

**DIN EN 16215**

ICS 65.120

Einsprüche bis 2018-11-14  
Vorgesehen als Ersatz für  
DIN EN 16215:2012-07

**Entwurf**

**Futtermittel –  
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –  
Bestimmung von Dioxinen und dioxin-ähnlichen PCB mittels GC/HRMS und  
von Indikator-PCB mittels GC/HRMS;  
Deutsche und Englische Fassung prEN 16215:2018**

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 and English version prEN 16215:2018

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 et anglaise prEN 16215:2018

**Anwendungswarnvermerk**

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-09-14 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und  
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs  
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter [www.din.de/go/entwuerfe](http://www.din.de/go/entwuerfe) bzw. für Norm-  
Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter [www.entwuerfe.normenbibliothek.de](http://www.entwuerfe.normenbibliothek.de),  
sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an [nal@din.de](mailto:nal@din.de) möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im  
Internet unter [www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe](http://www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe) oder für Stellungnahmen zu Norm-  
Entwürfen der DKE unter [www.dke.de/stellungnahme](http://www.dke.de/stellungnahme) abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL),  
10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten  
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 114 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

## Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16215:2018) 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.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

## 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 redaktionell überarbeitet und den derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

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

*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*

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

## Inhalt

|                                                                                                                      | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Europäisches Vorwort .....                                                                                           | 5     |
| Einleitung .....                                                                                                     | 6     |
| 1 Anwendungsbereich .....                                                                                            | 7     |
| 2 Normative Verweisungen .....                                                                                       | 9     |
| 3 Begriffe .....                                                                                                     | 9     |
| 4 Kurzbeschreibung .....                                                                                             | 10    |
| 5 Reagenzien .....                                                                                                   | 10    |
| 5.1 Allgemeines .....                                                                                                | 10    |
| 5.2 Dioxine, Furane, non-ortho PCB, mono-ortho PCB sowie nicht dioxin-ähnliche PCB und deren markierte Analoge ..... | 10    |
| 6 Geräte .....                                                                                                       | 11    |
| 7 Probenahme .....                                                                                                   | 11    |
| 8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe .....                                                                          | 11    |
| 9 Durchführung .....                                                                                                 | 11    |
| 9.1 Allgemeines .....                                                                                                | 11    |
| 9.2 Futtermittelprobe und Öl- oder Fettprobe .....                                                                   | 12    |
| 10 Extraktion .....                                                                                                  | 12    |
| 10.1 Allgemeines .....                                                                                               | 12    |
| 10.2 Modul BI: Extraktion mit automatisiertem druckunterstützten Flüssigextraktions- (PFE) System .....              | 12    |
| 10.3 Modul BII: Manuelles Extraktionsverfahren .....                                                                 | 14    |
| 11 Reinigung .....                                                                                                   | 15    |
| 11.1 Allgemeines .....                                                                                               | 15    |
| 11.2 Modul CI: Automatisierte Reinigung .....                                                                        | 17    |
| 11.3 Modul CII: Manuelle Probenreinigung, Entfernen von Fett und Gruppentrennung .....                               | 20    |
| 11.4 Zusätzliche Reinigungsschritte für die Fraktion A und Fraktion B von Modul CII .....                            | 24    |
| 11.5 Modul CIII: Entfernen der Matrix, manuelle Reinigung der Probe und Gruppentrennung .....                        | 27    |
| 12 Modul D: Gaschromatographie mit hochauflösender Massenspektrometrie (GC/HRMS) .....                               | 31    |
| 12.1 Allgemeines .....                                                                                               | 31    |
| 12.2 Durchführung .....                                                                                              | 32    |
| 13 Berechnung und Angabe der Ergebnisse .....                                                                        | 33    |
| 13.1 Allgemeines .....                                                                                               | 33    |
| 13.2 Kalibrierkriterien .....                                                                                        | 34    |
| 13.3 Identifizierung und Bestätigung .....                                                                           | 34    |
| 13.4 Berechnung .....                                                                                                | 35    |
| 13.5 Toxizitätsäquivalent-Werte (TEQ-Werte) .....                                                                    | 36    |
| 13.6 Wiederfindungsrate .....                                                                                        | 38    |
| 14 Präzision .....                                                                                                   | 38    |
| 15 Untersuchungsbericht .....                                                                                        | 40    |
| Anhang A (informativ) Beschreibung des PTV-Injektionssystems .....                                                   | 41    |

|                                                                                                          |                                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| A.1                                                                                                      | Injektion mit großem Volumen (100 µl) — GC/HRMS-Kalibriergemische der Dioxine und non-ortho PCB.....                                       | 41        |
| A.2                                                                                                      | Probenvorbereitungsverfahren.....                                                                                                          | 42        |
| A.3                                                                                                      | Bedingungen der PTV-Injektion bei Anwendung der 100-µl-Injektion.....                                                                      | 42        |
| <b>Anhang B (informativ) Beschreibung der Standards und der Konzentration der Standardlösungen .....</b> |                                                                                                                                            | <b>43</b> |
| B.1                                                                                                      | CAS-Nummern für Dioxine, Furane, non-ortho PCB, mono-ortho PCB und nicht dioxin-ähnliche PCB und deren markierte Analoge .....             | 43        |
| B.2                                                                                                      | Standardlösungen .....                                                                                                                     | 44        |
| B.2.1                                                                                                    | <sup>13</sup> C-1,2,3,4-TCDD (50 µg/ml) .....                                                                                              | 44        |
| B.2.2                                                                                                    | <sup>13</sup> C-1,2,3,6,7,8-HxCDF (50 µg/ml) .....                                                                                         | 44        |
| B.2.3                                                                                                    | <sup>37</sup> Cl <sub>4</sub> -2,3,7,8 TCDD (50 µg/ml) .....                                                                               | 44        |
| B.2.4                                                                                                    | <sup>13</sup> C-PCDD-Gemisch (1 µg/ml) .....                                                                                               | 44        |
| B.2.5                                                                                                    | <sup>13</sup> C-PCDF-Gemisch (1 µg/ml) .....                                                                                               | 45        |
| B.2.6                                                                                                    | TCDD-HpCDD-Gemisch (5 µg/ml).....                                                                                                          | 45        |
| B.2.7                                                                                                    | TCDF-HpCDF-Gemisch (5 µg/ml) .....                                                                                                         | 45        |
| B.2.8                                                                                                    | OCDD (10 µg/ml) .....                                                                                                                      | 45        |
| B.2.9                                                                                                    | OCDF (50 µg/ml) .....                                                                                                                      | 45        |
| B.2.10                                                                                                   | OCDF-Standard (5 µg/ml).....                                                                                                               | 45        |
| B.2.11                                                                                                   | Gemisch aus <sup>13</sup> C-non-ortho PCB (1 µg/ml) .....                                                                                  | 45        |
| B.2.12                                                                                                   | Gemisch aus <sup>13</sup> C-mono-ortho PCB (1 µg/ml) .....                                                                                 | 45        |
| B.2.13                                                                                                   | Gemisch aus <sup>13</sup> C-nicht dioxin-ähnlichen PCB (5 µg/ml) .....                                                                     | 45        |
| B.2.14                                                                                                   | Gemisch aus non-ortho PCB (10 µg/ml).....                                                                                                  | 45        |
| B.2.15                                                                                                   | Gemisch aus mono-ortho PCB (10 µg/ml).....                                                                                                 | 46        |
| B.2.16                                                                                                   | Handelsübliches Gemisch aus nicht dioxin-ähnlichen PCB (10 µg/ml) .....                                                                    | 46        |
| B.2.17                                                                                                   | DIOX-RS-100-Wiederfindungsstandard (100 pg/µl <sup>13</sup> C-1,2,3,4-TCDD und 100 pg/µl <sup>13</sup> C-1,2,3,6,7,8-HxCDF in Toluol)..... | 46        |
| B.2.18                                                                                                   | DIOX-RS-1-Wiederfindungsstandard (1 pg/µl <sup>13</sup> C-1,2,3,4-TCDD und 1 pg/µl <sup>13</sup> C-1,2,3,6,7,8-HxCDF in Toluol).....       | 46        |
| B.2.19                                                                                                   | TCDD-RS-III-Wiederfindungsstandard (100 pg/µl <sup>13</sup> C-1,2,3,4-TCDD in Isooctan).....                                               | 46        |
| B.2.20                                                                                                   | TCDD-RS-VI-Wiederfindungsstandard (25 pg/µl <sup>13</sup> C-1,2,3,4-TCDD in Isooctan).....                                                 | 46        |
| B.2.21                                                                                                   | CS-50-Reinigungsstandard (50 pg/µl <sup>37</sup> Cl <sub>4</sub> -2,3,7,8 TCDD in Toluol) .....                                            | 46        |
| B.2.22                                                                                                   | CS-1-Reinigungsstandard (1,0 pg/µl <sup>37</sup> Cl <sub>4</sub> -2,3,7,8 TCDD in Toluol) .....                                            | 46        |
| B.2.23                                                                                                   | Gemisch aus non-ortho PCB (NOP-500) (500 pg/µl in Toluol).....                                                                             | 47        |
| B.2.24                                                                                                   | Gemisch aus PCDD/F und non-ortho PCB (DIOXNOP) (20 pg/µl in Toluol) .....                                                                  | 47        |
| B.2.25                                                                                                   | Gemisch aus PCDD/F und non-ortho PCB (DIOXNOP-1) (2,0 pg/µl in Toluol) .....                                                               | 47        |
| B.2.26                                                                                                   | Gemisch aus mono-ortho PCB und Indikator-PCB (MOPIP-500) (500 pg/µl in Isooctan) .....                                                     | 47        |
| B.2.27                                                                                                   | Gemisch aus mono-ortho PCB und Indikator-PCB (MOPIP-25) (25 pg/µl in Isooctan).....                                                        | 47        |
| B.2.28                                                                                                   | Gemisch aus mono-ortho PCB und Indikator-PCB (MOPIP-2,5) (2,5 pg/µl in Isooctan).....                                                      | 47        |
| B.2.29                                                                                                   | Gemisch aus mono-ortho PCB und Indikator-PCB (MOPIP-0,25) (0,25 pg/µl in Isooctan) .....                                                   | 47        |
| B.2.30                                                                                                   | Gemisch aus <sup>13</sup> C-PCDD/F und <sup>13</sup> C-non-ortho PCB ( <sup>13</sup> C-DIOXNOP) (50 pg/µl in Toluol).....                  | 48        |
| B.2.31                                                                                                   | Gemisch aus <sup>13</sup> C-PCDD/F und <sup>13</sup> C-non-ortho PCB ( <sup>13</sup> C-DIOXNOP-2) (0,10 pg/µl in Toluol) .....             | 48        |
| B.2.32                                                                                                   | Gemisch aus <sup>13</sup> C-mono-ortho PCB und <sup>13</sup> C-Indikator-PCB ( <sup>13</sup> C-MOPIP-1) (50 pg/µl in Isooctan) .....       | 48        |
| B.2.33                                                                                                   | Gemisch aus <sup>13</sup> C-mono-ortho PCB und <sup>13</sup> C-Indikator-PCB ( <sup>13</sup> C-MOPIP-2) (2,0 pg/µl in Isooctan) .....      | 48        |
| B.3                                                                                                      | GC-Standardlösungen .....                                                                                                                  | 48        |
| B.3.1                                                                                                    | Standardgemische aus Dioxinen und non-ortho PCB .....                                                                                      | 48        |
| B.3.2                                                                                                    | Herstellung der mono-ortho PCB-Standardmischungen.....                                                                                     | 50        |

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Anhang C (informativ) Beispiel des automatisierten Verfahrens .....                                                                        | 51 |
| Anhang D (informativ) Massenspektrometer (MS).....                                                                                         | 53 |
| Anhang E (informativ) Anwendung der zusätzlichen Reinigung nach der Fraktionierung mit<br>einer kurzen mehrschichtigen Kieselgelsäule..... | 57 |
| E.1 Herstellung der Kieselgel-Gemische .....                                                                                               | 57 |
| E.2 Herstellung der kurzen mehrschichtigen Säule.....                                                                                      | 57 |
| Literaturhinweise.....                                                                                                                     | 58 |

## Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16215:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel - Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 16215:2012 ersetzen.

Im Vergleich mit der vorhergehenden Ausgabe sind folgende Änderungen vorgenommen worden:

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

## 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 Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 152/2009 vom 27. Januar 2009 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 Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 152/2009 [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. Kombinierbare Module und/oder Alternativen geben ein hochflexibles, „leistungsbezogenes“ Verfahren. Es ist zulässig, das Verfahren zu verändern, wenn sämtliche Leistungskriterien entsprechend der Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 152/2009 [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.

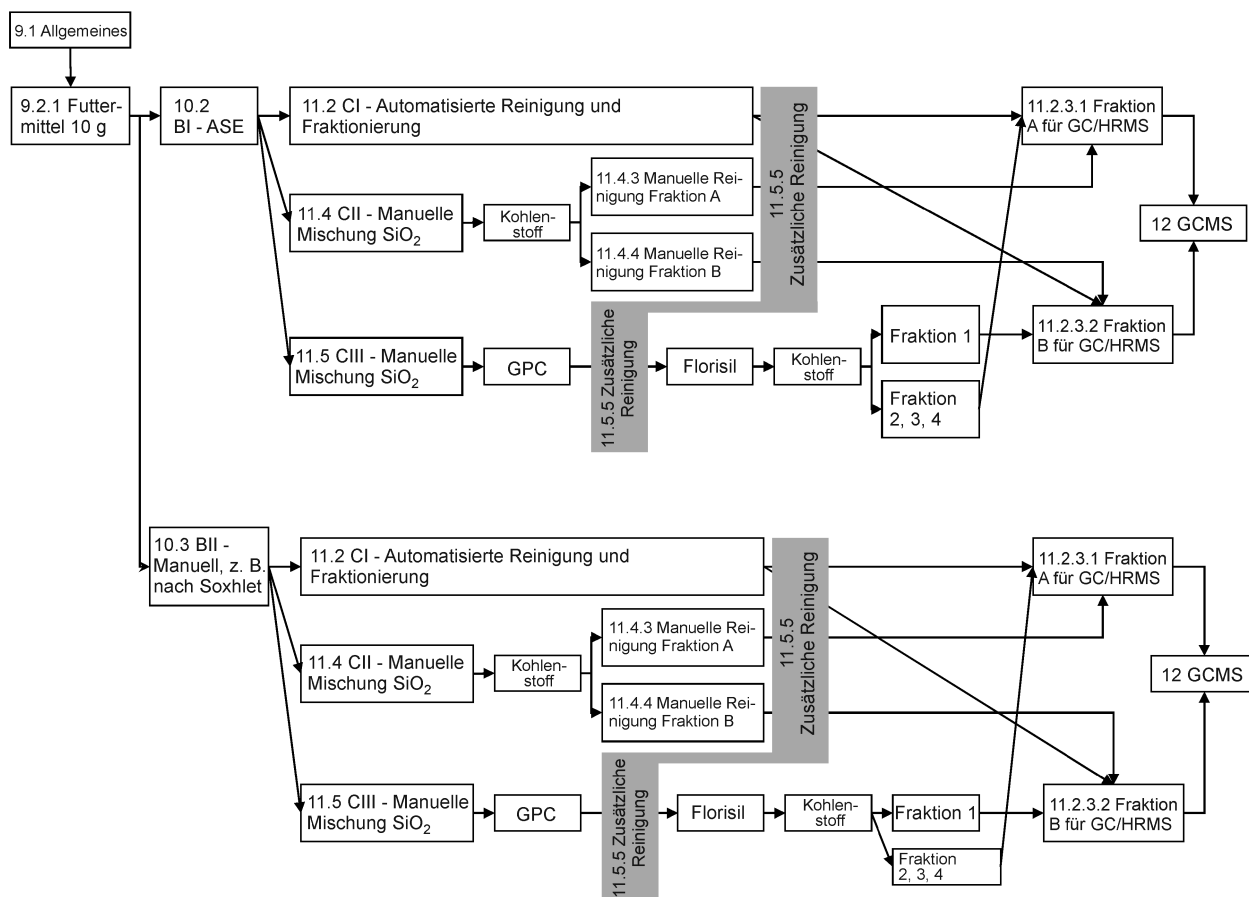


**Bild 1 — Fließschema für die Bestimmung von Dioxinen, dl-PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB in Futtermitteln**

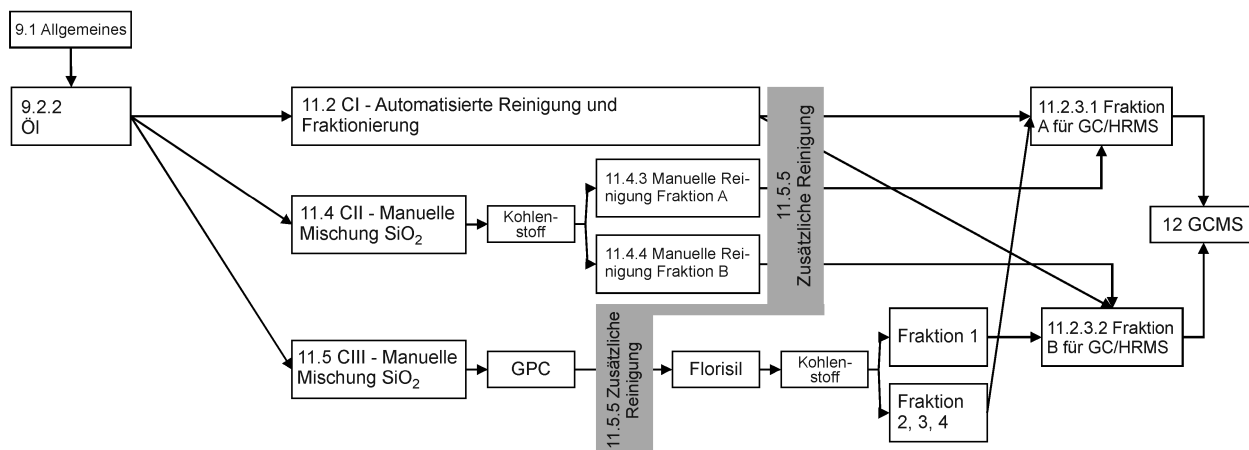


**Bild 2 — Fließschema für die Bestimmung von Dioxinen, dl-PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB in Öl und Fett**

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 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: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: 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 Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 152/2009 [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

Futtermittel-Zusatzstoffe sind Substanzen, die der in der Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 [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  $\frac{1}{2} LOQ$  angewendet.

## 4 Kurzbeschreibung

Eine Prüfmenge des Futtermittels oder Futtermittelbestandteils wird mit  $^{13}\text{C}$ -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 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 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 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  $\mu\text{l}$  in Kombination mit einem Injektionsvolumen von 2  $\mu\text{l}$  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 0 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 interessanten Verbindungen zeigen.

**WARNUNG — Die Anwendung dieser Europäischen Norm 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.**

### 5.2 Dioxine, Furane, non-ortho PCB, mono-ortho PCB sowie nicht dioxin-ähnliche PCB und deren markierte Analoge

- $^{13}\text{C}$ -Aufstocklösung für PCDD/F (interner Standard);
- $^{13}\text{C}$ -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 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 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 dieser Europäischen Norm 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 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.  $(10,0 \pm 0,10)$  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 µl  $^{13}\text{C}$ -DIOXNOP-2 (Anhang B, B.2.31) und 500 µl  $^{13}\text{C}$ -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 Probenmenge 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 µl  $^{13}\text{C}$ -DIOXNOP-2 (Anhang B, B.2.31) und 500 µl  $^{13}\text{C}$ -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 13.4 beruht auf einer Probenmenge von 10 g bei einem Futtermittel mit einem Fettgehalt  $\leq 25$  % 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  $\leq 25$  % 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 Tabelle B.1 aufgelisteten  $^{13}\text{C}$ -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 (10.2.1.2) 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.

**10.2.1.6 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 im Gerät für die druckunterstützte Flüssigextraktion (10.2.1.10) 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,<br>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 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 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 Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 152/2009 [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 Silanisierte 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) 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 ist im Heizmantel (10.3.2.4) unterzubringen. Sämtliche Ausrüstungen des Soxhlet-Apparats sind einschließlich des Kühlers 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 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 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 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 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 Kommissions-Verordnung (EG) Nr. 152/2009 [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 vorbereiten. 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 überladen, 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 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 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. Zusätzliche Aluminiumoxidsäulen können 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 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 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 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 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.

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.

#### **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  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (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 Mischbett-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 wird in Aktivkohle/Celit-Massenanteilen von 2 : 23 hergestellt.

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

#### **11.2.3.7 Verbindungsstück für Mischbett-Kieselgel-, Aluminiumoxid- und Aktivkohlesäulen.**

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

#### **11.2.3.9 Mikroeingänge 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 PCB und nicht dioxin-ähnliche PCB, gestaltet ist.

Zu den Probenextrakten von 25 ml (hergestellt nach [9.2.2] oder [10.2] oder [10.3]) werden 50 µl <sup>37</sup>Cl<sub>4</sub>-2,3,7,8-TCDD-Reinigungsstandard (Anhang B, 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 PCB und die nicht dioxin-ähnlichen PCB werden in der Fraktion „A“ gesammelt. In der Fraktion „B“ werden die Dioxine/Furane und die non-ortho PCB gesammelt. In Tabelle D.1 sind die 24 automatisierten Schritte beschrieben, siehe Anhang D.

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 Mischbett-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. In 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 PCB und nicht dioxin-ähnliche PCB 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. In den Schritten 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 graduierten 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 wird auf ~ 0,7 bar eingestellt. Die sensorische Endpunktdetektion wird gewählt und mit dem Einengen wird begonnen. 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 drei Viertel eingeeengt wurde, wird die Innenwand des Verdampfungsröhrchens (6.2) jedes Mal mit Isooctan (11.2.2.7, 5 ml bis 10 ml) aus einer Spritzflasche gewaschen und es wird erneut eingeeengt. Ist der Endpunkt erreicht, wird die Röhrchenwand erneut mit Isooctan (11.2.2.7, 5 ml bis 10 ml) gewaschen, das Röhrchen wird geschwenkt und es wird erneut eingeeengt. Zum Entfernen wird dieser Vorgang noch zweimal wiederholt. Am Ende, wenn der Endpunkt wieder erreicht ist, wird das Röhrchen vom Verdampfer entfernt. Zur Fraktion „A“ werden 100 µl TCDD-RS-VI (Anhang B, B.2.20) hinzugefügt und das Verdampfungsröhrchen wird mit 2 ml Isooctan (11.2.2.7) gewaschen und die Lösung wird auf einem Vortexmischer (6.5) gemischt. Anschließend wird die Fraktion „A“ bis zum geeigneten Volumen, z. B. 25 µl bis 50 µl, eingeeengt und in ein Gläschen (11.2.3.8) mit einem Mikroinsert mit flachem Boden (11.2.3.9) für den GC-Autosampler überführt. Das Verfahren wird weiter nach Modul D, Abschnitt 12, GC/HRMS durchgeführt.

Wie in 11.5.6 oder in Anhang E beschrieben, kann besonders bei verschmutzten komplexen Proben (oxidiertes Fett/Öl) möglicherweise für die zusätzliche Reinigung eine Säule mit dünner Kieselgelschicht angewendet werden, vorausgesetzt die Kommissions-Verordnung (EG) 152/2009 [1] wird eingehalten.

**11.2.4.3** Die Fraktion „B“ wird im graduierten 200-ml-Glasverdampfungsröhrchen gesammelt. Das den Extrakt enthaltende Verdampfungsröhrchen (6.2) wird in der Verdampfereinheit (6.1) mit der Badtemperatur bei  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$  untergebracht und der Druckluftdruck wird auf  $\sim 0,7$  bar eingestellt. Die sensorische Endpunktdetektion wird gewählt und mit der Einengung wird begonnen. Es ist zu beachten, dass der angezeigte Druck während der Anwendung unter 0,7 bar fallen kann. Wenn das Volumen des Lösemittels anschließend auf 75 % des Ausgangsvolumens eingeengt wurde, wird die Innenwand des Verdampfungsröhrchens (6.2) mit Toluol (11.2.2.1, 5 ml bis 10 ml) gewaschen, und es wird erneut eingeengt. Dies wird bei 50 % und 25 % des Ausgangsvolumens wiederholt. Ist der Endpunkt erreicht, wird die Röhrchenwand erneut mit Toluol (11.2.2.1, 5 ml bis 10 ml) gewaschen, das Röhrchen wird geschwenkt und es wird erneut eingeengt. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Am Ende, wenn der Endpunkt wieder erreicht ist, wird das Röhrchen vom Verdampfer entfernt. Zur Fraktion „B“ werden 100 µl DIOX-RS-1 (Anhang B, B.2.18) hinzugefügt und das Verdampfungsröhrchen wird mit 2 ml Toluol (11.2.2.1) gewaschen und die Lösung wird auf einem Vortexmischer (6.5) gemischt. Anschließend wird die Fraktion „B“ bis zum geeigneten Volumen, z. B. 10 µl bis 25 µl, eingeengt und ebenfalls in ein Gläschen (11.2.3.8) mit einem Mikroeinsatz mit flachem Boden (11.2.3.9) für den GC-Autosampler überführt. Es wird mit Abschnitt 12 fortgefahren.

Wie in 11.5.6 oder in Anhang E beschrieben, kann besonders bei verschmutzten komplexen Proben (oxidiertes Fett/Öl) möglicherweise für die zusätzliche Reinigung eine Säule mit dünner Kieselgelschicht angewendet werden, vorausgesetzt die Kommissions-Verordnung (EG) 152/2009 [1] wird eingehalten.

**ANMERKUNG 1** Fluid Management System, Watertown, USA ist beispielsweise ein Unternehmen, das Hardware und Einwegsäulen für die automatische Reinigung herstellt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN.

**ANMERKUNG 2** Unter der Voraussetzung, dass die Kommissions-Verordnung (EG) 152/2009 [1] eingehalten wird, können vergleichbare Verfahren in Kombination mit geeigneten Parametern angewendet werden. Das in Anhang D angegebene Programm muss als ein Beispiel angesehen werden, verschiedene Programme und Lösemittel können verwendet werden, vorausgesetzt, dass die Vorgehensweise (Verfahren und Programm) validiert ist.

## 11.3 Modul CII: Manuelle Probenreinigung, Entfernen von Fett und Gruppentrennung

### 11.3.1 Allgemeines

Dieses Modul beschreibt ein manuelles Verfahren zur Trennung, Fraktionierung und Reinigung von PCDD/F- und PCB-Analyten vor der Einengung und der Analyse mit GC/HRMS. Die Analyten werden mit der Lösemittel-Kaltextraktion, gleichzeitig mit einer sauren und basischen Hydrolyse an mehrschichtigen, gemischten Kieselgelsäulen von der Matrix getrennt. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine gleichzeitige (Tandem-)Fraktionierung von planaren PCDD/F und non-ortho-substituierten PCB von ortho-substituierten PCB, indem der Auslass der mehrschichtigen Säule direkt mit der Aktivkohlesäule verbunden wird. Alternativ darf der eingeengte Abfluss der mehrschichtigen Säule mit einem Aktivkohlesäule-Verfahren gesondert getrennt werden. Die Fraktionen – mono-ortho-substituierte PCB und nicht dioxin-ähnliche PCB (Fraktion A) und planare PCDD/F und non-ortho-substituierte PCB (Fraktion B) – werden an einer aktivierten basischen Aluminiumoxidsäule gereinigt.

### 11.3.2 Reagenzien und Materialien

**11.3.2.1 Toluol**, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

**11.3.2.2 n-Hexan**, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

**11.3.2.3 Dichlormethan**, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

**11.3.2.4 Kieselgel (Silicagel)**, Korngröße 63 µm bis 200 µm.

**11.3.2.5 KOH-Pellets.**

**11.3.2.6 Methanolische KOH-Lösung**, 5 mol/l (siehe 11.3.2.5 und 11.3.2.15).

281 g KOH-Pellets (11.3.2.5) werden in 1 l Methanol gelöst.

**11.3.2.7 Schwefelsäure**, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 96%ig, spezifische Dichte 1,84.

**11.3.2.8 Basisches Kieselgel**, hergestellt durch Mischen von 5 mol/l methanolischer KOH-Lösung (11.3.2.6) und Kieselgel (11.3.2.4) in Volumen-/Massenanteilen von 3 : 1 (ml/g), das Verdampfen des Methanols und eine Stabilisierung für 24 h ist zu ermöglichen.

**11.3.2.9 Schwefelsaures Kieselgel**, hergestellt durch Mischwalzen von Schwefelsäure (11.3.2.7) und Kieselgel (11.3.2.4) in Volumen-/Massenanteilen von 1 : 1,5 (ml/g) für mindestens 6 h.

**11.3.2.10 Dichlormethan/n-Hexan**, in Volumenanteilen von 4 : 6.

400 ml Dichlormethan (11.3.2.3) werden mit 600 ml n-Hexan (11.3.2.2) gründlich gemischt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur in einer dicht verschlossenen Flasche aufbewahrt.

**11.3.2.11 Methanol**, in einer Glasapparatur destilliert.

**11.3.2.12 Stickstoff.**

**11.3.2.13 Toluol/Dichlormethan**, in Volumenanteilen von 3 : 7.

600 ml Toluol (11.3.2.1) werden mit 1 400 ml Dichlormethan (11.3.2.3) gründlich gemischt.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur in einer dicht verschlossenen Flasche aufbewahrt.

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

**11.3.2.15 Methanol**, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

### 11.3.3 Geräte

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

**11.3.3.1 Große Glassäule**, 650 mm × 55 mm Innendurchmesser.

**11.3.3.2 Mittlere Glassäule**, 400 mm × 25 mm Innendurchmesser.

**11.3.3.3 Silanisierte Glaswolle.**

**11.3.3.4 Druckregler**, 0 bar bis 1 bar.

**11.3.3.5 Fritte**, Glasfaserscheibe.

**11.3.3.6 Trichter**, Standard, 150 mm, 80 mm Durchmesser, Borosilikatglas.

**11.3.3.7 Stopfen Nr. 11**, PTFE, mit Buchse 1/8"-Fitting.

**11.3.3.8 Stopfen Nr. 50**, PTFE, mit 1/8"-Verbindung zum Stickstoffanschluss.

**11.3.3.9 Schlauchverbindung**, PTFE, 1/8" Durchmesser, mit Fittings.

**11.3.3.10 Einschraubverbindung**, mit Gewinde, 1/8".

**11.3.3.11 Messzylinder**, Borosilikatglas, 250 ml, Teilung: 2 ml mit einer Messunsicherheit von  $\pm 0,5$  ml.

**11.3.3.12 Spritzflasche**, PTFE, 500 ml.

**11.3.3.13 Messzylinder**, Borosilikatglas, 500 ml, Teilung: 5 ml mit einer Messunsicherheit von  $\pm 0,5$  ml.

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

**11.3.3.15 Pasteurpipette**, Borosilikatglas, 150 mm.

**11.3.3.16 47-mm-GF/D**, (Glasfaserfilterscheiben).

**11.3.3.17 Fläschchen**, konisch, 1,1 ml.

**11.3.3.18 1-l-Glasflasche**, Duran Glas / amberfarben.

## **11.3.4 Durchführung**

### **11.3.4.1 Herstellung von gemischten Kieselgelsäulen**

Eine große Glassäule (11.3.3.1) wird mit Dichlormethan (11.3.2.3) gewaschen. Die Säule wird am unteren Ende (Verbindung Nr. 11) mit einem Stopfen Nr. 11 (11.3.3.7) verschlossen. Zwei Glasfaserscheiben (11.3.3.5) und ein Stopfen aus silanisierter Glaswolle (11.3.3.3) werden hinzugefügt. Auf diesen werden in aufsteigender Reihenfolge wasserfreies Natriumsulfat (11.3.2.14,  $[10 \pm 1]$  g), basisches Kieselgel (11.3.2.8,  $[50 \pm 5]$  g), schwefelsaures Kieselgel (11.3.2.9,  $[10 \pm 2,5]$  g), die 47-mm-Glasfaserscheibe (11.3.3.16) und wasserfreies Natriumsulfat (11.3.2.14,  $[30 \pm 3]$  g) gegeben. Um die Schichten der pulverisierten Reagenzien gleichmäßig auszurichten, wird die Säule kräftig geklopft. Eine 1-l-Glasflasche (11.3.3.18) wird am Auslass jeder Kieselgelsäule angeordnet.

**ANMERKUNG** Wenn die Aktivkohlesäule gleichzeitig (im Tandem) angewendet wird, kann diese zu diesem Zeitpunkt direkt mit dem Boden der gemischten Kieselgelsäule verbunden werden, unter Anwendung des nachstehend beschriebenen Verfahrens (11.3.4.2) zum Erhalt der Fraktion A und unter Anwendung des nachstehend beschriebenen Verfahrens (11.3.4.5) zum Erhalt der Fraktion B. Die Aktivkohlesäulen werden, wie in (11.3.4.3) beschrieben, mit den Lösemitteln in umgekehrter Richtung konditioniert und es wird sichergestellt, dass die Durchflussrichtung der Aktivkohlesäule vor der Anwendung deutlich gekennzeichnet ist. Das obere Ende der Aktivkohlesäule wird direkt mit dem Auslass der gemischten Kieselgelsäule und der Boden wird mit einem 1-l-Vorratsbehälter mittels der 1/8"-Schraubverbindungen und Schlauchverbindungen verbunden.

### **11.3.4.2 Probenreinigung mit der gemischten Kieselgelsäule**

Die Probe (9.2.2) oder der Extrakt (10.2) oder der Extrakt (10.3) wird in eine 1-l-Flasche (11.3.3.18) zu überführt. Mit einem Messzylinder (11.3.3.11) werden  $(200 \pm 10)$  ml n-Hexan (11.3.2.2) hinzugefügt und die Lösung wird gemischt. 75 g schwefelsaures Kieselgel (11.3.2.9) werden mit einem kleinen Trichter zu der Flasche gegeben und während der Zugabe wird die Lösung geschwenkt. Die Suspension wird quantitativ in eine große Glassäule (11.3.3.1) überführt, die Flasche wird 3-mal mit 10 ml bis 30 ml n-Hexan (11.3.2.2) aus einer Spritzflasche (11.3.3.18) gewaschen. Der untere Stopfen Nr. 11 wird überprüft und gedreht, um jegliche Luft einschlüsse zu entfernen und um eine Kanalbildung zu vermeiden, der Stopfen wird wieder festgedreht, sobald die Lösemittelfront den Stopfen erreicht hat. Die große Glassäule wird im Rahmengestell angehoben und die Probe wird in die 1-l-Flasche (11.3.3.18) am Auslauf jeder Vorrichtung auslaufen gelassen. Mit einem 500-ml-Messzylinder (11.3.3.13) wird Dichlormethan/n-Hexan (11.3.2.10,  $[400 \pm 40]$  ml) solange zugegeben, bis die anfänglichen 200 ml die Oberfläche der Reagenzlage erreicht haben. Die Säule wird auf das ursprüngliche Niveau abgesenkt.

Sorgfältig wird ein Stopfen Nr. 50 (11.3.3.8) auf jeder Säule angebracht und ein (10.2.1.7) Stickstoff-Kopfdruck, etwa 0,1 bar bis 0,2 bar, wird aufgebracht. Die Säulenbasis wird auf Undichtigkeiten geprüft und sämtliche Verbindungen, die sich gelockert haben, werden befestigt. Der Regler des Stickstoffanschlusses wird eingestellt (0,3 bar bis 0,5 bar). Dem Lösemittel wird es ermöglicht, durch die Säule in die 1-l-Flasche (11.3.3.18) abzulaufen (üblicherweise über Nacht). Es wird sichergestellt, dass der Lösemitteldruck es keiner Probe ermöglicht, schneller abzutropfen, als dass sich einzelne Tropfen ergeben. Es wird empfohlen, das System mindestens 30 min nach Beginn auf Druckänderungen zu überprüfen. Sobald das gesamte Extraktionslösemittel durch die Säule eluiert ist und das Röhrchen in der Aufnahme flasche zu sprudeln beginnt, wird die Stickstoffdruckversorgung abgeschaltet. Der Stopfen Nr. 50 (11.3.3.8) wird entfernt und mit n-Hexan (11.3.2.2, [100 ± 10] ml) in einem 100-ml-Messzylinder (11.3.3.14) wird die Innenwand der Säule gewaschen. Die Säulen werden erneut verschlossen und mit Druck beaufschlagt (bis zu 0,7 bar), das zusätzliche n-Hexan wird in der gleichen Flasche gesammelt, und wenn das Röhrchen in der Auffangflasche zu sprudeln beginnt, wird die Stickstoffdruckversorgung abgeschaltet.

Falls die Aktivkohlesäule direkt verbunden war, dann stellt dieser Extrakt die Fraktion der mono-ortho-substituierten PCB und der nicht dioxin-ähnlichen PCB (Fraktion A) dar. Weiter wird nach 11.3.4.3 verfahren. Die gemischte Kieselgelsäule wird entfernt und anschließend wird weiter nach 11.3.4.5 verfahren, um die Fraktion der PCDD/F- und die non-ortho-substituierten PCB zu erhalten (Fraktion B).

ANMERKUNG 1 Vergleichbare Aktivkohlenadsorptionsmittel könnten ebenfalls in Kombination mit geeigneten Parametern und Elutionslösemitteln verwendet werden, vorausgesetzt die Kommissions-Verordnung (EG) 152/2009 [1] wird eingehalten.

ANMERKUNG 2 Statt der vorstehend beschriebenen gemischten Kieselgelsäule kann GPC angewendet werden, siehe (11.5) Modul CIII.

#### **11.3.4.3 Vorbereitung und Anwendung der Aktivkohlesäule für die Trennung von mono-ortho PCB und nicht dioxin-ähnliche PCB (Fraktion A) von PCDD/F und non-ortho PCB (Fraktion B)**

Die Aktivkohlesäulen werden mit den folgenden Lösemitteln in umgedrehter Richtung konditioniert:

- a) Toluol (60 ± 10) ml (11.3.2.1);
- b) Methanol (60 ± 10) ml (11.3.2.15);
- c) Toluol (60 ± 10) ml (11.3.2.1);
- d) Dichlormethan/n-Hexan (60 ± 10) ml (11.3.2.10).

#### **11.3.4.4 Sammlung der nicht planaren Fraktion (kombinierte Fraktion der nicht dioxin-ähnlichen PCB und der mono-ortho PCB)**

Der mit 11.3.4.2 erhaltene Extrakt wird auf die Aktivkohlesäule überführt und mit 400 ml Dichlormethan/n-Hexan (11.3.2.10) eluiert. Die direkt durchlaufende und in der 1-l-Flasche aufgefangene Fraktion enthält mono-ortho PCB und nicht dioxin-ähnliche PCB. Der Extrakt wird in die Verdampfungsröhrchen überführt. Das Verdampfungsröhrchen wird in der Verdampfereinheit (6.1) mit einer Badtemperatur bei (40 ± 2) °C untergebracht und der Druckluftdruck wird auf ~ 0,7 bar eingestellt. Die sensorische Endpunktdetektion wird gewählt und mit dem Einengen wird begonnen. Wenn das Volumen um etwa ein Viertel, die Hälfte und um drei Viertel eingeengt wurde, wird die Innenwand des Verdampfungsröhrchens (6.2) jedes Mal mit Toluol/Dichlormethan (11.3.2.13, 5 ml bis 30 ml) gewaschen und es wird erneut eingeengt. Wenn der Endpunkt erreicht ist (≤ 0,5 ml etwa), wird die Röhrchenwand erneut mit n-Hexan (11.3.2.2, 15 ml bis 20 ml) gewaschen, das Röhrchen wird geschwenkt und es wird wieder eingeengt. Um jede Spur von DCM zu entfernen und um ein Endvolumen von ~ 0,5 ml in n-Hexan zurückzulassen, wird dieser Vorgang noch zweimal wiederholt. Diese Fraktion wird als Fraktion A bezeichnet und es wird weiter nach 11.4 verfahren.

#### 11.3.4.5 Sammlung der planaren Fraktion (kombinierte Fraktion der non-ortho PCB und der PCDD/F)

Nach dem Eluieren der Fraktion A wird die Aktivkohlesäule umgedreht, sodass der Durchfluss jetzt in der umgekehrten Richtung erfolgen wird. Die Säule wird mit einer mittleren Glassäule (11.3.3.2) verbunden, die als ein Vorratsbehälter für das Lösemittel verwendet wird. Das andere Ende der Säule wird durch eine 1/8"-Schlauchverbindung mit einem sauberen Verdampfungsröhrchen verbunden. Mit einem 250-ml-Messzylinder (11.3.3.11) werden die kombinierten non-ortho PCB und die PCDD/F in umgekehrter Richtung mit Toluol (11.3.2.1,  $[170 \pm 10]$  ml) in ein sauberes Verdampfungsröhrchen (6.2) eluiert.

Das Verdampfungsröhrchen wird in der Verdampfereinheit (6.1) mit einer Badtemperatur bei  $(40 \pm 2)$  °C untergebracht und der Druckluftdruck wird auf  $\sim 0,7$  bar eingestellt. Die sensorische Endpunktdetektion wird gewählt und mit der Einengung wird begonnen. Wenn das Volumen um etwa ein Viertel, die Hälfte und um drei Viertel eingeengt wurde, wird die Innenwand des Verdampfungsröhrchens (6.2) jedes Mal mit Toluol/Dichlormethan (11.3.2.13, 5 ml bis 30 ml) gewaschen und es wird erneut eingeengt. Wenn der Endpunkt erreicht ist ( $\leq 0,5$  ml etwa), wird die Röhrchenwand erneut mit n-Hexan (11.3.2.2, 15 ml bis 20 ml) gewaschen, das Röhrchen wird geschwenkt und es wird wieder eingeengt. Um jede Spur von Toluol zu entfernen und um ein Endvolumen von  $\sim 0,5$  ml in n-Hexan zurückzulassen, wird dieser Vorgang noch zweimal wiederholt.

Mit einer sauberen Pasteurpipette (13.3.3.15) wird der Extrakt quantitativ von dem Verdampfungsröhrchen (6.2) in ein 1,1-ml-Fläschchen überführt. Diese Fraktion wird als Fraktion B bezeichnet. Zur Reinigung wird weiter nach 11.4 verfahren.

### 11.4 Zusätzliche Reinigungsschritte für die Fraktion A und Fraktion B von Modul CII

#### 11.4.1 Reagenzien und Materialien

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

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

11.4.1.3 63–200 Kieselgel (Silicagel), Korngröße 63  $\mu\text{m}$  bis 200  $\mu\text{m}$ .

11.4.1.4 KOH-Pellets.

11.4.1.5 Methanol, für die Dioxinanalyse.

11.4.1.6 Methanolische KOH-Lösung, 5 mol/l (siehe 11.4.1.4 und 11.4.1.5).

36 g KOH-Pellets (11.4.1.4) werden in 1 l Wasser gelöst.

11.4.1.7 Basisches Kieselgel, hergestellt durch Mischen von 5 mol/l methanolischer KOH-Lösung (11.4.1.6) und Kieselgel (11.4.1.3) in Volumen-/Massenanteilen von 3 : 1 (ml/g), das Verdampfen des Methanols und eine Stabilisierung für 24 h ist zu ermöglichen.

11.4.1.8 Schwefelsaures Kieselgel, hergestellt durch Mischwalzen von Schwefelsäure/Kieselgel in Volumen-/Massenanteilen von 1 : 1,5 (ml/g) für mindestens 6 h.

11.4.1.9 Schwefelsäure,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 96%ig, spezifische Dichte 1,84.

11.4.1.10 Dichlormethan/n-Hexan, in Volumenanteilen von 3 : 7.

300 ml Dichlormethan werden mit 700 ml n-Hexan gründlich gemischt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur in einer dicht verschlossenen Flasche aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mindestens 1 Jahr haltbar.

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

#### **11.4.2 Geräte**

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

**11.4.2.1 Silanisierte Glaswolle.**

**11.4.2.2 Pasteurpipette**, Borosilikatglas, 150 mm.

**11.4.2.3 Aluminiumoxid** – basisch, WB5-Basic, in einem Muffelofen bei 450 °C mindestens 24 h thermisch behandelt.

**11.4.2.4 Vorratsbehälter**, 100 ml.

**11.4.2.5 Verbindungsmuffe**, PTFE.

#### **11.4.3 Manuelles Reinigungsverfahren: Entfernen der chemischen Störungen aus der Fraktion A**

##### **11.4.3.1 Allgemeines**

Die Reinigung der (mono-ortho und Indikator-)PCB-Fraktion erfordert zwei Reinigungssäulen. Diese sind nur herzustellen, um Feuchteabsorption und Deaktivierung zu verhindern, wenn sie dann gebraucht werden.

##### **11.4.3.2 Herstellung der Säule und Reinigung der Fraktion A**

Säule A: Eine Pasteurpipette (11.4.2.2) wird mit silanisierter Glaswolle (11.4.2.1, 0,25 cm bis 0,5 cm) verstopft. Wasserfreies Natriumsulfat (11.4.1.11, etwa 0,5 cm), basisches Kieselgel (11.4.1.7, 3 cm bis 3,5 cm), schwefelsaures Kieselgel (11.4.1.8, 3 cm bis 3,5 cm) und Natriumsulfat (11.4.1.11, etwa 0,5 cm) werden in aufsteigender Reihenfolge hinzugegeben. Die Pipette wird bis zu einem Maximum gefüllt, bei dem sich die Pipette verengt. Diese wird mit einer geeigneten PTFE-Verbindungsmuffe (11.4.2.5) mit einer sauberen Pasteurpipette verbunden, die mit einem Vorratsbehälter (11.4.2.4) verbunden ist, der als ein Vorratsbehälter für das Lösemittel eingesetzt wird. Mit einem 25-ml-Messzylinder (6.7) wird n-Hexan (11.4.1.1, [20 ± 2] ml) zum Vorratsbehälter (11.4.2.4) gegeben, um die Pipettenminisäule zu konditionieren. Das n-Hexan wird eluiert und verworfen.

Säule B: Eine Pasteurpipette (11.4.2.2) wird mit silanisierter Glaswolle (11.4.2.1, 0,25 cm bis 0,5 cm) verstopft. Wasserfreies Natriumsulfat (11.4.1.11, etwa 0,5 cm), aktiviertes Aluminiumoxid (11.4.2.3, 6,5 cm bis 7,5 cm) und Natriumsulfat (11.4.1.11, etwa 0,5 cm) werden in aufsteigender Reihenfolge hinzugegeben. Die Pipette wird mit einer geeigneten PTFE-Verbindungsmuffe (11.4.2.5) mit dem Vorratsbehälter (11.4.2.4) verbunden, der als ein Vorratsbehälter für das Lösemittel eingesetzt wird. Mit einem 25-ml-Messzylinder (6.7) wird Dichlormethan (11.4.1.2, [20 ± 2] ml) zum Vorratsbehälter gegeben, um die Pipettenminisäule zu konditionieren. Das Dichlormethan (11.4.1.2) wird eluiert und verworfen. n-Hexan (11.4.1.1, [20 ± 2] ml) wird zum Vorratsbehälter gegeben und eluiert und verworfen. Wenn die Säulenkonditionierung vollständig abgeschlossen ist, wird die Säule A mit einer geeigneten PTFE-Verbindungsmuffe (11.4.2.5) mit der Säule B verbunden.

ANMERKUNG Es ist sicherzustellen, dass die Säule B niemals austrocknet.

Mit einer sauberen Pasteurpipette (11.4.2.2) wird der Extrakt (11.3.4.4) quantitativ vom Verdampfungsröhrchen (6.2) zum oberen Ende der Säule A (11.4.3.2) überführt, die schrägen Seiten des Röhrchens/Fläschchens werden 3-mal mit n-Hexan (11.4.1.1, etwa 0,5 ml) gewaschen und diese Waschflüssigkeiten werden zum oberen Ende der Säule A überführt. Sobald die drei Waschungen durchgeführt wurden, wird die obere Säule mit einer PTFE-Verbindungsmuffe (11.4.2.5) mit der an den Vorratsbehälter angeschlossenen Pipette verbunden. Das sollte einen Stapel von vier verbundenen Elementen ergeben: ein Vorratsbehälter

(11.4.2.4) über einer sauberen Pasteurpipette (11.4.2.2) über Säule A über Säule B (11.4.3.2). n-Hexan (11.4.1.1,  $[10 \pm 2]$  ml) wird zum Vorratsbehälter gegeben, eluiert und verworfen. Säule A (saures/basisches Kieselgel) wird entfernt und an deren Stelle wird Säule B (Aluminiumoxid) mit der sauberen Pasteurpipette (11.4.2.2) verbunden. Mit einem 25-ml-Messzylinder (6.7) wird Dichlormethan/n-Hexan (11.4.1.10,  $[20 \pm 2]$  ml) in den Vorratsbehälter gefüllt, um die Fraktion A in ein sauberes Verdampfungsröhrchen (6.2) zu eluieren und es wird weiter nach 11.2.4.2 verfahren.

Wie in 11.5.6 oder in Anhang E beschrieben, kann besonders bei verschmutzten komplexen Proben (oxidiertes Fett/Öl) möglicherweise für die zusätzliche Reinigung eine Säule mit dünner Kieselgelschicht angewendet werden, vorausgesetzt die Kommissions-Verordnung (EG) 152/2009 [1] wird eingehalten.

#### 11.4.4 Herstellung der Säule und Reinigung der planaren Analyten der Fraktion B

Die Reinigung der PCDD/F- und non-ortho PCB-Fraktion erfordert zwei Reinigungssäulen. Um sicherzustellen, dass sie keine Feuchte absorbieren und deaktiviert werden, sind diese nur herzustellen, wenn sie gebraucht werden.

Säule C: Eine Pasteurpipette (11.4.2.2) wird mit silanisierter Glaswolle (11.4.2.1, 0,25 cm bis 0,5 cm) verstopft. Wasserfreies Natriumsulfat (11.4.1.11, etwa 0,5 cm), schwefelsaures Kieselgel (11.4.1.8, 3,5 cm bis 5,5 cm) und wasserfreies Natriumsulfat (11.4.1.11, etwa 0,5 cm) werden in aufsteigender Reihenfolge hinzugegeben. Die Pipette wird mit einer geeigneten PTFE-Verbindungs-muffe (11.4.2.5) mit einem Vorratsbehälter (11.4.2.4) verbunden, der als ein Vorratsbehälter für das Lösemittel eingesetzt wird. Mit einem 25-ml-Messzylinder (6.7) wird n-Hexan (11.4.1.1,  $[20 \pm 2]$  ml) zum Vorratsbehälter gegeben, um die Pipettenminisäule zu konditionieren. Das n-Hexan (11.4.1.1) wird eluiert und verworfen.

Säule D: Eine Pasteurpipette (11.4.2.2) wird mit silanisierter Glaswolle (11.4.2.1, 0,25 cm bis 0,5 cm) verstopft. Wasserfreies Natriumsulfat (11.4.1.11, etwa 0,5 cm), Aluminiumoxid (11.4.2.3, 6,5 cm bis 7,5 cm) und wasserfreies Natriumsulfat (11.4.1.11, etwa 0,5 cm) werden in aufsteigender Reihenfolge hinzugegeben. Die Pipette wird mit einer geeigneten PTFE-Verbindungs-muffe (11.4.2.5) mit dem Vorratsbehälter (11.4.2.4) verbunden, der als ein Vorratsbehälter für das Lösemittel eingesetzt wird. Mit einem 25-ml-Messzylinder (6.7) wird Dichlormethan (11.4.1.2,  $[20 \pm 2]$  ml) zum Vorratsbehälter gegeben, um die Pipettenminisäule zu konditionieren. Das Dichlormethan (11.4.1.2) wird eluiert und verworfen. n-Hexan (11.4.1.1,  $[20 \pm 2]$  ml) wird zum Vorratsbehälter gegeben, eluiert und verworfen.

Wenn die Säulenkonditionierung vollständig abgeschlossen ist, wird mit einer geeigneten PTFE-Verbindungs-muffe (11.4.2.5) die Säule C über der Säule D verbunden. Mit einer sauberen Pasteurpipette (11.4.2.2) wird der in 11.3.4.5 gewonnene Extrakt quantitativ zum oberen Ende der Säule C überführt, das Fläschchen wird 3-mal mit n-Hexan (11.4.1.1, etwa 0,5 ml) gewaschen und diese Waschflüssigkeiten werden zum oberen Ende der Säule C überführt. Sobald die drei Waschungen durchgeführt wurden, wird die obere Säule mit einer PTFE-Verbindungs-muffe (11.4.2.5) mit der an den Vorratsbehälter angeschlossenen Pipette verbunden. Das sollte einen Stapel von vier verbundenen Elementen ergeben: ein Vorratsbehälter (11.4.2.4) über einer sauberen Pasteurpipette (11.4.2.2) über Säule C über Säule D. Mit einem 25-ml-Messzylinder (6.7) wird n-Hexan (11.4.1.1,  $[20 \pm 2]$  ml) zum Vorratsbehälter gegeben, um die PCDD/F und die non-ortho PCB an der Säule D zu eluieren, das Hexan ist möglichst zu verwerfen.

Säule C (schwefelsaures Kieselgel) wird entfernt und an deren Stelle wird Säule D (Aluminiumoxid) mit der sauberen Pasteurpipette (11.4.2.2) verbunden. Mit einem 50-ml-Messzylinder (6.7) werden 30 ml DCM/n-Hexan (11.4.1.10) in den Vorratsbehälter gegeben, um die PCDD/F und die non-ortho PCB in ein Verdampfungsröhrchen (6.2) zu eluieren und es wird weiter nach 11.2.4.3 verfahren.

Wie in 11.5.6 oder in Anhang E beschrieben, kann besonders bei verschmutzten komplexen Proben (oxidiertes Fett/Öl) möglicherweise für die zusätzliche Reinigung eine Säule mit dünner Kieselgelschicht angewendet werden, vorausgesetzt die Kommissions-Verordnung (EG) 152/2009 [1] wird eingehalten.

## **11.5 Modul CIII: Entfernen der Matrix, manuelle Reinigung der Probe und Gruppentrennung**

### **11.5.1 Allgemeines**

Für die erste Reinigung der Probe (Entfernen von lipophilen Substanzen) nach der Extraktion wird eine manuell zu packende lange mehrschichtige Kieselgelsäule (11.5.4) angewendet. Die lange mehrschichtige Kieselgelsäule muss für die Zurückhaltung der störenden Fett- und fettlöslichen Matrix geeignet sein. Die PCDD/F/PCB enthaltende Fraktion eluiert in Abhängigkeit von der Durchflussrate und der Menge der stationären Phase von Cyclohexan/Toluol in Volumenanteilen von 1 : 1 in eine bestimmte Fraktion. Die gesammelte Fraktion wird in einem Verdampfer fast bis zur Trockne eingengt und erneut im geeigneten Lösemittel für den nächsten Reinigungsschritt (GPC [11.5.5] und/oder an der kurzen mehrschichtigen Kieselgelsäule [11.5.6]) gelöst. Die Gruppentrennung (in Fraktionen von Dioxinen und PCB) wird an einer Florisilsäule (11.5.7) durchgeführt. Schließlich wird der Extrakt mit einer Aktivkohlesäule gereinigt (Fraktion 1 = PSDD/F) und weiter getrennt in Fraktion 2 (= non-ortho PCB), Fraktion 3 (= mono-ortho PCB) und Fraktion 4 (= nicht dioxin-ähnliche PCB).

### **11.5.2 Reagenzien**

**11.5.2.1 n-Heptan**, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

**11.5.2.2 Ethylacetat**, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

**11.5.2.3 n-Hexan**, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

**11.5.2.4 Ethylacetat/Cyclohexan**, in Volumenanteilen von 1 : 1.

1 l Ethylacetat (11.5.2.2) wird mit 1 l Cyclohexan (11.5.2.5) gründlich gemischt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur in einer dicht verschlossenen Flasche aufbewahrt.

**11.5.2.5 Cyclohexan**, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

**11.5.2.6 Toluol**, für die Dioxin- und PCB-Analyse.

**11.5.2.7 Schwefelsäure**, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 96%ig, spezifische Dichte 1,84.

**11.5.2.8 Cyclohexan/Toluol**, in Volumenanteilen von 1 : 1

1 l Cyclohexan (11.5.2.5) wird mit 1 l Toluol (11.5.2.6) gründlich gemischt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur in einer dicht verschlossenen Flasche aufbewahrt.

#### **11.5.2.9 Wärmebehandeltes Kieselgel.**

Wärmebehandlung von Kieselgel über Nacht (≥ 10 h) bei 600 °C.

#### **11.5.2.10 Deaktiviertes Kieselgel.**

Wärmebehandeltes Kieselgel (11.5.2.9) wird durch Zugabe von 5 g Wasser zu 95 g des wärmebehandelten Kieselgels deaktiviert; es wird gründlich homogenisiert. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt mindestens über Nacht.

#### **11.5.2.11 NaOH-Pellets.**

#### **11.5.2.12 NaOH**, 1 mol/l.

40,0 g NaOH-Pellets (11.5.2.11) werden in 1 l Wasser gelöst.

#### 11.5.2.13 Basisches Kieselgel.

30 ml des 1 mol/l NaOH (11.5.2.12, wässrige Lösung) werden mit 100 g wärmebehandeltem Kieselgel (11.5.2.9) vermischt; es wird gründlich homogenisiert. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt mindestens über Nacht.

#### 11.5.2.14 Schwefelsaures Kieselgel.

46 g konzentrierte Schwefelsäure (11.5.2.7) werden mit 100 g wärmebehandeltem Kieselgel (11.5.2.9) gemischt; es wird gründlich homogenisiert. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt mindestens über Nacht.

#### 11.5.2.15 Florisil.

#### 11.5.2.16 Wärmebehandeltes Florisil.

Wärmebehandlung von Florisil (11.5.2.15) über Nacht ( $\geq 10$  h) bei 600 °C.

#### 11.5.2.17 Deaktiviertes Florisil.

Wärmebehandeltes Florisil (11.5.2.16) wird durch Zugabe von 3 g Wasser zu 97 g des wärmebehandelten Florisils (11.5.2.16) deaktiviert; es wird gründlich homogenisiert. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt mindestens über Nacht.

#### 11.5.2.18 Kohlenstoff, z. B. Carbopack B.

Kohlenstoff wird mit Toluol mit einem Soxhlet-Apparat für mindestens 24 h extrahiert.

#### 11.5.2.19 Celit (Kieselgur).

#### 11.5.2.20 Wärmebehandeltes Celit.

Wärmebehandlung von Celit (11.5.2.19) für  $\geq 10$  h bei 650 °C.

### 11.5.3 Geräte

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

#### 11.5.3.1 Chromatographische Säule, mit 10 cm Länge, Innendurchmesser etwa 1 cm.

#### 11.5.3.2 Chromatographische Säule, mit 20 cm Länge, Innendurchmesser etwa 1 cm.

#### 11.5.3.3 Chromatographische Säule, mit 30 cm Länge, Innendurchmesser etwa 4 cm.

#### 11.5.3.4 HPLC-Pumpe.

Die HPLC-Pumpe muss zur Aufrechterhaltung einer Durchflussrate von 5,0 ml/min Ethylacetat/Cyclohexan (11.5.2.4) oder Toluol (11.5.2.6) oder n-Hexan (11.5.2.3) oder von Gemischen von Toluol und n-Hexan geeignet sein.

#### 11.5.3.5 Automatisiertes Injektionssystem.

Das automatisierte Injektionssystem muss zur Durchführung einer Reihe von automatischen Injektionen von jeweils 5 ml geeignet sein.

#### **11.5.3.6 GPC-Säule.**

Die GPC-Säule muss zum Durchführen einer Trennung, wie durch die EPA-Methode 3640 A [5] festgelegt, geeignet sein. Beispielsweise: 45 cm Länge, 2,5 cm Innendurchmesser, stationäre Phase Bio Beads SX-3 (11.5.3.8) oder gleichwertig. Die Dioxin/PCB enthaltende Fraktion eluiert in Abhängigkeit von der Durchflussrate und der Menge der stationären Phase in eine bestimmte Fraktion. Vor der Anwendung muss die Fraktion überprüft werden. Als Orientierung, diese Säule ist zur Trennung von etwa 0,5 g bis 1 g Fett aus Dioxinen und PCB geeignet (vor Anwendung überprüfen).

**11.5.3.7 Fraktionssammler**, geeignet zur Sammlung von Fraktionen bis zu 500 ml.

**11.5.3.8 BIO Beads SX-3**, neutral, poröse Styrendivinybenzen-Copolymerperlen, mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 5 ml/min bei einem Gegendruck von 300 psi.

#### **11.5.4 Probenreinigung mit einer langen mehrschichtigen Kieselgelsäule**

Eine chromatographische Säule mit einer Länge von 30 cm (11.5.3.3), Innendurchmesser etwa 4 cm oder mit vergleichbaren Säulenmaßen wird vom Boden bis zum oberen Ende gepackt mit: 5 g deaktiviertes Kieselgel (11.5.2.10), 10 g basisches Kieselgel (11.5.2.13), 5 g deaktiviertes Kieselgel (11.5.2.10), 30 g schwefelsaures Kieselgel (11.5.2.14), 5 g deaktiviertes Kieselgel (11.5.2.10) und 35 g basisches Kieselgel (11.5.2.13).

Die mehrschichtige Kieselgelsäule wird mit 150 ml Cyclohexan/Toluol (11.5.2.8) vorgewaschen. Am Auslass der Säule wird eine entsprechende 500-ml-Flasche angebracht.

Der in 50 ml Cyclohexan/Toluol (11.5.2.8) gelöste Abdampfrückstand wird auf die lange mehrschichtige Kieselgelsäule gegeben.

Die PCDD/F/PCB enthaltende Fraktion wird mit 150 ml Cyclohexan/Toluol (11.5.2.8) eluiert.

Die gesammelte Fraktion wird in einem Verdampfungssystem (6.1) fast bis zur Trockne eingengt und erneut im geeigneten Lösemittel für die nächsten GPC-Schritte (11.5.5) und/oder an der kurzen mehrschichtigen Kieselgelsäule (11.5.6) gelöst.

#### **11.5.5 Probenreinigung mit Gelpermeations-Chromatographie**

Die vorbereitete Probe von 2,5 g Öl (9.2.2) wird in vier Portionen von je 5 ml, die jeweils nicht mehr als 0,75 g Fett enthalten, auf die GPC (11.5.3.6) injiziert (11.5.3.5). Die entsprechenden Fraktionen werden vereint, oder der Kieselgel-gereinigte Extrakt von 10 g Futtermittel (11.5.4) wird in Portionen von je 5 ml, die jeweils nicht mehr als 0,75 g Fett enthalten, auf die GPC (11.5.3.6) injiziert. Falls mehr als eine Injektion notwendig war, werden die entsprechenden Fraktionen vereint.

Die gesammelte(n) GPC-Fraktion(en) wird (werden) in einem Verdampfer (6.1) (40 °C, N<sub>2</sub>) auf ein Volumen von etwa 1 ml eingengt. Mit einer Florisilsäule (11.5.7) wird fortgefahren, oder (optional) es werden kleine Mengen Fett/Matrix mit einer kurzen mehrschichtigen Kieselgelsäule (11.5.6) entfernt.

ANMERKUNG Das GPC-System wird unter den empfohlenen Betriebsbedingungen abgeglichen und die Leistung der GPC-Säule wird überprüft, wie in der EPA-Methode 3640 A [6] festgelegt. Die zu sammelnde Fraktion muss mit einem Gemisch von PCB bestimmt werden.

#### **11.5.6 Kurze mehrschichtige Säule (optional)**

Eine chromatographische Säule mit einer Länge von 10 cm (11.5.3.1), Innendurchmesser etwa 1 cm oder mit vergleichbaren Säulenmaßen wird vom Boden bis zum oberen Ende gepackt mit: 0,3 g deaktiviertes Kieselgel (11.5.2.10), 1,0 g basisches Kieselgel (11.5.2.13), 0,3 g deaktiviertes Kieselgel (11.5.2.10), 1 g schwefelsaures Kieselgel (11.5.2.14) und 0,3 g deaktiviertes Kieselgel (11.5.2.10).

Die mehrschichtige Kieselgelsäule wird mit 40 ml n-Heptan (11.5.2.1) vorgewaschen.

An den Auslass der Säule wird eine entsprechende 25-ml-Flasche angebracht.

Die in 1 ml n-Heptan gelöste, bei (11.5.5) erhaltene Fraktion wird auf die Säule gegeben. Die Säule wird mit 20 ml n-Heptan (11.5.2.1) eluiert. Der gereinigte Extrakt kann z. B. mit einer Aktivkohlesäule (A und B) (11.3.4.3) in die beiden gewünschten Fraktionen getrennt werden oder mit einer Florisilsäule (11.5.7) in die Dioxin- und PCB-Fraktion.

#### **11.5.7 Trennung von PCDD/F und PCB an einer Florisilsäule (manuell gepackte Säule)**

Die Florisilsäule muss zur Trennung der PCDD/F aus PCB (nicht dioxin-ähnliche PCB und dl-PCB) geeignet sein. Eine chromatographische Säule mit einer Länge von 20 cm (11.5.3.2), Innendurchmesser 1 cm, stationäre Phase 6 g deaktiviertes Florisil (11.5.2.17) wird gepackt. Vor der Anwendung muss die Fraktionierung überprüft werden.

1 ml des vorgewaschenen Eluats wird auf die kurze mehrschichtige Kieselgelsäule (11.5.6) gegeben oder das GPC-vorgewaschene Eluat (11.5.5) auf die Florisilsäule (voreluiert mit 50 ml n-Heptan (11.5.2.1), das 0,2 % Toluol (11.5.2.6) enthält). Die PCB enthaltende Fraktion wird mit 50 ml n-Heptan (11.5.2.1), das 0,2 % Toluol (11.5.2.6) enthält und anschließend wird die PCDD/F-Fraktion mit 60 ml Toluol (11.5.2.6) in entsprechende Flaschen eluiert.

Die gesammelten Fraktionen werden in einem Verdampfer (6.1) fast bis zur Trockne eingengt und für die weitere Reinigung/Fraktionierung mit der Aktivkohlesäule (11.5.8 und 11.5.9) erneut in n-Hexan (11.5.2.3) gelöst.

#### **11.5.8 Trennung von PCB (PCB-Fraktion aus der Florisilsäule) in nicht dioxin-ähnliche PCB, mono-ortho PCB und non-ortho PCB an einer automatisierten Aktivkohlesäule**

Die Aktivkohlesäule muss zur Trennung von nicht dioxin-ähnlichen PCB, mono-ortho PCB und non-ortho PCB geeignet sein. Die Reinigung kann automatisch mit einer HPLC-Pumpe, -Säule und einem Fraktionssammler erfolgen oder manuell.

Eine chromatographische Säule mit einer Länge von 20 cm, Innendurchmesser 1 cm (einstellbar auf die Menge der stationären Phase) wird mit einem Gemisch von 2,0 g Aktivkohle (11.5.2.18) und 2 g wärmebehandeltes Celit (11.5.2.20) gepackt.

1 ml Eluat der PCB-Fraktion von der Florisilsäule (11.5.7) wird auf die Aktivkohlesäule gegeben. Die PCB enthaltene Fraktion wird mit den folgenden Lösemitteln und Lösemittelgemischen eluiert. Vor der Anwendung muss die Fraktionierung überprüft werden.

- nicht dioxin-ähnliches PCB: n-Hexan (Fraktionierungszeit z. B. 18 min, Durchflussrate 1,5 ml/min);
- mono-ortho PCB: n-Hexan/Toluol (92,5 : 7,5, V/V) (Fraktionierungszeit z. B. 20 min, Durchflussrate 1,5 ml/min);
- non-ortho PCB: Toluol (Fraktionierungszeit z. B. 25 min, Durchflussrate 1,5 ml/min).

PCB wird in den vorstehend erwähnten Lösemitteln oder Lösemittelgemischen in entsprechende Flaschen eluiert.

Zu den gesammelten Fraktionen werden 100 µl TCDD-RS-VI (Anhang B, B.2.20) hinzugefügt und anschließend in einem Verdampfer fast bis zur Trockne eingengt und auf ein angemessenes Volumen, z. B. 25 µl bis 50 µl gelöst und in ein Gläschen für den automatischen GC-Probengeber (GC-Autosampler) (11.2.3.8) mit einem Mikroeinsatz mit flachem Boden (11.2.3.9) überführt. Es wird weiter bei Modul D (Abschnitt 12, GC/HRMS) verfahren.

### **11.5.9 Reinigung der PCDD/F-Fraktion an Aktivkohlesäulen**

Die Aktivkohlesäule muss zur endgültigen Reinigung der PCDD/F-Fraktion für die GC/MS-Messung geeignet sein. Die Reinigung kann manuell oder automatisiert mit einer HPLC-Pumpe (11.5.3.4), einer Säule (11.5.3.1) und einem Fraktionssammler (11.5.3.7) erfolgen.

Eine chromatographische Säule mit der Länge von 10 cm (11.5.3.1), Innendurchmesser 1 cm, wird mit 0,4 g eines Gemisches von 0,07 g Aktivkohle (11.5.2.18) und 0,33 g wärmebehandeltes Celit (11.5.2.20) gepackt.

Die Aktivkohlesäule wird mit 20 ml n-Hexan vorgespült.

1 ml des vorgewaschenen Eluats der PCDD/F-Fraktion von der Florisilsäule (11.5.7) wird auf die Aktivkohlesäule gegeben und mit 2 ml n-Hexan (11.5.2.3) vorgewaschen. Eine 100-ml-Flasche wird am Auslass der Säule angebracht. Die PCDD/F-Fraktion wird mit 50 ml Toluol (11.5.2.6) eluiert. Zu den gesammelten Fraktionen werden 100 µl TCDD-RS-VI (Anhang B, B.2.20) hinzugefügt. Die gesammelte Fraktion wird in einem Verdampfer fast bis zur Trockne eingengt und für die GC/MS-Messung erneut in Toluol (11.5.2.6) gelöst. Es wird weiter bei Modul D (Abschnitt 12, GC/HRMS) verfahren.

**ANMERKUNG** Der manuelle Vorgang kann wie folgt automatisiert werden: Eine chromatographische Säule mit der Länge von 10 cm (11.5.3.1), Innendurchmesser 1 cm, wird mit einem Gemisch von 0,2 g Aktivkohle (11.5.2.18) und 0,2 g wärmebehandeltem Celit (11.5.2.20) gepackt. 1 ml des vorgewaschenen Eluats (11.5.7) wird auf die Aktivkohlesäule gegeben und mit 45 ml n-Hexan (11.5.2.3) bei einer Durchflussrate von 1,5 ml/min gewaschen. Die PCDD/F enthaltende Fraktion eluiert mit 37,5 ml Toluol (11.5.2.6) bei einer Durchflussrate von 1,5 ml/min unter Rückfluss. Es wird weiter bei Modul D (Abschnitt 12, GC/HRMS) verfahren.

Wie in Anhang E beschrieben, kann besonders bei verschmutzten komplexen Proben (oxidiertes Fett/Öl) für die zusätzliche Reinigung eine Säule mit dünner Kieselgelschicht für die PCDD/F und PCB-Fraktion angewendet werden, vorausgesetzt die Kommissions-Verordnung (EG) 152/2009 [1] wird eingehalten.

## **12 Modul D: Gaschromatographie mit hochauflösender Massenspektrometrie (GC/HRMS)**

### **12.1 Allgemeines**

Der Gaschromatograph muss mit einem Splitlos-Injektor oder einem Injektor mit großem Volumen ausgerüstet sein, die für Injektionen bis zu maximal 100 µl geeignet sind, siehe Anhang A.

Ein Beispiel für die Splitlos-Injektor-Parameter sind eine Temperatur von 220 °C und eine Splitzeit von 2 min.

**ANMERKUNG** Die Kommissions-Verordnung (EG) 152/2009 vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln wurde übernommen, um die Anwendung von GC-MS/MS zu ermöglichen. Es ist zulässig, GC-MS/MS im Rahmen dieser Norm anzuwenden, vorausgesetzt, dass die Leistungskriterien, wie in der Kommissions-Verordnung (EG) 152/2009 vom 27. Januar 2009 festgelegt, erfüllt werden.

#### **12.1.1 Reagenzien und Materialien**

##### **12.1.1.1 Perfluor-Kerosin (PFK).**

##### **12.1.1.2 Gaschromatograph, muss zum Betrieb mit Kapillarsäulen geeignet sein.**

Die Verwendung einer Kapillarsäule, beschichtet mit einer stationären Phase von einer nicht-polaren Polarität (Maße 60 m × 0,25 mm, Schichtdicke 0,25 µm) und des folgenden Programms wird empfohlen.

Der Säulenfluss (He) wird bei 1,2 ml/min konstant gehalten. Das Temperaturprogramm des Ofens der GC-Säule beginnt bei einer Anfangstemperatur von 110 °C, die 3 min gehalten wird. Danach wird die Temperatur mit 20 °C/min auf eine Temperatur von 200 °C erhöht, die 10 min gehalten wird. Nach diesem wird die Temperatur mit 4 °C/min bis zu einer Endtemperatur von 310 °C erhöht. Schließlich wird der GC auf 110 °C abgekühlt. Im Fall von Problemen bei der Trennung bei Proben im Bereich von legalen Grenzen könnte eine zusätzliche Säule mit anderer Polarität notwendig sein.

ANMERKUNG Eine alternative Säule und/oder ein alternatives Temperaturprogramm kann/können verwendet werden, vorausgesetzt, dass die Kommissions-Verordnung (EG) 152/2009 [1] hinsichtlich der Trennung kritischer Kongener beachtet wird.

## 12.2 Durchführung

### 12.2.1 Zu messende Ionen

Ein Beispiel zu messender ausgewählter Ionen ist in Anhang D angegeben.

### 12.2.2 Vorbereitung des Systems

Das Gaschromatographie-System wird entsprechend der empfohlenen Betriebsbedingungen abgeglichen.

### 12.2.3 Abstimmen des HRMS-Systems

Mit einem PFK-Molekularleck wird das Gerät abgestimmt, um das geforderte Auflösungsvermögen von 10 000 (10-%-Tal) bei einem  $m/z$ -Wert von 304,982 4 (PFK) oder andere geeignete PFK-Referenzsignale innerhalb des in den Tabellen D.3 bis D.8 festgelegten Bereichs der  $m/z$ -Werte zu erfüllen. Die Auflösung und die genauen  $m/z$ -Werte von drei bis fünf Referenzpeaks, die den Massenbereich des Deskriptors abdecken, werden beobachtet und aufgezeichnet. Die Auflösung muss größer oder gleich 10 000 sein und die Abweichung zwischen dem genauen  $m/z$ -Wert und dem theoretischen  $m/z$ -Wert für jeden genauen beobachteten  $m/z$ -Wert muss geringer als 5 ppm sein.

### 12.2.4 Überprüfung der Geräteeinstellungen

2 µl eines mittleren Kalibrierniveaus werden injiziert und Peakform und Retentionszeiten für alle Verbindungen der Fraktion „A“ und „B“ überprüft. Falls erforderlich, wird das SIR-Fenster für die Start-/Endzeit im MS-Menü des Geräteverfahrens modifiziert.

### 12.2.5 Überprüfung der Trennung des GC-Systems

#### 12.2.5.1 Trennung der Dioxine/Furane und der non-ortho PCB

An einer nicht-polaren Säule muss die Talhöhe für die Trennung der Verbindungen  $^{13}\text{C}$ -1,2,3,4,7,8-HxCDF und  $^{13}\text{C}$ -1,2,3,6,7,8-HxCDF  $\leq 25$  % sein. Anforderung der EPA-Methode 1613 [7] und den EU-Verordnungen (Kommissions-Verordnung (EG) 152/2009) [1].

#### 12.2.5.2 Trennung von mono-ortho PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB

An einer nicht-polaren Säule muss die Talhöhe für die Trennung der Verbindungen  $^{13}\text{C}$ -PCB-123 und  $^{13}\text{C}$ -PCB-118 und  $^{13}\text{C}$ -PCB-156 und  $^{13}\text{C}$ -PCB-157  $\leq 25$  sein. Anforderung der EPA-Methode 1613 [7] nur für Dioxine.

Die Koelution wird wie folgt berechnet:

$$Koelution = \left( \frac{x}{y} \right) \times 100 \% \quad (1)$$

Dabei ist

- $x$  die Höhe des Tals zur Grundlinie;
- $y$  die Peakhöhe des intensivsten Peaks.

## **12.2.6 Überprüfung der Empfindlichkeit des Systems**

### **12.2.6.1 Empfindlichkeit von Dioxinen/Furanen und non-ortho PCB**

Das Signal-Rausch-Verhältnis von 2,3,7,8-TCDD bei der Masse 321,893 6  $m/z$  muss mindestens 15 fg bei 100 fg an der Säule betragen. Wenn nicht, muss eine geeignete Maßnahme durchgeführt werden, z. B. durch Reinigung der Ionenquelle (falls eine verunreinigte Ionenquellen vorhanden ist) oder durch Neueinstellung des Gerätes oder durch Wechseln der analytischen Säule (schlechte Peakform).

### **12.2.6.2 Empfindlichkeit von mono-ortho PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB**

Das Signal-Rausch-Verhältnis von PCB-157 (3261,838 6  $m/z$ ) muss mindestens 10 fg bei 500 fg an der Säule betragen. Wenn nicht, muss eine geeignete Maßnahme durchgeführt werden, z. B. durch Reinigung der Ionenquelle (falls eine verunreinigte Ionenquellen vorhanden ist) oder durch Neueinstellung des Gerätes oder durch Wechseln der analytischen Säule (schlechte Peakform).

## **12.2.7 Bestimmung**

Mit einem Splitlos-Injektor werden 2  $\mu$ l der Kalibrierstandardlösungen (1 bis 9, Tabelle C.2) für mono-ortho PCB und nicht dioxin-ähnliche PCB und ein gleiches Volumen der Fraktion „A“ der Probenextrakte (erhalten bei CI und CII oder Fraktion 3 und Fraktion 4 [erhalten bei CIII]) injiziert. Diese Messungen werden für die Fraktion „B“ (erhalten bei CI und CII oder Fraktion 1 und 2 [erhalten bei CIII]) sowohl für die Kalibrierreihe als auch für die Proben wiederholt.

**ANMERKUNG** Bei der Fraktion 1, 2, 3 und 4 könnten die beobachteten Ionen (Anhang D) auf die zutreffenden eingeschränkt werden.

Die einzelnen Dioxine/Furane und dioxin-ähnlichen PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB werden auf der Grundlage der Retentionszeit, der genauen Masse und dem Ionenverhältnis identifiziert.

Die Menge der Dioxine/Furane und dioxin-ähnlichen PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB wird durch Vergleich der Größe der Probenpeaks mit denen der bekannten Menge der entsprechenden Dioxine/Furane und dioxin-ähnlichen PCB und nicht dioxin-ähnlichen PCB in den Kalibrierstandardlösungen (Tabelle C.2, 1 bis 9) bestimmt. Die Kalibrierung beruht auf dem Isotopen-Verdünnungsprinzip.

# **13 Berechnung und Angabe der Ergebnisse**

## **13.1 Allgemeines**

Bevor alle Daten bearbeitet werden, werden die Retentionszeiten aller zu analysierenden Verbindungen überprüft und, falls erforderlich, im Bearbeitungsverfahren modifiziert. Nach der Bearbeitung der Daten wird jedes Ergebnis manuell auf die korrekte Integration überprüft.

### **13.1.1 Kalibrierung durch Isotopenverdünnung**

Die Kalibrierung durch Isotopenverdünnung wird für die Dioxine, Furane und dioxin-ähnlichen PCB angewendet, bei denen die markierten Verbindungen vor der Extraktion den Proben zugefügt werden. Zur Kalibrierung des analytischen Systems durch Isotopenverdünnung werden 2  $\mu$ l der Kalibrierstandards 1 bis 9 (Anhang B) injiziert. Der relative Responsefaktor (*RRF*) wird für jede Konzentration berechnet.