

DIN EN 16215



ICS 65.120

Ersatz für
DIN EN 16215:2012-07

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Dioxinen und dioxin-ähnlichen PCB mittels GC/HRMS und
von Indikator-PCB mittels GC/HRMS;
Deutsche Fassung EN 16215:2020**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC/HRMS and of indicator PCBs by
GC/HRMS;
German version EN 16215:2020

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Dosage des dioxines, des PCB de type dioxine et des PCB indicateurs par GC/HRMS;
Version allemande EN 16215:2020

Gesamtumfang 59 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16215:2020) wurde von der Arbeitsgruppe 1 „Organische Kontaminanten“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) des Technischen Komitees CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird, unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ (Spiegelausschuss zu CEN/TC 327) im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Diese Norm enthält nationale Fußnoten.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 16215:2012-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) falsche technische Angaben sind berichtigt worden;
- b) Verweisungen in Abschnitt 2 und in den Literaturhinweisen sind aktualisiert worden;
- c) Unstimmigkeiten/Widersprüche wurden beseitigt;
- d) Norm wurde redaktionell überarbeitet und an die derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Frühere Ausgaben

DIN EN 16215: 2012-07

Deutsche Fassung

Futtermittel:
Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung von Dioxinen und dioxin-ähnlichen PCB mittels GC/HRMS und von Indikator-PCB mittels
GC/HRMS

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis

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

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et
d'analyse —

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

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 11. November 2019 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 CEN-CENELEC-Management-Zentrum 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, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
5 Reagenzien	9
5.1 Allgemeines	9
5.2 Dioxine, Furane, non-ortho PCB, mono-ortho PCB sowie nicht dioxin-ähnliche PCB und deren markierte Analoge	9
6 Geräte	10
7 Probenahme	10
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	10
9 Durchführung	10
9.1 Allgemeines	10
9.2 Futtermittelprobe und Öl- oder Fettprobe	11
10 Extraktion	11
10.1 Allgemeines	11
10.2 Modul BI: Extraktion mit automatisiertem druckunterstützten Flüssigextraktions- (PFE) System	11
10.3 Modul BII: Manuelles Extraktionsverfahren	13
11 Reinigung	14
11.1 Allgemeines	14
11.2 Modul CI: Automatisierte Reinigung	16
11.3 Modul CII: Manuelle Probenreinigung, Entfernen von Fett und Gruppentrennung	19
11.4 Zusätzliche Reinigungsschritte für die Fraktion A und Fraktion B von Modul CII	23
11.5 Modul CIII: Entfernen der Matrix, manuelle Reinigung der Probe und Gruppentrennung	26
12 Modul D: Gaschromatographie mit hochauflösender Massenspektrometrie (GC/HRMS)	30
12.1 Allgemeines	30
12.2 Reagenzien und Materialien	30
12.3 Durchführung	31
13 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	33
13.1 Allgemeines	33
13.2 Kalibrierung durch Isotopenverdünnung	33
13.3 Linearität	33
13.4 Kalibrierkriterien	33
13.5 Identifizierung und Bestätigung	33
13.6 Berechnung	34
13.7 Toxizitätsäquivalent-Werte (TEQ-Werte)	36
13.8 Wiederfindungsrate	37
14 Präzision	37

15	Untersuchungsbericht	39
	Anhang A (informativ) Beschreibung des PTV-Injektionssystems	40
	Anhang B (informativ) Beschreibung der Standards und der Konzentration der Standardlösungen	42
	Anhang C (informativ) Beispiel des automatisierten Verfahrens	50
	Anhang D (informativ) Massenspektrometer (MS)	52
	Anhang E (informativ) Anwendung der zusätzlichen Reinigung nach der Fraktionierung mit einer kleinen mehrschichtigen Kieselgelsäule.....	56
	Literaturhinweise.....	57

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 16215:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Juli 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juli 2020 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN 16215:2012.

Im Vergleich mit der vorhergehenden Ausgabe sind die folgenden technischen Änderungen vorgenommen worden:

- falsche technische Angaben sind berichtigt worden;
- Verweisungen wurden aktualisiert;
- Unstimmigkeiten wurden bereinigt; und
- redaktionelle Anpassungen sind vorgenommen worden.

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

Einleitung

Die vorhergehende Ausgabe dieses Dokuments entstand infolge der Richtlinie 2002/32/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 7. Mai 2002 über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung. Das Dokument unterstützt aktiv Analytiklaboratorien im Bereich der Futtermittelanalytik mit Anleitung für die Analyse von Dioxinen und PCB und erfüllt Kriterien, die in der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 vom 27. Januar 2009 der Kommission zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln festgelegt sind.

In dieser aktualisierten Version wurden offensichtliche Fehler bereinigt.

WARNUNG — Die Anwendung dieses Dokuments kann mit der Anwendung gefährlicher Stoffe, Verfahrensschritte und Ausrüstungsgegenstände verbunden sein. Diese Norm kann jedoch nicht alle mit ihrer Anwendung verbundene Sicherheitsprobleme anführen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Europäischen Norm, vor Anwendung angemessene Sicherheits- und Gesundheitsvorkehrungen zu treffen und zu prüfen, welche einschränkenden Vorschriften zu berücksichtigen sind.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument ist anwendbar für die Bestimmung von polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen (PCDD), polychlorierten Dibenzofuranen (PCDF), (zusammen als „Dioxine“ bezeichnet [PCDD/F]) und dioxin-ähnlichen PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB (dl-PCB und ndl-PCB) in Futtermitteln. Ringversuche sind durchgeführt worden. Das Verfahren ist für die Bestimmung von Dioxinen, dl-PCB und ndl-PCB bei der entsprechenden MRL in Mischfutter und Inhaltsstoffen, z. B. Öl, Tonmineral, geeignet. Das Verfahren ist auf Proben anwendbar, die Spurenkonzentrationen von einem Dioxin oder mehreren Dioxinen, dioxin-ähnlichen PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB enthalten. Die Bestimmungsgrenze (LOQ) beträgt

- 0,05 pg/g (OCDD/*F* = 0,1 pg/g) für die relevanten einzelnen Kongeneren der Dioxine/Furane,
- 0,05 pg/g für non-ortho PCB,
- 10 pg/g für mono-ortho PCB und
- 100 pg/g für nicht dioxin-ähnliche PCB.

Für die Bestimmung von Dioxinen und dioxin-ähnlichen PCB kann das Verfahren, wie in der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission [1] für Dioxine und dl-PCB in Futtermitteln festgelegt, als Bestätigungsverfahren angewendet werden. Bestätigungsverfahren, wie in dieser Norm beschrieben, sind Verfahren mit hochauflösender Gaschromatographie/hochauflösender Massenspektrometrie (HRGC/HRMS). Falls nur die Analyse der nicht dioxin-ähnlichen PCB erforderlich ist, kann ein GC-LRMS-Verfahren (z. B. EN 15741 [2]) angewendet werden, vorausgesetzt, dass für die zu untersuchende Matrix im relevanten Bereich die entsprechenden analytischen Leistungskriterien erfüllt werden.

Dieses Dokument ist in vier Module aufgeteilt. Jedes Modul beschreibt einen Teil des gesamten Verfahrens (siehe Bild 1 und Bild 2) wie folgt:

- 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. Das Kombinieren von Modulen und/oder Alternativen ermöglicht ein hochflexibles, „leistungsbezogenes“ Verfahren. Es ist zulässig, das Verfahren zu verändern, wenn sämtliche Leistungskriterien entsprechend der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission [1] 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.

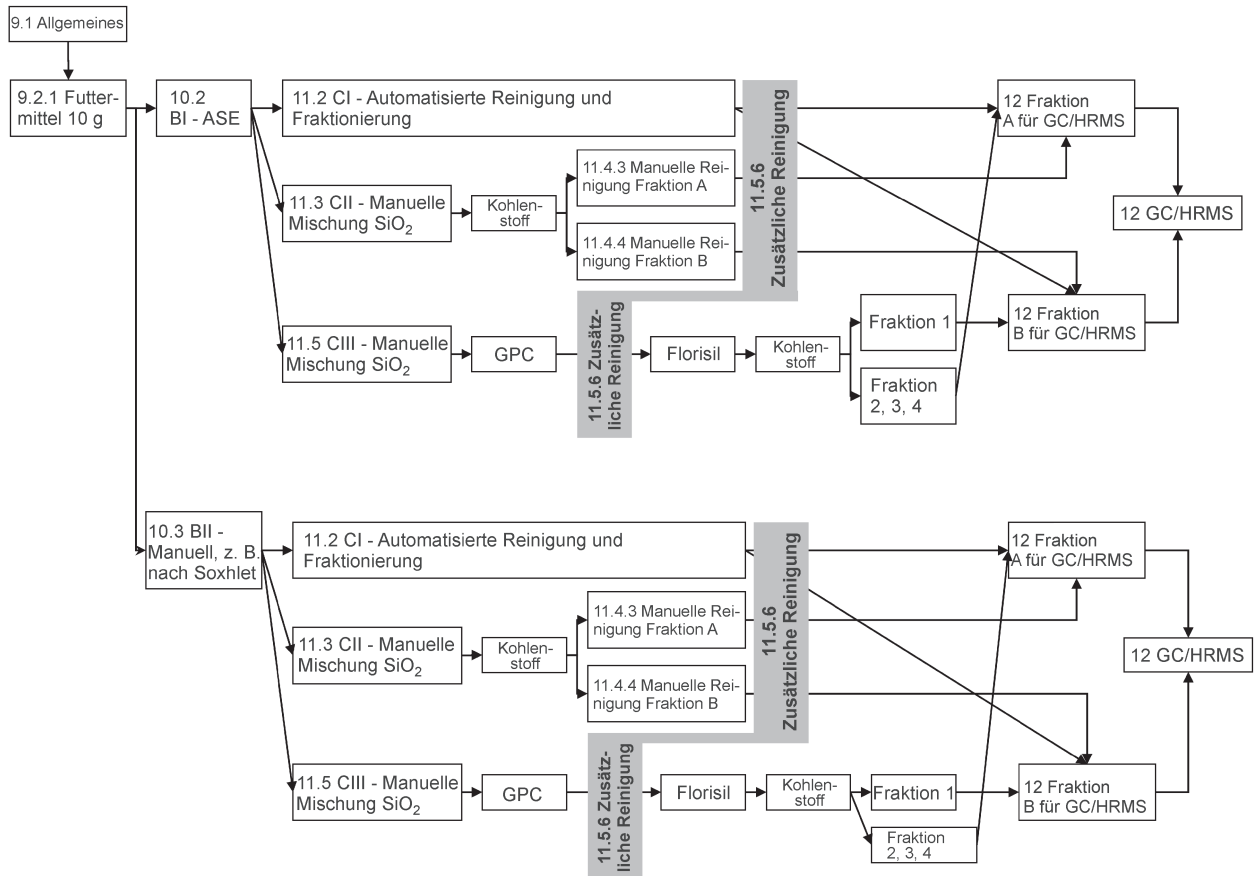


Bild 1 — Fließschema für die Bestimmung von Dioxinen, dl-PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB in Futtermitteln

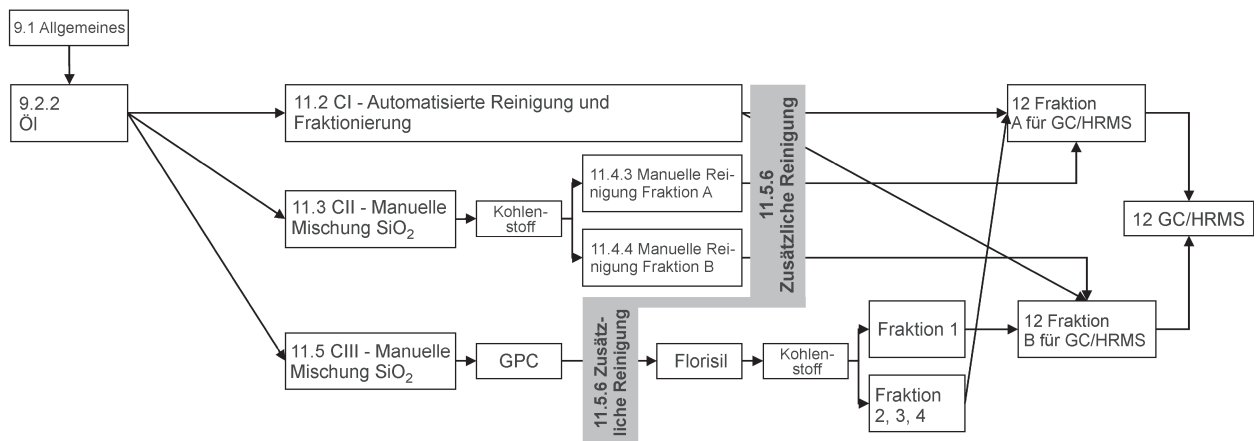


Bild 2 — Fließschema für die Bestimmung von Dioxinen, dl-PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB in Öl und Fett

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung (ISO 6498)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>

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-PCB und PCDD/F: Die richtige Definition für die Bestimmungsgrenze für jeden Kongener ist entsprechend der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission [1] anzuwenden.

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

3.3

Futtermittel-Zusatzstoffe

Substanzen, die der in der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 der Kommission [3] angeführten Definition von Futtermittel-Zusatzstoffen entsprechen

3.4

obere, mittlere und untere Grenzwert-Konzentrationen für den WHO-PCDD/F-TEQ und den WHO-PCB-TEQ

Konzentrationen, die in der Annahme berechnet werden, dass sämtliche Werte der verschiedenen Kongenere unter der Bestimmungsgrenze gleich der Bestimmungsgrenze sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei den unteren Grenzwert-Konzentrationen wird $LOQ = 0$ angewendet. Bei den mittleren Grenzwert-Konzentrationen wird $1/2 LOQ$ angewendet.

4 Kurzbeschreibung

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

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

Die Quantifizierung beruht auf der Isotopenverdünnung.

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

- a) für jedes Extraktionsmodul ist bei Futtermitteln oder Futtermittelbestandteilen eine gleiche Probenaufnahme von 10 g mit einem Fettgehalt $\leq 25\%$ oder 2,5 g Fett oder Öl erforderlich;
- b) um die geforderte LOQ 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 Für den Fall, dass eine höhere Empfindlichkeit erforderlich ist oder eine geringere Volumenreduktion gewünscht wird, ist die Injektion eines größeren Volumens mit PTV (in Anhang A ist ein Beispiel beschrieben) oder eine größere Probenaufnahme möglich (siehe auch 9.2.2, ANMERKUNG).

5 Reagenzien

5.1 Allgemeines

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 interessierenden Verbindungen zeigen.

5.2 Dioxine, Furane, non-ortho PCB, mono-ortho PCB sowie nicht dioxin-ähnliche PCB 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 für eine Beschreibung der Standards und der Konzentrationen der Standardlösungen.

6 Geräte

Sämtliche technischen Beschreibungen sind Beispiele für mögliche Systemeinstellungen und -parameter und sollten 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 etwa 0,5 ml.

6.3 Homogenisator.

6.4 Pasteurpipette, Borosilikatglas, Länge etwa 150 mm.

6.5 Vortexmischer.

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

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

7 Probenahme

Die Probe sollte tatsächlich repräsentativ sein und während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden sein. Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Ein empfohlenes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 6497 [4] angeführt.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe ist nach EN 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 werden direkt in n-Hexan gelöst.

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 an den 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. $(10,0 \pm 0,10)$ g der vorbereiteten Untersuchungsprobe sind in eine 100 ml-Glasflasche einzuwägen. Die Probemenge basiert auf einem Feuchtegehalt von 12 %. Wird die Extraktion mittels druckunterstützter Flüssigextraktion (en: Pressurized Fluid Extraction, PFE) durchgeführt, sind 3 g Kieselgur (Diatomeenerde) hinzuzugeben; es ist gründlich zu mischen. Die Probe ist mit 500 μ l ^{13}C -DIOXNOP-2 (Anhang B, B.2.31) und 500 μ l ^{13}C -MOPIP-2 (Anhang B, B.2.33) anzureichern und zu bebrüten, 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 sollte die Probenaufnahme proportional reduziert werden.

9.2.2 2,5 g Öl- oder Fettprobe

Eine entsprechende Menge, z. B. $(2,5 \pm 0,10)$ g der Öl- oder Fettprobe sind in einen 25 ml-Messzylinder (6.7) einzuwägen. Die Probe ist mit 500 μ l ^{13}C -DIOXNOP-2 (Anhang B, B.2.31) und 500 μ l ^{13}C -MOPIP-2 (Anhang B, B.2.33) anzureichern. Der Messzylinder ist bis zur 25 ml Marke 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 13.6 beruht auf einer Probenaufnahme von 10 g bei einem Futtermittel mit einem Fettgehalt ≤ 25 % und von 2,5 g bei Fett und Öl. Abweichungen von der Probenaufnahme können in den Gleichungen in 13.6 (M = Probenaufnahme 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 13.6 beruht jedoch auf einer Probenaufnahme von 10 g bei einem Futtermittel mit einem Fettgehalt ≤ 25 % und von 2,5 g bei Fett und Öl. Abweichungen von der Probenaufnahme sollten in den Gleichungen in 13.6 (M = Probenaufnahme in Gramm) berücksichtigt werden.

Der aus den in 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.

10.2.1.9 Geräte.

10.2.1.10 Gerät für die druckunterstützte Flüssigextraktion.

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

10.2.1.11 Extraktionszelle für die druckunterstützte Flüssigextraktion, z. B. 30 ml bis 40 ml.

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

10.2.1.13 Trichter.

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

10.2.1.15 Verdampfungsröhrchen, 0,5 ml Endpunkt.

10.2.2 Durchführung

Die Probe (9.2.1) ist in eine Extraktionszelle für die druckunterstützte Flüssigextraktion (10.2.1.11) zu geben und mit Kieselgur (10.2.1.1) aufzufüllen; die Extraktionszelle ist in das Gerät für die druckunterstützte Flüssigextraktion (10.2.1.10) zu platzieren. 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 (10.2.1.4).

Das mit jedem Zyklus erhaltene Lösemittel ist zusammenzumischen und über einen Trichter (10.2.1.13) mit einem Glaswollepfropfen (10.2.1.8) und mit 5 g vorgetrocknetem Natriumsulfat (10.2.1.6) zu filtrieren. Mit einem Verdampfer (10.2.1.14) 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 insgesamt) (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 25 ml Marke 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 Modul CIII, 11.5), fortzusetzen.

ANMERKUNG Unter der Voraussetzung, dass die Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission [1] 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 (10.2.1.2) sind mit 100 ml Ethanol (10.2.1.3) 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 h bei 160 °C erhitzt.

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

10.3.1.8 Silanierte Glaswolle.

10.3.2 Geräte

10.3.2.1 Extraktionshülsen, gereinigt durch Extrahieren im Soxhlet-Apparat für 2 h mit DCM (10.3.1.1).

10.3.2.2 Umlaufkühler.

10.3.2.3 Soxhlet-Apparat.

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

Der Soxhlet-Apparat (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 im Soxhlet-Apparat (10.3.2.3) zu platzieren. 200 ml Toluol (10.3.1.2) und 3 Siedesteinchen bis 6 Siedesteinchen (10.3.2.5) sind in den RBF (10.3.2.6) zu geben und dieser ist im Heizmantel (10.3.2.4) zu platzieren. Sämtliche Ausrüstungen des Soxhlet-Apparats sind einschließlich des Kondensators miteinander zu verbinden, und alle Dichtungen sind auf ihre Dichtheit zu überprüfen. Der Durchlauf des Soxhlet-Apparats 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 Heizmäntel sind abzuschalten, die Apparatur ist abkühlen zu lassen und der RBF mit dem Toluol aus dem Soxhlet-Apparat 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) zu platzieren. Sämtliche Ausrüstungen des Soxhlet-Apparats sind einschließlich des Kondensators miteinander zu verbinden, und alle Dichtungen sind auf ihre Dichtheit zu überprüfen. Der Durchlauf des Soxhlet-Apparats 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 Heizmäntel sind abzuschalten, die Apparatur ist abkühlen zu lassen und der 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 insgesamt) (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 25 ml-Marke 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 Modul CIII, 11.5), fortzusetzen.

ANMERKUNG Unter der Voraussetzung, dass die Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission [1] eingehalten wird, können vergleichbare Verfahren, z. B. nach der Twisselmann-Technik (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

Die Anwendung von Reinigungsverfahren ist unverzichtbar für eine geeignete Vorbereitung des Probenextraktes für die nachfolgende quantitative Bestimmung. Die Reinigungsverfahren müssen die Aufgabe erfüllen, PCDD/PCDF und dioxin-ähnliche PCB in den Extrakten zu konzentrieren und störende, im Rohextrakt auftretende Matrixkomponenten zu entfernen. Nachfolgend sind die Prinzipien der häufig angewendeten Reinigungstechniken kurz beschrieben.

11.1.1 Gelpermeations-Chromatographie

Der zu untersuchende Molekularmassebereich für PCDD/PCDF und dioxin-ähnliche PCB von 200 g/mol bis 500 g/mol kann von größeren Molekülen, wie z. B. Fett/Öl und Polymeren, die möglicherweise andere Reinigungsverfahren überlasten, getrennt werden.

11.1.2 Mehrschichtige Säule

Dieses Verfahren besteht aus Flüssigkeitschromatographie mit mehrschichtiger Säule auf Kieselgel mit verschiedenen Aktivitätsstufen und Oberflächenmodifikationen. Verbindungen mit anderen chemischen Eigenschaften als PCDD/PCDF und dioxin-ähnliche PCB können entfernt werden.

11.1.3 Behandlung mit Schwefelsäure

Eine direkte Behandlung des Probenextraktes zum Entfernen oxidierbarer Koextrakte mit Schwefelsäure ist möglich, wird jedoch aus Sicherheitsgründen nicht empfohlen. Außerdem sollte dieses Verfahren sehr sorgfältig durchgeführt werden, um Verluste an PCDD/PCDF und dioxin-ähnlichen PCB 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.

11.1.4 Aktivkohlesäule

Dieses Verfahren besteht aus Säulenadsorptions-Chromatographie mit Aktivkohle und darf 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 PCB, mono-ortho PCB und nicht dioxin-ähnlicher PCB verwendet werden.

11.1.5 Aluminiumoxidsäule

Ein Verfahren, das die Säulenflüssigkeitschromatographie auf Aluminiumoxid verschiedener Aktivitätsstufen und unterschiedlicher Acidität oder Basizität betrifft. Störende Verbindungen mit geringen Unterschieden in der Polarität oder Struktur, verglichen mit den PCDD/PCDF und dioxin-ähnlichen PCB, können entfernt werden. Zusätzlich können Aluminiumoxidsäulen zur Trennung der PCDD/PCDF von den dioxin-ähnlichen PCB angewendet werden.

11.1.6 Florisilsäule

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

11.1.7 Probenreinigungsverfahren

Bewährte Reinigungsverfahren müssen üblicherweise zwei oder mehr der vorstehend beschriebenen Techniken enthalten, die in unterschiedlicher Reihenfolge kombiniert werden können. Eine ausführliche Beschreibung des automatisierten Reinigungsverfahrens ist in Modul CI (automatisiertes Verfahren) aufgeführt. In Modul CII und Modul CIII sind manuelle Verfahren beschrieben, wobei Modul CII die Reinigung über eine gemischte Kieselgelsäule, gefolgt von einer Aktivkohlesäule beschreibt; dabei werden non-ortho PCB und PCDD/PCDF von mono-ortho PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB getrennt. Modul CIII beschreibt ein Reinigungsverfahren mit gemischtem Kieselgel, gefolgt von GPC oder Florisil. Andere Verfahren können ebenfalls angewendet werden, müssen aber nachweislich 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 Aluminiumoxidsäule und an einer Aktivkohle/Diatomeenerde-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. Eine ausführlichere Beschreibung der verschiedenen Schritte ist in Anhang C enthalten.

Nach dem automatisierten Verfahren werden zwei Fraktionen erhalten: mono-ortho-substituierte PCB und nicht dioxin-ähnliche PCB (Fraktion A) und planare PCDD/F und non-ortho-substituierte PCB (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 das Gewicht durch Zugabe von Lösemittel als Ersatz für die 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), Korngröße 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) werden in 1 l Wasser gelöst.