

DIN EN 18032



ICS 67.050

Einsprüche bis 2024-03-05

Entwurf

**Lebensmittel –
Schnellmethode zur Bestimmung mehrerer hochpolarer Pestizide und
ihrer Metaboliten in Lebensmitteln nach Extraktion mit angesäuertem
Methanol und Messung mittels LC- oder IC-MS/MS (QuPPE-Methode);
Deutsche und Englische Fassung prEN 18032:2023**

Foodstuff –

Quick Method for the Analysis of Multiple Highly Polar Pesticides and their Metabolites in Foodstuff Involving Extraction with Acidified Methanol and Measurement by LC- or IC-MS/MS (QuPPE-Method);

German and English version prEN 18032:2023

Produit alimentaire –

Méthode rapide pour l'analyse de plusieurs pesticides hautement polaires et de leurs métabolites dans les aliments impliquant une extraction avec du méthanol acidifié et une mesure par LC- ou IC-MS/MS (QuPPE-Methode);

Version allemande et anglaise prEN 18032:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-01-05 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 185 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 18032:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-08 AA „Pestizide“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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.

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

Lebensmittel – Schnellmethode zur Bestimmung mehrerer hochpolarer Pestizide und ihrer Metaboliten in Lebensmitteln nach Extraktion mit angesäuertem Methanol und Messung mittels LC- oder IC-MS/MS (QuPPe-Methode)

Foodstuff – Quick Method for the Analysis of Multiple Highly Polar Pesticides and their Metabolites in Foodstuff Involving Extraction with Acidified Methanol and Measurement by LC- or IC-MS/MS (QuPPe-Method)

Produit alimentaire – Méthode rapide pour l'analyse de plusieurs pesticides hautement polaires et de leurs métabolites dans les aliments impliquant une extraction avec du méthanol acidifié et une mesure par LC- ou IC-MS/MS (QuPPe-Methode)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Vorbereitung und Lagerung der Proben	7
5.1 Allgemeine Überlegungen	7
5.2 Laborprobe	7
5.3 Behandlung der Laborproben vor dem Mahlen	7
5.4 Homogenisierung der Probe	8
5.4.1 Allgemeine Überlegungen	8
5.4.2 Vorbereitung der Homogenate von getrockneten Früchten und ähnlichen Lebensmitteln	8
5.5 Analytische Einwaage	9
6 Durchführung	9
7 Auswertung der Ergebnisse	21
7.1 Identifizierung	21
7.2 Kalibrierung und Quantifizierung	21
7.3 Berechnung der Rückstandskonzentrationen	22
7.3.1 Berechnung der Rückstandskonzentrationen durch externe Kalibrierung ohne IL-ISs	22
7.3.2 Berechnung der Rückstandskonzentrationen durch externe Kalibrierung mit IL-IS	23
7.3.3 Berechnung der Rückstandskonzentration mit dem Standardadditionsverfahren	24
7.3.4 Berechnung der Rückstandskonzentrationen bei komplexen Rückstandsdefinitionen	24
8 Validität des Verfahrens	25
9 Untersuchungsbericht	28
10 Zusätzliche Informationen über die Analyse	29
10.1 Extraktionsdauer	29
10.2 Skalierung	29
Anhang A (informativ) Beschreibung der Module	30
A.1 Reagenzien	30
A.2 Prüfeinrichtungen und Geräte	36
A.3 Extraktionsmodule (E)	38
A.3.1 Allgemeines	38
A.3.2 Modul E1: Extraktion von 10 g Probe mit ≥ 80 % Feuchtegehalt	38
A.3.3 Modul E2: Extraktion von 10 g Probe mit 40 % bis 80 % Feuchtegehalt, nach Zugabe von Wasser	39
A.3.4 Modul E3: Extraktion eines rehydratisierten Homogenats von Proben mit einem ursprünglichen Feuchtegehalt zwischen 15 % und 40 %	40
A.3.5 Modul E4: Honig	40
A.3.6 Modul E5a: Extraktion von 2 g oder 5 g Probe mit einem Feuchtegehalt von < 15 % nach Zugabe von 10 ml Wasser	41
A.3.7 Modul E5b: Extraktion von 2 g oder 5 g Probe mit einem Feuchtegehalt von < 15 % nach Zugabe von Wasser, 10 % EDTA und Ameisensäure	42
A.3.8 Modul E6a: Extraktion von 10 g Probe tierischen Ursprungs mit einem Feuchtegehalt von > 30 %, nach Zugabe von Wasser	42
A.3.9 Modul E6b: Extraktion von 10 g Probe tierischen Ursprungs mit einem Feuchtegehalt von > 30 %, nach Zugabe von Wasser, 10 % EDTA und Ameisensäure	43
A.3.10 Modul E7: Extraktion von 5 g fettiger Probe, unterstützt durch mechanische Hilfsmittel	44
A.4 Reinigungsmodule (C)	45
A.4.1 Allgemeines	45
A.4.2 Modul C0: Keine Reinigung	45
A.4.3 Modul C1: Ausfrieren zur Ausfällung von schwach löslichen Koextraktivstoffen	45

A.4.4	Modul C2: Dispersive SPE mit C18-Sorbent	46
A.4.5	Modul C3a: Ausfällung mit Acetonitril	46
A.4.6	Modul C3b: Ausfällung mit Acetonitril kombiniert mit C18-Sorbent	47
A.4.7	Modul C4: Ultrafiltration mit Filtern mit einer Ausschlussgrenze bei 5 kDa oder 10 kDa (wahlfrei)	47
A.5	Verdünnungsmodule (DL)	47
A.5.1	Kurzbeschreibung	47
A.5.2	Durchführung	48
A.5.3	Berechnung	48
A.6	Messmodule (M)	48
A.6.1	Allgemeines	48
A.6.2	Modul M1: LC-MS/MS (HILIC-Säule, ESI, negativer Modus)	49
A.6.3	Modul M2: LC-MS/MS (HILIC-Säule, ESI, positiver Modus)	53
A.6.4	Modul M3: LC-MS/MS (Säule mit porösem Graphit-Kohlenstoff, ESI, negativer Modus)	56
A.6.5	Modul M4: IC-MS/MS (Anionenaustauscher-Säule, ESI, negativer Modus)	57
A.6.6	Modul M5: IC-MS/MS (Kationenaustauscher-Säule, ESI, positiver Modus)	58
A.6.7	MS-Bedingungen: Details und allgemeine Anmerkungen	60
A.7	Quantifizierungsmodule (Q)	74
A.7.1	Modul Q1a: Quantifizierung mittels Kalibrierung, die auf externen Standards in Lösemittel beruht (lösemittelbasiert ohne Verwendung von IL-IS)	74
A.7.2	Modul Q1b: Quantifizierung mittels Kalibrierung, die auf externen Standards in Lösemittel und IL-IS beruht (lösemittelbasiert mit Verwendung von IL-IS)	74
A.7.3	Modul Q2b: Quantifizierung mittels Kalibrierung, die auf externen Standards in Extrakten von generischen rückstandsfreien Proben und IL-IS beruht (matrixbasierte Kalibrierung mit Verwendung von IL-IS)	75
A.7.4	Modul Q3a: Quantifizierung mittels Kalibrierung, die auf externen Standards in Extrakten rückstandsfreier Proben des gleichen Matrixtyps beruht (matrixangepasste Kalibrierung ohne Verwendung von IL-IS)	76
A.7.5	Modul Q3b: Quantifizierung mittels Kalibrierung, die auf externen Standards in Extrakten rückstandsfreier Proben des gleichen Matrixtyps mit IL-IS beruht (matrixangepasste Kalibrierung mit Verwendung von IL-IS)	76
A.7.6	Modul Q4a: Quantifizierung mittels externer Standards, mit denen Mengen rückstandsfreier Kontrollproben dotiert werden und die das Gesamtverfahren ohne IL-IS durchlaufen (Kalibrierung über das Gesamtverfahren ohne IL-IS)	77
A.7.7	Modul Q4b: Quantifizierung mittels externer Standards, mit denen Mengen rückstandsfreier Kontrollproben dotiert werden und die das Gesamtverfahren mit IL-IS durchlaufen (Kalibrierung über das Gesamtverfahren mit IL-IS)	78
A.7.8	Modul Q5: Quantifizierung mittels Standardaddition zum Endextrakt (wahlweise mit IL-IS, falls verfügbar) (Standardadditionen zu Aliquoten des Extrakts)	79
A.7.9	Modul Q6: Quantifizierung mittels Standardaddition zu einzelnen Einwaagen der Probe (wahlweise mit IL-IS, falls verfügbar) (Standardadditionen zu Einwaagen)	80
Anhang B (normativ)	Zusätzliche Angaben	82
Anhang C (informativ)	Überblick über „Ergänzende Online-Informationsquellen“	95
Literaturhinweise		96

Tabellen

Tabelle 1	— Getrocknete Früchte/Wassermenge während der Homogenisierung	9
Tabelle 2	— Extraktionsmodule	10
Tabelle 3	— Reinigungsmodule	11
Tabelle 4	— Verdünnungsmodule — Beispiele	12
Tabelle 5	— Messmodule	14
Tabelle 6	— Quantifizierungsmodule	16

Tabelle 7 — Überblick über verfügbare Validierungsdaten, die im Rahmen von Validierungsstudien durch Ringversuche erhalten wurden (erfolgreiche Validierung durch ≥ 3 Laboratorien mit $n = 5$ für 2 Konzentrationen)	25
Tabelle 8 — Überblick über aktuell geltende Höchstgehalte (MRLs) und Vergleich mit den niedrigsten erfolgreich validierten Konzentrationen (LSVLs) im Ringversuch	26
Tabelle A.1 — Beispiele für Konzentrationen von IL-IS-Arbeitslösungen (IL-IS-WSln)	33
Tabelle A.2 — Beispiel eines Pipettierschemas für die Herstellung von Kalibrierstandards:	34
Tabelle A.3 — Beispiel für ein Pipettierschema für Standardadditionen zu Aliquoten des Extrakts	36
Tabelle A.4	49
Tabelle A.5	50
Tabelle A.6	51
Tabelle A.7	51
Tabelle A.8	52
Tabelle A.9	53
Tabelle A.10	54
Tabelle A.11	54
Tabelle A.12	55
Tabelle A.13	55
Tabelle A.14	56
Tabelle A.15	57
Tabelle A.16	57
Tabelle A.17	58
Tabelle A.18	59
Tabelle A.19	59
Tabelle A.20	60
Tabelle A.21	60
Tabelle A.22	61
Tabelle A.23	61
Tabelle A.24	62
Tabelle A.25	62
Tabelle A.26	63
Tabelle A.27	63
Tabelle A.28	63
Tabelle A.29	65
Tabelle A.30	71
Tabelle B.1 — Bevorzugte Kombinationen von E- und C-Modulen für Beispiele von Lebensmitteln	82

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 18032:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

WARNUNG — Die Anwendung dieses Dokuments kann den Einsatz gefährlicher Stoffe, Arbeitsgänge und Geräte bedingen. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung festzulegen, welche einschränkenden Vorschriften gelten.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung von Rückständen hochpolarer Pestizide und ihrer Metaboliten in verschiedenen Arten von Lebensmitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs, einschließlich Obst, Gemüse, Getreide, Hülsenfrüchte, Ölsaaten, Nüsse, Milch, Leber und Honig, fest, die mit üblichen Multiverfahren nicht untersucht werden können. Das Verfahren wurde in dem beim CVUA Stuttgart ansässigen EURL-SRM entwickelt [1], [2], [3] und ist in Ringversuchen an einer großen Zahl von Lebensmittel-Pestizid-Kombinationen näher untersucht worden. Leitlinien für die Kalibrierung sind in CEN/TS 17061:2019 dargelegt.

2 Normative Verweisungen

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

CEN/TS 17061:2019, *Lebensmittel — Anleitung zur Kalibrierung und quantitativen Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen und organischen Kontaminanten mit chromatographischen Verfahren*

3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

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

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

4 Kurzbeschreibung

Die Rückstände werden aus der homogenen Einwaage nach Anpassung des Wasservolumens und Zugabe von angesäuertem Methanol extrahiert. Im Falle von Obst und Gemüse wird die Mischung zentrifugiert, filtriert und direkt mittels LC-MS/MS oder IC-MS/MS analysiert. Bei Getreide, Hülsenfrüchten, Nüssen, ölhaltigen Samen und Lebensmitteln tierischen Ursprungs wird EDTA hinzugegeben, um Metallionen wie z. B. Calcium und Magnesium zu komplexieren, die die Analyse bestimmter Verbindungen (z. B. Glyphosat und AMPA) beeinträchtigen können. Da diese Lebensmittel auch einen bedeutenden Anteil an Protein enthalten, werden sie zusätzlich mit Acetonitril verdünnt, um Proteine auszufällen. Proben mit hohem Lipidgehalt werden einer dispersiven SPE mit C18-Sorbent unterzogen. In diesem Dokument werden verschiedene LC- und IC-MS/MS-Verfahren, welche die gleichzeitige Analyse unterschiedlicher Kombinationen von Pestiziden ermöglichen, beschrieben. Die Quantifizierung erfolgt unter Verwendung isotope markierter analoger Verbindungen der Zielanalyten als interne Standards (IL-ISs), sofern diese verfügbar sind. Wenn IL-ISs zu Beginn des Verfahrens direkt zur Einwaage gegeben werden, lassen sich dadurch alle Faktoren kompensieren, die einen Einfluss auf die Wiederfindungsraten haben, beispielsweise Volumenabweichungen und Analytverluste während der Probenvorbereitung. Auch Matrixeffekte während der Messung werden korrigiert. Die Verwendung von IL-ISs stellt eine gute Genauigkeit und Reproduzierbarkeit sicher. Die Quantifizierung ohne IL-ISs ist zwar möglich, in diesem Fall sind jedoch eine sorgfältige Anpassung des Wasservolumens und weitere Vorgehensweisen zur Kompensation von Wiederfindungsverlusten oder Matrixeffekten erforderlich. Das Analyseverfahren umfasst nur wenige Arbeitsschritte und ist mit geringem Materialverbrauch verbunden. Einen kurzen Überblick über das Verfahren geben die Ablaufdiagramme in den „Ergänzenden Online-Informationsquellen“, die über einen in Anhang C angegebenen Hyperlink abrufbar sind.

5 Vorbereitung und Lagerung der Proben

5.1 Allgemeine Überlegungen

Die Verfahren der Probenverarbeitung und Lagerung sollten nachweislich keinen signifikanten Effekt auf die in der Untersuchungsprobe (gelegentlich auch als „Analysenprobe“ bezeichnet) vorhandenen Rückstände haben. Durch die Verarbeitung sollte sichergestellt werden, dass die Untersuchungsprobe ausreichend homogen ist, sodass die Variabilität zwischen Teilproben (Einwaage zu Einwaage) annehmbar ist. Wenn eine einzelne analytische Einwaage wahrscheinlich nicht repräsentativ für die Untersuchungsprobe ist, müssen größere Einwaagen oder Parallelproben der Einwaagen analysiert werden, um eine bessere Schätzung des wahren Wertes zu liefern. Der Grad der Zerkleinerung sollte eine quantitative Extraktion der Rückstände unterstützen; andernfalls muss die Extraktion eine ergänzende Zerkleinerung mit einschließen, z. B. durch eine Homogenisierungsvorrichtung (A.2.2) oder durch Mahlhilfsmittel (z. B. Metallkugeln (A.2.3)).

5.2 Laborprobe

Eine Laborprobe ist die zur Analyse beim Labor eingehende Probe; sie sollte idealerweise nach internationalen Probenahmeprotokollen entnommen werden [4], [5]. Eine Laborprobe, die übermäßig verdorben ist oder deren Zustand sich verschlechtert hat, sollte im Normalfall nicht untersucht werden. Mit einer Haltbarkeitsdauer versehene Proben sollten üblicherweise innerhalb ihrer angegebenen Haltbarkeitsdauer untersucht werden. Laborproben sollten, wenn möglich, unmittelbar nach ihrem Eingang im Labor, auf jeden Fall bevor es zu signifikanten physikalischen oder chemischen Änderungen gekommen ist, verarbeitet werden. Wenn eine Laborprobe nicht unverzüglich verarbeitet werden kann, sollte sie unter geeigneten Bedingungen gelagert werden, um sie frisch zu halten und eine Verschlechterung ihres Zustands möglichst gering zu halten.

Wenn die Laborprobe in einem Zustand ist, der vor der Untersuchung keine Mahlung erfordert (z. B. Säfte, Milch und Getreidemehl), wird die Probe gerührt oder gut geschüttelt und dann werden direkt die analytischen Einwaagen entnommen. Wenn allerdings die Probe nicht ausreichend homogen ist oder davon auszugehen ist, dass die Extraktion der Rückstände durch die Anwesenheit größerer Partikel erheblich beeinträchtigt wird, sollte eine intensive Zerkleinerung mithilfe von geeigneten Hilfsmitteln durchgeführt werden.

5.3 Behandlung der Laborproben vor dem Mahlen

Zur Herstellung der Analysenprobe wird nur die Menge der Laborprobe genommen, für die die Höchstrückstandsgehalte gelten [6], [7]. Wenn aus praktischen Gründen eine Verkleinerung der Laborprobe erforderlich ist, muss dies so vorgenommen werden, dass die Repräsentativität sichergestellt ist. Dies gilt zum Beispiel, wenn Proben aus größeren Einheiten bestehen und das Nennvolumen des verfügbaren Mixers zu klein ist, um die erforderliche Anzahl auf einmal zu verarbeiten. In diesem Fall können Teile der Probe, d. h. keilförmige Ausschnitte (z. B. bei Melonen) oder Querschnitte (z. B. bei Gurken), einschließlich der Haut (äußeren Oberfläche), verwendet werden. Zum Mischen sollten dann gegenüberliegende Ausschnitte jeder Einheit (z. B. Viertel) verwendet werden (siehe z. B. [8]). Bei Proben von kleineren Einheiten (z. B. kleine Früchte wie Beeren, Hülsenfrüchte, Getreide) muss die Probe gründlich gemischt werden, bevor ein Aliquot für die weitere Verarbeitung entnommen wird.

Alle Teile, die Schwierigkeiten bei der Homogenisierung verursachen würden, dürfen vor dem Mahlvorgang entfernt werden (z. B. die Kerne im Falle von Steinfrüchten). Die Masse der Probe muss vor und nach dem Entfernen der störenden Probenanteile aufgezeichnet werden. Es sollten Vorkehrungen getroffen werden, um einen Verlust von Fruchtsaft oder -fleisch zu vermeiden. Die auf diese Weise erhaltene Probe wird als Untersuchungsprobe bezeichnet. Die Rückstandsrechnung muss auf der Masse der ursprünglichen Untersuchungsprobe (einschließlich der Kerne und unter der Annahme, dass diese Teile frei von Rückständen sind) beruhen.

Im Falle einer kryogenen Zerkleinerung mithilfe von Trockeneis lässt sich die Verarbeitung vereinfachen, indem die Proben vor der Zerkleinerung mit einem Messer grob zerteilt (z. B. in Stücke von 3×3 cm) und in einen Tiefkühlschrank (z. B. bei ≤ -18 °C über Nacht) gelagert werden.

5.4 Homogenisierung der Probe

5.4.1 Allgemeine Überlegungen

Bei frischen Erzeugnissen (z. B. Obst und Gemüse) ist die Homogenisierung bei Umgebungstemperatur oder unter gekühlten Bedingungen möglich; in den meisten Fällen ist jedoch die Kaltmahlung zu bevorzugen, da dadurch Verluste von empfindlichen Analyten verringert werden und sie üblicherweise zu kleineren Partikelgrößen und einem höheren Grad der Homogenität führt. Im Falle von frischen, nicht gefrorenen Erzeugnissen wird der zeitliche Abstand zwischen Homogenisierung und Extraktion so kurz wie möglich gehalten, um den Abbau empfindlicher Zielanalyten auf ein möglichst geringes Maß zu reduzieren.

Die Homogenisierung wird bei Lebensmitteln mit widerstandsfähiger Haut (z. B. Tomaten oder Weintrauben) üblicherweise durch Kaltmahlung (zusätzlich unterstützt durch Trockeneis oder flüssigen Stickstoff (A.1.12)) weiter verbessert. Werden Untersuchungsproben bei niedrigen Temperaturen verarbeitet, sind Maßnahmen zu ergreifen, um die Kondensation der Feuchtigkeit auf der Probe auf ein möglichst geringes Maß zu reduzieren. Ein ausreichendes Verflüchtigen von restlichem Kohlendioxid sollte ermöglicht werden, sodass dessen Beitrag zur Probenmasse vernachlässigbar ist. Für die Homogenisierung unter Verwendung von flüssigem Stickstoff wird das Probenmaterial (z. B. ganze Einheiten oder grob zerschnittene Einheiten) in einen geeigneten Kunststoffbehälter (z. B. aus PP oder Polystyrol) mit flüssigem Stickstoff eingetaucht. Sobald es vollständig eingefroren ist, wird es in eine leistungsstarke Messermühle überführt und so lange gemahlen, bis ein feines Pulver erhalten wird. Das gefrorene Pulver sollte rasch in ein Lagergefäß überführt werden. Es wird sichergestellt, dass der flüssige Stickstoff vollständig verdampft ist, bevor das Lagergefäß dicht verschlossen und in den Tiefkühlschrank gestellt wird.

Bei trockenen Lebensmitteln besteht der Zweck der Mahlung darin, Partikel mit einer Größe von < 1 mm herzustellen. Kleinere Partikelgrößen erleichtern die Extraktion. Es ist allerdings zu beachten, dass durch die Reibung während des Mahlvorgangs sehr hohe Temperaturen entstehen können. Kaltmahlung unter Zugabe von flüssigem Stickstoff oder Trockeneis ist hilfreich, um die Temperaturen niedrig zu halten. Die Verwendung von Ultra-Zentrifugalmühlen mit Ringfiltern trägt dazu bei, die maximale Partikelgröße zu begrenzen. Das Mahlen mit einer Messermühle ergibt üblicherweise eine breite Verteilung der Partikelgrößen. Eine in zwei Schritten durchgeführte Mahlung ist üblicherweise hilfreich, um die durchschnittliche Partikelgröße weiter zu reduzieren. Bei der Verarbeitung von trockenen Lebensmitteln mit hohem Ölgehalt führt übermäßiges Mahlen mit einer Messermühle oder das Mahlen mit Ultra-Zentrifugalmühlen aufgrund der Freisetzung von flüssigem Öl häufig zur Bildung einer Paste. In solchen Fällen ist die Kaltmahlung vorzuziehen. Homogenate von trockenen Lebensmitteln sollten optimalerweise auch im Tiefkühlschrank gelagert werden, obwohl die Stabilität der Analyten unter Umgebungsbedingungen üblicherweise deutlich besser ist als bei flüssigen Homogenaten.

ANMERKUNG Durch Zerkleinerung (einschließlich der zuvor genannten groben Zerteilung mit einem Messer) von nicht gefrorenen Proben mit hohem Feuchtegehalt (z. B. Obst und Gemüse) werden Matrix-Säfte freigesetzt, die den Abbau bestimmter empfindlicher Pestizide, mit denen sie in Kontakt kommen, beschleunigen können. Dies schließt auf der Haut von Erzeugnissen befindliche Pestizide mit ein, die Säften aus Früchten ausgesetzt werden, wenn diese (für die spätere Kaltmahlung) in grobe Stücke geschnitten und in einem Beutel gemischt werden.

5.4.2 Vorbereitung der Homogenate von getrockneten Früchten und ähnlichen Lebensmitteln

Getrocknete Früchte und ähnliche Lebensmittel (~ 15 % bis ≤ 40 % Feuchtegehalt) können als Aufschlammung oder in tiefgefrorenem Zustand ohne Zugabe von Wasser verarbeitet werden. Für die Verarbeitung als Aufschlammung werden 500 g gefrorene trockene Früchte eingewogen und X g kaltes Wasser (A.1.1) zugegeben (siehe Tabelle 1 und Tabelle B.1); die Mischung wird dann, wenn möglich, mit einem starken Mixer (A.2.1) unter Zugabe von Trockeneis (A.1.12) homogenisiert, um chemische und enzymatische Reaktionen zu verhindern oder zu verlangsamen. Für Extraktionen nach E3 (siehe Tabelle 2) werden Y g des Homogenats eingewogen (siehe Tabelle 1 und Tabelle B.1 entsprechend einer Probe von 5 g). Alternativ wird das Probenmaterial in ein Kunststoff- oder Polystyrolgefäß mit flüssigem Stickstoff eingetaucht. Sobald es vollständig eingefroren ist, wird es in eine leistungsstarke Messermühle überführt und solange gemahlen, bis ein feines Pulver erhalten wird. Es darf nicht zu lange gemahlen werden, und das gefrorene Pulver wird unverzüglich in ein Lagergefäß überführt und in den Tiefkühlschrank gestellt, um zu vermeiden, dass es klumpig und schwieriger zu handhaben wird.

Tabelle 1 — Getrocknete Früchte/Wassermenge während der Homogenisierung

Feuchtegehalt des Produkts	Probenmenge	Zugegebene Wassermenge	Masse der analytischen Einwaage (Y g; entsprechend 5 g der ursprünglichen trockenen Probe)
%	g	X g	g
~ 15 bis < 25	500	900	14
25 bis < 35	500	850	13,5
≥ 35 bis 40	500	800	13

Gefriergetrocknetes Obst und Gemüse (üblicher Feuchtegehalt 0,3 % bis 4 %) werden mit einer Messermühle mit hoher Drehzahl (A.2.1) homogenisiert, vorzugsweise nach Zugabe von Trockeneis oder flüssigem Stickstoff (A.1.12), um das Material kühl zu halten. Davon werden 2 g Probe für die Analyse eingesetzt (wie im Falle von anderen trockenen extraktreichen Lebensmitteln wie Gewürzen und trockenen Kräutern).

5.5 Analytische Einwaage

Eine oder mehrere einzelne Einwaagen, jede für eine Analyse ausreichend, sollte(n) aus dem Probenhomogenat, das wie zuvor beschrieben hergestellt wurde, entnommen werden. Wenn die Untersuchungsprobe vor der Entnahme der Einwaagen gelagert war und festgestellt wird, dass die Homogenität der Untersuchungsprobe während der Lagerung beeinträchtigt worden ist, muss die Untersuchungsprobe vor der Entnahme von Einwaagen erneut gemischt werden, um sicherzustellen, dass die Homogenität wiederhergestellt worden ist.

Wenn frische Erzeugnisse in einem nicht gefrorenen Zustand homogenisiert werden, sollten die Prüfmengen unmittelbar nach der Mahlung eingewogen und analysiert werden, es sei denn es konnte nachgewiesen werden, dass in der Zeitspanne zwischen Zerkleinerung und Beginn der Analyse kein bedeutender Abbau der Zielanalyten stattfindet. Wenn die Einwaagen nicht direkt analysiert werden können, müssen sie eingefroren werden, bis sie benötigt werden. Zu beachten ist, dass in solchen nicht gefrorenen flüssigen Homogenaten eine Trennung von (Frucht-)Fleisch und -Saft auftreten und die Variabilität zwischen den Einwaagen erhöhen kann. Daher ist das Homogenat vor der Einwaage gut zu rühren.

6 Durchführung

Die Extraktion wird in den Modulen E1 bis E7 (Tabelle 2) beschrieben. In Abhängigkeit vom Lebensmittel werden die zentrifugierten Rohextrakte entweder filtriert und direkt entsprechend den Messmodulen M1 bis M5 (Tabelle 5) weiterverarbeitet oder vor der Messung durch Anwendung eines oder mehrere der Reinigungsmodule C1 bis C4 (Tabelle 3) gereinigt. Ein Verdünnungsmodul DL (Tabelle 4) vor der Messung ist entweder angezeigt oder wird empfohlen; dies hängt aber auch von der Empfindlichkeit der verwendeten Messeinrichtungen ab. Die Rückstandskonzentrationen in den Proben können mithilfe der unter Q1 bis Q6 beschriebenen Quantifizierungsansätze berechnet werden (siehe Tabelle 6 mit Verweisung auf Kalibrierverfahren in CEN/TS 17061:2019). Für die Anwendung der Q-Module findet sich ein Entscheidungsbaum unter [11]. Weitere Kalibrier-/Quantifizierungsverfahren können CEN/TS 17061:2019 entnommen werden.

Bevorzugte Kombinationen von Modulen für eine Vielzahl von rohen und verarbeiteten Lebensmitteln, welche die Extraktion von Proben und Reinigung von Rohextrakten betreffen, sind in Tabelle B.1 aufgeführt.

- Entwurf -

Tabelle 2 — Extraktionsmodule

Modul	Kurzbeschreibung ^a	Bevorzugte Anwendung ^b und Einschränkungen	Beispiele / Anmerkungen ^b
E1	Extraktion von 10 g Probe ohne Wasserzugabe	Lebensmittel mit hohem Wassergehalt ($\geq 80\%$)	Obst, Gemüse, Fruchtsäfte
E2	Extraktion von 10 g Probe nach Zugabe von z. B. I) zwei ml Wasser II) 2,5 ml Wasser III) drei ml Wasser IV) 3,5 ml Wasser	Lebensmittel mit mittlerem Wassergehalt ($> 40\%$ bis $< 80\%$)	I) Kartoffel, Petersilie II) Banane, Meerrettich, frische Erbsen, Ingwer III) Avocado, Olive IV) Knoblauch
E3	Extraktion von z. B. 13,5 g Homogenat, das mit Wasserzugabe hergestellt wurde, siehe Tabelle 1	Lebensmittel mit geringem Wassergehalt (15% bis 40%)	getrocknete Früchte und ähnliche Erzeugnisse (z. B. Konfitüren/Marmeladen)
E4	Extraktion von 5 g Honig nach Zugabe von 7,5 ml Wasser	Honig	
E5a	Extraktion von 2 g oder 5 g Probe nach Zugabe von 10 ml Wasser	Lebensmittel mit sehr geringem Wassergehalt ($< 15\%$) Einschränkungen: nicht empfohlen für Pestizide und Metaboliten, die einen Phosphonsäure-Anteil enthalten (z. B. Glyphosat, AMPA, MPPA), siehe E5b	geringer Fettgehalt: raffiniertes Getreide, Pseudogetreide, Hülsenfrüchte, Magermilchpulver hoher Fettgehalt: Vollkorngetreide, Ölsaaten, Nüsse, Gewürze, Kräuter, Milchpulver, Säuglingsnahrung
E5b	Extraktion von 2 g oder 5 g Probe nach Zugabe von 9 ml Wasser, 1 ml 10 % EDTA, 0,1 ml Ameisensäure	Lebensmittel mit sehr geringem Wassergehalt ($< 15\%$) empfohlen für Pestizide und Metaboliten, die einen Phosphonsäure-Anteil enthalten (z. B. Glyphosat, AMPA, MPPA)	

- Entwurf -

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Modul	Kurzbeschreibung ^a	Bevorzugte Anwendung ^b und Einschränkungen	Beispiele / Anmerkungen ^b
E6a	Extraktion von 10 g Probe nach Zugabe von z. B. I) ein ml Wasser II) 1,5 ml Wasser III) zwei ml Wasser IV) 2,5 ml Wasser V) drei ml Wasser	Lebensmittel tierischen Ursprungs mit einem Wassergehalt (> 30 %) Einschränkungen: nicht empfohlen für Pestizide und Metaboliten, die einen Phosphonsäure-Anteil enthalten (z. B. Glyphosat, AMPA, MPPA), siehe E6b	I) Magermilch (geringer Fettgehalt) II) Vollmilch III) Niere, Fisch IV) Ei, Muskel V) Leber Im Falle von verarbeiteten Fleischerzeugnissen wird die Wassermenge erhöht (z. B. werden bei Räucherschinken mit 50 % Feuchtegehalt 5 ml Wasser oder 4/1/0,1 ml Wasser/10 % EDTA/Ameisensäure zu 10 g Probe gegeben).
E6b	Extraktion von 10 g Probe nach Zugabe von Wasser / 10 % EDTA / Ameisensäure, z. B. wie folgt: I) 0/1/0,1 ml II) 0,5/1/0,1 ml III) 1/1/0,1 ml IV) 1,5/1/0,1 ml V) 2/1/0,1 ml	Lebensmittel tierischen Ursprungs mit einem Wassergehalt (> 30 %) empfohlen für Pestizide und Metaboliten, die einen Phosphonsäure-Anteil enthalten (z. B. Glyphosat, AMPA, MPPA)	
E7	Extraktion von 5 g fettiger Probe, unterstützt durch mechanische Hilfsmittel (z. B. Metallkugeln)	Fette (Lipide, die bei Raumtemperatur eine nichtflüssige, z. B. feste, wachsartige oder pastöse, Konsistenz haben)	Fette tierischen und pflanzlichen Ursprungs
^a Die Angabe „ohne Wasserzugabe“ bezieht sich auf Verfahren, bei denen ein IL-IS vor einer Aliquotierung des Extrakts hinzugegeben wird. Wenn kein IL-IS verwendet wird oder wenn ein solcher zu einem Aliquot des Extrakts zugegeben wird, ist eine Anpassung des Wasservolumens bis zu einem Gesamtvolumen von 10 ml (Probenwasser + zugegebenes Wasser) angezeigt, um die systematische Abweichung zu mindern. ^b Der Wassergehalt der verschiedenen Lebensmittel kann Tabelle B.1 entnommen werden.			

Tabelle 3 — Reinigungsmodule

Modul	Beschreibung	Bevorzugte Anwendungen	Beispiele
C0	keine Reinigung	das meiste Obst und Gemüse	
C1	Ausfrieren zur Ausfällung von schwach löslichen Koextraktivstoffen oder um die Filtration zu unterstützen	Lebensmittel, von denen die Extrakte schwierig zu filtrieren sind oder die Koextraktivstoffe enthalten, welche bei niedrigen Temperaturen ausfallen (z. B. Lipide, Zucker, Proteine)	Rohextrakte von z. B. Ananas, Kartoffeln, Getreidemehlen (insbesondere fein gemahlene Mehlen), Avocado, Oliven, Erdbeeren
C2	dispersive SPE mit C18-Sorbent	Lebensmittel mit hohem Fett- und geringem Proteingehalt	Avocado, Oliven
C3a	Ausfällung mit Acetonitril zur Entfernung von Proteinen und anderen Koextraktivstoffen mit begrenzter Löslichkeit in Acetonitril	Lebensmittel mit hohem Proteingehalt	raffiniertes Getreide, Pseudogetreide, Hülsenfrüchte, Magermilchpulver

- Entwurf -

Tabelle 3 (fortgesetzt)

Modul	Beschreibung	Bevorzugte Anwendungen	Beispiele
C3b	Ausfällung mit Acetonitril in Kombination mit C18-Sorbent zur Entfernung von Proteinen, Lipiden und anderen Koextraktivstoffen mit begrenzter Löslichkeit in Acetonitril	Lebensmittel mit hohem Protein- und hohem Fettgehalt	Ölsaaten, Nüsse, Getreide, Leber, Niere, Vollmilch, Muskel
C4	Ultrafiltration mit Filtern mit einer Ausschlussgrenze bei 5 kDa oder 10 kDa	Lebensmittel mit hohem Proteingehalt	Ölsaaten, Nüsse, Hülsenfrüchte, Getreide, Pseudogetreide, Leber, Niere, Vollmilch, Muskel

Tabelle 4 — Verdünnungsmodule — Beispiele

Modul DLx ^a	Beschreibung der Verdünnung ^b	Umstände (zur Orientierung) ^c	Beispiele / Empfehlungen
DL1	unverdünnte Extrakte	— Messung unverdünnter Extrakte mit zufriedenstellender Leistung möglich — Empfindlichkeit des Analyten erlaubt keine Verdünnung, aber Matrixeffekte sind (verglichen mit der Kalibrierung) vernachlässigbar (< ca. ± 20 %) oder werden ausreichend kompensiert (z. B. über IL-IS oder Matrixanpassung)	
DL2	2-fache Verdünnung ($V_1 + V_2, 1 + 1$)	— größere (nicht vernachlässigbare) Matrixeffekte (z. B. zwischen ± 20 % und ± 40 %), die anderweitig nicht ausreichend kompensiert werden (z. B. über IL-IS oder Matrixanpassung) — siehe auch die nachfolgend aufgeführten allgemeinen Ziele und Voraussetzungen	— DL2 vor der Analyse mittels M3a oder M3b von Probenextrakten von E5b und E6b (mit EDTA) nach C3 oder C3a (wie es die Empfindlichkeit des Messgeräts zulässt)

Tabelle 4 (fortgesetzt)

Modul DLx ^a	Beschreibung der Verdünnung ^b	Umstände (zur Orientierung) ^c	Beispiele / Empfehlungen
DLx 5 bis 10 z. B. x = 5 (DL5); x = 10 (DL10)	5-fache Verdünnung ($V_1 + V_2, 1 + 4$) 10-fache ($V_1 + V_2, 1 + 9$)	— starke Matrixeffekte (z. B. zwischen $\pm 40\%$ und $\pm 90\%$), die anderweitig nicht ausreichend kompensiert werden (z. B. über IL-IS oder Matrixanpassung) — starke Matrixbeladung im Extrakt, die die Leistung oder Robustheit der Messung beeinträchtigt — siehe auch die nachfolgend aufgeführten allgemeinen Ziele und Voraussetzungen	— DL10 zur Analyse von Chlorat, Perchlorat, Phosphonsäure, Bromid mittels M3b — DL5 bei Anwendung von IC-MS/MS (M4 oder M5) — DL5 vor der Analyse mittels M3a oder M3b von Probenextrakten von E5b und E6b (mit EDTA) nach C3a oder C3b (wie es die Empfindlichkeit des Messgeräts zulässt)
DLx > 10 z. B. x = 50 (DL50)	50-fache Verdünnung ($V_1 + V_2, 1 + 49$)	— sehr starke Matrixeffekte (z. B. $> \pm 90\%$), die anderweitig nicht ausreichend kompensiert werden (z. B. über IL-IS oder Matrixanpassung) — starke Matrixbeladung im Extrakt, die die Leistung oder Robustheit der Messung beeinträchtigt — siehe auch die nachfolgend aufgeführten allgemeinen Ziele und Voraussetzungen	— zur Quantifizierung von Bromid (hohe Höchstgehalte an Rückständen (MRLs) und hohe Hintergrundkonzentrationen) (wie es die Empfindlichkeit des Messgeräts zulässt)
^a Die Modulnummer zeigt den Verdünnungsfaktor an und dient der Dokumentation des Verfahrens. Jeder Verdünnungsfaktor kann angewendet werden, solange die Voraussetzungen (siehe Liste unter Tabelle 4) erfüllt sind. ^b Verdünnungen können hergestellt werden, indem ein bestimmtes Volumen des Extrakts (V_1) mit einem bestimmten Volumen eines mit Wasser mischbaren Lösemittels (V_2), welches eine mobile Phase bzw. ein Eluent der LC sein darf (siehe A.6), gemischt wird. Die Verdünnung kann bei dem LC- oder IC-Injektionsvorgang erfolgen. Falls durch die Verdünnung eine Ausfällung ausgelöst wird, wird empfohlen, nach der Verdünnung eine Filtration mit einem Spritzenfilter (A.2.11) durchzuführen. Verdünnungen mit Blindproben-Extrakten sind ebenfalls möglich und manchmal sinnvoll (z. B. um Matrixeffekte auf vergleichbarem Niveau zu halten). ^c Erläuterung zu Matrixeffekten: Eine Änderung des Messsignals (d. h. Unterdrückung oder Verstärkung) von z. B. 90 % ist in diesem Dokument wie folgt festgelegt: $\pm 90\%$			

Die allgemeinen Ziele bei der Verdünnung durch Anwendung der Tabelle 4 sind:

- Vermindern von Matrixeffekten,
- Verringern von Retentionszeit-Verschiebungen,
- Verbessern der Peakformen,
- Verbessern der chromatographischen Trennung von störenden Verbindungen,
- Erhalten eines Signals innerhalb des Kalibrierbereichs bzw. linearen Wertebereichs,
- Verringern der Einwirkung der Matrix auf das Messgerät (zur Erhöhung der langfristigen Robustheit und Verkürzung der Instandhaltungsintervalle).

Daraus ergeben sich die folgenden allgemeinen Voraussetzungen für die Verdünnung:

- Signalintensitäten des (der) Analyten und IL-IS(s) bleiben nach Verdünnung zufriedenstellend;
- alle Verschiebungen durch Matrixeffekte werden angemessen kompensiert.

Tabelle 5 — Messmodule

Modul	Angaben zum Messgerät	Beispiele für Analyten	Beispiele für Säulen
M1	LC-MS/MS HILIC-Phase ESI, negativer Modus	Glyphosat, Glufosinat, Fosetyl, Chlorat, Perchlorat usw.	APPC ^a Torus DEA ^a Raptor Polar X ^c Obelisc N ^d Trinity Q1 ^b Luna Polar Pesticide ^e
M2	LC-MS/MS HILIC-Phase ESI, positiver Modus	Chlormequat, Mepiquat, Cyromazin, Matrin, Nicotin usw.	Amide BEH ^a Obelisc R ^d Trinity P1 ^b
M3	LC-MS/MS Phase aus porösem Graphit-Kohlenstoff ESI, negativer Modus	Glyphosat, Glufosinat, Fosetyl, Chlorat, Perchlorat usw.	Hypercarb ^b

Tabelle 5 (fortgesetzt)

Modul	Angaben zum Messgerät	Beispiele für Analyten	Beispiele für Säulen
M4	IC-MS/MS Anionenaustauscher-Phase ESI, negativer Modus	Glyphosat, Glufosinat, Fosetyl, Chlorat, Perchlorat usw.	AS19 ^b AS24 ^b
M5	IC-MS/MS Kationenaustauscher-Säule ESI, positiver Modus	Chlormequat, Mepiquat, Cyromazin, Matrin, Nicotin usw.	CS17 ^b
^a APPC, Torus DEA, Amide BEH sind die Handelsnamen der von WATERS gelieferten Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produkts durch CEN oder CENELEC. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen. ^b Trinity Q1, Trinity P1, Hypercarb, AS19, AS24, CS17 BEH sind die Handelsnamen der von Thermo gelieferten Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produkts durch CEN oder CENELEC. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen. ^c Raptor Polar X ist der Handelsname eines von Restek gelieferten Produkts. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produkts durch CEN oder CENELEC. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen. ^d Obelisc N, Obelisc R sind die Handelsnamen der von Sielc gelieferten Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produkts durch CEN oder CENELEC. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen. ^e Luna Polar Pesticides ist der Handelsname eines von Phenomenex gelieferten Produkts. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produkts durch CEN oder CENELEC. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.			

- Entwurf -

Tabelle 6 — Quantifizierungsmodule

Modul ^g	Beschreibung	Umstände		Effekte			Voraussetzungen, Anmerkungen und Beispiele	Verweisung in CEN/TS 17061:2019
		Verwendung von angepasster Blind- proben- Matrixa	IL-IS (zu Beginn des Verfahrens zu- gegeben)b	Dieser Ansatz ...				
				korrigiert eine schlechte absolute Wieder- findungc	korrigiert Matrix- effekted	reduziert die Auswirkung von Wechsel- wirkungen im Injektore		
Q1a	Quantifizierung mittels Kalibrierung, die auf externen Standards in Lösemittel beruht (lösemittelbasiert ohne IL-IS)	nein	nein	nein	nein	nein	Voraussetzungen: Da dieser Ansatz nicht die Wiederfindung oder Matrixeffekte korrigiert, müssen absolute Wiederfindungsraten ausreichend sein, und Matrixeffekte sollten vernachlässigbar oder durch Verdünnung ausreichend reduziert sein). Beispiel: Bromid (wenn sich praktisch keine Blindproben-Matrizes finden lassen und kein IL-IS verfügbar ist)	6.4.2 bis 6.4.5
Q1b	Quantifizierung mittels Kalibrierung, die auf externen Standards in Lösemittel und IL-IS beruht (lösemittelbasiert mit IL-ISf)	nein	ja	ja	ja	nein	Voraussetzungen: Die Abwesenheit einer Matrix (in den Kalibrierlösungen) hat keine erhebliche Auswirkung auf das chromatographische Verhalten des Zielanalyten. Beispiel: Chlorat in Milch (wenn sich praktisch keine Blindproben-Matrizes finden lassen, ein IL-IS aber verfügbar ist)	6.5.3

- Entwurf -

Tabelle 6 (fortgesetzt)

Modul ^g	Beschreibung	Umstände		Effekte			Voraussetzungen, Anmerkungen und Beispiele	Verweisung in CEN/TS 17061:2019
		Verwendung von angepasster Blind-proben-Matrixa	IL-IS (zu Beginn des Verfahrens zu-gegeben)b	Dieser Ansatz ...				
				korrigiert eine schlechte absolute Wieder-findungc	korrigiert Matrix-effekted	reduziert die Auswirkung von Wechsel-wirkungen im Injektore		
Q2a	Quantifizierung mittels Kalibrierung, die auf externen Standards in Extrakten generischer rückstandsfreier Proben (bevorzugt mit geringer Extraktbeladung), z. B. Gurke, Tomate, ohne Verwendung von IL-IS beruht (matrixbasiert ohne IL-IS)	nein	nein	nein	nein	ja	Beispiel: wenn ein Labor mehrere Typen von Proben in derselben Charge analysiert, wodurch es praktisch schwierig ist, matrixangepasste Standards herzustellen	6.4.2 bis 6.4.5
Q2b	Quantifizierung mittels Kalibrierung, die auf externen Standards in Extrakten generischer rückstandsfreier Proben (bevorzugt mit geringer Extraktbeladung), z. B. Gurke, Tomate, und IL-IS beruht (matrixbasiert mit IL-ISf)	nein	ja	ja	ja	ja	Beispiel: wenn ein Labor mehrere Typen von Proben in derselben Charge analysiert, wodurch es praktisch schwierig ist, matrixangepasste Standards herzustellen	6.5.3
Q3a	Quantifizierung mittels Kalibrierung, die auf externen Standards in Extrakten rückstandsfreier Proben des gleichen Matrixtyps beruht (matrixangepasst ohne IL-IS)	ja	nein	nein	ja	ja	Voraussetzung: Die absolute Wiederfindungsrate des Analyten sollte ausreichend sein (da dieser Ansatz keine Wiederfindungsverluste korrigiert).	6.4.2 bis 6.4.5
Q3b	Quantifizierung mittels Kalibrierung, die auf externen Standards in Extrakten rückstandsfreier Proben des gleichen Matrixtyps mit IL-IS beruht (matrixangepasst mit IL-ISf)	ja	ja	ja	ja	ja		6.5.3

- Entwurf -

Tabelle 6 (fortgesetzt)

Modul ^g	Beschreibung	Umstände		Effekte			Voraussetzungen, Anmerkungen und Beispiele	Verweisung in CEN/TS 17061:2019
		Verwendung von angepasster Blind- proben- Matrixa	IL-IS (zu Beginn des Verfahrens zu- gegeben)b	Dieser Ansatz ...				
				korrigiert eine schlechte absolute Wieder- findungc	korrigiert Matrix- effekted	reduziert die Auswirkung von Wechsel- wirkungen im Injektore		
Q4a	Quantifizierung mittels externer Standards, mit denen Probenmengen rückstandsfreier Proben dotiert werden, d. h. Quantifizierung durch Kalibrierung über das gesamte Verfahren (<u>vorzugsweise mit einer angepassten Matrix</u>) (verfahrensbegleitend ohne IL-IS)	(ja) angepasste Matrix bevorzugt	nein	(ja) inhärent, wenn angepasste Matrix verwendet wird	(ja) inhärent, wenn angepasste Matrix verwendet wird	ja	Voraussetzung: Eine angepasste Matrix sollte verwendet werden, um Wiederfindung und Matrixeffekte zu korrigieren (da kein IL-IS verwendet wird). Anmerkung: Zu beachten ist, dass die absoluten Wiederfindungswerte einiger Analyte schwankend sind, selbst zwischen verschiedenen Proben des gleichen Matrixtyps (z. B. verschiedene Sorten von Reis).	6.7
Q4b	Quantifizierung mittels externer Standards, mit denen Probenmengen rückstandsfreier Proben dotiert werden, d. h. Quantifizierung durch Kalibrierung über das gesamte Verfahren (mit IL-IS und <u>vorzugsweise mit einer angepassten Matrix</u>) (verfahrensbegleitend mit IL-ISf)	(ja) angepasste Matrix bevorzugt	ja	ja	ja	ja	Anmerkung: Der IL-IS korrigiert sowohl Matrixeffekte als auch Wiederfindungsraten und sollte zu Beginn des Verfahrens, sowohl zur Einwaage der zu analysierenden Probe als auch zu den für die Kalibrierung des Verfahrens verwendeten Einwaagen zugegeben werden (verfahrensbegleitender IL-IS). Wenn der gleiche Matrixtyp verwendet wird, werden Matrixeffekte und Wiederfindungsraten zusätzlich über die Matrixanpassung und den verfahrensbegleitenden Ansatz korrigiert. Wenn eine angepasste Matrix nicht verfügbar ist, ist eine Matrix mit ähnlicher Auswirkung auf die Wiederfindung zu bevorzugen.	6.7

Tabelle 6 (fortgesetzt)

Modul ^g	Beschreibung	Umstände		Effekte			Voraussetzungen, Anmerkungen und Beispiele	Verweisung in CEN/TS 17061:2019
		Verwendung von angepasster Blind-proben-Matrixa	IL-IS (zu Beginn des Verfahrens zu-gegeben)b	Dieser Ansatz ...				
				korrigiert eine schlechte absolute Wieder-findungc	korrigiert Matrix-effekted	reduziert die Auswirkung von Wechsel-wirkungen im Injektore		
Q5a/b	Quantifizierung mittels Standardaddition zum Endextrakt (wahlweise mit IL-IS, falls verfügbar). Wird kein IL-IS verwendet, gilt Modul Q5a, und wenn ein IL-IS verwendet wird, gilt Modul Q5b. Für weitere Informationen siehe den Entscheidungsbaum, der unter [11] abgerufen werden kann. (Standardadditionen zu Aliquoten des Extrakts)	nein (identische Matrix wird verwendet)	(ja) wahlweise	nein	ja (inhärent)	ja	Ein beliebiger IS kann hierbei eingesetzt werden. Durch Einsatz eines IL-IS erfolgt keine Korrektur der Wiederfindung. Dieser Ansatz ist für Analyten mit zufriedenstellenden absoluten Wiederfindungsraten anzuwenden, bei denen nicht annehmbare Matrixeffekte durch andere Maßnahmen aber nicht angemessen kompensiert werden. Es wird angenommen, dass jeder Aliquot des Extrakts den gesamten Rückstand enthält, der ursprünglich in dem durch diesen Aliquot repräsentierten Anteil der Matrix enthalten war. Es ist daher wichtig sicherzustellen, die richtige Menge Wasser zu ergänzen (Tabelle B.1), sodass das Gesamtvolumen des Extrakts gleich 20 ml Wasser ist.	6.6.2

- Entwurf -

Tabelle 6 (fortgesetzt)

Modul ^g	Beschreibung	Umstände		Effekte			Voraussetzungen, Anmerkungen und Beispiele	Verweisung in CEN/TS 17061:2019
		Verwendung von angepasster Blindproben-Matrixa	IL-IS (zu Beginn des Verfahrens zu-gegeben)b	Dieser Ansatz ...				
				korrigiert eine schlechte absolute Wiederfindungc	korrigiert Matrixeffekted	reduziert die Auswirkung von Wechselwirkungen im Injektore		
Q6a/b	Quantifizierung mittels Standardaddition zu einzelnen Einwaagen der Probe (wahlweise mit IL-IS, falls verfügbar) Wird kein IL-IS verwendet, gilt Modul Q6a, und wenn ein IL-IS verwendet wird, gilt Modul Q6b. Für weitere Informationen siehe den Entscheidungsbaum, der unter [11] abgerufen werden kann. (Standardadditionen zu Einwaagen der Probe)	nein (identische Matrix wird verwendet)	(ja)	ja (inhärent)	ja (inhärent)	ja	Beispiel: Fälle, in denen eine angepasste Matrix, die zur Kalibrierung verwendet werden könnte, nicht verfügbar ist und eine Korrektur der resultierenden Wiederfindung notwendig ist	6.6.3
a Angepasste Blindproben-Matrizes mit vernachlässigbaren Konzentrationen des Zielanalyten (= die zur Herstellung von Kalibrierstandards verwendet werden könnten) sind jederzeit verfügbar und werden verwendet, dann „ja“, bzw. sind nicht verfügbar, dann „nein“. b „Ja“ gibt an, dass ein geeigneter IL-IS verfügbar ist und zu Beginn des Verfahrens (vor einer Aliquotierung) zugegeben wird. „Nein“ gibt an, dass ein IL-IS nicht verfügbar ist oder verfügbar ist, aber nicht zugegeben wird. c Wenn Wiederfindungsverluste während der Extraktion nicht vernachlässigbar sind, werden Verfahren empfohlen, die mit „ja“ gekennzeichnet sind. Wenn die Korrektur der Wiederfindung allein auf der Verwendung eines IL-IS beruht, muss der IL-IS zu Beginn des Verfahrens (vor einer Aliquotierung) zu den Proben gegeben werden. d Wenn Matrixeffekte nicht vernachlässigbar sind, werden Verfahren empfohlen, die mit „ja“ gekennzeichnet sind. e Wenn die chromatographische Leistung in Abwesenheit einer (beliebigen) Matrix (z. B. aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Injektor) beeinträchtigt ist, werden Verfahren empfohlen, die mit „ja“ gekennzeichnet sind. f Im Falle von geringen Wiederfindungsraten sollte der IL-IS zu Beginn des Verfahrens zugegeben werden (= verfahrensbegleitender IL-IS). g Für die Anwendung der Q-Module findet sich ein Entscheidungsbaum unter [11].								

7 Auswertung der Ergebnisse

7.1 Identifizierung

Zur Identifizierung wird auf die letzte Version des DG-SANTE-Dokuments verwiesen: *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed* [9]. Der Identifizierungsprozess umfasst die Sammlung einer Reihe von Nachweisen, die zusammengenommen die Entscheidung über die Identität des Analyten begründen. Der Prozess umfasst den Vergleich der Retentionszeiten und Peakformen der in der Probe zu identifizierenden Analyten und eines mitinjizierten IL-IS und/oder eines Referenzstandards der nativen Verbindung sowie einen Vergleich der relativen Abundanz (d.h. des Signalverhältnisses) eines oder mehrerer Paare von aufgezeichneten LC-MS/MS-Massenübergängen mit denen eines Referenzstandards. Falls weitere Zweifel bestehen, können weitere Nachweise gewonnen werden, indem der Extrakt mithilfe eines anderen chromatographischen Trennsystems (Säule, Lösemittel) erneut analysiert wird.

Matrizes, die eine sehr starke Signalunterdrückung bei den Analytsignalen verursachen, erhöhen die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse. Die Verwendung eines IL-IS hilft, Matrixeffekte (Signalunterdrückung) abzuschätzen. Im Falle sehr starker Unterdrückungen (z. B. > 80 %) wird die Durchführbarkeit des Nachweises des Analyten an der Bestimmungsgrenze (LOQ) überprüft, um das Risiko eines falsch negativen Ergebnisses möglichst gering zu halten. Zu diesem Zweck wird der Probenextrakt mit dem Zielanalyten an der LOQ und/oder einer höheren Konzentration aufdotiert und (erneut) injiziert. Falls erforderlich, wird die LOQ erhöht.

7.2 Kalibrierung und Quantifizierung

Die verwendeten Messsysteme (z. B. LC-MS/MS) sind entsprechend den Anforderungen in CEN/TS 17061:2019 zu kalibrieren, wobei die Vorgaben zu berücksichtigen sind, die im Dokument über die analytische Qualitätskontrolle und die Verfahren zur Methodvalidierung [9] beschrieben sind. In Tabelle 6 sind die Quantifizierungsmodule (Q1 bis Q6) aufgeführt, die spezifisch für die Kalibrierung und Quantifizierung empfohlen werden, wenn bestimmte Umstände und Voraussetzungen erfüllt sind. Ein Entscheidungsbaum, der die Priorisierung der Quantifizierungsmodule erleichtern soll, findet sich in [11].

Wenn ein bestimmter Analyt Wiederfindungsraten aufweist, die nicht die anerkannten Leistungskriterien erfüllen (siehe z. B. [9]), sollten Kalibrierungsansätze angewendet werden, die diesen Aspekt berücksichtigen. Die Zugabe des IL-IS zu Beginn des Verfahrens ist der praktisch unkomplizierteste Ansatz. Bei Fehlen von IL-ISs ist der Ansatz der Standardadditionen zu Einwaagen (Q6) oder der Ansatz der Kalibrierung über das Gesamtverfahren (Q4a) anzuwenden (siehe auch Tabelle 6).

Der Konzentrationsbereich der Kalibrierlösungen sollte die Rückstandskonzentrationen der Zielanalyten in den Probenextrakten umfassen.

Kalibrierung ohne IL-IS: Wenn kein adäquater IL-IS eingesetzt wird und die Auswirkung von Matrixeffekten während der Messung erheblich oder unbekannt ist, sollten die Kalibrierungsansätze eine Kompensation der Matrixeffekte sicherstellen. Im umgekehrten Fall sollten die gewonnenen Ergebnisse lediglich als eine erste Schätzung (semiquantitativ) angesehen werden. Wenn relevante Rückstandskonzentrationen detektiert werden (z. B. vermutete MRL-Überschreitungen), ist eine präzisere Analyse notwendig. Diese kann unterschiedliche Ansätze einschließen, beispielsweise die Verwendung von matrixangepassten Kalibrierstandards (Q3a), Standardadditionen (Q5 und Q6, wobei Letzteres auch Wiederfindungsverluste korrigiert) oder Kalibrierung über das Gesamtverfahren (Q4a). Des Weiteren ist es wichtig sicherzustellen, dass das Gesamtvolumen des Rohextrakts vor jedweder Verdünnung möglichst nahe bei 20 ml liegt (entspricht einer Massenkonzentration der Probe von 0,5 g/ml Extrakt, wenn die Einwaage 10 g beträgt). Dies erfolgt durch Anpassung des Wassergehalts wie in Tabelle B.1 dargestellt.

Kalibrierung mit IL-IS: Die Verwendung von IL-ISs macht die Matrixanpassung üblicherweise überflüssig, jedoch werden matrixbasierte Kalibrierungen (Q2 bis Q6) häufig gegenüber lösemittelbasierten bevorzugt, da die Abwesenheit von Matrixkomponenten zu Peakverzerrungen aufgrund von Wechselwirkungen verschiedener Analyten mit Oberflächen innerhalb des chromatographischen Systems führen kann.

Für Zwecke der Quantifizierung ist es daher von größter Wichtigkeit, dass das Verhältnis zwischen der absoluten IL-IS-Menge, die vor der Extraktion der Probe (oder dem isolierten Aliquot des Probenextrakts) zugesetzt wird, und der absoluten IL-IS-Menge, die den Kalibrierstandardlösungen zugesetzt wird (oder mindestens das Verhältnis der beiden Mengen), bekannt ist, da es in Berechnungen verwendet wird.

Alternativ kann ein IL-IS einem Aliquot (z. B. 1 ml) des Probenextrakts zugesetzt werden, das in das Injektionsfläschchen überführt wird. Auf diese Weise wird die erforderliche IL-IS-Menge um einen Faktor von z. B. 20 vermindert, wodurch die Kosten der Analyse gesenkt werden. Dies stellt dennoch sicher, dass Matrixeffekte zuverlässig kompensiert und Retentionszeit-Verschiebungen zuverlässig detektiert werden. Dieser Ansatz korrigiert allerdings keine Abweichungen des Extraktvolumens und Analytverluste, die vor der IL-IS-Zugabe (z. B. während der Extraktion und Reinigung) auftreten. Im Falle von größeren Abweichungen des Extraktvolumens und bei Analyten, die bekanntermaßen geringe oder variable absolute Wiederfindungsraten aufweisen, sollten die auf diesem Wege (späte IL-IS-Zugabe) erhaltenen Ergebnisse als semiquantitativ angesehen werden und eine erneute Analyse unter Zugabe eines geeigneten IL-IS vor der Extraktion sollte durchgeführt werden, bevor quantitative Ergebnisse ausgegeben werden.

7.3 Berechnung der Rückstandskonzentrationen

7.3.1 Berechnung der Rückstandskonzentrationen durch externe Kalibrierung ohne IL-ISs

Die Rückstandskonzentration des identifizierten Analyten A in der Probe, in mg/kg (w_A), wird nach Gleichung (1) unter Verwendung der Massenkonzentration der Probe im Endextrakt ($\rho_{\text{final extract}}^{\text{sample}}$) und der Massenkonzentration des Analyten im Endextrakt (ρ_A , siehe Quantifizierungsmodule) berechnet:

$$w_A = \frac{\rho_A}{\rho_{\text{final extract}}^{\text{sample}}} \quad (1)$$

Dabei ist

ρ_A die Massenkonzentration des identifizierten Analyten A in der Analyselösung (Endextrakt), in $\mu\text{g/ml}$, siehe die jeweiligen Verweisungen auf CEN/TS 17061:2019, 6.4.2 bis 6.4.5, unter Q1 bis Q6;

$\rho_{\text{final extract}}^{\text{sample}}$ die Massenkonzentration der Probe im Endextrakt, in g/ml.

Die Massenkonzentration der Probe im Endextrakt wird wie folgt nach Gleichung (2) berechnet:

$$\rho_{\text{final extract}}^{\text{sample}} = \frac{m_{\text{sample}}}{V_{\text{ex}}} \quad (2)$$

Dabei ist

m_{sample} die Masse der analytischen Einwaage der Probe;

V_{ex} das Volumen des Extrakts nach der Extraktion oder Reinigung. Vorausgesetzt, dass der Wassergehalt der Probe wie in Tabelle B.1 dargestellt angepasst worden ist, kann das Extraktionsvolumen (in ml) gleich 20 ml angenommen werden (oder 40 ml, falls ein Reinigungsschritt entsprechend Modul C3a oder C3b, mit zweifacher Verdünnung des Probenextrakts mit Acetonitril, einbezogen ist).

Da kein IL-IS verwendet wird, muss das Volumen des Extrakts (V_{ex}) bekannt sein. Wenn eine Verdünnung erfolgt ist (Modul DL), ist der Verdünnungsfaktor (F_{dilution}) zu berücksichtigen, siehe Gleichung (3). Verdünnungen, die auf Probenextrakt und Kalibrierlösungen gleichermaßen angewendet werden, sind bei dem Verdünnungsfaktor nicht zu berücksichtigen. Die Massenkonzentration der Probe im Endextrakt $\rho_{\text{final extract}}^{\text{sample}}$ (siehe auch die Quantifizierungsmodule unter XXX) wird nach Gleichung (4) berechnet:

$$F_{\text{dilution}} = \frac{V_A + V_B}{V_A} \quad (3)$$

$$\rho_{\text{final extract}}^{\text{sample}} = \frac{m_{\text{sample}}}{V_{\text{ex}}} \times \frac{1}{F_{\text{dilution}}} = \frac{m_{\text{sample}}}{V_{\text{ex}}} \times \frac{V_A}{(V_A + V_B)} \quad (4)$$

Dabei ist

V_A das Volumen des für die Verdünnung eingesetzten Rohextrakt-Aliquots (in ml);

V_B das Volumen des für die Verdünnung von V_A zugegebenen Lösemittels (in ml);

F_{dilution} der Verdünnungsfaktor in Bezug auf Verdünnungen des Endextrakts (ausgenommen Verdünnungen, die auf gleiche Weise auf die Kalibrierstandards angewendet werden).

Durch Einsetzen der gemessenen Peakfläche des Pestizids in der Probe (y_A) wird die Konzentration des Analyten im Endextrakt (ρ_A) bestimmt, wie in CEN/TS 17061:2019, 6.4.2 bis 6.4.5, beschrieben. Der Massenanteil w_A des Analyten in der Probe wird nach Gleichung (1) berechnet.

7.3.2 Berechnung der Rückstandskonzentrationen durch externe Kalibrierung mit IL-IS

Der folgende Berechnungsansatz erfordert, dass das Verhältnis der IL-IS-Massen, die zu den Einwaagen und zu dem (den) Kalibrierstandard(s) zugegeben werden, $m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}/m_{\text{Cal}}^{\text{IL-IS}}$, bekannt und konstant ist. Indem der IL-IS über die Kalibrierstufen konstant gehalten wird, kann das Peakverhältnis $y_A/y_{\text{IL-IS}}$ jeder Kalibrierstufe graphisch gegen die absolute Masse des Analyten $m_{\text{Cal}}^{\text{analyte}}$ aufgetragen werden, statt gegen das Verhältnis $m_{\text{Cal}}^{\text{analyte}}/m_{\text{Cal}}^{\text{IL-IS}}$ ($m_{\text{Cal}}^{\text{IL-IS}}$ wird gleich 1 gesetzt). Siehe auch CEN/TS 17061:2019, 6.5.3.

Der Massenanteil w_A des Analyten in der Probe, in Milligramm je Kilogramm, wird mittels Gleichung (5) berechnet:

$$w_A = \frac{\left(\frac{y_A}{y_{\text{IL-IS}}} - c \right)}{b} \cdot \frac{1}{m_{\text{sample}}} \cdot \frac{m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}}{m_{\text{Cal}}^{\text{IL-IS}}} \quad (5)$$

Dabei ist

y_A die Peakfläche des Analyten im Endextrakt (Zählung (en: counts));

$y_{\text{IL-IS}}$ die Peakfläche des IL-IS im Endextrakt (Zählung);

c der Achsenabschnitt der linearen Kalibrierfunktion;

b die Steigung der linearen Kalibrierfunktion;

m_{sample} die Masse der Einwaage (in g);

$m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}$ die Masse des IL-IS, der vor der Extraktion der Probe zugesetzt wird (irrelevant, da eliminiert);

$m_{\text{Cal}}^{\text{IL-IS}}$ die Masse des IL-IS in den Kalibrierstandards (irrelevant, da eliminiert).

Falls der IL-IS einem Aliquot des Endextrakts zugesetzt wird, muss m_{sample} ersetzt werden durch $m_{\text{sample-AL}}$, die mittels Gleichung (6) erhalten wird:

$$m_{\text{sample-AL}} = \frac{m_{\text{sample}}}{V_{\text{ex}}} \times \frac{1}{F_{\text{dilution}}} = \frac{m_{\text{sample}}}{V_{\text{ex}}} \times \frac{V_A}{(V_A + V_B)} \quad (6)$$

Dabei ist

$m_{\text{sample-AL}}$ die Probenmasse, die im Aliquot, welcher für die Zugabe des IL-IS eingesetzt wird, repräsentiert wird (in g).

Dabei darf jede Verdünnung, die nach der Zugabe des IL-IS zu einem festgelegten Aliquot vorgenommen wird, nicht im Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

7.3.3 Berechnung der Rückstandskonzentration mit dem Standardadditionsverfahren

Der Ansatz der Standardaddition ist das Verfahren der Wahl, wenn kein geeigneter IL-IS verfügbar ist. Durch diesen Ansatz werden Matrixeffekte üblicherweise besser kompensiert als bei Anwendung einer matrixangepassten Kalibrierung (CEN/TS 17061:2019, 6.6).

Bei den Standardadditionen zum Endextrakt wird die Konzentration des Analyten ρ_A im Endextrakt über die lineare Regressionsgerade der Peakflächen gegen die dotierten Konzentrationen und die Masse der Probe, die durch das eingesetzte Aliquot des Endextrakts repräsentiert wird, bestimmt, wie in CEN/TS 17061:2019, 6.6.2, beschrieben. Der Massenanteil w_A des Analyten in der Probe wird nach Gleichung (1) berechnet. Dabei wird angenommen, dass das Gesamtvolumen des Probenextrakts genau 20 ml beträgt (oder 40 ml, falls ein Reinigungsschritt entsprechend Modul C3a oder C3b, mit zweifacher Verdünnung mit Acetonitril, einbezogen ist), vorausgesetzt, dass der Wassergehalt der Probe eingestellt worden ist, wie in Tabelle B.1 dargestellt.

Im Falle von Standardadditionen zu mehreren Einwaagen wird die Masse des Analyten in der Probeneinwaage über die lineare Regressionsgerade der Peakflächen gegen die dotierten Analytmassen bestimmt, wie in CEN/TS 17061:2019, 6.6.3, beschrieben. Der Massenanteil des Analyten in der Probe ergibt sich aus dem Quotienten der Masse des Analyten m_A in der Einwaage und der Masse der Einwaage m_{sample} .

Wenn die Messsignale der Extrakte mit Standardaddition außerhalb des linearen Detektionsbereichs der LC-MS/MS liegen, sollten die Lösungen verdünnt werden.

Beim Standardadditionsverfahren wird die gesuchte Analytkonzentration durch lineare Extrapolation ermittelt. Deshalb ist es wichtig, dass der Analyt im untersuchten Kalibrierbereich ein lineares Detektionsverhalten zeigt.

7.3.4 Berechnung der Rückstandskonzentrationen bei komplexen Rückstandsdefinitionen

Im Falle von komplexen gesetzlichen Rückstandsdefinitionen müssen einige Komponenten so angegeben werden, wie durch den Text der jeweiligen Rückstandsdefinition festgelegt, indem Umrechnungsfaktoren (C_f), die aus den Molekularmassen abgeleitet werden, angewendet werden. Davon sind gegenwärtig die folgenden beiden Komponenten betroffen, die in diesem Dokument einbezogen sind: Glufosinat und Fosetyl. Nachstehend ist ein Beispiel einer Berechnung für Fosetyl gezeigt.

$$\begin{aligned} C_{\text{Fosetyl (Summe)}} &= C_{\text{Fosetyl}} + C_{\text{Phosphonsäure}} \times C_{f(\text{Phosphonsäure} \rightarrow \text{Fosetyl})} \\ &= C_{\text{Fosetyl}} + C_{\text{Phosphonsäure}} \times (M_{\text{wFosetyl}}/M_{\text{wPhosphonsäure}}) \\ &= C_{\text{Fosetyl}} + C_{\text{Phosphonsäure}} \times (110,05/81,99) = C_{\text{Fosetyl}} + C_{\text{Phosphonsäure}} \times 1,342 \end{aligned}$$

8 Validität des Verfahrens

Das Verfahren wurde durch Ringversuche gemeinschaftlich für verschiedene Analyt-Matrix-Kombinationen validiert. Die in [2] [3] und [11] dargestellten Validierungsdaten wurden im Rahmen von mehreren Validierungsstudien durch Ringversuche erhalten. Dabei wurden die Labore gebeten, Validierungsversuche nach einem detaillierten analytischen Protokoll durchzuführen und ihre gewonnenen Daten vorzulegen. Die benötigten Analyten und IL-ISs wurden den Laboren von den Organisatoren bereitgestellt, während die Blindproben-Matrizes durch die Labore selbst beschafft und homogenisiert wurden. Die Art der in diesen Untersuchungen zu verwendenden Matrizes war festgelegt. Insgesamt wurden drei separate Validierungsrunden durchgeführt, jede mit 10 bis 20 teilnehmenden Laboren. Es wurde als unerlässlich angesehen, dass eine erhebliche Anzahl an Kombinationen aus Analyt, Matrix und Konzentration von mindestens 8 Laboren erfolgreich validiert wurde.

Eine ausreichende Validität des Verfahrens für eine bestimmte Analyt-Matrix-Kombination wurde angenommen, wenn mindestens drei Labore mit mindestens fünf Parallelproben zur Wiederfindung je Konzentration mittels IL-IS korrigierte Wiederfindungsraten im Bereich von 80 % bis 120 % sowie eine relative Standardabweichung unter Wiederholbedingungen (RSD) von ≤ 20 % erreichten. Die Validierungsergebnisse sind in zusammengefasster Form in [11] und in detaillierter Form in [10] zu finden. Die Bestimmungsgrenzen hängen vom Analyten, der Matrix und der Empfindlichkeit der verwendeten analytischen Messgeräte ab. In Tabelle 7 ist zusammengefasst, für welche Kombinationen von Analyten und Lebensmittelgruppen (zur Klassifizierung siehe [9]) mit dem vorgestellten Verfahren Validierungsdaten erhalten wurden, die die oben genannten Kriterien erfüllen.

Zusätzliche Validierungsdaten zu diesem Verfahren oder zu Varianten dieses Verfahrens finden sich in [10].

Tabelle 7 — Überblick über verfügbare Validierungsdaten, die im Rahmen von Validierungsstudien durch Ringversuche erhalten wurden (erfolgreiche Validierung durch ≥ 3 Laboratorien mit $n = 5$ für 2 Konzentrationen)

Analyt	Lebensmittelgruppe (Codes wie in [9])						
	Hoher Wassergehalt	Hoher Säuregehalt und hoher Wassergehalt	Hoher Ölgehalt und sehr geringer Wassergehalt	Hoher Ölgehalt und mittlerer Wassergehalt	Hoher Stärke- und/oder Proteingehalt und geringer Wasser- und Fettgehalt	Fleisch (Muskel) und Meeresfrüchte	Milch und Milch-erzeugnisse
	(1)	(2)	(4a)	(4b)	(5)	(7)	(8)
AMPA	x	x	x		x	x	x
Bromid	x	x		x	x		x
Chlorat	x	x		x	x		x
Chlormequat	x	x		x	x		x
Cyanursäure	x	x					x
Cyromazin	x	x		x	x		x
Daminozid	x	x		x	x		x
Ethephon	x	x	x		x	x	x
Fosetyl-Al	x	x	x		x	x	x
Glufosinat	x	x	x		x	x	x
Glyphosat	x	x	x		x	x	x
HEPA	x	x	x		x	x	x

Tabelle 7 (fortgesetzt)

Analyt	Lebensmittelgruppe (Codes wie in [9])						
	Hoher Wassergehalt	Hoher Säuregehalt und hoher Wassergehalt	Hoher Ölgehalt und sehr geringer Wassergehalt	Hoher Ölgehalt und mittlerer Wassergehalt	Hoher Stärke- und/oder Protein-gehalt und geringer Wasser- und Fettgehalt	Fleisch (Muskel) und Meeresfrüchte	Milch und Milch-erzeug-nisse
Maleinsäurehydrazid	x	x					
Melamin	x	x		x	x		x
Mepiquat	x	x		x	x		x
MPPA	x	x	x		x	x	x
N-Acetyl-Glufosinat	x	x	x		x	x	x
N-Acetyl-Glyphosat	x	x	x		x	x	x
Nereistoxin	x	x		x	x		x
Perchlorat	x	x		x	x		x
Phosphonsäure	x	x		x	x		x
Trimethylsulfonium	x	x		x	x		x

Tabelle 8 — Überblick über aktuell geltende Höchstgehalte (MRLs) und Vergleich mit den niedrigsten erfolgreich validierten Konzentrationen (LSVLs) im Ringversuch

Anmerkung	Verbindung	Hoher Wasser-/Säuregehalt			Trocken - geringer Fettgehalt			Trocken - hoher Fettgehalt		
		LSVL mg/kg	N	Niedrigster MRL mg/kg	LSVL mg/kg	N	Niedrigster MRL mg/kg	LSVL mg/kg	N	Niedrigster MRL mg/kg
Rechtlich nicht relevant	AMPA	0,05	12		0,1	5		0,1	6	
	Bromid	0,1	10	20 / 5 (Beeren)	10	9	50			20
	Chlorat	0,01	12	0,05	0,02	12	0,05			0,05
	Chlormequat (Cl)	0,01	10	0,01	0,01	10	0,01			0,01
Rechtlich nicht relevant	Cyanursäure	0,05	5		0,1	1		0,1	1	
	Cyromazin	0,01	10	0,05	0,01	7	0,05			0,05
	Daminozid	0,01	8	0,06	0,01	5	0,06			0,1
	Ethephon	0,01	10	0,05	0,02	4	0,05	0,02	6	0,1
	Fosetyl-Al	0,01	12	2 (für die Summe)	0,02	5	2 (für die Summe)	0,02	6	2 (für die Summe)
	Glufosinat	0,03	9	0,03 (für die Summe)	0,06	5	0,03 (für die Summe)	0,06	7	0,03 (für die Summe)
	Glyphosat	0,05	11	0,1	0,1	6	0,1	0,1	7	0,1

Tabelle 8 (fortgesetzt)

Anmerkung	Verbindung	Hoher Wasser-/Säuregehalt			Trocken – geringer Fettgehalt			Trocken – hoher Fettgehalt		
		LSVL mg/kg	N	Niedrigster MRL mg/kg	LSVL mg/kg	N	Niedrigster MRL mg/kg	LSVL mg/kg	N	Niedrigster MRL mg/kg
Rechtlich nicht relevant	HEPA	0,02	10		0,04	5		0,04	7	
	Maleinsäure-hydrazid	0,02	4	0,2	0,04	1	0,2	0,04	1	0,2
Rechtlich nicht relevant	Melamin	0,01	8		0,01	7				
	Mepiquat (Cl)	0,01	10	0,02	0,01	10	0,02			0,05
	MPPA	0,02	11	siehe Glufosinat	0,04	6	siehe Glufosinat	0,04	6	siehe Glufosinat
	N-Acetyl-Glufosinat	0,02	12	siehe Glufosinat	0,04	7	siehe Glufosinat	0,04	7	siehe Glufosinat
Rechtlich nicht relevant	N-Acetyl-Glyphosat	0,05	9		0,1	4		0,1	6	
Rechtlich nicht relevant	Nereistoxin	0,01	9		0,01	7				
Kontaminant	Perchlorat	0,01	11		0,02	11				
	Phosphonsäure	0,1	6	siehe Fosetyl	0,2	5	siehe Fosetyl			siehe Fosetyl
	Trimethyl-sulfonium	0,01	11	0,05	0,01	10	0,05			0,05
Rechtlich nicht relevant	AMPA	0,05	8		0,05	8		0,05	3	
	Bromid			0,05	5	7	0,05			0,05
	Chlorat			0,05	0,01	6	0,1			0,05
	Chlormequat (Cl)			1,5/0,15 (Geflügel)	0,01	9	0,5			1,5/0,15 (Geflügel)
Rechtlich nicht relevant	Cyanursäure	0,05	2		0,05	2		0,05	2	
	Cyromazin			0,01	0,01	9	0,01			0,01
	Daminozid			0,06	0,01	8	0,06			0,06
	Ethephon	0,01	6	0,4/0,08 (Geflügel)	0,01	7	0,05	0,01	2	0,4/0,08 (Geflügel)
	Fosetyl-Al	0,01	7	0,5 (für die Summe)	0,01	7	0,5 (für die Summe)	0,01	3	0,5 (für die Summe)
	Glufosinat	0,03	7	3/0,1 (Geflügel) (für die Summe)	0,03	8	0,03 (für die Summe)	0,03	3	3/0,1 (Geflügel) (für die Summe)

Tabelle 8 (fortgesetzt)

Anmerkung	Verbindung	Hoher Wasser-/Säuregehalt			Trocken – geringer Fettgehalt			Trocken – hoher Fettgehalt		
		LSVL mg/kg	N	Niedrigster MRL mg/kg	LSVL mg/kg	N	Niedrigster MRL mg/kg	LSVL mg/kg	N	Niedrigster MRL mg/kg
	Glyphosat	0,05	8	0,05/0,2 (Rind)	0,05	8	0,05	0,05	4	0,05/0,1 (Geflügel)/ 0,5 (Schwein)/2 (Rind)
Rechtlich nicht relevant	HEPA				0,02	8		0,02	1	
	Maleinsäurehydrazid	0,02	2	0,1/0,02 (Geflügel)	0,02	1	0,07			2/0,02 (Geflügel)
Rechtlich nicht relevant	Melamin				0,01	8				
	Mepiquat (Cl)			0,05	0,01	9	0,07			0,05
	MPPA	0,02	8	siehe Glufosinat	0,02	8	siehe Glufosinat	0,02	5	siehe Glufosinat
	N-Acetyl-Glufosinat	0,02	8	siehe Glufosinat	0,02	8	siehe Glufosinat	0,02	4	siehe Glufosinat
Rechtlich nicht relevant	N-Acetyl-Glyphosat	0,05	6		0,05	7		0,05	2	
Rechtlich nicht relevant	Nereistoxin				0,01	8				
Kontaminant	Perchlorat				0,01	6				
	Phosphonsäure			siehe Fosetyl	0,1	5	siehe Fosetyl			siehe Fosetyl
	Trimethylsulfonium			0,05	0,01	9	0,1			0,05

9 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

- alle Informationen, die zur Identifikation der Probe notwendig sind;
- eine Verweisung auf diese Europäische Norm (einschließlich des Jahres ihrer Veröffentlichung);
- die Ergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben wurden;
- das Datum und die Art der Probenahme (wenn möglich);
- das Eingangsdatum der Probe im Labor;
- das Untersuchungsdatum;
- alle Besonderheiten, die während der Untersuchung festgestellt wurden;

- alle Arbeitsschritte, die nicht in diesem Verfahren festgelegt sind oder als wahlfrei angesehen wurden und die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben.

10 Zusätzliche Informationen über die Analyse

10.1 Extraktionsdauer

Bei Obst und Gemüse ist eine Schüttelzeit von 1 min meist ausreichend. Im Falle von Getreide und anderen trockenen Proben ist es wichtig sicherzustellen, dass solche Proben fein gemahlen werden, um die Zugänglichkeit der Rückstände für das Extraktionslösemittel zu verbessern. Darüber hinaus ist eine Extraktionsdauer von mindestens 15 min für diese Matrizes notwendig. Im Falle von unzureichend zerkleinerten Untersuchungsproben oder wenn Hinweise vorliegen, dass die Extraktionsausbeute des Analyten nicht ausreichend ist, sollte die Extraktion zeitlich verlängert und/oder durch mechanische Hilfsmittel (z. B. Schüttelmaschine (A.2.8), Hochleistungs-Dispergiergerät (A.2.2)) verbessert werden. Bei Verwendung eines Hochleistungs-Dispergiergeräts wird nach Zusatz von 10 ml angesäuertem Methanol und des IL-IS das dispergierende Element in die Probe eingetaucht und diese für etwa 2 min bei hoher Drehzahl homogenisiert. Da der IL-IS bereits in der Probe vorhanden ist, besteht keine Notwendigkeit, den am Dispergiererelement haftenden Probenrest abzuspülen. Das Dispergiererelement muss jedoch immer vor seiner Verwendung bei der nächsten Probe gereinigt werden. Schüttel- oder Einweich-/Eintauchzeiten sollten 60 min nicht überschreiten, um einen Abbau instabiler Analyten auf ein Mindestmaß zu reduzieren.

10.2 Skalierung

In diesem Dokument werden in den Extraktionsmodulen E1 bis E7 bestimmte Massen in Bezug auf die Probenmasse spezifiziert. Sowohl die Extraktion als auch die Reinigung können unabhängig voneinander im Maßstab erhöht oder verringert werden. Bei der maßstäblichen Verringerung der Extraktion (d. h. der Masse der Einwaage) ist es äußerst wichtig sicherzustellen, dass die Variabilität zwischen den Einwaagen annnehmbar bleibt. Wenn der Homogenitätsgrad unzureichend ist, ist eine maßstäbliche Erhöhung oder eine Mittelwertbildung bei den betreffenden Analysen notwendig.

Anhang A (informativ)

Beschreibung der Module

A.1 Reagenzien

Sofern keine anderslautenden Festlegungen bestehen, werden Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit verwendet und alle Vorsichtsmaßnahmen getroffen, um eine mögliche Kontamination von Wasser, Lösemitteln, Sorbentien, anorganischen Salzen usw. zu vermeiden.

Alle beim Verfahren verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien sollten regelmäßig durch z. B. Reagenzien-Blindprüfungen auf relevante Konzentrationen der zu untersuchenden Analyten überprüft werden.

A.1.1 Wasser, deionisiert, für Wasserzugaben zu den Proben

A.1.2 Wasser, ultrarein, z. B. hergestellt mit einem Laborwasser-Reinigungssystem

Im Handel erhältliches, für MS geeignetes Wasser kann für mobile Phasen bei der LC-MS/MS bzw. für IC geeignetes Wasser kann für mobile Phasen bei der IC-MS/MS verwendet werden.

A.1.3 Methanol, mindestens für HPLC geeignet; für die Herstellung mobiler Phasen wird bevorzugt Methanol in MS-Qualität verwendet.

A.1.4 Acetonitril, mindestens für HPLC geeignet; für die Herstellung mobiler Phasen wird bevorzugt Acetonitril in MS-Qualität verwendet.

A.1.5 Ameisensäure, konzentriert, > 98 %; für die Herstellung mobiler Phasen wird bevorzugt Ameisensäure in MS-Qualität verwendet.

A.1.6 Essigsäure, konzentriert, > 98 %; für die Herstellung mobiler Phasen wird bevorzugt Essigsäure in MS-Qualität verwendet.

A.1.7 Angesäuertes Methanol, für die Extraktion der Mehrzahl der Proben

10 ml Ameisensäure (A.1.5) werden in einen 1 000-ml-Messkolben pipettiert und bis zur Marke mit Methanol (A.1.3) aufgefüllt.

A.1.8 C18-Sorbent, Schüttgut, Partikelgröße 30 µm bis 300 µm (auch als ODS-Sorbent bezeichnet)

A.1.9 Ammoniumformiat, analysenrein (p. a.)

A.1.10 Ethylendiamintetraessigsäure-Tetranatriumsalz, Na₄-EDTA

BEISPIEL Tetranatriumdihydrat-Salz (CAS-Nr.: 10378-23-1)(MW = 416,20) oder Tetranatriumtetrahydrat-Salz (CAS-Nr.: 13235-36-4)(MW = 452,23).

A.1.11 Na₄-EDTA-Lösung, 10 %, wässrig (EDTA-Lösung)

15,85 g EDTA-Tetranatriumtetrahydrat (oder 14,59 g EDTA-Tetranatriumdihydrat) (A.1.10) werden in einen 100-ml-Messkolben mit Stopfen eingewogen, in 80 ml Wasser gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung enthält 10 % EDTA-Tetraanionen-Äquivalente (Massenanteil je Volumeneinheit).

A.1.12 Hilfsmittel für die Kaltmahlung, z. B. Trockeneis oder flüssiger Stickstoff

Hilfsmittel von technischem Reinheitsgrad können verwendet werden. Es ist regelmäßig zu überprüfen, dass das jeweilige Hilfsmittel keine relevanten Konzentrationen der zu untersuchenden Verbindungen enthält.

A.1.13 Pestizidstandards.

A.1.14 Interne Standards (IL-ISs).

Für Beispiele von Bezugsquellen wird auf die aktuelle Version von [2] verwiesen. Es wird regelmäßig überprüft, ob die IL-ISs native Verbindungen in Konzentrationen enthalten, die zu falsch positiven Ergebnissen oder zu nicht annehmbaren Quantifizierungsfehlern führen würden.

A.1.15 Mobile Phasen für LC-MS/MS.

Siehe detaillierte Angaben bei den Modulen M1 (A.6.2), M2 (A.6.3) und M3 (A.6.4).

A.1.16 Pestizid-Stammlösungen.

Unter Verwendung von wassermischbaren Lösemitteln werden Stammlösungen aller zu analysierenden Pestizide in einer Konzentration hergestellt, die hoch genug ist (z. B. 1 mg/ml), um die Herstellung komplexer Arbeitslösungen zu ermöglichen. Beispiele geeigneter Lösemittel sind in [11] aufgeführt (siehe auch Anhang C).

Einige Standards werden als Salze oder Hydrate verkauft. Beispiele für einige Umrechnungsfaktoren, die bei Umrechnungen zwischen üblichen Standards und den Analyten anzuwenden sind, sind in [11] enthalten (siehe auch Anhang C). Die Lösungen werden in Kunststoffgefäßen aufbewahrt, da einige der durch dieses Verfahren abgedeckten Verbindungen zu Wechselwirkungen mit Glasoberflächen neigen (siehe Beispiele für Kunststoffgefäße unter A.2.15).

Die Stammlösungen sollten üblicherweise bei $\leq 6^\circ\text{C}$ gelagert werden. Die Stabilität der Stammlösungen wird während der Lagerung regelmäßig kontrolliert [9]. Vor der Entnahme eines Aliquots aus der Stammlösung wird überprüft, ob sich ein Niederschlag darin gebildet hat, der gegebenenfalls wieder aufgelöst wird.

A.1.17 Pestizid-Arbeitslösungen/-mischungen.

Pestizid-Arbeitslösungen werden in geeigneten Konzentrationen durch Verdünnen der Stammlösungen (A.1.16) eines oder mehrerer Pestizide mit wassermischbaren Lösemitteln hergestellt, wie für die Dotierung von Proben in Wiederfindungsversuchen und für die Herstellung der Kalibrierstandards (siehe A.1.22 und A.1.23) erforderlich. Vorschläge für Lösemittel zur Herstellung von Arbeitslösungen werden in [11] gegeben (siehe auch Anhang C).

Bei der Herstellung matrixangepasster Standards (siehe A.1.22) sollte die Konzentration der Pestizid-Arbeitslösung mindestens das Fünffache der Konzentration des Pestizids in dem herzustellenden matrixangepassten Standard betragen, sodass die Verdünnung des Blindproben-Extrakts $\leq 20\%$ bleibt.

Die Lösungen werden in Kunststoffgefäßen aufbewahrt, da einige der durch dieses Verfahren abgedeckten Verbindungen zu Wechselwirkungen mit Glasoberflächen neigen (siehe Beispiele für Kunststoffgefäße unter A.2.15).

Die Stammlösungen sollten üblicherweise bei $\leq 6^\circ\text{C}$ gelagert werden. Die Stabilität der Stammlösungen wird während der Lagerung regelmäßig kontrolliert [9]. Vor der Entnahme eines Aliquots aus der Stammlösung wird überprüft, ob sich ein Niederschlag darin gebildet hat, der gegebenenfalls wieder aufgelöst wird.

A.1.18 Interne Standards (IL-ISs) und IL-IS-Stammlösungen.

Stammlösungen aller relevanten IL-ISs werden in einer Konzentration hergestellt, die hoch genug ist, um die Herstellung der gewünschten IL-ISs-Mischungen zu ermöglichen. Wenn die Lösungen der IL-ISs selbst hergestellt werden, müssen wassermischbare Lösemittel verwendet werden. Weitere Informationen zu geeigneten

Lösemitteln können [11] entnommen werden. IL-ISs, die als Lösungen im Handel erworben werden, können in Abhängigkeit von der Konzentration als Stamm- oder Arbeitslösungen verwendet werden.

Die Lösungen werden in Kunststoffgefäßen aufbewahrt, da einige der durch dieses Verfahren abgedeckten Verbindungen zu Wechselwirkungen mit Glasoberflächen neigen (siehe Beispiele für Kunststoffgefäße unter A.2.15).

Im Allgemeinen sind die absoluten Konzentrationen der IL-IS-Lösungen nicht wichtig, solange die IL-IS-Konzentration im Endextrakt hoch genug ist, um ein gut messbares Signal zu erzeugen, das nicht relevant durch miteluierte Matrixkomponenten gestört wird. Ein IL-IS-Standard von relativ geringer Reinheit ist weiterhin annehmbar, solange der Gehalt an nativen Analyten (unabhängig davon, ob sie ursprünglich – als Verunreinigung – vorhanden waren oder ob sie während der Lagerung der Arbeitslösungen entstanden sind) niedrig genug ist, um falsch positive Ergebnisse ausschließen und sicherstellen zu können, dass jeglicher Einfluss auf die Quantifizierung bei positiven Ergebnissen vernachlässigbar ist.

Einige Beispiele, wo Sorgfalt notwendig ist, um die Bildung nativer Analyten aus IL-ISs zu vermeiden, sind:

- N-Acetyl-Glyphosat (Acetyl-D3): deacetyliert unter Bildung von nativem Glyphosat;
- Fosetyl-D5: hydrolysiert zu nativer Phosphonsäure;
- Maleinsäurehydrazid-D2: Der Standard enthält üblicherweise einen kleinen, aber relevanten Anteil der nativen Verbindung als Verunreinigung.

A.1.19 IL-IS-Arbeitslösung I (IL-IS-WSln-1), für die Dotierung von Proben vor der Extraktion

IL-IS-Arbeitslösungen I, die einen oder mehrere geeignete IL-ISs in geeigneten Konzentrationen enthalten, üblicherweise 20 µg/ml, werden durch Verdünnen der IL-IS-Stammlösungen (A.1.18) mit wassermischbaren Lösemitteln hergestellt. Ausnahmen hinsichtlich der Konzentrationen sind in Tabelle A.1 aufgeführt. Eine detailliertere Tabelle mit vorgeschlagenen Konzentrationen der Arbeitslösungen sowie eine Tabelle mit Vorschlägen für die zu verwendenden Lösemittel können [11] entnommen werden.

Die Lösungen werden in Kunststoffgefäßen aufbewahrt, da einige der durch dieses Verfahren abgedeckten Verbindungen zu Wechselwirkungen mit Glasoberflächen neigen (siehe Beispiele für Kunststoffgefäße unter A.2.15).

In Gegenwart von Wasser, und insbesondere bei hohen pH-Werten, wird $^{18}\text{O}_3$ -Phosphonsäure nach und nach in $^{18}\text{O}_2^{16}\text{O}_1$ -, $^{18}\text{O}_1^{16}\text{O}_2$ - und schließlich (native) $^{16}\text{O}_3$ -Phosphonsäure umgewandelt. Die von den EURLs gelieferte $^{18}\text{O}_3$ -Phosphonsäure-Standardlösung sollte bevorzugt in Acetonitril verdünnt werden, worin die $^{18}\text{O}_3$ -Spezies für längere Zeitspannen stabil ist, wie nachgewiesen werden konnte.

A.1.20 IL-IS-Arbeitslösung II (IL-IS-WSln-2), für die Herstellung der Kalibrierstandards

IL-IS-WSln-2 wird in einer geeigneten Konzentration, üblicherweise 1 µg/ml, durch Verdünnen von IL-IS-WSln-1 (A.1.19) mit einem wassermischbaren Lösemittel hergestellt. Ausnahmen hinsichtlich der Konzentrationen sind in Tabelle A.1 aufgeführt. Eine detailliertere Tabelle mit vorgeschlagenen Konzentrationen der Arbeitslösungen sowie eine Tabelle mit Vorschlägen für die zu verwendenden Lösemittel können [11] entnommen werden.

Die Lösungen werden in Kunststoffgefäßen aufbewahrt, da einige der durch dieses Verfahren abgedeckten Verbindungen zu Wechselwirkungen mit Glasoberflächen neigen (siehe Beispiele für Kunststoffgefäße unter A.2.15).

Tabelle A.1 — Beispiele für Konzentrationen von IL-IS-Arbeitslösungen (IL-IS-WSln)

Interner Standard (IL-IS) ^a , Kennzeichnungen siehe A.6.7.3 und A.6.7.4	IL-IS-Zugabe zu Einwaagen (5.5)		IL-IS-Zugabe zu Kalibrierstandards (A.1.22)		Ungefähre IL-IS-Konz. in Probenextrakten (von ~ 20 ml) oder Kalibrierstandards (~ 1 ml)
	Vorgeschlagene Konz. der IL-IS-WSln-1 (A.1.19)	Absolute Masse des IL-IS, mit der die Probe dotiert wird (100 µl IL-IS-WSln-1) ($m_{\text{ILISsample}}$)	Vorgeschlagene Konz. der IL-IS-WSln-2 (A.1.20) ^b	Absolute Masse des IL-IS, mit der Kalib.-Std. dotiert wird (100 µl IL-IS-WSln-2) ($m_{\text{ILIScal-mix}}$)	
	µg/ml	µg	µg/ml	µg	µg/ml
Meiste Verbindungen	20	2	1	0,1	0,1
Desphenyl-Chloridazon, AMPA	40	2	2	0,2	0,2
Chlormequat, Mepiquat, Nereis-toxin, Nicotin, PTU, Trimethylsulfonium	10	1	0,5	0,05	0,05
Propamocarb	2	0,2	0,1	0,01	0,01
^a Die Konzentration des IL-IS sollte hoch genug sein, um eine gute Detektion mit nur geringem Einfluss durch Rauschen sicherzustellen (ein S/N-Verhältnis von > 20 ist üblicherweise ausreichend). Es sollte jedoch beachtet werden, dass isotopenmarkierte interne Standards (IL-ISs) manchmal kleine Mengen der nicht markierten analogen Verbindungen enthalten. Um das Risiko falsch positiver Ergebnisse möglichst weit zu reduzieren, sollte die Menge an IL-IS, die zu den Proben zugegeben wird, deshalb nicht größer sein als notwendig. Die Quantifizierung der Ausgangsverbindung ist üblicherweise nicht in größerem Maße beeinträchtigt, da eine Kreuzkontamination üblicherweise nur in geringen Konzentrationen auftritt und zudem auch vergleichbare Konzentrationen des nativen Pestizids, die aus dem IL-IS stammen, in den Kalibrierstandards vorhanden sind und folglich über den Achsenabschnitt subtrahiert werden. ^b Zur Herstellung der Kalibrierstandards wird eine 20-fache Verdünnung der IL-IS-Arbeitslösung verwendet, vorausgesetzt dass der Rohextrakt nicht weiter durch C3a oder C3b und/oder DLx verdünnt wurde.					

A.1.21 Blindproben-Extrakte, zur Herstellung von Standardlösungen verwendet

Unter Verwendung von Lebensmitteln, die keine relevanten Mengen des zu untersuchenden Analyten enthalten, werden Extraktion und Reinigung wie für das jeweilige Lebensmittel vorgesehen durchgeführt, allerdings ohne IL-IS zuzusetzen. Der Extrakt wird für die Herstellung von matrixangepassten oder matrixbasierten Standards (A.1.22) verwendet.

A.1.22 Standardlösungen für die Kalibrierung, lösemittelbasiert, matrixbasiert und matrixangepasst

Standardlösungen für Kalibrierungszwecke werden hergestellt, indem verschiedene Volumina einer Pestizid-Arbeitslösung und gleiche Volumina von IL-IS-Arbeitslösung II (A.1.20) zugegeben werden und alle Lösungen auf ein festgelegtes Volumen verdünnt werden, und zwar mit entweder:

- einer Mischung aus Wasser (A.1.1) + angesäuertem Methanol (A.1.7), $V_1 + V_2$, 1 + 1 (im Falle von lösemittelbasierten Standards); oder
- einem Extrakt einer generischen Blindproben-Matrix (matrixbasiert); oder
- einem Extrakt des gleichen Matrixtyps (matrixangepasst).

Die in den Fällen b) und c) zu verwendenden Blindproben-Extrakte werden wie in A.1.21 beschrieben erzeugt. Die Verwendung von Standards mit verschiedenen Pestizidkonzentrationen ermöglicht die Erstellung einer Kalibrierkurve. Siehe das Beispiel eines Pipettierschemas in Tabelle A.2.

Tabelle A.2 — Beispiel eines Pipettierschemas für die Herstellung von Kalibrierstandards:

		Kalibrierstandards											
		Lösemittelbasiert mit IL-IS ^d			Matrixbasiert mit IL-IS ^d			Matrixangepasst ohne IL-IS ^f			Matrixangepasst mit IL-IS ^d		
Kalibrierstufe (µg Analyt/ml) oder (µg Pestizid/„IL-IS-Menge“ ^a)		0,05	0,1	0,25	0,05	0,1	0,25	0,05	0,1	0,25	0,05	0,1	0,25
Mischung aus Wasser (A.1.1) + angesäuertem Methanol (A.1.7), $V_1 + V_2$, 1 + 1		850 µl	800 µl	850 µl	50 µl	—	50 µl	100 µl	50 µl	100 µl	50 µl	—	50 µl
Extrakt der generischen Blindproben-Matrix (z. B. Gurke oder Tomate)		—	—	—	800 µl	800 µl	800 µl	—	—	—	—	—	—
Blindproben-Extrakt (A.1.21)		—	—	—	—	—	—	850 µl	850 µl	850 µl	800 µl	800 µl	800 µl
Pestizid-Arbeitslösung (A.1.17) ^b	1 µg/ml	50 µl	100 µl	—	50 µl	100 µl	—	50 µl	100 µl	—	50 µl	100 µl	—
	5 µg/ml	—	—	50 µl	—	—	50 µl	—	—	50 µl	—	—	50 µl
IL-IS-WSln-2 (A.1.20) ^{a c}		100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	—	—	—	100 µl	100 µl	100 µl
Gesamtvolumen [µl]		1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl
e Wenn IL-ISs nicht verfügbar sind oder nicht eingesetzt werden, sind matrixangepasste Standards (siehe A.1.22 und Anhang A.XXX) bzw. ist der Ansatz der Standardaddition (A.7.9) besonders wichtig, um Matrixeffekte bei der Messung zu kompensieren. In beiden Fällen wird angenommen, dass das Gesamtvolumen der Probenextrakte genau 20 ml ist, was jeweils einem Probenäquivalent von 0,5 g je ml entspricht.													
a Eine IS-Einwaage würde der Masse an IS entsprechen, die in 100 µl IS-WSln-2 enthalten ist (die in dem konkreten Beispiel zu jedem Kalibrierstandard zugegeben wird).													
b Die Konzentration der Pestizid-Arbeitslösung(en) sollte ausreichend hoch sein, um eine übermäßige Verdünnung des Blindproben-Extrakts zu vermeiden, was durch einen Matrixeffekt bedingte Abweichungen zur Folge hätte.													
c Für Kalibrierstandards von 1 ml wird dringend empfohlen, die IL-IS-WSln-2 (A.1.20) durch 20-fache Verdünnung der IL-IS-WSln-1 (A.1.19) herzustellen. Zur Herstellung der Kalibrierstandards können dasselbe Volumen und dieselbe Pipette wie bei der IL-IS-Zugabe während der Extraktion verwendet werden.													
d Bei Verwendung von IL-ISs sind Matrixanpassung und Volumeneinstellungen von geringerer Bedeutung, da der IS sämtliche matrixbedingten Signalunterdrückungen/-verstärkungen kompensiert. Darüber hinaus können hierbei lösemittelbasierte Kalibrierungen verwendet werden. Wichtig ist, dass a) das Massenverhältnis von Pestizid und IS in den jeweiligen Kalibrierstandards und b) das Verhältnis zwischen der zur Probe zugegebenen IL-IS-Masse (E-Module; A.3) und der zu dem/den Kalibrierstandard(s) zugegebenen IL-IS-Masse bekannt ist und aufgezeichnet wird. Aus Gründen der Zweckmäßigkeit sollte das letztgenannte Massenverhältnis über alle Kalibrierstufen hinweg konstant gehalten werden (z. B. bei 20 zu 1, wenn Kalibrierstandards von 1 ml hergestellt werden).													
f Die Kalibrierstufe von 0,05 µg/ml entspricht 0,1 mg Pestizid/kg Probe, wenn Einwaagen von 10 g, bzw. 0,2 mg/kg Probe, wenn Einwaagen von 5 g verwendet werden. Wenn der Rohextrakt weiter verdünnt wird und wenn Einwaagen von 5 g verwendet werden (z. B. bei Hülsenfrüchten, Nüssen und Ölsaaten), entspricht die Kalibrierstufe 0,05 µg/ml der Pestizid-Konzentration von 0,4 mg/kg Probe.													

- Im Sinne einer guten Laborpraxis sollten die folgenden Empfehlungen berücksichtigt werden:
- **Empfehlung 1:** Die Verwendung von IL-IS wird dringend empfohlen. Wenn kein IL-IS verwendet wird, ist eine Wasserzugabe angezeigt, sodass zusammen mit dem Wasser in der Probe insgesamt 10 g erreicht werden.
- **Empfehlung 2:** Das Massenverhältnis des IL-IS, der zur Standardlösung und zur Analysenprobe zugegeben wird, wird bei der Berechnung des Pestizidgehalts in der Probe einbezogen.
- **Empfehlung 3:** Die Stabilität der Analyten und IL-ISs in den Standardlösungen sollte sorgfältig unter praktischen Bedingungen (Temperatur, Lichteinwirkung, Lagerzeit) untersucht werden, um ihre jeweilige höchstmögliche Lagerungszeit zu bestimmen. Wenn Analyten und ihr entsprechender IL-IS in denselben Standardlösungen während der gesamten Lagerdauer zusammen vorhanden sind, kann davon ausgegangen werden, dass diese sich in ähnlicher Weise verhalten und dass ihr Konzentrationsverhältnis weitestgehend konstant bleibt.
- **Empfehlung 4:** Die Masse des zu der (den) Standardlösung(en) zugesetzten IL-IS hängt von dem Volumen der herzustellenden Standardlösung ab und sollte so sein, dass die Konzentration des IL-IS in der Standardlösung annähernd der in den Probenextrakten entspricht. Wenn zum Beispiel das Volumen der herzustellenden Standardlösung 1 ml beträgt und der Extrakt der anfänglichen Einwaage innerhalb von etwa 20 ml verteilt ist, sollte die Masse des IL-IS, der in die Standardlösung(en) zugegeben ist, 20-mal geringer sein als die Masse, die der Analysenprobe zugesetzt wurde. Dieses Verhältnis erhöht sich von 20 auf 40, wenn der Probenextrakt im Laufe des Verfahrens um den Faktor 2 verdünnt wird (z. B. bei C3a und C3b in Tabelle 3).

A.1.23 Lösungen für den Ansatz der Standardadditionen zu Aliquoten des Extrakts

Es werden vier gleiche Mengen des Endextrakts hergestellt und drei von ihnen mit steigenden Mengen Analyt dotiert. Die zuzugebenden Mengen sollten so gewählt werden, dass sie innerhalb des linearen Bereichs bleiben. Es sollte vermieden werden, dass die zugegebenen Konzentrationen zu nahe an der geschätzten Konzentration des Analyten sind ($w_{A(\text{approx})}$, diese Information ergibt sich aus einer vorläufigen Analyse), um zu vermeiden, dass die Messvariabilität einen zu starken Einfluss auf die Steigung hat, die zur Berechnung der Analytkonzentration verwendet wird. Falls die Konzentrationen außerhalb des linearen Bereichs liegen, ist eine Verdünnung aller vier Extrakte mit dem Extraktionslösemittel angezeigt.

Es wird eine Arbeitslösung (A.1.17) des Analyten bei einer Konzentrationsstufe hergestellt, bei der 50 µl oder 100 µl der Lösung die niedrigste Menge des zuzugebenden Analyten enthält.

BEISPIEL 1 Fläschchen 1) ohne Zugabe, Fläschchen 2) $0,5 \times w_{A(\text{approx})}$, Fläschchen 3) $1 \times w_{A(\text{approx})}$ und Fläschchen 4) $1,5 \times w_{A(\text{approx})}$.

BEISPIEL 2 Fläschchen 1) ohne Zugabe, Fläschchen 2) $1 \times w_{A(\text{approx})}$, Fläschchen 3) $2 \times w_{A(\text{approx})}$ und Fläschchen 4) $3 \times w_{A(\text{approx})}$.

Das Volumen wird in allen Fläschchen durch Zugabe der entsprechenden Mengen Lösemittel eingestellt.

Ein Beispiel für ein Pipettierschema entsprechend Beispiel B ist in Tabelle A.3 dargestellt. Die Berechnung des Massenanteils des Pestizids in der Probe, w_A , wird in 7.3.3 gezeigt. Dieser Ansatz funktioniert sowohl über die Flächen der Signale (ohne Verwendung eines internen Standards) als auch über Signalfächen-Verhältnisse von Analyt zu internem Standard (nicht notwendigerweise ein IL-IS). Wenn ein interner Standard verwendet wird, muss dieser der Einwaage der Probe nicht notwendigerweise vor der Extraktion zugesetzt werden. Tabelle A.3 bezieht sich auf den Ansatz, bei dem den Aliquoten, die bei der Standardaddition verwendet werden, kein interner Standard zugesetzt wird. Die Menge des zugegebenen internen Standards sollte zu einer geeigneten Konzentration in dem Fläschchen führen. Das Verhältnis des Signals zu dem eines IS jeden Typs korrigiert Abweichungen beim Injektionsvolumen; ein IL-IS trägt außerdem dazu bei, die Linearität im Falle eines nichtlinearen Ansprechverhaltens bei der Detektion zu verbessern.

Tabelle A.3 — Beispiel für ein Pipettierschema für Standardadditionen zu Aliquoten des Extrakts

Beispiel für einen Probenextrakt, der 0,5 g Probenäquivalente je ml und einen geschätzten Rückstandsgehalt ($w_{A(\text{approx})}$) von 0,5 mg/kg = 0,25 µg/1 000 µl enthält:				
	Fläschchen 1	Fläschchen 2	Fläschchen 3	Fläschchen 4
Volumen des Probenextrakts für 0,5 g Probe	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl
Volumen der Pestizid-Arbeitslösung, die 5 µg/ml enthält (A.1.17)	—	50 µl	100 µl	150 µl
Masse des Pestizids, das in jedes Fläschchen gegeben wird ($m_{\text{add}}^{\text{aliquot}}$)	—	0,25 µg	0,5 µg	0,75 µg
Lösemittel (für Volumenangleichung)	150 µl	100 µl	50 µl	—
Endvolumen	1 150 µl	1 150 µl	1 150 µl	1 150 µl

Dieser Ansatz korrigiert die Ergebnisse nicht hinsichtlich der Wiederfindung, kompensiert aber Matrixeffekte. Auch bei Verwendung eines IL-IS wird die Wiederfindung nicht korrigiert.

A.2 Prüfeinrichtungen und Geräte

Übliche Laborgeräte und insbesondere die folgenden:

A.2.1 Probenverarbeitungsausrüstung mit hoher Leistung, zum Mahlen der Proben

Messermøhlen sind für alle Arten von feuchten Lebensmitteln gut geeignet. Bei der Kaltmahlung ist sicherzustellen, dass eine Møhle verwendet wird, bei der Verdampfen von Trockeneis oder flüssigem Stickstoff möglich ist. Für trockene Lebensmittel eignen sich auch Schneidmøhlen oder Ultra-Zentrifugalmøhlen, die z. B. mit 0,5-mm-Sieben ausgestattet sind.

A.2.2 Hochleistungs-Dispergiergerät, zur Homogenisierung oder unterstützten Extraktion

Siehe 10.1.

A.2.3 Mahlkugeln aus nichtrostendem Stahl, Durchmesser 7 mm bis 10 mm

A.2.4 Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckeln, Nennvolumen von 50 ml

A.2.5 Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckeln, Nennvolumen von 10 ml, für den Schritt der dispersiven SPE (A.4.4)

A.2.6 Automatische Pipetten, geeignet für die Handhabung von Volumina von 10 µl bis 100 µl, 200 µl bis 1 000 µl und 1 µl bis 10 ml

A.2.7 Lösemittel-Dispenser, Nennvolumen von 10 ml, für angesäuertes Methanol (A.1.7)

A.2.8 Mechanische Schüttelvorrichtung, z. B. für 50-ml-Zentrifugenröhrchen geeignet

A.2.9 Zentrifuge, geeignet für die im Verfahren verwendeten Zentrifugenröhrchen und die > 3 000 g erreichen kann

Zentrifugen, die höhere Zentrifugalkräfte erreichen und die Proben während der Zentrifugation kühlen können, sind zu bevorzugen.

ANMERKUNG Höhere relative Zentrifugalkräfte (z. B. RCF > 10 000 *g*) und Kühlung während der Zentrifugation (z. B. auf –10 °C) sind vorteilhaft, indem sie eine vermehrte Ausfällung von Matrixkomponenten verursachen. Die Zentrifugenröhrchen sind auf ihre Eignung für höhere Drehzahlen zu prüfen.

A.2.10 Spritzen für Einmalgebrauch, geeignet für die verwendeten Filter

BEISPIEL 2-ml- oder 5-ml-Einmalspritzen aus Polypropylen mit Luer-Spitze.

Hinsichtlich geeigneter Spritzenfilter siehe A.2.11.

A.2.11 Einmal-Spritzenfilter, Partikelfilter

BEISPIEL Filter mit 25 mm Durchmesser (Ø) mit einer Porengröße von 0,2 µm und aus den folgenden Membranmaterialien: hydrophilisiertes Polytetrafluorethylen (H-PTFE) oder Cellulose-Mischester oder Polyester. Filter mit 0,45 µm Porengröße der genannten Typen können vor den 0,2-µm-Filtern angebracht werden, falls letztere bei direkter Verwendung verstopfen. PTFE-Filter mit 5 µm Porengröße zur Entfernung von Pollen aus Honigextrakten.

Empfehlung: Die Filter werden hinsichtlich einer Kontamination durch die zu untersuchenden Analyten überprüft. Beispielsweise sind PTFE-Filter auf TFA zu überprüfen. In den oben genannten Polyesterfiltern wurden erhebliche Konzentrationen an Perchlorat und Chlorat nachgewiesen, ebenso in PES-, Nylon-, PTFE- und PVDF-Filtern. Für die Eignungsprüfung wird von dem Worst-Case-Szenario ausgegangen, bei dem die Filter schnell verstopfen (z. B. wenn nur 200 µl durch jedes Filter eluiert werden). Ein derartig starkes Verstopfen wurde zum Beispiel bei industriell gemahlenem Getreide, Birnen und Ananas beobachtet. Weiterführende Informationen siehe Literaturhinweis [2] und [3].

A.2.12 Filter für die Ultrafiltration, für Zentrifugen geeignete Filter mit einer Ausschlussgrenze bei einer molekularen Masse von 5 kDa oder 10 kDa

A.2.13 Autosampler-Fläschchen, geeignet für LC- und IC-Autosampler

Die Verwendung von Kunststofffläschchen wird dringend empfohlen, da mehrere der in diesem Dokument behandelten Verbindungen dazu neigen, mit Glasoberflächen zu interagieren (z. B. Phosphonat, Nicotin, Paraquat, Diquat und Glyphosat – dies ist keine vollständige Auflistung). Solche Wechselwirkungen mit Glasoberflächen treten üblicherweise vermehrt in Lösungen auf, die aus aprotischen Lösemitteln bestehen (z. B. Acetonitril). Durch Erhöhen des Wassergehalts und/oder der Azidität werden solche Wechselwirkungen üblicherweise vermindert. Prozentuale Verluste aufgrund derartiger Wechselwirkungen sind bei niedrigen Konzentrationen üblicherweise höher.

A.2.14 Messkolben mit Stopfen, für die Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen, z. B. 20-ml-, 25-ml-, 50-ml-, 100-ml-Glaskolben

Die Verwendung von Messkolben und Stopfen aus Kunststoff wird dringend empfohlen, da mehrere der in diesem Dokument behandelten Verbindungen dazu neigen, mit Glasoberflächen zu interagieren.

A.2.15 Kunststoffgefäße, für die Lagerung von Stamm- oder Arbeitslösungen und die Lagerung von Extrakten, z. B. 15-ml-Gefäße aus Polypropylen mit Schraubverschluss

A.2.16 LC-MS/MS-System, ausgestattet mit ESI-Quelle und geeigneten Säulen

Zu Einzelheiten siehe A.6.2, A.6.3 und A.6.4.

A.2.17 IC-MS/MS-System, ausgestattet mit ESI-Quelle und geeigneten Säulen

Zu Einzelheiten siehe A.6.5 und A.6.6.

A.3 Extraktionsmodule (E)

A.3.1 Allgemeines

Empfehlung 1: Proben sollten vor der Extraktion bevorzugt eingefroren aufbewahrt werden und vorzugsweise in gefrorenem oder angetautem Zustand extrahiert werden. Honig ist diesbezüglich eine Ausnahme.

Empfehlung 2 (Verwendung von IL-ISs): Durch Verwendung eines IL-IS werden Abweichungen vom Volumen des Endextrakts kompensiert. Wenn Nachweise einer Verbindung eher selten durchgeführt und der IL-IS teuer ist, ist es ratsam, den IL-IS zu dem 1-ml-Aliquot, der in das Autosampler-Fläschchen überführt wurde, zu geben. Alternativ könnte der IL-IS bei der ersten Screening-Analyse sogar vollständig ausgelassen und erst bei einer zweiten Analyse im Fall eines Nachweises zugegeben werden. Die erste Vorgehensweise ist vorzuziehen, insbesondere wenn die Retentionszeit der Verbindung eine Tendenz zur Verschiebung zeigt. Durch Vergleich der Retentionszeiten zwischen dem IS und dem vermuteten Peak, sowie der Peakform, wird die Sicherheit der Identifizierung erheblich verbessert.

Empfehlung 3 (Ausfrieren (F-O) vor der Aliquotierung): Es wird empfohlen, die Röhrchen mit den darin enthaltenen Proben vor oder während der Zentrifugation abzukühlen. Sobald der Schüttelvorgang beim Extraktionsschritt abgeschlossen ist, wird das Zentrifugenröhrchen mit der Untersuchungsprobe/Lösemittel-Mischung in einen Tiefkühlschrank gestellt (z. B. für 30 min bei etwa -80°C oder für > 120 min bei etwa -20°C) und zentrifugiert, während es noch kalt ist (5 min bei $\geq 3\,000\,g$). Eine gekühlte Zentrifugation ist gegenüber der Zentrifugation bei Umgebungstemperatur vorzuziehen, da sie dazu beiträgt, zusätzliche Koextraktivstoffe zu entfernen. Dazu werden Zentrifugenvorrichtungen verwendet, die Temperaturen von deutlich unter -5°C (z. B. -10°C) erreichen, und es wird für > 20 min bei hoher Zentrifugalgeschwindigkeit (z. B. $> 10\,000\,g$) zentrifugiert. Die Zentrifugationszeit kann auf 5 min verkürzt werden, wenn der Extrakt vorgefroren ist. Diese Vorgehensweise eignet sich für Extrakte aller Proben und wird insbesondere für Proben empfohlen, die zu Schwierigkeiten bei der Filtration führen. Wenn ein solches Ausfrieren durchgeführt wird, kann das Ausfrieren von Aliquoten des isolierten Rohextrakts (siehe Modul C1) entfallen.

Empfehlung 4 (Filtration von Partikeln): Eine Filtration vor der Messung wird empfohlen. Zu diesem Zweck wird der Extrakt mithilfe einer Spritze (A.2.10) und Spritzenfiltern mit einer Porengröße von $0,2\,\mu\text{m}$ (A.2.11) filtriert, entweder direkt in ein Autosampler-Fläschchen (A.2.13) oder in ein verschließbares Lagergefäß (A.2.15). Falls es während der Verdünnung zu Ausfällungen kommt, sollte der Extrakt nach dem Verdünnungsschritt filtriert werden.

ANMERKUNG Unter Berücksichtigung des natürlichen Wassergehalts der Probe und des zugegebenen Wassers (falls kein IL-IS verwendet wird) hat der Rohextrakt ein Gesamtvolumen von etwa 20 ml. Bei Verwendung von 10 g Probenmaterial entspricht dies 0,5 g Probe je ml Extrakt.

A.3.2 Modul E1: Extraktion von 10 g Probe mit $\geq 80\%$ Feuchtegehalt

A.3.2.1 Kurzbeschreibung

Dieses Extraktionsmodul wird für Lebensmittel mit einem Wassergehalt von $\geq 80\%$, beispielsweise Obst, Gemüse und Fruchtsäfte, verwendet. In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird. Das homogenisierte Prüfmateriale wird, wenn möglich, in gefrorenem Zustand verwendet. Nach Zugabe von 10 ml angesäuertem Methanol wird es kräftig geschüttelt und dann zentrifugiert. Ein Ausfrieren während oder nach der Extraktion sowie eine Filtration des Endextrakts werden empfohlen.

A.3.2.2 Durchführung

A.3.2.2.1 Einwaage der analytischen Prüfmenge und Anpassung des Wasservolumens

Als eine repräsentative analytische Prüfmenge werden $10,0\,\text{g} \pm 0,1\,\text{g}$ (m_{sample}) der homogenisierten Probe in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (A.2.4) eingewogen. Wird kein IL-IS verwendet, wird Wasser entsprechend den in Tabelle B.1 angegebenen Mengen in das Zentrifugenröhrchen gegeben, sodass ein Gesamt-Wassergehalt von 10 g erreicht wird. Bei Verwendung eines IL-IS erfolgt die Anpassung des Wasservolumens wahlweise.

A.3.2.2.2 Zugabe von IL-IS (empfohlen)

Ein festgelegtes kleines Volumen der IL-IS-Arbeitslösung (IL-IS-WSln-1) (A.1.19) ($V_{\text{ILIS}}^{\text{add}}$, z. B. 100 µl, die eine festgelegte Masse des IL-IS ($m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}$) enthalten) wird der analytischen Einwaage zugesetzt. Mögliche interne Standards sind in A.6.7.3 und A.6.7.4 aufgeführt.

A.3.2.2.3 Extraktion und Zentrifugation

10 ml angesäuertes Methanol (A.1.7) werden zu der analytischen Einwaage gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen und für 1 min bis 15 min von Hand oder mit einem mechanischen Schüttelgerät (A.2.8) kräftig geschüttelt. Danach wird der Extrakt für 5 min bei $\geq 3\,000\,g$ (A.2.9) zentrifugiert.

Die Empfehlung 4 und die ANMERKUNG in A.3.1 sind zu beachten.

A.3.3 Modul E2: Extraktion von 10 g Probe mit 40 % bis 80 % Feuchtegehalt, nach Zugabe von Wasser

A.3.3.1 Kurzbeschreibung

Dieses Extraktionsmodul wird für Lebensmittel mit einem Wassergehalt von $> 40\%$ und $< 80\%$, z. B. Avocado oder Ingwer, verwendet. In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird. Zum homogenisierten Prüfmateri al wird Wasser zugegeben, sodass ein Gesamt-Wassergehalt von etwa 10 g im Extraktionsröhrchen erreicht wird. Das homogenisierte Prüfmateri al wird, wenn möglich, in gefrorenem Zustand verwendet. Nach Zugabe von 10 ml angesäuertem Methanol wird es kräftig geschüttelt und dann zentrifugiert. Ein Ausfrieren während oder nach der Extraktion sowie eine Filtration des Endextrakts werden empfohlen.

A.3.3.2 Durchführung

A.3.3.2.1 Einwaage der analytischen Prüfmenge und Anpassung des Wasservolumens

Als eine repräsentative analytische Prüfmenge werden $10,0\,g \pm 0,1\,g$ (m_{sample}) der homogenisierten Probe in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (A.2.4) eingewogen.

Die entsprechende Menge Wasser (A.1.1) wird zugegeben, sodass ein Gesamt-Wassergehalt von etwa 10 g erreicht wird. Abhängig vom jeweiligen Lebensmittel (siehe Tabelle 2 und Tabelle B.1) werden 2 ml Wasser (E2(I)), 2,5 ml Wasser (E2(II)), 3 ml Wasser (E2(III)) oder 3,5 ml (E2(IV)) hinzugegeben.

A.3.3.2.2 Zugabe von IL-IS (empfohlen)

Ein festgelegtes kleines Volumen der IL-IS-Arbeitslösung (IL-IS-WSln-1) (A.1.19) ($V_{\text{ILIS}}^{\text{add}}$, z. B. 100 µl, die eine festgelegte Masse des IL-IS ($m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}$) enthalten) wird der analytischen Einwaage zugesetzt. Mögliche interne Standards sind in A.6.7.3 und A.6.7.4 aufgeführt.

A.3.3.2.3 Extraktion und Zentrifugation

10 ml angesäuertes Methanol (A.1.7) werden zu der analytischen Einwaage gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen und für 1 min bis 15 min von Hand oder mit einem mechanischen Schüttelgerät (A.2.8) kräftig geschüttelt. Danach wird der Extrakt für 5 min bei $\geq 3\,000\,g$ (A.2.9) zentrifugiert.

Die Empfehlung 4 und die ANMERKUNG in A.3.1 sind zu beachten.

A.3.4 Modul E3: Extraktion eines rehydratisierten Homogenats von Proben mit einem ursprünglichen Feuchtegehalt zwischen 15 % und 40 %

A.3.4.1 Kurzbeschreibung

Dieses Extraktionsmodul wird für Lebensmittel mit einem Wassergehalt von > 15 % und 40 %, z. B. getrocknete Früchte, die nach Wasserzugabe homogenisiert wurden, verwendet. In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird. Das nach (5.4.2) erhaltene rehydratisierte und homogenisierte Prüfmateri- al wird, wenn möglich, in gefrorenem Zustand verwendet. Nach Zugabe von 10 ml angesäuertem Methanol wird es kräftig geschüttelt und dann zentrifugiert. Ein Ausfrieren während oder nach der Extraktion sowie eine Filtration des Endextrakts werden empfohlen.

A.3.4.2 Durchführung

A.3.4.2.1 Einwaage der analytischen Prüfmenge

Als eine repräsentative analytische Prüfmenge werden Y g (z. B. $13,5 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$, siehe einzeln aufgeführte Mengen in Tabelle 1 und Tabelle B.1) des nach (5.4.2) erhaltenen rehydratisierten und homogenisierten Materials (entsprechend 5 g Probe) in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (A.2.4) eingewogen.

Empfehlung: Wenn die Lebensmittel mit einem ursprünglichen Feuchtegehalt zwischen 15 % und 40 % ohne Wasserzugabe homogenisiert wurden (z. B. unter Verwendung von flüssigem Stickstoff), wird wie folgt fortgefahren: Eine Menge von $5,0 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ (m_{sample}) des gefrorenen Pulvers wird in das Zentrifugenröhrchen eingewogen; dazu werden 8 ml Wasser zugegeben, falls die Proben einen Feuchtegehalt von ~ 35 % bis 40 % haben, bzw. 8,5 ml Wasser, falls der Feuchtegehalt der Proben ~ 25 % bis < 35 % bzw. 9 ml Wasser, falls der Feuchtegehalt der Proben ~ 15 % bis < 25 % beträgt (siehe auch Tabelle B.1).

A.3.4.2.2 Zugabe von IL-IS (empfohlen)

Ein festgelegtes kleines Volumen der IL-IS-Arbeitslösung (IL-IS-WSln-1) (A.1.19) ($V_{\text{ILIS}}^{\text{add}}$, z. B. 100 µl, die eine festgelegte Masse des IL-IS ($m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}$) enthalten) wird der analytischen Einwaage zugesetzt. Mögliche interne Standards sind in A.6.7.3 und A.6.7.4 aufgeführt.

A.3.4.2.3 Extraktion und Zentrifugation

10 ml angesäuertes Methanol (A.1.7) werden zu der analytischen Einwaage gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen und für 1 min bis 15 min von Hand oder mit einem mechanischen Schüttelgerät (A.2.8) kräftig geschüttelt. Danach wird der Extrakt für 5 min bei $\geq 3\,000 \text{ g}$ (A.2.9) zentrifugiert.

A.3.5 Modul E4: Honig

A.3.5.1 Kurzbeschreibung

Dieses Extraktionsmodul wird für Honig verwendet, der einen durchschnittlichen Feuchtegehalt von üblicherweise 17 % bis 20 % hat, siehe Tabelle B.1. Zum homogenisierten Prüfmateri- al werden 7,5 ml Wasser und 10 ml angesäuertes Methanol zugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von etwa 20 ml im Extraktionsröhrchen erreicht wird. Der verdünnte Honig wird kräftig geschüttelt und dann zentrifugiert.

A.3.5.2 Durchführung

A.3.5.2.1 Einwaage der analytischen Prüfmenge

Als eine repräsentative analytische Prüfmenge werden $5,0 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ (m_{sample}) der homogenisierten Probe in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (A.2.4) eingewogen.

7,5 ml Wasser (A.1.1) werden zugegeben, sodass ein Gesamt-Wassergehalt von etwa 10 g erreicht wird.

A.3.5.2.2 Zugabe von IL-IS (empfohlen)

Ein festgelegtes kleines Volumen der IL-IS-Arbeitslösung (IL-IS-WSln-1) (A.1.19) ($V_{\text{ILIS}}^{\text{add}}$, z. B. 100 µl, die eine festgelegte Masse des IL-IS ($m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}$) enthalten) wird der analytischen Einwaage zugesetzt. Mögliche interne Standards sind in A.6.7.3 und A.6.7.4 aufgeführt.

A.3.5.2.3 Extraktion und Zentrifugation

10 ml angesäuertes Methanol (A.1.7) werden zu der analytischen Einwaage gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen und für 1 min bis 15 min von Hand oder mit einem mechanischen Schüttelgerät (A.2.8) kräftig geschüttelt. Danach wird der Extrakt für 5 min bei $\geq 3\,000\text{ g}$ (A.2.9) zentrifugiert.

ANMERKUNG Einige Honigextrakte, insbesondere wenn sie zuvor mit moderater Zentrifugalkraft zentrifugiert wurden, können immer noch erhebliche Mengen an Pollen (üblicher Durchmesser $> 10\text{ }\mu\text{m}$) enthalten, der ein Verstopfen von engporigen Partikelfiltern (mit einer Porengröße von $< 1\text{ }\mu\text{m}$) verursachen kann. In diesem Fall wird das Passieren des Extrakts durch ein Filter mit $5\text{ }\mu\text{m}$ Porengröße erwogen, an den wahlweise in Reihe ein $0,2\text{-}\mu\text{m}$ -Filter angebracht ist. Bei hohen Zentrifugationskräften (z. B. $> 10\,000\text{ g}$) ist dieses Problem gemindert.

A.3.6 Modul E5a: Extraktion von 2 g oder 5 g Probe mit einem Feuchtegehalt von $< 15\%$ nach Zugabe von 10 ml Wasser

A.3.6.1 Kurzbeschreibung

Dieses Extraktionsmodul wird für Lebensmittel mit einem sehr niedrigen Wassergehalt von $< 15\%$, z. B. Getreide oder Hülsenfrüchte, verwendet. In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird. Zum homogenisierten Prüfmateri al wird Wasser zugegeben, sodass ein Wassergehalt von etwa 10 g in der analytischen Einwaage erreicht wird. Nach Zugabe von 10 ml angesäuertem Methanol wird es kräftig geschüttelt und dann zentrifugiert. Ein Ausfrieren während oder nach der Extraktion sowie eine Filtration des Endextrakts werden empfohlen. Für die Analyse von Pestiziden und Metaboliten, die einen Phosphonsäure-Anteil enthalten (z. B. Glyphosat, AMPA, MPPA) wird das gleichwertige Modul E5b empfohlen.

A.3.6.2 Durchführung

A.3.6.2.1 Einwaage der analytischen Prüfmenge und Anpassung des Wasservolumens

Als eine repräsentative analytische Prüfmenge werden $2,0\text{ g} \pm 0,02\text{ g}$ oder $5,0\text{ g} \pm 0,05\text{ g}$ (m_{sample}) (siehe Tabelle B.1) der homogenisierten Probe in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (A.2.4) eingewogen. Die entsprechende Menge Wasser wird zugegeben, sodass ein Gesamt-Wassergehalt von etwa 10 g erreicht wird.

A.3.6.3 Zugabe von IL-IS (empfohlen)

Ein festgelegtes kleines Volumen der IL-IS-Arbeitslösung (IL-IS-WSln-1) (A.1.19) ($V_{\text{ILIS}}^{\text{add}}$, z. B. 100 µl, die eine festgelegte Masse des IL-IS ($m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}$) enthalten) wird der analytischen Einwaage zugesetzt. Mögliche interne Standards sind in A.6.7.3 und A.6.7.4 aufgeführt.

A.3.6.3.1 Extraktion und Zentrifugation

10 ml angesäuertes Methanol (A.1.7) werden zu der analytischen Einwaage gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen und für 15 min mit einem mechanischen Schüttelgerät (A.2.8) kräftig geschüttelt. Danach wird der Extrakt für 5 min bei $> 3\,000\text{ g}$ (A.2.9) zentrifugiert.

Empfehlung 1: Im Falle von Chiasamen und Leinsamen (Flachs) führt die direkte Zugabe von Wasser zu den Proben zu einem Einweichen und zur Bildung einer gelartigen Schicht, die die Zugänglichkeit der Rückstände behindert. Um dieses Phänomen zu umgehen, wird die Reihenfolge bei der Lösemittelzugabe wie folgt geän-

dert. Zuerst werden 10 ml angesäuertes Methanol (A.1.7) zugegeben, es wird kurz geschüttelt, und dann werden 10 ml Wasser zugegeben und es wird für 15 min mit einem mechanischen Schüttelgerät (A.2.8) geschüttelt.

Empfehlung 2: Wenn kein automatischer Schüttler zur Verfügung steht, dürfen trockene Produkte für 1 min von Hand geschüttelt werden; danach erfolgt eine Einweichdauer von 15 min, bevor anschließend ein zweites Mal für 1 min kräftig von Hand geschüttelt wird.

A.3.7 Modul E5b: Extraktion von 2 g oder 5 g Probe mit einem Feuchtegehalt von < 15 % nach Zugabe von Wasser, 10 % EDTA und Ameisensäure

A.3.7.1 Kurzbeschreibung

Dieses Extraktionsmodul wird für die Analyse von Pestiziden und Metaboliten, die einen Phosphonsäure-Anteil enthalten (z. B. Glyphosat, AMPA, MPPA), aus Lebensmitteln mit sehr niedrigem Wassergehalt von < 15 %, z. B. Getreide oder Hülsenfrüchte, empfohlen. In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird. Zum homogenisierten Prüfmateriale wird Wasser zugegeben, sodass ein Wassergehalt von etwa 10 g in der analytischen Einwaage (einschließlich des durch die EDTA-Lösung zugegebenen Wassers) erreicht wird. Nach Zugabe von 10 ml angesäuertem Methanol, einer zusätzlichen Menge an Ameisensäure und 10%iger wässriger EDTA-Lösung wird es kräftig geschüttelt und dann zentrifugiert. Ein Ausfrieren während oder nach der Extraktion sowie eine Filtration des Endextrakts werden empfohlen.

A.3.7.2 Durchführung

A.3.7.2.1 Einwaage der analytischen Prüfmenge und Anpassung des Wasservolumens

Als eine repräsentative analytische Prüfmenge werden $2,0\text{ g} \pm 0,02\text{ g}$ oder $5,0\text{ g} \pm 0,05\text{ g}$ (m_{sample}) (siehe Tabelle B.1) der homogenisierten Probe in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (A.2.4) eingewogen. Die entsprechende Menge Wasser wird zugegeben, sodass ein Wassergehalt von etwa 10 g (einschließlich des durch die EDTA-Lösung zugegebenen Wassers) erreicht wird.

A.3.7.2.2 Zugabe von IL-IS (empfohlen)

Ein festgelegtes kleines Volumen der IL-IS-Arbeitslösung (IL-IS-WSln-1) (A.1.19) ($V_{\text{IL-IS}}^{\text{add}}$, z. B. 100 µl, die eine festgelegte Masse des IL-IS ($m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}$) enthalten) wird der analytischen Einwaage zugesetzt. Mögliche interne Standards sind in A.6.7.3 und A.6.7.4 aufgeführt.

A.3.7.2.3 Extraktion, Zentrifugation und Filtration

10 ml angesäuertes Methanol (A.1.7) und eine zusätzliche Menge von 100 µl konzentrierter Ameisensäure (A.1.5) werden zu der analytischen Einwaage gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen und zur Verteilung der Säure für wenige Sekunden geschüttelt, um Proteine gerinnen (koagulieren) zu lassen. Ein ml der 10%igen wässrigen EDTA-Lösung (A.1.11) wird hinzugegeben und das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen, bevor es für 15 min mit einem mechanischen Schüttelgerät (A.2.8) kräftig geschüttelt wird. Der Extrakt wird für 5 min bei $\geq 3\,000\text{ g}$ (A.2.9) zentrifugiert.

Die Empfehlungen 1 und 2 in A.3.6.3.1 sind zu beachten.

A.3.8 Modul E6a: Extraktion von 10 g Probe tierischen Ursprungs mit einem Feuchtegehalt von > 30 %, nach Zugabe von Wasser

A.3.8.1 Kurzbeschreibung

Dieses Extraktionsmodul wird für Lebensmittel tierischen Ursprungs mit einem Feuchtegehalt von > 30 %, z. B. Milch, Muskel (Fleisch) oder Leber, verwendet. In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird. Zum homogenisierten Prüfmateriale wird Wasser zugegeben, sodass ein Wassergehalt von etwa 10 g in der analytischen Einwaage erreicht wird. Nach Zugabe von 10 ml angesäuertem Methanol wird es kräftig geschüttelt und dann zentrifugiert. Für die Analyse von Lebensmitteln mit

einer erheblichen Menge an nicht trennbarem Fett (z. B. Hackfleisch) sollte die Probe während des Extraktionsschritts erwärmt werden. Für die Analyse von Pestiziden und Metaboliten, die einen Phosphonsäure-Anteil enthalten (z. B. Glyphosat, AMPA, MPPA) wird das gleichwertige Modul E6b empfohlen.

A.3.8.2 Durchführung

A.3.8.2.1 Einwaage der analytischen Prüfmenge und Anpassung des Wasservolumens

Als eine repräsentative analytische Prüfmenge werden $10,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ (m_{sample}) (siehe Tabelle B.1) der homogenisierten Probe in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (A.2.4) eingewogen.

Die entsprechende Menge Wasser wird zugegeben, sodass ein Gesamt-Wassergehalt von etwa 10 g erreicht wird. Abhängig vom jeweiligen Lebensmittel (siehe Tabelle 2 und Tabelle B.1) werden 1 ml (E6a (I)), 1,5 ml (E6a (II)), 2 ml (E6a (III)), 2,5 ml (E6a (IV)) oder 3 ml Wasser (E6a (V)) hinzugegeben. Wenn ein IL-IS verwendet wird, darf auf die Wasserzugabe zur Volumenkorrektur verzichtet werden, wenn es sich um Lebensmittel mit $> 80 \%$ Wassergehalt handelt (z. B. Vollmilch, Magermilch), siehe auch Tabelle B.1.

A.3.8.2.2 Zugabe von IL-IS (empfohlen)

Ein festgelegtes kleines Volumen der IL-IS-Arbeitslösung (IL-IS-WSln-1) (A.1.19) ($V_{\text{ILIS}}^{\text{add}}$, z. B. 100 μl , die eine festgelegte Masse des IL-IS ($m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}$) enthalten) wird der analytischen Einwaage zugesetzt. Mögliche interne Standards sind in A.6.7.3 und A.6.7.4 aufgeführt.

A.3.8.2.3 Extraktion und Zentrifugation

10 ml angesäuertes Methanol (A.1.7) werden zu der analytischen Einwaage gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen und für 1 min bis 15 min von Hand oder mit einem mechanischen Schüttelgerät (A.2.8) kräftig geschüttelt. Danach wird der Extrakt für 5 min bei $\geq 3\,000 \text{ g}$ (A.2.9) zentrifugiert.

Empfehlung 1: Für die Analyse von Lebensmitteln mit einer erheblichen Menge an nicht trennbarem Fett (z. B. Hackfleisch, Salami, Würstchen) wird das Zentrifugenröhrchen, nach der Zugabe des angesäuerten Methanols, für 3 min bis 4 min in ein auf 80°C erwärmtes Wasserbad gestellt, bis das Fett vollständig geschmolzen ist. Es wird dann, während es noch heiß ist, für 1 min von Hand oder für 2 min bis 15 min mit einem automatischen Schüttler kräftig geschüttelt, um die Verteilung der polaren Pestizide in die wässrige Phase sicherzustellen.

Empfehlung 2: Die Probe sollte nicht länger erhitzt werden als notwendig.

A.3.9 Modul E6b: Extraktion von 10 g Probe tierischen Ursprungs mit einem Feuchtegehalt von $> 30 \%$, nach Zugabe von Wasser, 10 % EDTA und Ameisensäure

A.3.9.1 Kurzbeschreibung

Dieses Extraktionsmodul wird für die Analyse von Pestiziden und Metaboliten, die einen Phosphonsäure-Anteil enthalten (z. B. Glyphosat, AMPA, MPPA), in Lebensmitteln tierischen Ursprungs mit einem Wassergehalt von $> 30 \%$, z. B. Milch, Muskel (Fleisch) oder Leber, empfohlen. In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird. Zum homogenisierten Prüfmaterial wird Wasser zugegeben, sodass ein Wassergehalt von etwa 10 g in der analytischen Einwaage (einschließlich des durch die EDTA-Lösung zugegebenen Wassers) erreicht wird. Nach Zugabe von 10 ml angesäuertem Methanol, einer zusätzlichen Menge an Ameisensäure und 10%iger wässriger EDTA-Lösung wird es kräftig geschüttelt und dann zentrifugiert. Für die Analyse von Lebensmitteln mit einer erheblichen Menge an nicht trennbarem Fett (z. B. Hackfleisch) sollte die Probe während des Extraktionsschritts erwärmt werden. Ein Ausfrieren während oder nach der Extraktion sowie eine Filtration des Endextrakts werden empfohlen.

A.3.9.2 Durchführung

A.3.9.2.1 Einwaage der analytischen Prüfmenge und Anpassung des Wasservolumens

Als eine repräsentative analytische Prüfmenge werden $10,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ (m_{sample}) der homogenisierten Probe in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (A.2.4) eingewogen.

Die entsprechende Menge Wasser wird zugegeben, sodass ein Wassergehalt von etwa 10 g (einschließlich des durch die EDTA-Lösung zugegebenen Wassers) erreicht wird. Abhängig vom jeweiligen Lebensmittel (siehe Tabelle B.1) werden 0,5 ml (E6b (II)), 1 ml (E6b (III)), 1,5 ml (E6a (IV)) oder 2 ml Wasser (E6b (V)) hinzugegeben. Wenn ein IL-IS verwendet wird, darf auf die Wasserzugabe zur Volumenkorrektur verzichtet werden, wenn es sich um Lebensmittel mit $> 80 \%$ Wassergehalt handelt (z. B. Vollmilch, Magermilch), siehe auch Tabelle B.1.

A.3.9.2.2 Zugabe von IL-IS (empfohlen)

Ein festgelegtes kleines Volumen der IL-IS-Arbeitslösung (IL-IS-WSln-1) (A.1.19) ($V_{\text{ILIS}}^{\text{add}}$, z. B. 100 μl , die eine festgelegte Masse des IL-IS ($m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}$) enthalten) wird der analytischen Einwaage zugesetzt. Mögliche interne Standards sind in A.6.7.3 und A.6.7.4 aufgeführt.

A.3.9.2.3 Extraktion und Zentrifugation

10 ml angesäuertes Methanol (A.1.7) und eine zusätzliche Menge von 100 μl konzentrierter Ameisensäure (A.1.5) werden zu der analytischen Einwaage gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen und zur Verteilung der Säure für wenige Sekunden geschüttelt, um Proteine gerinnen (koagulieren) zu lassen. Ein ml der 10%igen wässrigen EDTA-Lösung (A.1.11) wird hinzugegeben und das Zentrifugenröhrchen wird sorgfältig verschlossen, bevor es für 1 min bis 15 min von Hand oder mit einem mechanischen Schüttelgerät (A.2.8) kräftig geschüttelt wird. Der Extrakt wird für 5 min bei $\geq 3\,000 \text{ g}$ (A.2.9) zentrifugiert.

Die Empfehlungen 1 und 2 in A.3.8.2.3 sind zu beachten.

A.3.10 Modul E7: Extraktion von 5 g fettiger Probe, unterstützt durch mechanische Hilfsmittel

A.3.10.1 Kurzbeschreibung

Dieses Extraktionsmodul wird für Lebensmittel mit einem hohen Fettgehalt und einem niedrigen Wassergehalt, z. B. Fett pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, verwendet. In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird.

A.3.10.2 Durchführung

A.3.10.2.1 Einwaage der analytischen Prüfmenge

Als eine repräsentative analytische Prüfmenge werden $5,0 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ (m_{sample}) der homogenisierten Probe in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (A.2.4) eingewogen.

Es wird kein Wasser zugegeben.

A.3.10.2.2 Zugabe von IL-IS (empfohlen)

Ein festgelegtes kleines Volumen der IL-IS-Arbeitslösung (IL-IS-WSln-1) (A.1.19) ($V_{\text{ILIS}}^{\text{add}}$, z. B. 100 μl , die eine festgelegte Masse des IL-IS ($m_{\text{sample}}^{\text{IL-IS}}$) enthalten) wird der analytischen Einwaage zugesetzt. Mögliche interne Standards sind in A.6.7.3 und A.6.7.4 aufgeführt.

A.3.10.2.3 Extraktion, Zentrifugation und Filtration

In das Gefäß werden 10 ml Methanol (A.1.7), das 30 % Wasser (A.1.1) und (1) % Ameisensäure (A.1.5) enthält, sowie mechanische Hilfsmittel (z. B. 3 bis 5 Mahlkugeln aus nichtrostendem Stahl mit einem Durchmesser von 7 mm bis 10 mm) gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wird verschlossen und für 5 min bis 20 min mit einem mechanischen Schüttelgerät (A.2.8) kräftig geschüttelt. Der Extrakt wird in den Tiefkühlschrank gestellt und/oder mit einer Kühlzentrifuge für 5 min bei $> 3\,000\text{ g}$ (A.2.9) zentrifugiert.

A.4 Reinigungsmodule (C)

A.4.1 Allgemeines

Empfehlung 1: Im Anschluss an die Zentrifugation sollte der dekantierte Extrakt durch ein Filter passiert werden, wenn er direkt einem Messmodul (M) unterzogen wird. Zu diesem Zweck wird der Extrakt mithilfe einer Spritze (A.2.10) und Spritzenfiltern mit einer Porengröße von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (A.2.11) filtriert, entweder direkt in ein Autosampler-Fläschchen (A.2.13) oder in ein verschließbares Lagergefäß (A.2.15).

A.4.2 Modul C0: Keine Reinigung

A.4.2.1 Kurzbeschreibung

In Abhängigkeit von der Matrix, dem Messmodul und dem Leistungsvermögen der verfügbaren Messgeräte werden die Extrakte aus E1 bis E7 oder aus C1 bis C5 direkt mithilfe von LC- oder IC-Methoden gemessen. Wenn die Umstände eine Verdünnung ermöglichen, ist diese wie unter den Verdünnungsmodulen (DL) beschrieben durchzuführen.

ANMERKUNG Dieses „Modul“ dient hauptsächlich der systematischen Dokumentation der Verfahren durch eine Abfolge von Modulen, wie beispielhaft in Tabelle B.1 gezeigt.

A.4.3 Modul C1: Ausfrieren zur Ausfällung von schwach löslichen Koextraktivstoffen

A.4.3.1 Kurzbeschreibung

Dieses Modul wird für die Entfernung von schwach löslichen Koextraktivstoffen der Matrix (z. B. Fett, Saccharide) aus dem Extrakt verwendet. Der Reinigungseffekt beruht auf der verminderten Löslichkeit der meisten Substanzen bei niedrigen Temperaturen. C1 kann entweder nach einem der Extraktionsmodule (E1 bis E7) oder vor oder nach einem der anderen Reinigungsschritte durchgeführt werden. Wenn es vor der Messung durchgeführt wird, ist eine Filtration des Extrakts angezeigt. In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird.

A.4.3.2 Durchführung

Der nach einem der Extraktionsschritte (E1 bis E7) oder einem der anderen Reinigungsmodule (C0, C2, C3a, C3b und C4) erhaltene Extrakt wird in einen Tiefkühlschrank gestellt (z. B. für 30 min bei etwa $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder für $> 120\text{ min}$ bei etwa $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) und kurz zentrifugiert, während er noch kalt ist (z. B. 3 min bei $\geq 3\,000\text{ g}$). Das Dekantieren des Extrakts ist durchzuführen, während der Extrakt noch kalt ist, um zu vermeiden, dass sich die Matrixkomponenten wieder auflösen.

Empfehlung 1: Niedrige Temperaturen senken die Löslichkeit störender Matrixkomponenten, was zu verstärkter Ausfällung führt; dies erleichtert den Filtrationsschritt erheblich. Auch die nachfolgende LC- oder IC-MS/MS-Analyse wird erleichtert, indem Matrixeffekte reduziert werden und die Lebensdauer der Säulen erhöht wird. Um ein Wiederauflösen der Matrixkomponenten zu verhindern, wird empfohlen, einen Aliquot des kalten Überstands zur späteren Verwendung in ein verschließbares Gefäß zu überführen oder sofort mit den nächsten Schritten fortzufahren, während der Extrakt noch kalt ist.

Empfehlung 2: Nach Ausfrieren des Aliquots wird eine Kühltrentrifugation statt einer Zentrifugation bei Umgebungstemperatur empfohlen: Der Extrakt wird für 5 min bei hoher Zentrifugalgeschwindigkeit (z. B. $> 10\,000\,g$) und niedriger Temperatur (z. B. unter $-5\,^{\circ}\text{C}$) zentrifugiert.

Empfehlung 3: Dieses Modul (C1) ist für Extrakte aller Proben geeignet, und wird besonders empfohlen, wenn ein Ausfrieren (en: freeze-out, F-O) des Extraktionsgefäßes nicht durchgeführt wurde (siehe A.3.1).

Empfehlung 4: Der Zentrifugationsschritt kann durch eine schnelle Filtration oder ein Dekantieren des gefrorenen Extrakts ersetzt werden.

Empfehlung 5: Durch die Kombination von Ausfrieren (C1) mit C3a oder C3b, bei denen Extrakte mit Acetonitril verdünnt werden, wird die Ausfällung polarer Matrixkomponenten, z. B. von Zuckern, unterstützt.

A.4.4 Modul C2: Dispersive SPE mit C18-Sorbent

A.4.4.1 Kurzbeschreibung

Dieses Modul wird für die Entfernung von Lipiden aus Extrakten von Lebensmitteln, die hohe Lipidgehalte aufweisen, z. B. Avocado, Oliven, Kokosnuss und tierisches Fett, verwendet. In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird. Der nach E1 bis E7 erhaltene Rohextrakt wird durch dispersive Festphasenextraktion (dSPE) mit C18-Sorbent gereinigt.

A.4.4.2 Durchführung

Ein festgelegter Aliquot, z. B. 4 ml, der Methanol-Phase aus den nach E1 bis E7 erhaltenen Extrakten wird in ein Zentrifugenröhrchen (A.2.5) überführt, das bereits die entsprechende Menge an C18-Sorbent (A.1.8), z. B. 200 mg (50 mg/ml Extrakt) enthält. Das Röhrchen wird dicht verschlossen, für mindestens 30 s kräftig geschüttelt, dann in eine Zentrifuge (A.2.9) eingebracht und für 5 min bei $\geq 3\,000\,g$ zentrifugiert.

A.4.5 Modul C3a: Ausfällung mit Acetonitril

A.4.5.1 Kurzbeschreibung

Dieses Modul wird für die Ausfällung von Proteinen in Lebensmitteln, die hohe Mengen an Proteinen und geringe Mengen an Lipiden enthalten, verwendet (z. B. Hülsenfrüchte, weiße Getreidemehle, Magermilchpulver, Magermilch, magerer Fisch). In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird. Üblicherweise wird dieses Reinigungsmodul auf den nach E5a, E5b bis E6a, E6b erhaltenen Rohextrakt angewendet.

A.4.5.2 Durchführung

Ein festgelegter Aliquot V_A (x ml, z. B. 2 ml), des Überstands nach E5a, E5b bis E6a, E6b wird in ein Zentrifugenröhrchen (A.2.5) überführt, das bereits das gleiche Volumen V_B Acetonitril (A.1.4) (x ml) enthält. Das Röhrchen wird dicht verschlossen, für mindestens 30 s kräftig geschüttelt, dann in eine Zentrifuge (A.2.9) eingebracht und für 5 min bei $\geq 3\,000\,g$ zentrifugiert.

Empfehlung 1: Der Unterschied zwischen Modul C3a und C3b besteht in der Zugabe von C18-Sorbent. Lebensmittel, für die Modul C3a empfohlen wird, dürfen auch durch Modul C3b, ohne nachteilige Auswirkung auf die Analyten, gereinigt werden.

Empfehlung 2: Durch dieses Reinigungsmodul wird der Extrakt zweifach verdünnt. Dies sollte bei der Herstellung von Kalibrierstandards beachtet werden.

A.4.6 Modul C3b: Ausfällung mit Acetonitril kombiniert mit C18-Sorbent

A.4.6.1 Kurzbeschreibung

Dieses Modul wird für die Ausfällung von Proteinen in Lebensmitteln, die hohe Mengen an Proteinen enthalten, und für die Entfernung von Lipiden verwendet (z. B. Vollkorngetreide, Ölsaaten, Nüsse, Säuglingsnahrung, Vollmilch, Niere, Eier, Muskel, Leber und Niere). In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird. Üblicherweise wird dieses Reinigungsmodul auf den nach E5a, E5b bis E6a, E6b erhaltenen Rohextrakt angewendet.

A.4.6.2 Durchführung

Ein festgelegter Aliquot V_A (x ml, z. B. 2 ml), des Überstands nach E5a, E5b bis E6a, E6b wird in ein Zentrifugenröhrchen (A.2.5) überführt, das bereits C18-Sorbent (50 mg je ml Probenextrakt) enthält. Anschließend wird das gleiche Volumen (x ml) Acetonitril (A.1.5) in das Röhrchen gegeben, das dann dicht verschlossen, für mindestens 30 s kräftig geschüttelt, anschließend in eine Zentrifuge (A.2.9) eingebracht und für 5 min bei $\geq 3\,000\,g$ zentrifugiert wird.

Siehe auch die Empfehlungen 1 und 2 in A.4.5.2.

A.4.7 Modul C4: Ultrafiltration mit Filtern mit einer Ausschlussgrenze bei 5 kDa oder 10 kDa (wahlfrei)

A.4.7.1 Kurzbeschreibung

Dieses Modul umfasst eine durch Zentrifugation unterstützte Ultrafiltration durch Filter mit einer Ausschlussgrenze bei einer molekularen Masse von 5 kDa oder 10 kDa. Das Hauptziel bei diesem Schritt besteht darin, gelöste oder kolloidal dispergierte Proteine, Peptide und Polysaccharide zu entfernen, die zuvor nicht durch Ausfällung und Zentrifugation, und auch nicht durch Standardfiltration mit 0,2- μ m-Filter, entfernt wurden (siehe A.2.11). Die Entfernung solcher Partikel ist üblicherweise von Vorteil für die Lebensdauer der Chromatographiesäulen. Dieser Reinigungsschritt kann wahlweise und mit einem beliebigen aus den E- oder C-Modulen erhaltenen Extrakt durchgeführt werden, er wird aber für Lebensmittel empfohlen, die durch E5a, E5b bis E6a, E6b extrahiert werden (z. B. für Hülsenfrüchte, Ölsaaten, Nüsse, Vollkorngetreide und -mehle, Milch, Leber). In Tabelle B.1 ist angegeben, für welche Lebensmittel dieses Modul vorzugsweise verwendet wird.

A.4.7.2 Durchführung

Ein Aliquot, z. B. 3 ml, der Methanol-Phase aus den nach E1 bis E7 erhaltenen Extrakten oder aus den nach C0 bis C3b erhaltenen gereinigten Extrakten wird in eine Ultrafiltrationseinheit (A.2.12) für die Zentrifugation überführt und in einer Zentrifuge (A.2.9) bei $\geq 3\,000\,g$ für 10 min zentrifugiert.

Empfehlung: Wenn die Zentrifugation länger dauert, wird mit einem zweiten 10-minütigen Zentrifugations-schritt fortgefahren.

A.5 Verdünnungsmodule (DL)

A.5.1 Kurzbeschreibung

In Abhängigkeit von der Matrix, dem Messmodul und dem Leistungsvermögen der verfügbaren Messgeräte können die nach den E- oder C-Modulen erhaltenen Extrakte (Einzelheiten siehe unten) vor der LC- oder IC-basierten Messung mit einem wassermischbaren Lösemittel oder Lösemittelgemisch verdünnt werden. In besonderen Fällen sind auch Verdünnungen mit geeigneten Blindproben-Extrakten möglich, z. B. wenn der Zweck der Verdünnung darin besteht, die Analytkonzentration im Probenextrakt zu reduzieren, sodass sie innerhalb des Kalibrierbereichs liegt. Das Hauptziel bei diesem Schritt ist es, die Matrixkonzentration im Extrakt zu verringern, weil dies dazu beiträgt, die chromatographische Trennung der Analyten von hoch konzentrierten Verbindungen in der Matrix zu verbessern und allgemein Matrixeffekte bei der Messung zu reduzieren.

Tabelle 4 enthält Beispiele, bei denen dieses Modul bevorzugt angewendet wird und wie die Codierung vorgenommen wird. Die Codierung der Verdünnungsmodule besteht aus den Buchstaben DL und der Zahl, die den Verdünnungsfaktor repräsentiert.

A.5.2 Durchführung

Ein Aliquot (V_A) der nach den Modulen E1 bis E4 und E7 erhaltenen Extrakte oder aus den nach den Modulen C1 bis C5 vorliegenden gereinigten Extrakten wird mit einem festgelegten Volumen eines wassermischbaren Lösemittels (V_B) auf ein resultierendes Gesamtvolumen ($V_A + V_B$) verdünnt. Die Verdünnung kann in einem Autosampler-Fläschchen (A.2.13) oder in einem geeigneten Lagergefäß (A.2.15) vorgenommen werden. Wenn die Verdünnung zu einer sichtbaren Ausfällung führt, ist eine Filtration des Extrakts durch ein 0,2- μ m-Filter (A.2.11) angezeigt. Die Verdünnung kann auch beim LC- oder IC-Injektionsvorgang erfolgen.

Die Extrakte nach E5a, E5b, E6a und E6b müssen durch Anwendung der Module C2 oder C3a oder C3b gereinigt werden, bevor sie verdünnt werden.

Die Reinigungsmodule C3a und C3b beinhalten auch einen Verdünnungsschritt, der jedoch jeweils als ein Reinigungsschritt aufzufassen ist.

Änderungen in der Zusammensetzung des Lösemittels (infolge einer Verdünnung des Extrakts) können zu einer Ausfällung von Matrixkomponenten (Reinigungseffekt) und möglicherweise zu Analytverlusten führen. Durch die Kombination der Verdünnung mit einem Ausfrierschritt (C1) wird dieser Effekt verstärkt. Wenn der organische Anteil erhöht wird (z. B. wenn mit angesäuertem Methanol (A.1.7) verdünnt wird), kann es zu einer Ausfällung von polaren Komponenten der Matrix (z. B. Zucker) kommen. Wenn dagegen der wässrige Anteil erhöht wird (z. B. wenn mit Wasser verdünnt wird), können lipophile Matrixkomponenten und Analyte ausfallen. Im Falle einer sichtbaren Ausfällung, und wenn keine weiteren Reinigungsschritte (C1 bis C5) mehr vor der Messung durchzuführen sind, wird empfohlen, die Extrakte mithilfe einer Spritze (A.2.10) und Spritzenfiltern mit einer Porengröße von 0,2 μ m (A.2.11) zu filtrieren, entweder direkt in ein Autosampler-Fläschchen (A.2.13) oder in ein verschließbares Lagergefäß (A.2.15). Bei Verdünnungen, die im Injektorsystem erfolgen, sind Ausfällungen oft nur vorübergehend, da sich die Ausfällungen üblicherweise wieder auflösen, da sich die Zusammensetzung der mobilen Phase während des chromatographischen Durchlaufs verändert.

Beim Verdünnen ist sicherzustellen, dass die Empfindlichkeit des Messgeräts weiterhin für eine adäquate Messung niedrigerer Konzentrationen des Zielanalyten und IL-IS ausreichend ist. In bestimmten Fällen muss die Menge an IL-IS, die zu den Proben zugegeben wird, angepasst werden, um eine geeignete Messung sicherzustellen. Außerdem ist zu beachten, dass die verminderte Matrixbeladung auch Matrixeffekte und das chromatographische Verhalten des Analyten (z. B. Peak tailing) beeinflussen kann.

A.5.3 Berechnung

Siehe 7.3.

A.6 Messmodule (M)

A.6.1 Allgemeines

Die Messung kann mit verschiedenen Geräten, Geräteparametern und Trennsäulen durchgeführt werden. Einige Geräteparameter und Trennsäulen sind in diesem Modul aufgeführt. Die folgenden Betriebsbedingungen für die LC-MS/MS und IC-MS/MS haben nachweislich zu zufriedenstellenden Ergebnissen geführt, es handelt sich aber lediglich um Beispiele für die experimentellen Bedingungen beim Betrieb der genannten Geräte. Variationen dieser Bedingungen stellen keine Abweichungen von dem Verfahren dar.

Typische Chromatogramme mit den üblicherweise erhaltenen Retentionszeiten und Peakformen der Analyten sowie einige Hinweise, wie bestimmte Trennsäulen zu konditionieren sind, finden sich in der aktuell gültigen Version des QuPPE-Verfahrens [2], [3].