



**Empfehlung der AG Pestizide
zur laborinternen Methodvalidierung von Pestizidmethoden
mit Hilfe von Zusatzversuchen,
hier der QuEChERS-Methode
(DIN EN 15662 / § 64 LFGB L 00.00-115 bzw. L 00.00-115/1);
Modul 2: trockene Lebensmittel**

Zielstellung der hier beschriebenen Vorgehensweisen

Auf Modul 1 (veröffentlicht in *Lebensmittelchemie* 69, 13-15 (2015)) wird verwiesen.

Gegenüber den durch Modul 1 erfassten Matrixgruppen sind bei analytischen Bestimmungen an getrockneten Kräutern oder Tee die koextrahierten Matrixbestandteile die häufigste Ursache für unzureichende bzw. zu hohe Wiederfindungsraten von Analyten. Geeignete Maßnahmen sind zu treffen, um Matrixeffekte zu erkennen bzw. auszugleichen (z. B. Isotopenstandard, Matrixkalibrierung).

Wenn keine Proben mit gewachsenen Rückständen bekannter Höhe bzw. keine geeigneten Referenzmaterialien zur Methodvalidierung verwendet werden, sollte die Durchführungsvariante A (Zugabe von Standards, Wasser und Acetonitril, sowie 15 minütige Extraktion bei Raumtemperatur) stets zuerst angewendet werden. Erst wenn dabei eine zu geringe Wiederfindung beobachtet wird, sollten die weiteren Durchführungsvarianten zur Ursachenanalyse eingesetzt werden.

Es sollten stets die „Worst-Case“ Bedingungen der Routineanalytik berücksichtigt werden (z. B. Temperaturen, Standzeiten vor der Extraktion).

Durchführungsvariante A (stets zuerst anzuwenden)

Auf eine genau eingewogene homogene Matrix werden bei Zimmertemperatur Standardlösungen dotiert wobei eine möglichst große Oberfläche des Materials benetzt werden sollte. Die weiteren Arbeitsschritte werden entsprechend der jeweiligen Vorschrift durchgeführt.

Für die Methoden nach § 64 LFGB L 00.00-115 bzw. L 00.00-115/1

Tee/getrocknete Kräuter/Kräutertees/Früchtetees/Gewürze:

1. Die zu dotierende Matrix ist zerkleinert (Teilchengröße möglichst < 1000 µm).
2. Die zu verwendende Einwaage beträgt mindestens **2 g**.
3. Die Dotierung der Analyten erfolgt mit **50 bis 200 µl** Standardlösung. Solange die Löslichkeit der Analyten ausreicht (≥ 10 mg/ml), sind für die Herstellung der Standardlösung wasserlösliche organische Lösungsmittel (z. B. Acetonitril, Aceton oder Methanol) zu verwenden.

4. Nach der Zugabe von 10 ml Wasser (zu diesem Zeitpunkt keine pH-Justierung) und kurzem Anschütteln erfolgt spätestens nach 10 min¹ die Zugabe von 10 ml Acetonitril.
5. Die Extraktion erfolgt entsprechend den Vorgaben der DIN EN 15662 / § 64 LFGB L 00.00-115 bzw. L 00.00-115/1 durch Schütteln **für 15 min**

Alle anschließenden Schritte sind entsprechend DIN EN 15662 / § 64 LFGB L 00.00-115 bzw. L 00.00-115/1 durchzuführen.

Getreide, Hülsenfrüchte

1. Die zu dotierende Matrix ist zerkleinert (z.B. Kryogen-, Fallzahlmühle; Teilchengröße möglichst < 500 µm).
2. Die zu verwendende Einwaage beträgt **5 g**.
3. Die Dotierung der Analyten erfolgt mit **50 bis 200 µl** Standardlösung. Solange die Löslichkeit der Analyten ausreicht (≥ 10 mg/ml), sind für die Herstellung der Standardlösung wasserlösliche organische Lösungsmittel (z. B. Acetonitril, Aceton oder Methanol) zu verwenden.
4. Nach der Zugabe von 10 ml Wasser (zu diesem Zeitpunkt keine pH-Justierung) und kurzem Anschütteln erfolgt spätestens nach 10 min¹ die Zugabe von 10 ml Acetonitril.
5. Die Extraktion erfolgt entsprechend den Vorgaben der DIN EN 15662/ § 64 LFGB L 00.00-115 bzw. L 00.00-115/1 durch Schütteln **für 15 min** oder mit Hilfe eines Dispergierwerkzeuges (z. B. Ultra-Turrax) über die gleiche Zeit.

Alle anschließenden Schritte sind entsprechend DIN EN 15662 / § 64 LFGB L 00.00-115 bzw. L 00.00-115/1 durchzuführen.

Trockenfrüchte:

Die Dotierung erfolgt zum Homogenisat, welches entsprechend der Methode § 64 LFGB L 00.00-115 Abschnitt 6.3 bzw. der Methode § 64 LFGB L 00.00-115/1 Baustein E 4 hergestellt wird²:

1. Dazu werden 500 g Probe mit 850 g kaltem Wasser versetzt und zerkleinert (durch Trockeneiszugabe wird die Probe ggf. weiter gekühlt).
2. Die zu verwendende Einwaage beträgt 13,5 g (entsprechend 5 g Probe). Es erfolgt zu diesem Zeitpunkt keine Pufferung der Probe. Falls die laborübliche Vorgehensweise eine Aufarbeitung bei Raumtemperatur beinhaltet, wird die Probe vor der Dotierung auf Umgebungstemperatur (18 bis 25 °C) gebracht.

Nun erfolgt die weitere Vorgehensweise gemäß Modul 1 für Obst und Gemüse. Die Zeitspanne zwischen Dotierung und Extraktion sollte so gewählt werden, dass sie die Routinebedingungen (auch die ungünstigen langen Fälle) widerspiegelt.

Durchführungsvariante B (entfällt bei getrockneten Produkten)

¹ Werden routinemäßig längere Einweichzeiten angewendet, so sollte die Zeitspanne dieses Experimentes entsprechend angepasst werden

² Wurde das Trockenobst ohne Wasserzusatz vermahlen oder liegt es gefriergetrocknet vor, so ist es wie Getreide und Hülsenfrüchte zu behandeln.

Durchführungsvariante C – Verbesserte Extraktionseffizienz

Zum Nachweis einer unzureichenden Extraktionseffizienz nach dem vorgegebenen Schütteln für 15 min erfolgen die Zusatzversuche mit nur einer Änderung nach Durchführungsvariante A. Die Änderung bezieht sich auf Schritt 5. Zur Erhöhung der Extraktionseffizienz sind die Proben 30 bis 60 min (optimale Zeit ermitteln) mit einem mechanischen Schüttler oder mit einem Dispergierwerkzeug (z.B. Ultra-Turrax) zu extrahieren.

Es ist stets zu bedenken, dass Extraktionszeiten die für dotierte Stoffe als ausreichend befunden wurden, nicht unbedingt auch für gewachsene Rückständen ausreichend sind, da hier nicht nur Wechselwirkungen der Stoffe mit der Matrixoberfläche eine Rolle spielen, sondern z. B. auch deren Zugänglichkeit für das Extraktionsmittel. So zeigen Stoffe die in Matrixbestandteile (z. B. Stärke, Wachs) eingeschlossen eine verzögerte Extraktion. In diesen Fällen kann eine Erhöhung der Extraktionseffizienz von gewachsenen Rückständen auch durch bessere Zerkleinerung der Probe (z.B. Teilchengröße möglichst < 200 µm) erreicht werden. Wird aufgrund von Experimenten mit gewachsenen Rückständen eine längere Extraktionszeit als notwendig erachtet, so sollte überprüft werden ob sich diese verlängerte Extraktionszeit negativ auf andere Zielanalyten auswirkt.

Durchführungsvariante D - pH-Einstellung

Bei Vermutung einer unzureichenden pH-Stabilität oder von pH-abhängigem Extraktions- oder Verteilungsverhalten der Analyten sollten im ersten Schritt alle hierzu verfügbaren Literaturinformationen überprüft werden. Alternativ kann die AG Pestizide diesbezüglich kontaktiert werden. Anschließend sind Zusatzversuche mit nur einer Änderung nach Durchführungsvariante A durchzuführen. Die Änderung bezieht sich auf Schritt 4. Zur Sicherung der Analytstabilität ist bei der Wasserzugabe der pH der Probe mit geeigneten wässrigen Pufferlösungen bzw. einer definierten Menge Säure bzw. Lauge einzustellen.

So empfiehlt sich bei Produkten, die den pH-Wert so beeinflussen können dass er sich negativ auf die Stabilität oder Extrahierbarkeit der Zielanalyten auswirkt (z. B. Hibiskus), die pH-Einstellung bei der Wasserzugabe immer vorzunehmen. Um das Verteilungsverhalten oder die Stabilität bestimmter Stoffe zu verbessern, kann es in einigen Fällen notwendig sein, neben der pH-Veränderung in Schritt 4, ggf. auch am zweiten Extraktions- /Verteilungsschritt auf die Zugabe von Puffersalzen zu verzichten und die Phasentrennung lediglich durch Zugabe von NaCl und MgSO₄ einzuleiten.

Hinweise bei Wiederfindungsproblemen:

Führen keine der hier beschriebenen Durchführungsvarianten zu einer ausreichenden Wiederfindung, sind möglichst weitere Untersuchungen zur Klärung der Ursachen anzuschließen. Hochpolare Stoffe ($\log K_{ow} < -0,5$) zeigen eine hohe Affinität zur wässrigen Phase und neigen dazu nur unzureichend wiedergefunden zu werden. Bei sehr unpolaren Stoffen (z.B. HCB, DDT) kann es bei stark fetthaltigen Produkten zu erheblichen Verlusten durch Verteilung in die Fettphase kommen. Eine Reduzierung der Probeneinwaage schwächt diese Effekte ab. Weitere Faktoren, die zu Verlusten führen können, sind z.B. Lichteinfluss, Temperatureinfluss, Einfluss der Extraktionszeit (möglicher Abbau während der Extraktion), Einfluss der Quellzeit, Einfluss der Clean-Up-Schritte.

An dieser Stelle wird darauf hingewiesen werden, dass Parameteränderungen wie die Quellzeit oder pH-Wert punktuell die Wiederfindung von neu zu evaluierenden Pestiziden verbessern kann, dies jedoch zum Nachteil bei den Wiederfindungen von bereits validierten Pestiziden generieren kann. Dies gilt es immer im Gesamtkontext einer Multikomponenten-Analytik zu berücksichtigen.

Literatur:

- (1) DIN EN 15662:2009-02, Pflanzliche Lebensmittel — Bestimmung von Pestizidrückständen mit GC-MS und/oder LC-MS/MS nach Acetonitril Extraktion/Verteilung und Reinigung mit dispersiver SPE—QuEChERS Verfahren, (übernommen in Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 00.00-115), Beuth-Verlag, Februar 2009.
- (2) § 64 LFGB L 00.00-115:2014-02, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Pestizidrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln - GC-MS und/oder LC-MS/MS nach Acetonitril-Extraktion/Verteilung und Reinigung mit dispersiver SPE (QuEChERS) (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN EN 15662, Ausgabe Februar 2009), Beuth-Verlag, Februar 2014.
- (3) § 64 LFGB L 00.00-115/1:2015-03, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: Untersuchung von Lebensmitteln: Multimethode zur Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels GC-MS(/MS) oder LC-MS/MS nach Acetonitril-Extraktion/Verteilung und Aufreinigung mittels dispersiver SPE (QuEChERS modular), L 00.00-115-1, Beuth-Verlag, März 2015.
- (4) Bordin A B, Minetto L, do Nascimento Filho I, Beal L L, Sidnei M. Determination of Pesticide Residues in Whole Wheat Flour Using Modified QuEChERS and LC-MS/MS, Food Anal. Methods (2017), 10, 1-9. DOI 10.1007/s 12161-016-0542-2.
- (5) Rasche C, Fournes B, Dirks U, Speer K. Multi-residue pesticide analysis (gas-chromatography - tandem mass spectrometry detection) - Improvement of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for dried and fat-rich cereals - Benefit and limit of standardized apple puree calibration (screening), J. Chromatogr. A 1403 (2015) 21-31.
- (6) Hepperle J, Dörk D, Barth A, Taşdelen B, Anastassiades M. Studies to improve the extraction yields of incurred pesticide residues from crops using the QuEChERS method. J AOAC Int. (2015) 98 (2), 450-63. DOI: 10.5740/jaoacint.13-068.

Verabschiedet auf der 105. Sitzung der AG Pestizide, Frankfurt am Main, 02.05.2017