



Empfehlung der AG Pestizide zur laborinternen Methodvalidierung von Pestizidmethoden mit Hilfe von Zusatzversuchen, hier QuEChERS-Methode (DIN EN 15662:2008 bzw. L 00.00-115); (Modul 1: Obst und Gemüse)

Zielstellung der hier beschriebenen Vorgehensweisen

Durch die übliche laborinterne Methodvalidierung, d.h. ohne Proben mit gewachsenen Rückständen bekannter Gehalte oder von Referenzmaterial mit Rückständen geeigneter bekannter Konzentration mit entsprechenden Homogenitäts- und Stabilitätstest, können keine umfassenden Kenntnisse zur Analytstabilität und sonstiger Analytverluste erhalten werden. Trotzdem sollten bei der Validierung erste Hinweise auf eine geringe Stabilität der Analyte oder eine feste Bindung der Analyte an die Probenmatrix gesucht werden.

Dazu wird hier vorgeschlagen, Proben unter zulässigen „worst-case“ Bedingungen zu extrahieren. Nur so sind Hinweise auf eine enzymatische, lösungsmittelabhängige oder pH-Instabilität zu erhalten bzw. kann eine schnelle Bindung des dotierten Analyten an die Probenmatrix erkannt werden. Sobald ungenügende Wiederfindungen beobachtet werden, sind weitere Versuche zur Ursachenklärung notwendig, da auch bei nachfolgenden Schritten der Extraktreinigung oder der analytischen Bestimmung geringe Wiederfindungen verursacht werden können.

Inzwischen gut bekannte Beispiele einer mangelnden Stabilität von Wirkstoffen bei der QuEChERS-Extraktion sind der Zerfall von Chlorthalonil in Gegenwart bestimmter Matrixbestandteile von Alliumarten, der Abbau von Malathion in Getreide nach Wasserzusatz, der vollständige enzymatische Zerfall von Thiram bei der Zerkleinerung von Proben, die Umsetzung von Benfuracarb und Carbosulfan zu Carbofuran oder auch der Abbau von Thiophanat-methyl zu Carbendazim in bestimmten Pflanzenhomogenaten. Weniger bekannt ist, dass sich auch der Wirkstoff Amitraz nach längerer Einwirkzeit schlechter extrahieren lässt, wobei unbekannt ist, ob er sich dabei zersetzt oder fester an die Pflanzenmatrix bindet. Eine zu geringe Wiederfindung bei der Acetonitrilextraktion kann bei längerer Einwirkzeit auch nach Zusatz von Dichlofluanid, Dodin, Ethoxyquin, Quinmerac und Spinosad beobachtet werden. Dies wird auch durch eine überdurchschnittliche Anzahl geringer Wiederfindungen im EURL-Datapool (<http://www.eurl-pesticides-datapool.eu/>) belegt. Letztlich kann eine erschwerte Extrahierbarkeit nur bei bestimmten Matrizes (z.B. bei Trauben oder Rucola) beobachtet werden. Diese Beispiele unterstreichen die Notwendigkeit, der Stabilität und Extrahierbarkeit von Pestiziden eine besondere Beachtung zu schenken.

Wenn keine Proben mit gewachsenen Rückständen bekannter Höhe bzw. keine geeigneten Referenzmaterialien zur Methodvalidierung verwendet werden, sollte deshalb die Durchführungsvariante A (Extraktion bei Raumtemperatur und 60 min Wartezeit) stets zuerst angewendet werden. Erst wenn dabei eine zu geringe Wiederfindung beobachtet wird, sollten die weiteren Durchführungsvarianten zur Ursachenanalyse eingesetzt werden.

Durchführungsvariante A (stets zuerst anzuwenden)

Diese Durchführungsvariante erlaubt den intensivsten Kontakt der Analyte mit der Probenmatrix. Sie liefert damit die deutlichsten Hinweise auf eine ungenügende Stabilität der Analyte und zeigt am ehesten an, ob die Extraktionseffizienz durch Adsorption oder Bindung beeinflusst wird.

Auf eine homogene Matrix werden bei Zimmertemperatur auf eine genau eingewogene Probenmenge zwischen 50- 200 μl Standardlösung dotiert. Die Einwirkzeit der Dotierlösung auf die ungepufferte Probe muss mind. 60 min betragen. Dabei wird die dotierte Probe auf Umgebungstemperatur gehalten. Nach der Einwirkzeit erfolgt gegebenenfalls die Zugabe von zusätzlich notwendigem Wasser, internem Standard, Lösungsmittel und Reagenzien. Die weiteren Extraktionsschritte werden entsprechend der jeweiligen Vorschrift durchgeführt.

Für Methode L 00.00-115

1. Die zu dotierende Matrix ist zerkleinert (Partikelgröße $\leq 1 \text{ mm}^3$) oder kryogemahlen zu verwenden und wird vor der Dotierung auf **Umgebungstemperatur** (18 – 30 °C) erwärmt.
2. Die zu verwendende Einwaage beträgt **10 g**. Es erfolgt zu diesem Zeitpunkt keine Pufferung der Probe.
3. Die Dotierung der Analyte erfolgt mit **50 bis 200 μl** Standardlösung. So lange die Löslichkeit der Analyte ausreicht ($\geq 10 \text{ mg/ml}$) sind als Lösungsmittel der Standardlösung wasserlösliche organische Lösungsmittel (z.B. Acetonitril, Aceton oder Methanol) zu verwenden.
4. Die Einwirkzeit der Dotierlösung muss **60 min** betragen. Dabei wird die dotierte Probe auf Umgebungstemperatur gehalten.
5. **Nach der Einwirkzeit** erfolgen die Zugabe von zusätzlich notwendigem Wasser, 10 ml Acetonitril und internem Standard.
6. Die Extraktion erfolgt entsprechend den Vorgaben der DIN EN 15662:2008 bei kryogemahlten Proben durch Schütteln **für 15 min** oder bei weniger zerkleinerten Proben mit Hilfe eines Dispergierwerkzeuges (z.B. Ultra Turrax) über die gleiche Zeit.
7. Alle anschließenden Schritte sind entsprechend DIN EN 15662:2008 bzw. der amtlichen Methode L 00.00-115 durchzuführen.

Erst wenn auftretende Probleme bei der Extraktion von Pestiziden hinreichend dokumentiert sind und allgemein berücksichtigt werden (siehe einige der oben genannten Beispiele), kann auf die Durchführungsvariante A verzichtet werden.

Durchführungsvariante B

Diese Durchführungsvariante ist nur anzuwenden, wenn in Zusatzversuchen nach Durchführungsvariante A unzureichende Wiederfindungen beobachtet wurden, die vermutlich durch eine enzymatische Zersetzung der Analyte hervorgerufen wurden (siehe z.B. Fussel et al. J Agric Food Chem 55 (2007) 1062-1070). Durch den geringeren Kontakt der Analyte mit der Probe liefert diese Durchführungsvariante allerdings auch geringere Hinweise auf mangelnde Extraktionseffizienz durch Adsorption oder Bindung.

Auf eine möglichst kryogemahlene Probe wird die Dotierlösung so für mind. 5 min gegeben, dass die Probe nicht auftaut. Die gefrorene Probe wird anschließend umgehend extrahiert.

Für Methode L 00.00-115

1. Die zu dotierende Matrix ist zerkleinert (Partikelgröße $\leq 1 \text{ mm}^3$) oder kryogemahlen zu verwenden und wird vor der Dotierung auf **-15 bis -20 °C** gekühlt.

2. Die zu verwendende Einwaage beträgt 10 g. Es erfolgt zu diesem Zeitpunkt keine Pufferung der Probe.
3. Die Dotierung der Analyte erfolgt mit 50 bis 200 µl Standardlösung. So lange die Löslichkeit der Analyte ausreicht (≥ 10 mg/ml) sind als Lösungsmittel der Standardlösung wasserlösliche organische Lösungsmittel (z.B. Acetonitril, Aceton oder Methanol) zu verwenden.
4. Die Einwirkzeit der Dotierlösung muss **5 min** überschreiten, darf aber nicht so lang sein, dass die Probe auftaut.
5. Nach der Einwirkzeit erfolgen die Zugabe von zusätzlich notwendigem Wasser, 10 ml Acetonitril und internem Standard.
6. Die Extraktion erfolgt entsprechend den Vorgaben der DIN EN 15662:2008 bei cryogemahlene Proben durch Schütteln für 15 min oder bei weniger zerkleinerten Proben mit Hilfe eines Dispergierwerkzeuges (z.B. Ultra Turrax).
7. Alle anschließenden Schritte sind entsprechend DIN EN 15662:2008 bzw. der amtlichen Methode L 00.00-115 durchzuführen.

Durchführungsvariante C – Verlängerte Extraktionszeit

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 6. Zur Erhöhung der Extraktionseffizienz sind kryogemahlene Proben 60 min mit einem mechanischen Schüttler oder mit einem Dispergierwerkzeug (z.B. Ultra Turrax) zu extrahieren.

Durchführungsvariante D - pH-Einstellung vor der Dotierung

Bei Vermutung einer unzureichenden pH-Stabilität der Analyte sollten im ersten Schritt alle hierzu verfügbaren Literaturinformationen überprüft werden. Alternativ kann die AG Pestizide kontaktiert werden. Anschließend sind Zusatzversuche mit nur einer Änderung nach Durchführungsvariante A durchzuführen. Die Änderung bezieht sich auf Schritt 2. Zur Sicherung der Analytstabilität ist der pH der Probe mit geeigneten wässrigen Pufferlösungen bzw. einer definierten Menge Säure bzw. Lauge einzustellen, bevor die Zugabe der Dotierlösung im Schritt 3 erfolgt.

Führen keine der hier beschriebenen Durchführungsvarianten zu einer ausreichenden Wiederfindung, sind möglichst weitere Untersuchungen zur Klärung der Ursachen anzuschließen.

1. Die zu dotierende Matrix ist zerkleinert (Partikelgröße ≤ 1 mm³) oder kryogemahlen zu verwenden und wird vor der Dotierung auf **Umgebungstemperatur** (18 – 30 °C) erwärmt.
2. Eine aliquote Menge der homogenisierten Probe wird in ein geeignetes Gefäß eingewogen. Es erfolgt zu diesem Zeitpunkt keine Pufferung der Probe.
3. Die Dotierung der Analyte erfolgt mit **50 bis 200 µl** Standardlösung. So lange die Löslichkeit der Analyte ausreicht (≥ 10 mg/ml) sind als Lösungsmittel der Standardlösung wasserlösliche organische Lösungsmittel (z.B. Acetonitril, Aceton oder Methanol) zu verwenden.
4. Die Einwirkzeit der Dotierlösung muss **60 min** betragen. Dabei wird die dotierte Probe auf Umgebungstemperatur gehalten.
5. **Nach der Einwirkzeit** erfolgen die Zugabe von zusätzlich notwendigem Wasser, dem Extraktionsmittel und internem Standard.

Verabschiedet auf der 100. Sitzung der AG Pestizide, Kassel, 12.11.2014