das Waschen der Schlauchverbindung mit Toluol (11.2.2.1). In Schritt 23 wird die Aktivkohlesäule in umgekehrter Richtung mit Toluol (11.2.2.1) eluiert und die Fraktion „B“ gesammelt. Am Ende des Verfahrens (Schritt 24) wird die Schlauchverbindung mit n-Hexan (11.2.2.2) gewaschen.

11.2.4.2 Die Fraktion „A“ wird im graduieren 200-ml-Glasverdampfungsröhrchen gesammelt. Das den Extrakt enthaltende Verdampfungsröhrchen (6.2) wird in der Verdampfereinheit (6.1) mit der Badtemperatur bei (40 ± 2) °C untergebracht und der Stickstoffdruck ist auf ~ 0,7 bar einzustellen. Die sensorische Endpunktdetektion ist zu wählen und mit dem Einengen zu beginnen. Es ist zu beachten, dass der angezeigte Druck während der Anwendung unter 0,7 bar fallen kann. Wenn das Volumen um etwa ein Viertel, die Hälfte und um