
- Masterarbeit -

**„Methodenvalidierung zum Nachweis von Pestiziden
in fetthaltigen Lebensmitteln nach QuEChERS
mittels LC-MS/MS-Verfahren“**

Vivien Mitschke

Hochschule Anhalt
Fachbereich für Angewandte Biowissenschaften & Prozesstechnik
Studiengang Pharmatechnik

Hochschulbetreuer: Herr Prof. Dr. habil. Bertram Wolf

Betreuer im Betrieb: Dr. Torsten Neuhof
SGS INSTITUT FRESENIUS GmbH
Tegeler Weg 33
10589 Berlin

Berlin, den 22.10.2014

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Professor Dr. habil. Bertram Wolf für seine Unterstützung und Hilfestellung bei meiner Arbeit. Ebenso bedanke ich mich herzlich bei Dr. Torsten Neuhof für die sachverständige Betreuung meiner schriftlichen Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an Constance Voigt und Christiane Scheel, durch die ich erst die Möglichkeit bekommen habe, die Arbeit bei der SGS Institut Fresenius GmbH durchzuführen. Ich bedanke mich ganz herzlich bei Sengül Demirçan, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Mein Dank geht auch an Philip Kaprol, Laëtitia Marchal und Franziska Schumann für ihre Unterstützung und ihr Entgegenkommen bei fachlichen Fragen.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern im Labor für die Unterstützung bei meiner Arbeit im Labor.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Ich habe alle Stellen, die ich aus den Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommen habe, als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Berlin, 22.10.2014

Ort / Datum

Vivien Mitschke

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Eidesstattliche Erklärung.....	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Diagrammverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
2 Aufgabenstellung	3
3 Grundlagen	4
3.1 Richtlinien im Lebensmittelbereich	4
3.2 Pestizide	5
3.3 Analyse von Pestizidrückständen in Lebensmitteln.....	7
3.4 Trennverfahren Flüssigchromatographie	8
3.4.1 Stationäre Phase	9
3.4.2 Mobile Phase	11
3.4.3 Modifier.....	12
3.5 Massenspektrometrie.....	13
3.5.1 Einlass-System	13
3.5.2 Ionenquelle	14
3.5.3 Massenanalysator	15
3.5.4 Detektor	16
3.6 Gekoppeltes LC-MS/MS-Verfahren	16
3.7 Validierung einer analytischen Methode des gekoppelten LC-MS/MS Verfahrens im Zusammenhang mit der QuEChERS-Probenaufbereitung.....	17
4 Untersuchungen	21
4.1 QuEChERS-Methode für nicht fetthaltige Lebensmittel	21
4.2 Modifizierte QuEChERS-Methode für fetthaltige Lebensmittelproben	26
4.3 Materialien	31
4.3.1 Lebensmittelmatrices	31
4.3.2 Modellanalyten.....	31
4.4 Analysemethode	34

4.4.1 LC-MS/MS - Analyseparameter	34
4.4.2 Akzeptanzkriterien der Validierungsparameter.....	38
4.5 Durchführung	39
5 Ergebnisse und Diskussion	45
5.1 Butoxycarboxim	45
5.1.1 Sonnenblumenöl.....	45
5.1.2 Kürbiskerne	49
5.1.3 Auswertung Butoxycarboxim	52
5.2 Linuron	54
5.2.1 Sonnenblumenöl.....	54
5.2.2 Kürbiskerne	58
5.2.3 Auswertung Linuron	61
5.3 MCPB.....	62
5.3.1 Sonnenblumenöl.....	62
5.3.2 Kürbiskerne	66
5.3.3 Auswertung MCPB	70
6 Zusammenfassung und Ausblick	70
Literaturverzeichnis.....	72
Anhangsverzeichnis	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeiner Aufbau einer HPLC-Anlage.....	9
Abbildung 2: Kieselgel mit Hydroxygruppen	10
Abbildung 3: C18-Modifizierung von Kieselgel	10
Abbildung 4: Allgemeiner Aufbau eines Massenspektrometers	13
Abbildung 5: Strukturformel Dinatriumhydrogencitrat Sesquihydrat	23
Abbildung 6: Strukturformel Trinatriumcitrat Dihydrat	24
Abbildung 7: Hydratisierung der Salzionen am Beispiel von NaCl [29].....	24
Abbildung 8: Modifiziertes Kieselgel mit primärem Amin (links) und sekundärem Amin (rechts).....	26
Abbildung 9: Additionsreaktion des primärenamins an eine Aldehydgruppe	26
Abbildung 10: Allgemeine Strukturformel Carbamidsäure	31
Abbildung 11: Allgemeine Strukturformel Oxim	32
Abbildung 12: Isomere des Butoxycarboxims	32
Abbildung 13: Allgemeine Strukturformel Phenylharnstoffe	32
Abbildung 14: Strukturformel Linuron	33
Abbildung 15: Strukturformel MCPB	33
Abbildung 16: HTC PAL Systems Autosampler der Fa. CTC Analytics	34
Abbildung 17: Agilent Technologies HPLC-Anlage	35
Abbildung 18: QTrap® 5500 Massenspektrometer der Fa. AB Sciex.....	37
Abbildung 19: Grindomix GM 200 der Fa. Retsch.....	42
Abbildung 20: Probenübersicht.....	42
Abbildung 21: Probenvorbereitungsschritte am Beispiel von Sonnenblumenöl	43
Abbildung 22: Phasentrennung	43
Abbildung 23: Mutlifuge X3R der Fa. Thermo Scientific	44
Abbildung 24: Butoxycarboxim-Peak in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)	46
Abbildung 25: Lösemittel- und Matrix-Blank von Butoxycarboxim in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)	46
Abbildung 26: Butoxycarboxim-Peak in Kürbiskernen (0,8 ng/ml).....	49
Abbildung 27: Lösemittel- und Matrix-Blank von Butoxycarboxim in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)	50
Abbildung 28: Linuron-Peak in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)	55
Abbildung 29: Lösemittel- und Matrix-Blank von Linuron in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml) ..	55
Abbildung 30: Linuron-Peak in Kürbiskernen (0,8 ng/ml).....	58

Abbildung 31: Lösemittel- und Matrix-Blank von Linuron in Kürbiskernen (0,8 ng/ml).....	59
Abbildung 32: MCPB-Peak in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)	63
Abbildung 33: Lösemittel- und Matrix-Blank von MCPB in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml) ...	63
Abbildung 34: MCPB-Peak in Kürbiskernen (0,8 ng/ml).....	67
Abbildung 35: Lösemittel- und Matrix-Blank von MCPB in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)	67

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Fließschema der QuEChERS-Methode für nicht fetthaltige Lebensmittel.....	22
Diagramm 2: Vergleich der QuEChERS-Methoden (Schritt: Homogenisierung).....	28
Diagramm 3: Vergleich der QuEChERS-Methoden (Schritt: Einwaage).....	28
Diagramm 4: Vergleich der QuEChERS-Methoden (Schritt: Extraktion/Phasentrennung)....	28
Diagramm 5: Vergleich der QuEChERS-Methoden (Schritt: dispersive SPE)	29
Diagramm 6: Zusammenfassung der veränderten QuEChERS-Methode für fetthaltige Lebensmittel	30
Diagramm 7: Kalibriergeraden Butoxycarboxim des Versuchstags mit Sonnenblumenöl.....	45
Diagramm 8: Kalibriergeraden Butoxycarboxim des Versuchstags mit Kürbiskernen	49
Diagramm 9: Kalibriergeraden Linuron des Versuchstags mit Sonnenblumenöl.....	54
Diagramm 10: Kalibriergeraden Linuron des Versuchstags mit Kürbiskernen	58
Diagramm 11: Kalibriergeraden MCPB des Versuchstags mit Sonnenblumenöl	62
Diagramm 12: Kalibriergeraden MCPB des Versuchstags mit Kürbiskernen.....	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Elutrope Reihe für Solvenzien nach zunehmender Polarität [17].....	12
Tabelle 2 : Allgemeine Strukturformel primärer und sekundärer Amine	25
Tabelle 3: HPLC-Parameter	35
Tabelle 4: Einstellung der Gradientenelution.....	36
Tabelle 5: Retentionszeiten der Modellanalyten in Minuten	37
Tabelle 6: Masse-Ladungszahl der Modellanalyten nach Übergang	37
Tabelle 7: Herstellschema der Kalibrierlösung	40
Tabelle 8: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)	47
Tabelle 9: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Sonnenblumenöl (4,0 ng/ml)	47

Tabelle 10: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Sonnenblumenöl (7fach Injektion 4,0 ng/ml)	48
Tabelle 11: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)	50
Tabelle 12: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Kürbiskernen (4,0 ng/ml)	51
Tabelle 13: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Kürbiskernen (7fach Injektion 4,0 ng/ml)	51
Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse von Butoxycarboxim	52
Tabelle 15: Wiederfindung von Linuron in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)	56
Tabelle 16: Wiederfindung von Linuron in Sonnenblumenöl (4,0 ng/ml)	56
Tabelle 17: Wiederfindung von Linuron in Sonnenblumenöl (7fach Injektion 4,0 ng/ml)	57
Tabelle 18: Wiederfindung von Linuron in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)	59
Tabelle 19: Wiederfindung von Linuron in Kürbiskernen (4,0 ng/ml)	60
Tabelle 20: Wiederfindung von Linuron in Kürbiskernen (7fach Injektion 4,0 ng/ml)	61
Tabelle 21: Zusammenfassung der Wiederfindungen von Linuron	61
Tabelle 22: Wiederfindung von MCPB in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)	64
Tabelle 23: Wiederfindung von MCPB in Sonnenblumenöl (4,0 ng/ml)	64
Tabelle 24: Wiederfindung von MCPB in Sonnenblumenöl (7fach Injektion 4,0 ng/ml)	65
Tabelle 25: Wiederfindung von MCPB in Kürbiskernen (7fach Injektion 4,0 ng/ml)	68
Tabelle 26: Wiederfindung von MCPB in Kürbiskernen (4,0 ng/ml)	68
Tabelle 27: Wiederfindung von MCPB in Kürbiskernen (7fach Injektion 4,0 ng/ml)	69
Tabelle 28: Zusammenfassung der Wiederfindungen von MCPB	70

Abkürzungsverzeichnis

BfR	-	Bundesinstitut für Risikoanalyse
BVL	-	Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
GC	-	Gaschromatographie
EG	-	Europäische Gemeinschaft
EWG	-	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
GD	-	General Direktion
LC	-	Liquid Chromatographie (Flüssigchromatographie)
LFGB	-	Lebensmittel und Bedarfsgegenstände Gesetzbuch
MS	-	Massenspektrometer
PHH	-	Phenylharnstoffe
QuEChERS	-	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
PA	-	Pascal
PSA	-	Primäre und Sekundäre Amine
SPE	-	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
U	-	Umdrehung
VK	-	Varianzkoeffizient
WDF	-	Wiederfindung

Chemische Formeln/Namen

MgSO ₄	-	Magnesiumsulfat
NaCl	-	Natriumchlorid
Na ₂ H-Citrat * 1,5 H ₂ O	-	Dinatriumhydrogencitrat Sesquihydrat
Na ₃ -Citrat * 2 H ₂ O	-	Trinatriumcitrat Dihydrat

1 Einleitung

“The world is becoming smaller and smaller through improved transportation and electronic communication. We share each other’s cultures, foods and even pesticide residues.”¹

Pflanzenschutzmittel und ihre Rückstände in Lebensmitteln sind in der heutigen Zeit ein viel diskutiertes Thema. Zwar lässt der hohe Bedarf an Lebensmitteln derzeit keinen Verzicht auf ihren Einsatz zu, jedoch ist man sich bei der Anwendung von Pflanzenschutzmitteln gesundheitlicher Risiken bewusst. Die tägliche Nahrungszufuhr bestimmt unser Leben und eben deshalb ist die Kontrolle und Einhaltung der Qualität unserer Lebensmittel so wichtig. Damit die Gesundheit des Endverbrauchers keinen Schaden erfährt, wurden nach *Verordnung (EG) Nr. 396/2005 des europäischen Parlaments und Rates vom 23. Februar 2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs und zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG des Rates* Höchstmengen für Pestizidrückstände in Lebensmitteln festgelegt, welche nicht überschritten werden dürfen [2]. Jedes Unternehmen, welches in Europa Lebensmittel vertreibt, ist dafür verantwortlich, dass diese Höchstmengen nicht überschritten werden. Da die Gesundheit des Menschen an erster Stelle steht, muss sichergestellt sein, dass hinsichtlich dieser Höchstmengen zuverlässige Analysen von Pestizidrückständen durchgeführt werden. Deshalb ist es notwendig, auf validierte Methoden zum Nachweis von Pestizidrückständen in Lebensmitteln zurückzugreifen [2]. Die Untersuchungen von Lebensmitteln auf Pestizidrückstände erfolgen in Kontrolllaboren, welche geprüfte Untersuchungsmethoden einsetzen. Eines dieser Kontrolllabore in Deutschland ist die SGS Institut Fresenius GmbH in Berlin. Dort werden Stichproben von Lebensmitteln auf Pestizidrückstände untersucht und deren Gehalt bestimmt.

Der Weg vom Lebensmittel bis zu der zu analysierenden Probe besteht aus hauptsächlich zwei Schritten: die Probenvorbereitung und die anschließende Probenanalyse. Die Analyse selbst erfordert durch automatisierte Verfahren geringen Aufwand, jedoch ist die Probenvorbereitung ein zeit- und kostenintensiver Schritt. Bei der Probenvorbereitung erfolgt die Homogenisierung des Lebensmittels, die Extraktion der Pestizidrückstände und je nach anschließender Analysemethode, die Aufreinigung der Probe, wodurch störende Matrixbestandteile des Lebensmittels entfernt werden. Bei der SGS Institut Fresenius GmbH bestehen bereits Methoden für den Nachweis von Pestiziden in fetthaltigen Lebensmitteln.

¹ Wheeler, Willis B. / Lee, S. Mark / Richman, Sylvia J.: Pesticides in Agriculture and the Environment, Basel, 2002, S. 204.

Bisher angewandte Methoden der Probenvorbereitung für fetthaltige Lebensmittel, wie zum Beispiel Soxhlet- oder beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE), erfordern jedoch im Vergleich zu nicht fetthaltigen Lebensmitteln einen höheren Kosten- und Zeitfaktor, da größere Mengen an Lösemittel verbraucht werden und diese Extraktionsverfahren der Pestizidrückstände sehr zeitaufwendige Prozesse sind. Deshalb soll der Schritt der Probenvorbereitung fetthaltiger Lebensmittel optimiert und zeitlich verkürzt werden.

In diesem Fall wird eine bestehende Methode für die Analyse von nicht fetthaltigen Lebensmitteln auf fetthaltige Lebensmittelmatrices übertragen. Diese Methode wird als „QuEChERS-Methode“ bezeichnet, welche sich aus den englischen Worten *Quick*, *Easy*, *Cheap*, *Effective*, *Rugged* und *Safe* zusammensetzt. Sie findet in sehr vielen Kontrolllaboren Einsatz und wird auch bei der SGS Institut Fresenius GmbH angewandt [3]. Bei der Methode handelt es sich um die Probenvorbereitung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion und dispersiver Festphasenextraktion. Anschließend erfolgt die Analyse mit Hilfe der Kopplung von flüssigchromatographischen Trennverfahren und massenspektrometrischer Vermessung der Probe. Diese Methode ist im Vergleich zu anderen sehr schnell und einfach zu handhaben. Der Kostenfaktor ist gering, da nur ein geringer Verbrauch an Lösemitteln während der Probenvorbereitung besteht. Sie ist effektiv, da sie eine Vielzahl an Pestizidanalyten erfassen kann und durch ihre einfache Handhabung Fehlerquellen reduziert werden können, wodurch die Methode sichere Ergebnisse liefert. Aufgrund dieser Punkte eignet sich die Methode gut für die Anpassung an fetthaltige Systeme und findet bereits in verschiedenen Kontrolllaboren für die Untersuchung von fetthaltigen Lebensmitteln Anwendung.

2 Aufgabenstellung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Validierung einer analytischen Methode zur Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen in fetthaltigen Lebensmitteln. Bei der Methode handelt es sich um eine Probenvorbereitung mit Flüssig-Flüssig-Extraktion sowie Aufreinigung mittels dispersiver Festphasenextraktion und anschließender Analyse durch Kopplung von Flüssigchromatographie (Liquid Chromatographie - LC) und Massenspektrometrie (MS). Die QuEChERS-Methode wurde bisher für die Untersuchung von hydrophilen Lebensmitteln in der SGS Institut Fresenius GmbH angewandt und sollte nun für die Analyse von fetthaltigen Systemen angepasst werden. Die neuen Probenvorbereitungsschritte wurden im Validierungsplan erfasst. Die Analysemethode selbst sollte nicht verändert werden und von der bisherigen Anwendung bei hydrophilen Systemen, auf die Analyse von lipophilen Lebensmitteln übertragen werden. Die Validierung erfolgte für die bereits in der Routine eingesetzten 287 Pestizidanalyten. Eine Validierung mit reinen Standardlösungen wäre nicht repräsentativ, da die Analyseergebnisse beispielsweise von Matrixeinflüssen abhängen. Deshalb wurden verschiedene Lebensmittelmatrices für die Validierung ausgewählt, welche ein möglichst breites Spektrum an unterschiedlichen fetthaltigen Systemen abdecken. Für die Validierung wurden folgende sechs verschiedene fetthaltige Lebensmittelmatrices ausgewählt: Kakaopulver, Kürbiskerne, Sonnenblumenöl, Sojabohnen, Sesam und Walnüsse. In dieser Arbeit wird die Validierung für die drei Pestizidmodellanalyten Butoxycarboxim, Linuron und MCPB in den Matrices Sonnenblumenöl und Kürbiskerne vorgestellt.

3 Grundlagen

3.1 Richtlinien im Lebensmittelbereich

Lebensmittel werden nach der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 *des Europäischen Parlaments und des Rates zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit* als alle Stoffe definiert, die dazu bestimmt sind, vom Menschen, zum Teil verarbeitet oder unverarbeitet, aufgenommen zu werden [4]. Bevor das Lebensmittel jedoch für den Endverbraucher, den Menschen, zur Verfügung gestellt werden kann, muss eine gute Qualität des Produktes gewährleistet sein. Die Produktqualität umfasst beispielsweise die Einhaltung geltender Rechtsvorschriften sowie den Wert des Lebensmittels hinsichtlich Gesundheit, Genuss und Gebrauch [5]. Im Bereich der Lebensmittelsicherheit bestehen verschiedene Institutionen und Behörden, welche bei der Überwachung und Kontrolle von Lebensmitteln in der Europäischen Union und Deutschland mitwirken. In der EU gibt es 3 wichtige Institutionen: Die EU-Generaldirektion (GD) für Gesundheit und Verbraucherschutz, das Europäische Lebensmittel- und Veterinäramt und die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA - European Food Safety Authority). Die EFSA hat eine beratende Funktion in Bereichen wie Ernährung und Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit. Die GD kann Rechtsvorschriften vorschlagen und setzt die vom europäischen Parlament und Rat erstellten Beschlüsse im Gesundheits- und Verbraucherschutzbereich um. Die Prüfung der Umsetzung rechtlicher Vorschriften in den Mitgliedstaaten der EU wird durch das Europäische Lebensmittel- und Veterinäramt durchgeführt. In Deutschland sind die Bundesländer zuständig für die Kontrolle der Einhaltung europäischer Richtlinien und Verordnungen. Sie überwachen dabei beispielsweise die Lebensmittelherstellung und den Verkauf. Das in Deutschland zuständige Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit dient als Kontaktstelle im Bereich der Lebensmittelsicherheit zwischen der EU und Deutschland und hilft beispielsweise bei der Durchführung von Inspektionen durch das Europäische Lebensmittel- und Veterinäramt. Werden im Bereich der Lebens- oder Futtermittel in deutschen Bundesländern Risiken erkannt, kontaktiert das Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) nach Überprüfung die Europäische Kommission, welche das Risiko in das Europäische Schnellwarnsystem für Lebensmittel und Futtermittel (RASFF) einpflegt. Weitere in Deutschland zuständige Behörden sind das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und der Zoll. Das BfR nimmt Stellung zu Themen im Bereich der Sicherheit von

Lebensmitteln und dem Verbraucherschutz und erfasst dazu Gutachten. Der Zoll überprüft Lebensmittel, die nach Deutschland importiert werden und kontrolliert, ob die Ware den gesetzlichen Vorschriften entspricht. All diese Institutionen sind wichtig für die Sicherheit der Lebensmittel in der EU und Deutschland und beteiligen sich mit an der stetigen Verbesserung hinsichtlich Qualität und Verbraucherschutz [6]. Der Schutz der Verbraucher bezieht sich ebenfalls auf die kritische Betrachtung für die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln. Aufgrund der hohen Nachfrage an Lebensmitteln ist heutzutage eine Optimierung der Lebensmittelherstellung notwendig. Das Bevölkerungswachstum in den letzten 50 Jahren in der EU und der Export in Dritte-Welt-Länder erfordern die Produktion hoher Mengen an Lebensmitteln und dies ist ohne die Nutzung von Pestiziden nicht möglich.

3.2 Pestizide

Der Begriff Pestizid wird als Synonym für Pflanzenschutzmittel verwendet. So finden in vielen Literaturquellen keine Unterscheidungen zwischen den Begriffen statt. Auch in der vorliegenden Arbeit werden beide Begriffe sinngleich verwendet. Laut dem Pflanzenschutzgesetz wird Pflanzenschutz bei nichtparasitärer Störung und Befall mit Schadorganismen angewendet. In der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates werden weitere Verwendungszwecke aufgezählt [7] :

1. Einfluss auf Lebensvorgänge von Pflanzen im Unterschied zum Einfluss von Nährstoffen
2. Konservierung von Pflanzenerzeugnissen
3. Zerstörung von einigen Pflanzen oder bestimmten Teilen von Pflanzen
4. Hemmung oder Vorbeugung von Pflanzenwachstum

Eine Einteilung der verschiedenen Pflanzenschutzmittel kann nach ihrem Anwendungsgebiet erfolgen. Im Folgenden werden die wichtigsten Pestizidgruppen aufgezählt und näher erläutert:

Insektizide:

Insektizide sind Bekämpfungsmittel gegen Insekten. Die Hauptwirkung von Insektizidwirkstoffen ist die Beeinflussung der Reizweiterleitung oder –Übertragung im

Nervensystem des Insekts. Das Nervensystem von Insekten hat als Grundbaustein Nervenzellen. Die Reizübertragung findet zwischen mehreren Nervenzellen statt bis zum Zielorgan. Über den synaptischen Spalt erfolgt eine Reizweiterleitung zwischen zwei Nervenzellen. Dieser Prozess wird durch Acetylcholin induziert. Damit es jedoch nicht zur dauerhaften Reizleitung kommt, wird Acetylcholin durch das Enzym Acetylcholinesterase abgebaut. Einige der Insektizidwirkstoffe verhindern diesen Schritt, da sie die Acetylcholinesterase hemmen. Dazu gehören beispielsweise Carbamate oder organische Phosphorsäureester. Eine weitere Wirkungsweise von Insektiziden ist die, dass sie anstelle des Acetylcholins den Prozess der Reizweiterleitung induzieren. Die Acetylcholinesterase kann den Pestizidwirkstoff nicht abbauen und so kommt es ebenfalls zur dauerhaften Reizweiterleitung, wodurch das Insekt getötet wird [8].

Insektizide können lokal oder systemisch wirken. Unter lokaler Wirkung versteht man das direkte Benetzen des Insekts oder die eigenständige Aufnahme durch das Insekt nach Verteilung des Insektizids auf der Pflanzenoberfläche. Die systemische Wirkung erfolgt, wenn das Insektizid der Pflanze in gelöster Form, beispielweise über den Boden und damit über die Wurzeln, zugeführt wird. Das Insektizid verteilt sich so in der Pflanze, pflanzenfressende Insekten nehmen es auf und können getötet werden.

Beispiele für chemische Gruppen, die als Insektizid Anwendung finden: Organophosphate, Carbaminsäureester(Carbamate), Pyrethrine und Pyrethroide sowie chlorierte cyclische Kohlenwasserstoffe.

Herbizide:

Diese Pflanzenschutzmittel wirken gegen Unkräuter. Sie dienen der Zerstörung unerwünschter Pflanzen, indem sie hauptsächlich in verschiedene Stoffwechselprozesse eingreifen. Beispielsweise können sie Vorgänge wie Photosynthese, Aminosäuresynthese oder Zellatmung stören, indem sie Enzymaktivitäten hemmen [9]. Wichtige chemische Gruppen, die als Herbizid Einsatz finden sind Carbamate, Harnstoffderivate, Phenoxy-carbonsäuren sowie Triazine [8,10]. Herbizide können hinsichtlich verschiedener Kriterien eingeteilt werden. Dazu gehört der Aussaatzeitpunkt der Kulturpflanze und darauf bezogen der Anwendungstermin des Herbizids, der Applikationsbereich sowie der Ort der Aufnahme des Herbizids durch die Pflanze. Des Weiteren findet eine Einteilung nach Wirkungsbereich und Wirkungsweise statt [8]. Eine der wichtigsten Einteilungen ist die nach dem Wirkungsbereich. Dabei unterscheidet man selektive Herbizide von Totalherbiziden. Die

Wirkung von selektiven Herbiziden bezieht sich auf bestimmte Pflanzen, während Totalherbizide gegen eine Vielzahl von Pflanzenarten wirken [11].

Fungizide:

Fungizide wirken gegen Pilze, welche die Pflanze schädigen können. Sie können nicht-systemisch oder systemisch wirken. Systemisch wirkende Fungizide können über die Wurzeln oder die Blattoberflächen in die Pflanze eindringen und durch die Verteilung so den Befall des Pilzes von innen verhindern, während nicht-systemisch wirkende Fungizide die Keimung von Pilzsporen, beziehungsweise das Vordringen des Pilzes in die Pflanze von außen, verhindern [12]. Die allgemeine Wirkungsweise ist die Hemmung oder Zerstörung von Enzymen und Proteinen, welche beispielsweise bei der Ausbildung von Pilzsporen, beziehungsweise bei der Zellteilung, benötigt werden. Die Atmungskette in den Mitochondrien oder die Ausbildung der Zellmembran kann gehemmt werden und somit zum Tod des Pilzes beziehungsweise zur Wachstumsstagnation führen. Wichtige Vertreter der Fungizide sind z.B. Aldehyde, Carbonsäurederivate, Benzimidazole und Imidazole, Triazine sowie Antibiotika [8,13].

Die beschriebenen Wirkungen von Pestiziden sind für den Schutz von Kulturpflanzen wünschenswert, stellen für die menschliche Gesundheit jedoch eine Gefahr dar, da gewisse Rückstandsmengen in den pflanzlichen Lebensmitteln bleiben. Die Toxizität der Pestizide besteht bereits in geringen Mengen und deshalb ist es wichtig, den Menschen mit so wenig Mengen wie möglich in Kontakt treten zu lassen. Damit keine Lebensmittel an den Endverbraucher gelangen, welche schädigende Wirkungen aufweisen, werden diese vor ihrem Verkauf auf Pestizidrückstände analysiert.

3.3 Analyse von Pestizidrückständen in Lebensmitteln

Im LFGB ist der § 9 "Pflanzenschutz- oder sonstige Mittel" maßgebend für den Schutz des Verbrauchers vor überhöhten Rückständen [14]. Wenn ein Erntegut oder ein Lebensmittel tierischer Herkunft in den Verkehr kommt, dürfen die vorhandenen Rückstände die zulässigen Rückstandshöchstmengen nicht überschreiten, welche in der gültigen Fassung der bisherigen nationalen Rückstands-Höchstmengen-Verordnung (RHmV) aufgeführt sind. Das BVL führt mehrjährig Untersuchungen verschiedenster Lebensmittel auf Pestizidrückstände durch, die im Verdacht stehen Konzentrationen über den Höchstmengen aufzuweisen. Diese Untersuchungen basieren auf der Anwendung von präzisen und zuverlässigen

Analysemethoden in der Pestizidrückstandsanalytik. Durch die Vielzahl an unterschiedlichen Lebensmittelmatrices und verwendeten Pestiziden stellen Untersuchungen im Bereich der Lebensmittel eine große Herausforderung dar. Deshalb muss näher betrachtet werden, was für die Analyse von Pestizidrückständen in Lebensmitteln bei der Probenvorbereitungen notwendig ist, um die zu untersuchenden Pestizidanalyten aus dem Lebensmittel zu extrahieren und eine spezifische Analyse zu ermöglichen. Da Bestandteile des Lebensmittels die analytischen Untersuchungen stören können und so zu falschen Analyseergebnissen führen würden, werden alle Störstoffe weitestgehend durch die Probenvorbereitung entfernt. Man unterscheidet bei der Analyse von Pestiziden zwischen Multi- und Einzelmethode. Multimethoden können eine große Anzahl an Pestizidwirkstoffen aus der Lebensmittelprobe extrahieren und nachweisen. Da jedoch bei der Anwendung von Multimethoden nicht alle Pestizidrückstände erfasst werden, können bestimmte Pestizidanalyten nur mit spezifischen Einzelmethode nachgewiesen werden.

3.4 Trennverfahren Flüssigchromatographie

Die Flüssigchromatographie basiert auf dem Prinzip der Wechselwirkung und Verteilung eines Probeanalyten zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, welche als mobile und stationäre Phase bezeichnet werden. Bei der mobilen Phase handelt es sich um ein Lösungsmittel (Fließ- oder Elutionsmittel), welches aus mehreren Komponenten bestehen kann, während die stationäre Phase ein Feststoff ist [15]. Je stärker die Wechselwirkung zwischen dem Analyten und der stationären Phase ist, desto später wird der Analyt mithilfe des Fließmittels von der Säule gespült. Dieser Vorgang kann durch den Verteilungskoeffizienten K beschrieben werden. Der Verteilungskoeffizient berechnet sich aus dem Quotienten der Analytkonzentration in der stationären Phase und der Konzentration des Analyten in dem Fließmittel.

$$K = \frac{C_{\text{stationäre Phase}}}{C_{\text{mobile Phase}}}$$

Der Verteilungskoeffizient ist substanzspezifisch und abhängig von den verwendeten Materialien für die stationäre und mobile Phase. Bei einem Wert über 1 weist die Substanz eine größere Affinität zur stationären Phase auf, während Substanzen mit einem Verteilungskoeffizienten kleiner 1 stärker mit dem Fließmittel wechselwirken. Durch dieses Prinzip lassen sich Analyten mit unterschiedlichen chemischen oder je nach verwendeter

Säule, mit verschiedenen physikalischen Eigenschaften trennen. Am häufigsten findet in der Analytik die Trennung mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) statt. Dabei wird das Fließmittel durch die stationäre Phase gepumpt. Die stationäre Phase ist in der HPLC in Form einer Säule gepackt. Durch die Pumpe wird das Fließmittel über Schläuche zur Mischkammer gepumpt, in der, bei Nutzung mehrerer Fließmittelkomponenten, homogenisiert wird. Mittels einer Injektionsspritze wird die Probelösung über ein Ventilsystem zu dem bereits vorhandenen Fließmittel gegeben und gelangt zur Vorsäule. Dort werden bereits gröbere Verunreinigungen entfernt, um die Hauptsäule nicht zu stark zu verschmutzen.

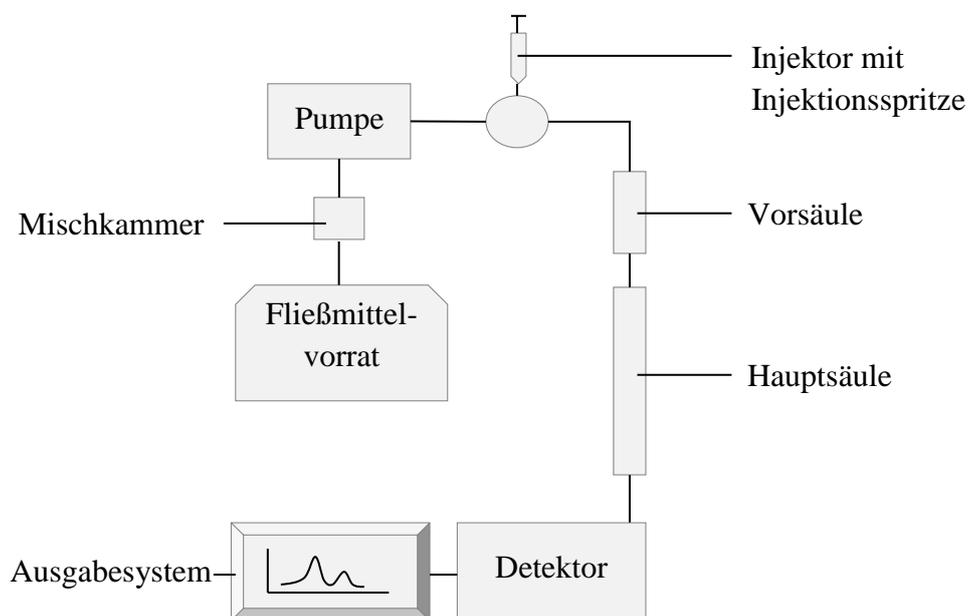


Abbildung 1: Allgemeiner Aufbau einer HPLC-Anlage

Anschließend läuft die Probe über die Hauptsäule, die Probenkomponenten werden getrennt und kommen zu unterschiedlichen Zeiten beim Detektor an. Im vorliegenden Fall handelt es sich um eine massenspektrometrische Detektion der Analyten, die die ermittelten Daten weiter an ein Auswertesystem leitet. Dort wird das Ergebnis in einem Chromatogramm dargestellt, indem das detektierte Signal in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen ist. Der Zeitpunkt, zu dem der Analyt beim Detektor ankommt, wird Retentionszeit genannt. Das Signal, welches in Abhängigkeit von der Zeit detektiert wird, wird als Peak dargestellt und besitzt eine bestimmte Fläche. Über die Fläche erfolgt die Quantifizierung des Analyten [16].

3.4.1 Stationäre Phase

In der HPLC werden Trennsäulen als stationäre Phase verwendet. Sie bestehen meist aus gepackten, porösen Kieselgelpartikeln, deren Korngröße im Bereich von 5 bis 10 μm liegt

[17]. Es gibt verschiedene Trennwirkungen, welche durch die unterschiedlichen Eigenschaften des Säulenmaterials zustande kommen. In der HPLC werden hauptsächlich folgende Trennmethode angewandt:

- Normalphasenchromatographie
- Umkehrphasenchromatographie

Diese beiden Trennsysteme unterscheiden sich hinsichtlich der chemischen Oberflächenbeschaffenheit der Kiesegelpartikel, welche funktionelle Gruppen aufweisen können.

Normalphasenchromatographie

Bei der Normalphasenchromatographie weist die stationäre Phase eine höhere Polarität als die mobile Phase auf, da es sich bei den funktionellen Gruppen des Kiesegels um polare Hydroxygruppen handelt.

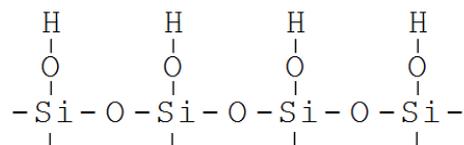


Abbildung 2: Kiesegel mit Hydroxygruppen

Durch die Polarität der Säule werden bei der Trennung die polaren Stoffe zurückgehalten und eluieren später als die unpolaren Stoffe.

Umkehrphasenchromatographie (RP Reversed Phase)

Bei der Umkehrphasenchromatographie ist die stationäre Phase unpolarer als das Elutionsmittel. Ein Vorteil bei der Verwendung von Kiesegel als eines der Trennmaterialien ist, dass die Oberfläche leicht modifiziert werden kann. Unter Abspaltung von Salzsäure wird die Octadecyldimethylsilyl-Gruppe an die Oberfläche des Kiesegels gebunden (Abb. 3).

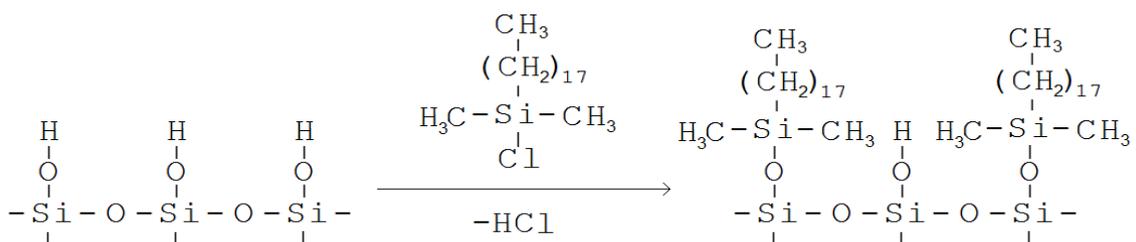


Abbildung 3: C18-Modifizierung von Kiesegel

Diese Kieselgele sind unpolar, da es sich bei der Octadecyldimethylsilyl-Gruppe um eine unpolare funktionelle Gruppe handelt. Säulen mit dieser Modifizierung werden als C18-Säulen bezeichnet, da es sich um eine Kohlenstoffkette mit 18 Kohlenstoffatomen handelt. Da diese Form der Modifizierung aus sterischen Gründen nicht alle polaren Hydroxygruppen ersetzt, kann eine weitere Modifizierung erfolgen, bei der weitestgehend alle Hydroxygruppen substituiert werden. Diesen Schritt bezeichnet man als „endcapping“. Häufig erfolgt eine Substitution mit einem kurzkettigen Molekül, wie zum Beispiel mit der Trimethylsilangruppe [16]. Dadurch wird verhindert, dass es trotz der ersten Modifizierung weiterhin zu stärkeren Wechselwirkungen mit polaren Analyten kommt. Bei der Trennung von polaren und unpolaren Analyten muss jedoch verhindert werden, dass, je nach Säule, keiner der Analyten zu früh eluiert und so womöglich in der Totzeit beim Detektor ankommt und nicht erfasst wird. Bei der SGS Institut Fresenius GmbH erfolgt die Trennung der Pestizide mit Kieselgelen, an die unpolare Kohlenstoffketten mit polaren gebunden sind. Säulen mit dieser Substitution nennt man „embedded-polar-group“-gebundene Phasen.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten, wird die Säule über einen Säulenofen temperiert, da die Temperatur Einfluss auf das Verteilungsgleichgewicht zwischen Analyt und der mobilen und stationären Phase hat. Je höher die Temperatur, desto schneller kommen die Probeanalyten beim Detektor an, während geringe Temperaturen die Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes begünstigen und sich so der Analyt langsamer über die Säule bewegt. Deshalb ist die Aufrechterhaltung einer bestimmten Temperatur für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wichtig.

3.4.2 Mobile Phase

Die mobile Phase kann aus einem oder mehreren Solvenzien bestehen [18]. Bei der Nutzung eines Lösungsmittelgemisches gibt es zwei Arten der Elution: die isokratische Elution und die Gradientenelution. Bei der isokratischen Elution bleibt die Zusammensetzung des Elutionsmittels während des gesamten Laufs konstant. Bei der Gradientenelution wird die Zusammensetzung verändert. Für die Auswahl eines geeigneten Fließmittels müssen wichtige Kriterien beachtet werden: die Probe muss im Fließmittel löslich sein, es muss sich zwischen der Probesubstanz und den beiden Phasen ein Verteilungsgleichgewicht einstellen und die Probe muss mit der mobilen Phase vollständig von der stationären Phase entfernt werden können. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Fließmittelstärke bzw. Elutionskraft. Sie gibt an, wie stark die Wechselwirkung der Probe mit dem Fließmittel ist. Eine Anordnung der Lösungsmittel nach ihrer Fließmittelstärke wird elutrope Reihe genannt [18].

Tabelle 1: Elutrope Reihe für Solvenzien nach zunehmender Polarität [17]

Lösungsmittel	Polaritätsindex	Elutionsstärke ϵ^0 (SiO ₂)
Cyclohexan	0,04	0,03
n-Hexan	0,1	0,01
Toluol	2,4	0,22
Ethanol	4,3	0,68
Methanol	5,1	0,73
Acetonitril	5,8	0,50
Wasser	10,2	stark

Die Elutionskraft ϵ^0 der Lösungsmittel wird (Tab. 1), bei einer stationären Phase aus Kieselgel, mit steigender Polarität größer. Die Fließmittelstärke ist abhängig von der verwendeten stationären Phase. Bei einer polaren stationären Phase steigt auch die Elutionskraft mit steigender Polarität des Fließmittels. Bei einer unpolaren stationären Phase besitzt jedoch das Lösungsmittel die größte Elutionskraft, welches am unpolarsten ist. Das bedeutet, die mobile und die stationäre Phase treten in Konkurrenz um den Probeanalyten. Bei der Wahl des Fließmittels sollte jedoch beachtet werden, dass sich zwischen beiden Phasen und dem Probeanalyten ein Verteilungsgleichgewicht einstellen muss. Deshalb sollte die Elutionskraft einerseits nicht zu groß sein, andererseits den Analyten jedoch immer noch vollständig von der Säule abtragen. Vor Verwendung muss das Fließmittel frei von gelösten Gasen sein, da es bei einer Blasenbildung zur Störung im Detektor kommen kann, was durch die Verwendung eines Ultraschallbades bei der Herstellung des Fließmittels sowie durch einen HPLC-internen Entgaser geschehen kann.

3.4.3 Modifier

Bei Modifiern handelt es sich um Substanzen, die die Eigenschaften des Fließmittels für die Analyse verändern. Am häufigsten werden Stoffe verwendet, die den pH-Wert beeinflussen. Je nach verwendeter Säule und zu analysierenden Analyten ist eine Protonierung oder Deprotonierung des Analyten erwünscht. Beispielsweise werden Basen im sauren Milieu protoniert, während der Dissoziation von Säuren entgegengewirkt wird. Bei einer RP-Phase würde der saure Analyt somit früher eluieren, da der Wechselwirkung mit der stationären Phase entgegengewirkt wird.

3.5 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eines der wichtigsten Verfahren in der Pestizidrückstandsanalytik. Das Prinzip ist die Erzeugung gasförmiger Ionen aus den Analytmolekülen der zu untersuchenden Probe, welche dann nach ihrer Ladung und Masse getrennt werden. Ein Massenspektrometer hat folgenden Aufbau (Abb. 4):

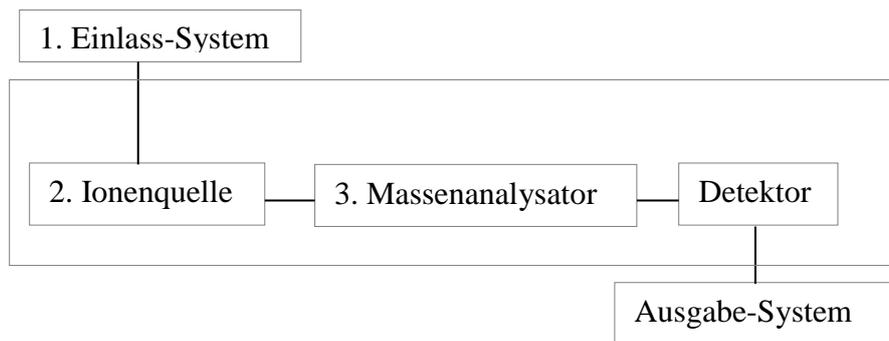


Abbildung 4: Allgemeiner Aufbau eines Massenspektrometers

Durch das Einlass-System wird die Probe für die Abläufe im Massenspektrometer vorbereitet und diesem zugeführt. In der Ionenquelle kommt es zur Ionisierung der Probeanalyten, wodurch positive oder negative Ionen entstehen können. Dieses Ionengemisch wird im Massenanalysator beschleunigt und zu einem Ionenstrahl gebündelt. Anschließend erfolgt die Trennung der Ionen mithilfe von unterschiedlichen Analysator-Trennverfahren. Die Ionen werden bis zum Detektor weitergeleitet, dort registriert und das erfasste Signal weiter an das Ausgabesystem geleitet. Die Schritte vom Analysator bis zum Detektor finden im Hochvakuum statt, da Ionen ansonsten mit den in der Luft enthaltenen Molekülen zusammenstoßen würden. In vielen Fällen arbeitet die Ionenquelle ebenfalls im Hochvakuum, vereinzelt jedoch auch unter Atmosphärendruck (101 325 Pa) [19].

Bei der SGS Institut Fresenius GmbH erfolgt die massenspektrometrische Analyse mit dem AB Sciex QTrap® 5500. In den folgenden Kapiteln werden das verwendete Einlass-System, die Ionenquelle sowie der verwendete Massenanalysator genauer beschrieben.

3.5.1 Einlass-System

Die Probe wird durch das Einlass-System nicht nur dem Massenspektrometer zugeführt, sondern auch für die erforderliche Messung vorbereitet. Dazu bestehen 3 Möglichkeiten zur Probeneinführung: das Verdampfen der Probe vor der Ionisation (indirekter Einlass), das Überführen in die Gasphase von festen oder flüssigen Proben durch die Ionenquelle (direkter Einlass) und das Zerstäuben der flüssigen Probe zu einem Nebel, aus dem die Ionen in die

Gasphase übergehen (Spray-Verfahren). Die Wahl der Probeneinführung ist von der Beschaffenheit der Probe und der genutzten Ionenquelle abhängig [19].

In der vorliegenden Arbeit wird das Spray-Verfahren als Einlass-System verwendet, da die Probe in gelöster Form vorliegt. Diese wird im Zusammenhang mit der Ionenquelle beschrieben, da die Probeneinführung und die Ionisierung fließend ineinander übergehen.

3.5.2 Ionenquelle

Das Prinzip der Ionisierung ist die Gewinnung von Ionen durch die Zerstörung von Probenmolekülen, was durch verschiedene Ionisierungsverfahren geschehen kann. Prinzipiell wird jedoch eine Zufuhr von einer Mindestenergie erfordert, um aus dem höchstbesetzten Orbital des Probenmoleküls Elektronen zu entfernen. Bei der Elektronenstoß-Ionisation wird beispielsweise ein Elektronenstrahl erzeugt, der Elektronen aus dem Probenmolekül herausstößt oder Elektronen auf unbesetzte Orbitale hinzufügt. So entstehen negativ oder positiv geladene Ionen. Einem ähnlichem Prinzip folgt die Oberflächenionisation. Dabei wird die Probe auf ein Trägermodul gegeben und auf dessen Oberfläche mit einem Laserstrahl beschossen, wodurch die Probe in Ionen zerfällt. Es bestehen weitere Ionenquellen, jedoch liegt das Hauptaugenmerk auf der Elektrospray-Ionisation, da sie bei der SGS Institut Fresenius GmbH zur Untersuchung von Pestizidrückständen Anwendung findet.

Bei der Elektrospray-Ionisation wird die Probe durch das Spray-Verfahren in die Ionenquelle gegeben. Die Substanz, welche in einem flüchtigen Lösungsmittel gelöst ist, wird dabei durch eine dünne Metallkapillare gegeben, an der eine Spannung angelegt ist. Die Zudosierung der Lösung erfolgt mit einer Geschwindigkeit von weniger als einem Milliliter pro Minute in eine am Massenspektrometer außen angebrachte Kammer. Durch die entgegengesetzte Zuführung eines Stickstoffstroms und der angelegten Spannung kommt es zur Tröpfchenbildung, welche je nach angelegter Spannung einen Überschuss an positiv oder negativ geladenen Ionen aufweisen. Die Tröpfchen wandern durch das elektrische Feld zu einer Gegenelektrode, in diesem Fall das Curtain Plate, und dabei verdampft das Lösemittel, wodurch sich der Tröpfchenradius verkleinert. Die gleich geladenen Ionen stoßen sich gegenseitig ab, es kommt zur Auflösung der Tröpfchen und durch ein Hochvakuum im Massenspektrometer werden die Ionen durch eine Öffnung (Orifice), eingesaugt [20]. Bei der Ionisierung mittels Elektrospray-Ionisation können positive und negativ geladene Ionen gebildet werden, was von der angelegten Spannung an der Metallkapillare abhängig ist. Im Negativ-Ionenmodus wird eine

negative Spannung angelegt und es bilden sich negative Ionen, während im Positiv-Modus umgekehrt verfahren wird.

Ionenarten

Bei der massenspektrometrischen Untersuchung können Moleküle und Ionen fragmentiert werden. Die Art der entstandenen Ionen hängt ebenfalls von der Ionenquelle ab. Bei der Ionisierung von Molekülen können beispielsweise Molekülionen, Quasi-Molekülionen und mehrfach geladenen Ionen entstehen. Molekülionen, dargestellt als M^+ , sind Radikale, da sie ein nicht gepaartes Elektron und somit eine kurze Lebensdauer besitzen. Sie können beispielweise bei der Elektronenstoßionisation (EI) entstehen. Die EI wird ebenfalls in Tandem-MS verwendet, um Molekülionen zu weiteren Ionenfragmenten zu spalten. Besitzt ein Ion mehrere positive Ladungen, so bezeichnet man diese als mehrfach geladene Ionen. Sie können, wie die Quasi-Molekülionen, bei der Elektrospray-Ionisation entstehen. Quasi-Molekülionen werden beispielsweise als $[M+H]^+$ (Protonierung) oder $[M-H]^-$ (Deprotonierung) dargestellt [19, 21].

3.5.3 Massenanalysator

Nachdem Ionen bestimmter Ladung gebildet wurden, werden sie im Massenanalysator nach ihrer Masse getrennt. Dafür müssen die Ionen, mithilfe von elektrischen Feldern, beschleunigt werden. Die Ionen fügen sich dadurch zu einem Ionenstrahl zusammen und können getrennt werden [19].

Bei der SGS Institut Fresenius GmbH erfolgt die Ionentrennung mithilfe von Triple-Quad-Analysatoren. Ein Quadrupol besteht aus 4 Metallstäben, welche parallel und im Quadrat positioniert sind. An zwei diagonal benachbarte Stäbe wird eine Wechselspannung angelegt, wodurch sich im Raum zwischen den Stäben abwechselnd ein positiv oder negativ geladenes Feld bildet. Gleichzeitig erfolgt das umgekehrte Anlegen einer Wechselspannung an den beiden anderen Metallstäben. Je nach Ladung der Ionen bewegen diese sich im Raum zwischen den Stäben oder auf diese zu. In Abhängigkeit von der Frequenz wandern die Ionen zwischen den Stäben hin und her und werden je nach Ionenmasse stärker oder schwächer von der Mitte des Stabsystems abgelenkt. Dadurch wird erreicht, dass nur Ionen einer bestimmten Masse durch den Quadrupol geleitet werden und so getrennt zum Detektor gelangen.

Das Triple-Quad-Massenspektrometer besteht aus 3 hintereinander geschalteten Quadrupolen. Die Verwendung von zwei Analysator-Einheiten bezeichnet man als Tandem-Massenspektrometer (MS/MS). Bei dem Triple-Quad-Analysator findet im ersten Quadrupol

die Ionentrennung (MS1) statt. Die Ionen werden zum zweiten Quadrupol weitergeleitet, dort durch Elektronenstoßionisation fragmentiert und im dritten Quadrupol erneut getrennt und analysiert (MS2) [19]. Diese Analysator-Schaltung wird auch als *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) bezeichnet. Bei dieser Analyse können Analyten spezifischer nachgewiesen werden, da die erneute Ionisierung Ionen erzeugt, die mit größerer Sicherheit dem Analyten zugeordnet werden können. Dabei spricht man von Massenübergängen des Analyten.

3.5.4 Detektor

Die Ionen können in der Massenspektrometrie mit verschiedenen Detektoren erfasst werden. Die am häufigsten angewandten Detektoren sind Elektronenvervielfacher, Faraday-Detektoren und die Registrierung auf einer Photoplatte. Beim Farady-Detektor nehmen mehrere Auffänger die Bewegungsenergie der Ionen auf und wandeln diese in elektrische Energie um. Bei der Photoplatte schlagen die Ionen auf eine Platte auf, was zur Schwärzung führt. Die Intensität der Schwärze kann durch ein Linienspektrum wiedergegeben werden. Die erfassten Daten der Detektoren sind immer proportional zur Menge an Ionen.

Der Sekundärelektronenvervielfacher soll in der vorliegenden Arbeit genauer beschrieben werden. Dabei handelt es sich um in Kaskaden angeordnete Dynoden, auf die die Ionen auftreffen und dadurch ein bestimmtes Vielfaches an Sekundärelektronen erzeugen. Diese Elektronen treffen wiederum auf die nächste Dynode auf und schlagen dort ebenfalls ein bestimmtes Vielfaches an Elektronen heraus. Durch diese Kaskade kommt es zu einer Signalverstärkung und zur Ausbildung einer Stromstärke, welche proportional zur Ionenkonzentration gemessen werden kann.

3.6 Gekoppeltes LC-MS/MS-Verfahren

Da es sich bei der QuEChERS-Methode um eine Multimethode handelt, kann eine Vielzahl an Analyten aus der Lebensmittelprobe extrahiert werden. Bei einer unbekannt Probe wäre es möglich, mit dem Massenspektrometer einen großen Bereich an Ionen zu erfassen und zu analysieren. Jedoch weisen Massenspektrometer eine begrenzte Registrierung der analytischen Signale innerhalb einer Messung auf. Somit gehen viele Signale verloren, welche beispielsweise bei der Quantifizierung sehr wichtig sind. Bei zu wenigen Signalen kann keine präzise Bestimmung der Signalintensität und somit der Analytkonzentration gemacht werden,

weshalb eine separate Quantifizierung der einzelnen Analyten optimal ist. Bei einer Vielzahl an bekannten Analyten in einer Probe werden diese deshalb getrennt, damit sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Massenspektrometer auftreffen. Dazu kann das Massenspektrometer an Trennsysteme, wie beispielsweise der Flüssigchromatographie, gekoppelt werden (LC-MS/MS). Das bedeutet, der Analysezeitpunkt der Analyten ist abhängig von der Retentionszeit. Damit die Analyten von der HPLC-Anlage direkt in das Massenspektrometer eingebracht werden können, wird ein sogenanntes Interface benutzt. Von der HPLC gelangt die Probe zum Ionisierungsraum der ESI-Ionenquelle. Dort ist eine Interfaceplatte (Curtain Plate) mit einer Mikroöffnung eingebaut. Zwischen dieser Interfaceplatte und dem Orifice des Massenspektrometers wird ein Stickstoffstrom durchgeleitet, der mit nicht ionisierten Molekülen der Probe kollidiert und verhindert, dass diese in das Massenspektrometer gelangen. Dieses Gas bezeichnet man als Curtain Gas, welches die Aufgabe eines Vorhangs einnimmt und dadurch das Massenspektrometer, trotz hoher Probenzufuhr, vor starker Verschmutzung schützt.

3.7 Validierung einer analytischen Methode des gekoppelten LC-MS/MS Verfahrens im Zusammenhang mit der QuEChERS-Probenaufbereitung

Eine Validierung im Sinne der DIN EN ISO 17025 bestätigt, dass spezielle Forderungen für bestimmte und gezielte Anwendungen erfüllt werden. Diese Bestätigung erfolgt mittels einer Untersuchung und Erbringung eines Nachweises, dass die QuEChERS-Methode Pestizidrückstände in fetthaltigen Lebensmitteln qualitativ und quantitativ zuverlässig bestimmt. Die Methodvalidierung beginnt mit der Erstellung eines Validierungsplans, in dem die zu validierende Methode beschrieben wird und welche Analyten hinsichtlich der Validierung untersucht werden. Im Allgemeinen erfordert die Validierung einer analytischen Methode die Untersuchung hinsichtlich Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Richtigkeit, Präzision sowie Selektivität [22, 23].

Linearität

Unter dem Begriff *Linearität* wird die direkte Proportionalität einer Messgröße, in diesem Fall die Peakfläche, und der Analytkonzentration verstanden [24]. Dazu werden Kalibrierlösungen bestimmter Pestizidkonzentration hergestellt und analysiert. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Konzentration der Bestimmungsgrenze im Bereich zwischen der ersten und

letzten Konzentration der Kalibrierlösungen liegt. Mit Hilfe der erhaltenen Signalstärke der jeweiligen Lösung wurde eine lineare Kalibrierfunktion errechnet.

Als Akzeptanzkriterium wurde die Erfüllung des Linearitätstests nach Mandel gesetzt. Dabei wird geprüft, ob sich die Messergebnisse an eine lineare oder quadratische Funktion annähern.

Lineare Funktion: $y = a + bx$

Quadratische Funktion: $y = a + bx + cx^2$

Der Linearitätstest nach Mandel wird mithilfe der Qualitätssicherungs- und Statistiksoftware QSM (Qualitätssicherung mit statistischen Methoden) Netzwerkversion 4.01 durchgeführt. Zur Bestätigung der Linearität müssen mindesten fünf Kalibrierpunkte unterschiedlicher Konzentration in der Geraden vorhanden sein.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wird auch als Limit of quantitation (LOQ) bezeichnet. Sie gibt die kleinste Analytkonzentration an, die mit einer bestimmten Genauigkeit quantifiziert werden kann. Bei der Nachweisgrenze handelt es sich um die kleinste Konzentration, die eine qualitative Bestimmung des Analyten zulässt. Sie wird auch als Limit of detection (LOD) bezeichnet. Vor der Analyse wird die erforderliche Bestimmungsgrenze abgeschätzt. Anschließend erfolgt die Ermittlung des Signal-Rausch-Verhältnisses S/N um den Analytenpeak, zur Bestätigung der Bestimmungsgrenze.

$$S/N = \frac{H}{h_n}$$

S/N - Signal-Rausch-Verhältnis
 H - Signalthöhe
 h_n - Rauschen

Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgt unter der Annahme eines Signal-Rausch-Verhältnisses von 3:1, beziehungsweise ein Drittel des Wertes der Bestimmungsgrenze [22,23].

Des Weiteren wird die Bestimmungsgrenze durch die Kalibriergeraden bestätigt beziehungsweise widerlegt. Sie gibt den Arbeitsbereich für zukünftige Routinemessungen an.

Die zu quantifizierenden Analytkonzentrationen dürfen nicht unter der Bestimmungsgrenze liegen.

Richtigkeit

Die Überprüfung der Richtigkeit kann über verschiedene Methoden erfolgen. Es können Proben analysiert werden, deren Gehalt bereits bekannt ist (Referenzmaterial) oder Proben, denen der Analytstandard in bestimmter Konzentration hinzugegeben wurde. Zusätzlich müssen Blank-Proben der jeweiligen Matrix vermessen und, bei Vorhandensein von Pestizidrückständen, diese von den ermittelten Konzentrationen abgezogen werden. Anhand der Wiederfindung kann die Richtigkeit bestätigt werden.

Die Wiederfindung wird wie folgt berechnet:

$$WDF [\%] = \frac{X_{ist} * 100\%}{X_{soll}}$$

- X_{ist} - Ermittelte Konzentration (Ist-Wert)
- X_{soll} - Zudotierte Konzentration (Soll-Wert)
- WDF - Wiederfindung [%]

Mit Berechnung des Mittelwerts der Wiederfindungsrate kann der Variationskoeffizient VK berechnet werden.

$$VK = \frac{s * 100\%}{\bar{x}}$$

- VK - Variationskoeffizient [%]
- s - Standardabweichung
- \bar{x} - Mittelwert

Der Mittelwert wird wie folgt berechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n x_i$$

- n - Anzahl der Messungen
- x_i - Ermittelte Messwert

Präzision

Die Präzision ist ein Maß der Genauigkeit und Robustheit der analytischen Methode. Mit ihr lässt sich bestimmen, ob die Analysemethode, bei unterschiedlichen Bedingungen, reproduzierbare Ergebnisse liefert. Es gibt drei Präzisionsparameter für die Validierung der analytischen Methode: Wiederholpräzision, intermediäre Präzision und Systempräzision.

a. Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision, beziehungsweise Wiederholbarkeit, prüft auf die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen innerhalb einer Messreihe. Dazu werden mehrere Lebensmittelproben derselben Charge mit der gleichen Konzentration dotiert und vermessen.

b. Intermediäre Präzision

Bei der intermediären Präzision handelt es sich um eine Prüfung der Reproduzierbarkeit unter Einfluss unterschiedlicher Bedingungen. Dabei kann es sich um einen zweiten Mitarbeiter, die Nutzung eines anderen Messgerätes oder die Durchführung an einem anderen Tag handeln. Es werden aus den Messungen die Wiederfindung, dessen Mittelwert, die Standardabweichung sowie der Varianzkoeffizient berechnet. Die Standardabweichung s wird wie folgt berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{(\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$$

c. Systempräzision

Mit der Systempräzision wird die Genauigkeit und Robustheit der Messinstrumente bestimmt. Dazu wird ein und dieselbe Probe mehrfach gemessen und erfasst, in wie weit die Werte vom Mittelwert abweichen.

Selektivität

Die Selektivität gibt an, ob die Bestimmung von einer Vielzahl von unterschiedlichen Analyten gleichzeitig möglich ist. Die Analyten stören sich gegenseitig nicht und lassen sich qualifizieren und quantifizieren.

4 Untersuchungen

4.1 QuEChERS-Methode für nicht fetthaltige Lebensmittel

Die QuEChERS-Methode ist eine *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* (L 00.00-15, amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB) und findet bei der SGS Institut Fresenius GmbH Anwendung für den Nachweis von Pestiziden in Lebensmitteln, die einen hohen Wasseranteil und nur sehr geringen bis gar keinen Fettanteil aufweisen. Das Grundprinzip der QuEChERS-Methode basiert auf der Extraktion der Pestizidrückstände mit dem Lösungsmittel Acetonitril unter Zugabe von bestimmten Salzen und einer anschließenden Aufreinigung, auch bezeichnet als Cleanup, durch dispersive Festphasenextraktion (Solid phase extraction - SPE). Der Schritt des Cleanup soll alle störenden Matrixbestandteile entfernen. Die Extraktion mit Acetonitril erfordert ein ungefähres 1:1-Verhältnis vom Wassergehalt in der Probe und dem zugegebenen Acetonitril. Das bedeutet, bei einem Wassergehalt von weniger als 80% in der Lebensmittelprobe, wird zusätzlich Wasser zugegeben. Im Folgenden werden alle Schritte der QuEChERS-Methode für nicht fetthaltige Lebensmittel beschrieben.

1. Homogenisierung der Lebensmittelprobe

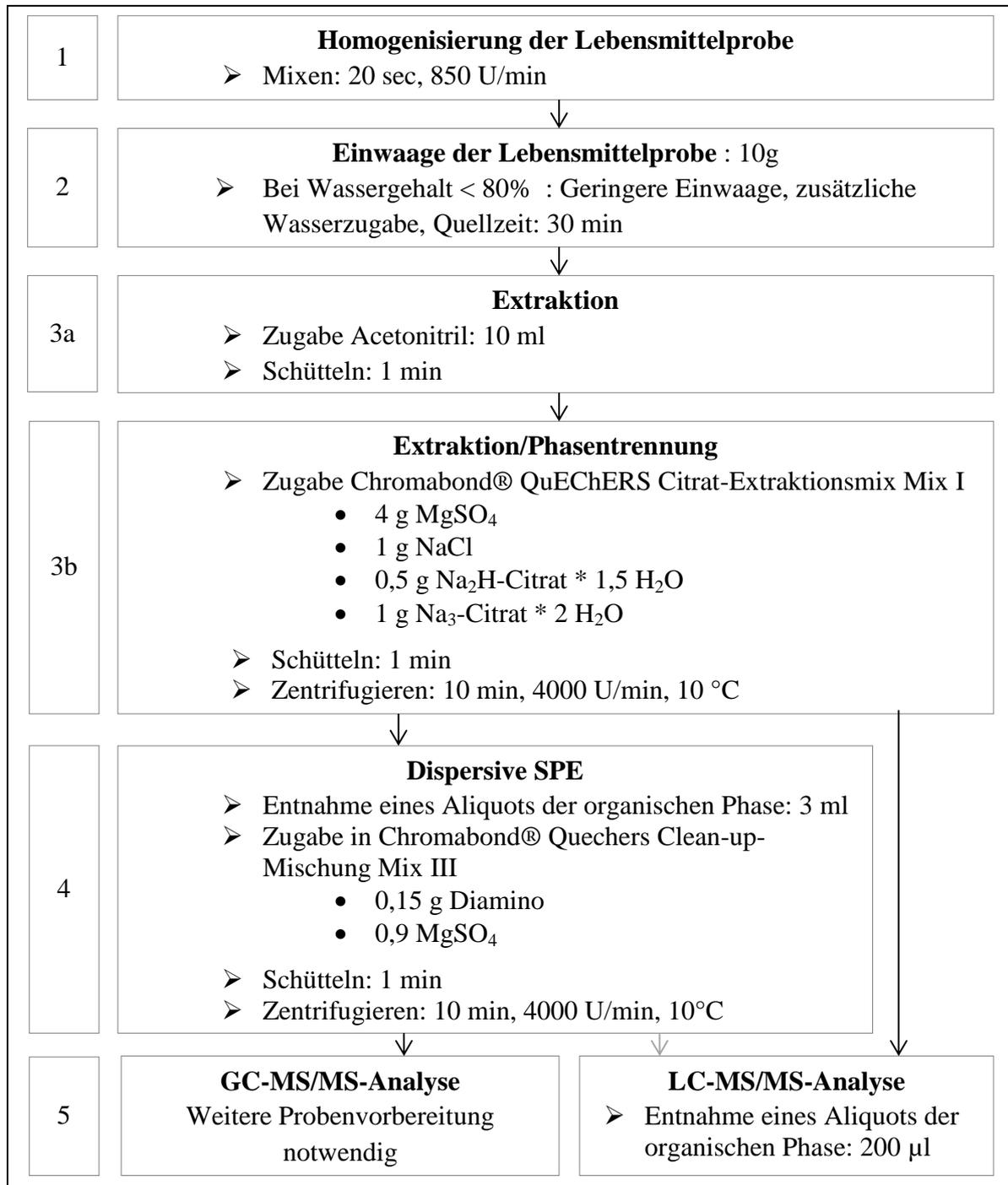
Damit eine optimale Extraktion der Pestizidanalyten gewährleistet ist, muss die zu untersuchende Lebensmittelprobe homogen sein. Des Weiteren muss die geringe Einwaage repräsentativ für den kompletten Lebensmittelbatch sein. Die Homogenisierung (1) erfolgt durch die Probenzerkleinerung mithilfe eines Mixers. Die Probe wird dabei für 20 Sekunden bei 850 U/min zerkleinert und vermischt. Ein wichtiger Aspekt bei der Probenhomogenisierung ist, dass die Proben durch die Rotation nicht zu stark erwärmt werden, da bestimmte Pestizide hitzeempfindlich sind und so zerstört werden können.

2. Einwaage der Lebensmittelprobe

Anschließend werden 10 g der homogenen Probe in ein 50 ml – Zentrifugenröhrchen eingewogen. Sollte es sich dabei um eine Probe handeln, die weniger als 80% Wassergehalt hat, wird die Einwaage, bezogen auf den Wassergehalt angepasst, zusätzlich Wasser zugegeben und geschüttelt. Beispielsweise werden von Getreideproben 5 g eingewogen und anschließend werden 10 ml Wasser ergänzt. Bestimmte Proben weisen bereits in diesem Schritt sehr geringe pH-Werte auf, weshalb eine Zugabe von Natriumhydroxid erforderlich

ist, bis sich ein pH-Wert von 7 einstellt. Auch ein pH-Wert darüber sollte verhindert werden, da es sonst zum Zerfall einiger Pestizidanalyten kommen kann.

Diagramm 1: Fließschema der QuEChERS-Methode für nicht fetthaltige Lebensmittel [38]



3. Extraktion und Phasentrennung

Bei dem Arbeitsschritt *Extraktion* handelt es sich um eine Flüssig-Flüssig-Extraktion. Es handelt sich bei den zu extrahierenden Pestiziden um leicht (100-1000 g/l), wenig (10-33 g/l) und sehr schwer in Wasser lösliche Analyten (0,1-33 g/l). Größtenteils sind jedoch alle

Pestizide gut in organischen Lösungsmitteln löslich. Als Extraktionsmittel wird ebenfalls ein organisches Lösungsmittel verwendet. Dabei hat sich das Lösungsmittel Acetonitril bewährt, da es gut mit Wasser mischbar ist und eine mittlere Polarität aufweist, sodass sich eine Vielzahl an Pestizidmolekülen darin löst. Des Weiteren ist für eine spätere Phasentrennung, wie im Falle einer Aceton-Extraktion, kein zusätzliches unpolares Lösungsmittel notwendig, sondern kann durch die Zugabe von verschiedenen Salzen hervorgerufen werden [25]. Zusätzlich ist Acetonitril selektiv für die Pestizidanalyten und extrahiert nur wenige Lebensmittelbestandteile [25]. Es wird für die Herstellung der Pestizidstandardlösungen Acetonitril verwendet, weshalb eine Extraktion in diesem Lösungsmittel am repräsentativsten ist. Deshalb wird der Probe für die Extraktion 10 ml Acetonitril zugegeben und für eine Minute geschüttelt. Für eine optimale Extraktion sollten die Komponenten Wasser und Acetonitril im Verhältnis 1:1 vermischt werden. Es handelt sich in diesem Fall um eine Flüssig-Flüssig-Extraktion, da die lipophilen Pestizide aus der wässrigen Phase in die organische Phase übergehen [26]. Da Acetonitril jedoch vollständig mit Wasser mischbar ist, findet zunächst keine Phasentrennung und deshalb keine Verteilung der Analyten in den unterschiedlichen Lösungsmitteln statt. Zusätzlich ist die Löslichkeit einiger Pestizide in Wasser größer als in Acetonitril und würden somit nicht nachweisbar sein. Deshalb erfolgt im Schritt *Extraktion/Phasentrennung* die Zugabe von 0,5 g Dinatriumhydrogencitrat Sesquihydrat ($\text{Na}_2\text{H-Citrat} \cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$), 1g Trinatriumcitrat Dihydrat ($\text{Na}_3\text{-Citrat} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$), 1 g Natriumchlorid (NaCl) und 4 g Magnesiumsulfat (MgSO_4). Dinatriumhydrogencitrat Sesquihydrat und Trinatriumcitrat Dihydrat sind wasserhaltige Salze der Citronensäure. Sie wirken als pH-Puffer in der Lösung. Dinatriumhydrogencitrat Sesquihydrat ist ein weißes kristallines Pulver, welches in wässriger Lösung zu einem pH-Wert von 4,5 – 5,5 führt [27].

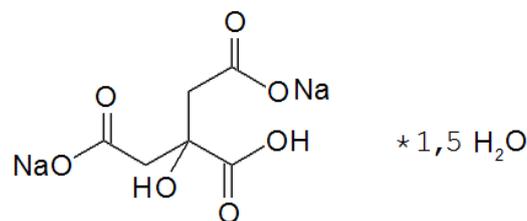


Abbildung 5: Strukturformel Dinatriumhydrogencitrat Sesquihydrat

Trinatriumcitrat Dihydrat ist ein weißer, geruchloser Feststoff der in wässriger Lösung einen pH-Wert von 7,9 – 9,5 puffert [28].

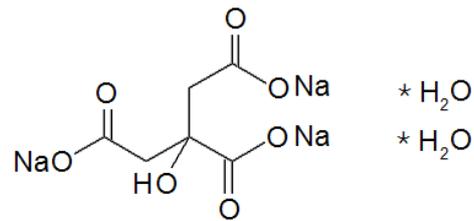


Abbildung 6: Strukturformel Trinatriumcitrat Dihydrat

Werden die beiden Citratsalze in Kombination zur Probe zugegeben, stellt sich ein leicht saurer pH-Wert ein, bei dem die Extraktion saurer Herbizide gewährleistet ist und sich base- und säureempfindliche Pestizide nicht abbauen. Natriumchlorid und Magnesiumsulfat führen zum Aussalzeffekt und die hydrophilen Pestizidmoleküle gehen in die organische Phase über [26]. Die dissoziierten Salze binden Wassermoleküle und es kommt zur Hydratisierung.

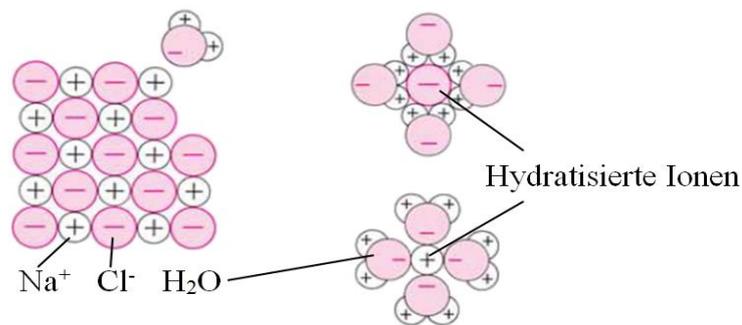


Abbildung 7: Hydratisierung der Salzionen am Beispiel von NaCl [29]

Durch den Aussalzeffekt kommt es zur Sättigung der wässrigen Phase, wodurch deren Dichte erhöht und eine Phasentrennung der beiden Lösungsmittel erreicht wird [30]. Magnesiumsulfat ist eine stark hygroskopische Substanz, die als Trockenmittel eingesetzt wird und hier die Entfernung von wässrigen Rückständen aus der organischen Phase bewirkt [31]. Beispielsweise bindet wasserfreies Magnesiumsulfat bis zu 12 Wassermoleküle [32]. Dieses Gemisch wird eine Minute geschüttelt, damit es zu einer schnellen Dissoziation der Salze und Verteilung der Pestizidanalyten kommt. Dieser Vorgang ist exotherm, da die Hydratationsenthalpie von den Ionen der zugegebenen Substanzen höher ist als die benötigte Gitterenergie zum Dissoziieren der Moleküle. Damit es zu keiner Zerstörung der Pestizidwirkstoffe durch die Temperaturerhöhung kommt, erfolgt die anschließende Zentrifugierung bei einer Temperatur von 10°C über 10 Minuten bei 4000 U/min und damit zur Phasentrennung. Bei der SGS Institut Fresenius GmbH erfolgt nach diesem Schritt bereits die Probennahme zur Analyse mittels LC-MS/MS. Noch vorhandene Störstoffe können durch Flüssigchromatographie ausreichend abgetrennt werden und stören die Analyse der Pestizide

nicht. Für die GC-MS/MS-Methode muss jedoch der Aufreinigungsschritt mittels dispersiver Festphasenextraktion durchgeführt werden, da die Gaschromatographie empfindlicher gegenüber Störstoffen ist als die Flüssigchromatographie.

4. Dispersive Festphasenextraktion

Bei dem Schritt der dispersiven Festphasenextraktion werden von der organischen Phase 3 ml entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen, welches 0,15 g primäre und sekundäre Amine auf Siliziumdioxid (PSA), die Diaminophase, sowie 0,9 g Magnesiumsulfat enthält, gegeben. Unter dispersiver Festphasenextraktion versteht man die Bindung bestimmter Stoffe aus einer flüssigen Probe an eine feste Phase. Die feste Phase liegt jedoch nicht gepackt als Säule, sondern als Suspension vor. Bei der festen Phase handelt es sich in diesem Fall um modifiziertes Kieselgel, welches primäre und sekundäre Amine gebunden hat. Das Kieselgel selbst besitzt normalerweise Hydroxygruppen als funktionelle Gruppe. Bei einer Modifizierung werden jedoch die Hydroxygruppen mehr oder weniger von primären und sekundären Aminogruppen ausgetauscht. Chemisch gesehen handelt es sich bei Aminen um Ammoniakderivate. Je nach Substitutionsgrad der Wasserstoffatome des Ammoniaks, können die Amine in primäre, sekundäre und tertiäre Amine eingeteilt werden. Die Substitution der Wasserstoffatome erfolgt durch organische Molekülgruppen wie zum Beispiel Alkylreste. In Tabelle 2 sind die allgemeinen Strukturformeln von primären und sekundären Aminen aufgezeigt [33].

Tabelle 2 : Allgemeine Strukturformel primärer und sekundärer Amine

	Strukturformel
Primäre Amine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{R}-\text{N} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$
Sekundäre Amine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{R}-\text{N} \\ \diagdown \\ \text{R} \end{array}$

Diese Moleküle sind als funktionelle Gruppen an die Oberfläche des Kieselgels gebunden. In Abbildung 8 8 ist ein Beispiel für ein Kieselgel mit einem primären und einem sekundären Amin dargestellt.

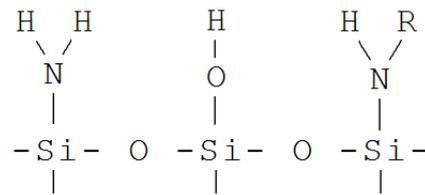


Abbildung 8: Modifiziertes Kieselgel mit primärem Amin (links) und sekundärem Amin (rechts)

Kieselgele mit primären und sekundären Aminen entfernen hauptsächlich polare Stoffe wie Zucker, organische Säuren und Farbstoffe. Primäre Amine reagieren beispielsweise mit Aldehyden. Dabei kommt es zur Additionsreaktion des primärenamins an die Aldehydgruppe und es bildet sich eine Schiff'sche Base.

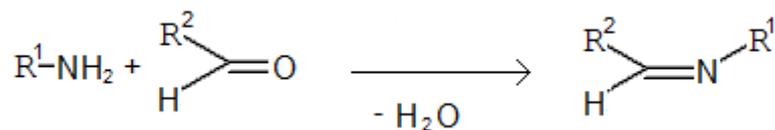


Abbildung 9: Additionsreaktion des primärenamins an eine Aldehydgruppe

Diese Reaktion kann auf reduzierende Zucker übertragen werden, da diese ebenfalls eine Aldehydgruppe enthalten. Außerdem bilden sich zwischen den Wasserstoffatomen der Zucker und der Diamino-Einheit Wasserstoffbrückenbindungen, wodurch die Zucker ebenfalls gebunden werden. Des Weiteren können Amine durch Anionenaustauschereffekte organische Säuren binden. Dabei bindet sich das Anion der Säure an die Aminogruppe unter Abspaltung von Wasserstoffionen. Beispielsweise können so Fruchtsäuren oder dissoziierte Farbstoffe aus der Lebensmittelmatrix entfernt werden. Das Problem bei der Verwendung der Diaminophase ist, dass sich saure Pestizidgruppen ebenfalls an die Phase binden und somit die Wiederfindung verringert ist. Damit es zu keiner Störung durch Rückstände von Wasser kommt, befindet sich in dem Cleanup-Mix ebenfalls Magnesiumsulfat, welches das Wasser bindet. Diese Mischung wird eine Minute lang geschüttelt und anschließend 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Bei dem Überstand handelt es sich um die aufgereinigte Probe, die mittels GC- oder LC-MS/MS analysiert wird.

4.2 Modifizierte QuEChERS-Methode für fetthaltige Lebensmittelproben

Die Problematik bei der Pestizidrückstandsanalyse in fetthaltigen Lebensmitteln liegt darin, dass die Fettbestandteile die Wiederfindung von Pestiziden beeinflussen können und die zur Analyse verwendeten Geräte verschmutzen können. Chemisch gesehen handelt es sich bei

Fetten, beziehungsweise fetten Ölen, um mit Glycerol veresterte Fettsäuren (Triacylglycerole). Die in Lebensmittel vorhandenen Fettsäuren sind vorwiegend unverzweigte Kohlenstoffketten mit einer Säuregruppe. Fettsäuren, die nur Einfachbindungen zwischen den Kohlenstoffen aufweisen nennt man gesättigte Fettsäuren, während Fettsäuren mit Doppelbindungen als ungesättigt bezeichnet werden. Fette sind unpolare Substanzen, weshalb der Aufreinigungsschritt mit der Diaminophase nicht ausreicht, da diese nur polare Substanzen bindet und die Fette aus dem Extrakt nicht entfernt würden. Deshalb muss dieser Schritt für die Validierung verändert werden. In wissenschaftlichen Artikeln wurde bereits über die Untersuchungen hinsichtlich der Pestizidrückstandsanalytik in fetthaltigen Lebensmitteln berichtet. Cunha et al [34] befassen sich in „Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticides residues in olives“ mit der Untersuchung von Pestizidrückständen in Oliven und Olivenöl. Darin wird in der Probenvorbereitung der Schritt des Cleanup mit einer Mischung aus PSA, Magnesiumsulfat und C18-Kieselgelmaterial durchgeführt. Kieselgele mit dieser Modifizierung sind unpolar und wechselwirken stark mit unpolaren Stoffen. Die Wiederfindungen der untersuchten Analyten weisen trotzdem Werte im Akzeptanzbereich von 70% - 109% auf [34]. Aufgrund solcher Untersuchungen wurde bei der Anpassung der QuEChERS-Methode auf fetthaltige Lebensmittel der Cleanup-Schritt ebenfalls mit C18-Kieselgelmaterial durchgeführt. Zwischen dem C18-Material kann es zu Wechselwirkung mit sehr unpolaren Pestizidanalyten kommen. Deshalb wurde die Menge des C18-Materials so klein wie möglich gehalten. Eine Einwaage von 10 g Probe wie bisher wäre deshalb zu groß und würde bei der Aufreinigung mit nur geringen Mengen des C18-Materials keine Erfolge versprechen. Deshalb wurde die Einwaagemenge der Probe auf 2 g reduziert, wodurch auch die Materialien Magnesiumsulfat und die Diaminophase in ihren Mengen verringert werden können.

Damit fetthaltige pflanzliche Lebensmittelproben ebenso einfach und schnell für die Analytik vorbereitet werden können wie nichtfetthaltige Lebensmittel (LM), wurde die QuEChERS-Methode wie folgt verändert.

1. Homogenisierung der Lebensmittelprobe

Die Rückstandsanalyse in fetthaltigen Systemen erfordert ebenfalls eine Homogenisierung der Lebensmittelprobe.

Diagramm 2: Vergleich der QuEChERS-Methoden (Schritt: Homogenisierung)

	QuEChERS	QuEChERS für fetthaltige LM
1	Homogenisierung der Lebensmittelprobe ➤ Mixen: 20 sec, 850 U/min	

Die fetthaltigen Proben wurden ebenfalls, wenn nötig, für 20 Sekunden bei 850 U/min zerkleinert und vermischt. Dieser Schritt wurde nicht verändert.

2. Einwaage der Lebensmittelprobe

Diagramm 3: Vergleich der QuEChERS-Methoden (Schritt: Einwaage)

	QuEChERS	QuEChERS für fetthaltige LM
2	Einwaage der LM-Probe : 10g ➤ Bei Wassergehalt < 80% : Geringere Einwaage, zusätzliche Wasserzugabe, Quellzeit: 30 min	Einwaage der LM-Probe : <u>2g</u> ➤ <u>Wasserzugabe: 10ml</u> ➤ <u>Quellzeit: 30 min</u>

Der Schritt der Einwaage wurde für die fetthaltigen Lebensmittel von 10 g auf 2 g reduziert. Es wurden zu jeder Probe 10 ml Wasser gegeben, gevortext und eine Quellungszeit von 30 Minuten eingehalten. Hydrophile Pestizide gehen hier in der wässrigen Phase in Lösung, während die liophilen Pestizide in der Fettphase bleiben.

3. Extraktion und Phasentrennung

Diagramm 4: Vergleich der QuEChERS-Methoden (Schritt: Extraktion/Phasentrennung)

	QuEChERS	QuEChERS für fetthaltige LM
3a	Extraktion ➤ Zugabe Acetonitril: 10 ml ➤ Schütteln: 1 min	
3b	Extraktion/Phasentrennung ➤ Zugabe Chromabond® QuEChERS Citrat-Extraktionsmix Mix I <ul style="list-style-type: none"> • 4 g MgSO₄ • 1 g NaCl • 0,5 g Na₂H-Citrat * 1,5 H₂O • 1 g Na₃-Citrat * 2 H₂O ➤ Schütteln: 1 min ➤ Zentrifugieren: 10 min, 4000 U/min, 10 °C	

Die Arbeitsschritte (3a) *Extraktion* und (3b) *Extraktion/Phasentrennung* wurden nicht verändert. Es wurden 10 ml Acetonitril zu der Probe gegeben und 1 min geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Citrat-Salz-Mixes, welcher die gleiche Menge an Dinatriumhydrogencitrat Sesquihydrat, Trinatriumcitrat Dihydrat, Magnesiumsulfat und Natriumchlorid enthält. Durch die Zugabe von Acetonitril, lösen sich die Fettbestandteile in diesem und mit ihnen die lipophilen Pestizide. Mittels des Citrat-Salz-Mixes kommt zu Phasentrennung.

Bei nicht fetthaltigen Lebensmittelproben erfolgte nach diesem Schritt bereits die Probennahme zur Analyse mittels LC-MS/MS, da bei fetthaltigen Systemen jedoch eine Entfernung der Fettbestandteile notwendig ist, wurde anschließend der Cleanup-Schritt durchgeführt.

4. Dispersive Festphasenextraktion

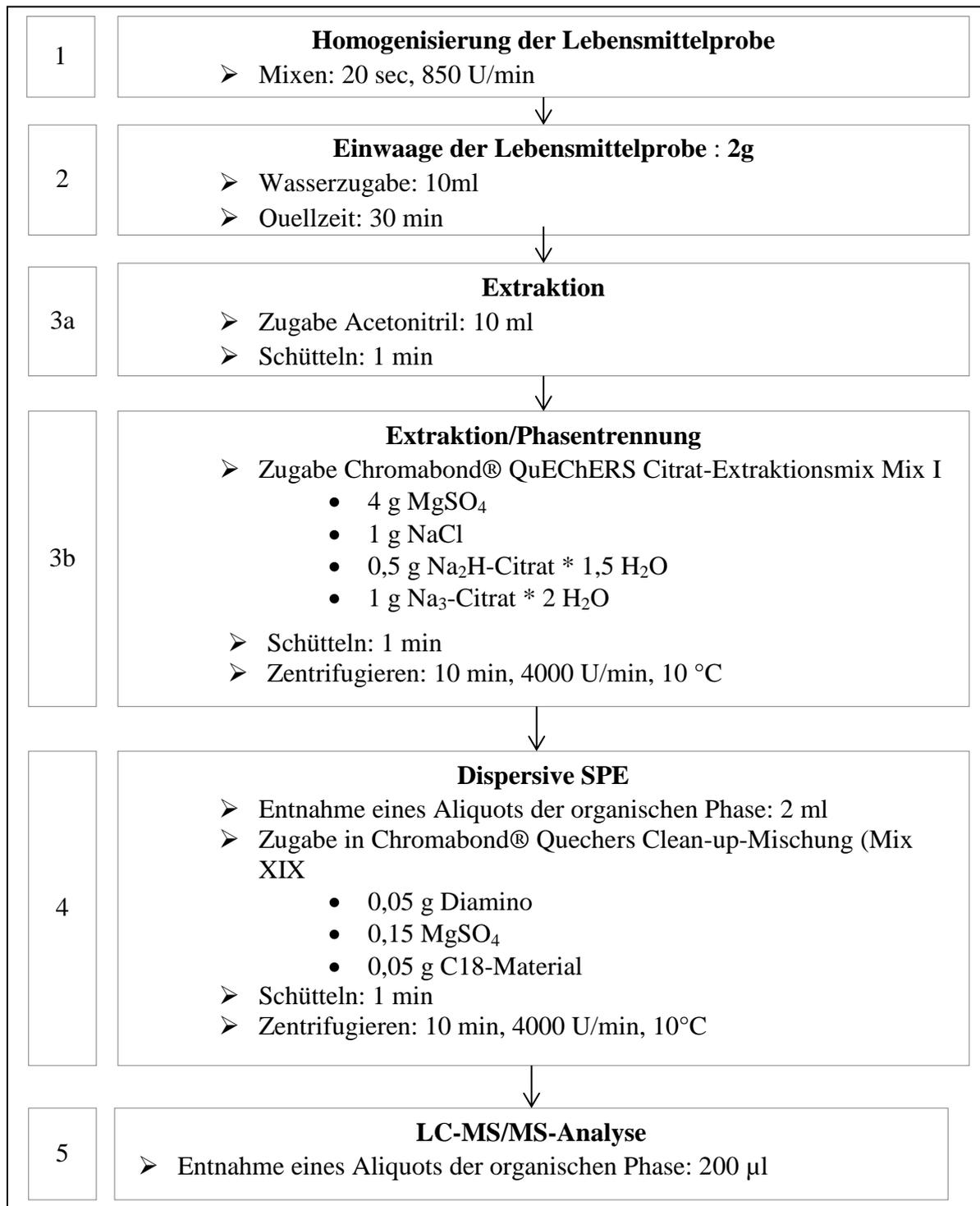
Diagramm 5: Vergleich der QuEChERS-Methoden (Schritt: dispersive SPE)

	QuEChERS	QuEChERS für fetthaltige LM
4	<p>Dispersive SPE</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Entnahme eines Aliquots der organischen Phase: 3 ml ➤ Zugabe in Chromabond® Quechers Clean-up-Mischung Mix III <ul style="list-style-type: none"> • 0,15 g Diamino • 0,9 MgSO₄ ➤ Schütteln: 1 min ➤ Zentrifugieren: 10 min, 4000 U/min, 10°C 	<p>Dispersive SPE</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Entnahme eines Aliquots der organischen Phase: <u>2 ml</u> ➤ Zugabe in Chromabond® Quechers Clean-up-Mischung Mix XIX <ul style="list-style-type: none"> • <u>0,05 g Diamino</u> • <u>0,15 g MgSO₄</u> • <u>0,05 g C18-Material</u> ➤ Schütteln: 1 min ➤ Zentrifugieren: 10 min, 4000 U/min, 10°C

Dieser Schritt wurde verändert. Es wurde ein Aliquot der organischen Phase von 2 ml anstelle von 3 ml entnommen, damit so wenig Matrixbestandteile wie möglich mitentnommen werden. Dieses Aliquot wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 0,05 g Diaminophase, 0,15 g Magnesiumsulfat und 0,05 g C18-Material gegeben. Aufgrund der geringen Einwaage des Lebensmittels von 2 g, den verhältnismäßig geringeren Mengen an Zuckern und organischen Säuren in fetthaltigen LM und dem geringen Volumen des Aliquots wurde die Menge der Diaminophase und des Magnesiumsulfats reduziert. Zur Entfernung der Fettbestandteile sind 0,05 g C18-Material im Cleanup-Mix vorhanden. Die Anlagerung der Fette an die C18-Gruppen des Kieselgels basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen. Dabei kommt es zu

Aggregation der unpolaren Molekül [35]. Die Problematik bei der Verwendung des C18-Materials ist, dass sich unpolare Pestizidmoleküle an das Kieselgel binden können. Diese Mischung wurde eine Minute lang geschüttelt und anschließend 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Bei dem Überstand handelte es sich um die aufgereinigte Probe, die mittels LC-MS/MS analysiert wird.

Diagramm 6: Zusammenfassung der veränderten QuEChERS-Methode für fetthaltige Lebensmittel



4.3 Materialien

4.3.1 Lebensmittelmatrices

Bei der Methodenvalidierung wurden pflanzliche fetthaltige Lebensmittelmatrices ausgewählt. Da die Matrix der zu untersuchenden Lebensmitteln bei der Rückstandsanalytik einen Einfluss auf die einzelnen Schritte von der Probenvorbereitung bis hin zur Analyse der Probe hat, mussten repräsentativ verschiedene Matrices ausgewählt werden. Für die Validierung wurden 6 verschiedene fetthaltige Lebensmittelmatrices ausgewählt: Kakaopulver, Kürbiskerne, Sonnenblumenöl, Sojabohnen, Sesam und Walnüsse. In der vorliegenden Arbeit wird die Auswertung der Validierung hinsichtlich der Matrices Sonnenblumenöl und Kürbiskerne stattfinden.

Sonnenblumenöl

Das Sonnenblumenöl der Firma BioPlanète (Bram, Frankreich) wird aus Sonnenblumensamen gewonnen, besitzt eine hellgelbe Farbe und gehört zu den fetten Ölen. Das Sonnenblumenöl enthält kein Wasser oder Kohlenhydrate und besitzt einen Fettgehalt von 100%.

Kürbiskerne

Die untersuchten Kürbiskerne des sterischen Ölkürbisses stammen von der Firma Alnatura Produktions- und Handels GmbH (Bickenbach, Deutschland). Sie weisen eine dunkelgrüne Färbung und einen Fettgehalt von ca. 50% auf.

4.3.2 Modellanalyten

4.3.2.1 Butoxycarboxim

IUPAC Name: 3-methylsulfonylbutanone-O-methylcarbamoyloxime

Butoxycarboxim ist ein Isomerengemisch, deren Verbindungen zu den Wirkstoffgruppen der Carbamate und Oxime zählen. Carbamate sind Ester oder Salze der Carbamidsäure [36].

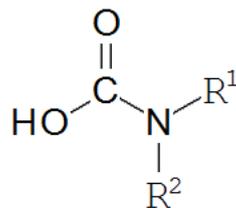


Abbildung 10: Allgemeine Strukturformel Carbamidsäure

Oxime sind oxidierte Amine, die ein chirales Stickstoffatom besitzen (Abb. 11).

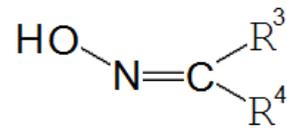


Abbildung 11: Allgemeine Strukturformel Oxim

Bei Butoxycarboxim ist an das chirale Stickstoffatom eine Carbamatgruppe mit einer Methylgruppe und einem Wasserstoff gebunden. Der Rest R³ an dem Kohlenstoffatom ist ebenfalls eine Methylgruppe und der R⁴ ist eine Ethyl-Methyl-Sulfonyl-Gruppe.

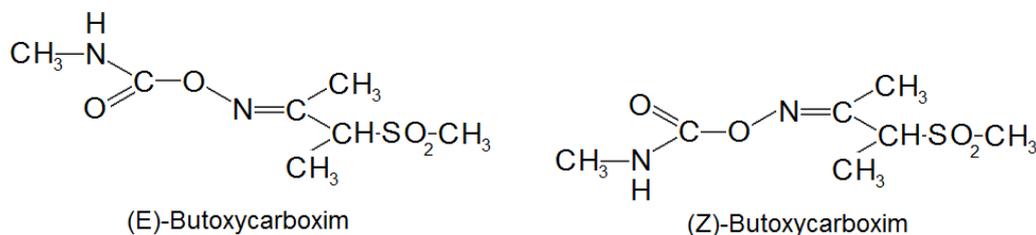


Abbildung 12: Isomere des Butoxycarboxims

Das farblose und geruchlose Kristall wird als Insektizid verwendet und ist leicht löslich in Wasser (209 g/l) und organischen Lösungsmitteln. Butoxycarboxim besitzt hinsichtlich seines Abbauprozesses eine Halbwertszeit von 501 d, im leicht sauren Milieu jedoch 18 d und 16 d im neutralen und leicht basischen Milieu. Eine temperaturabhängige Zersetzung findet bei über 100°C statt [37].

4.3.2.2 Linuron

IUPAC Name: 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea

Linuron gehört zu der Gruppe der Phenylharnstoffe. Diese besitzen eine Phenyl- und eine Methylharnstoffgruppe sowie drei Restgruppen.

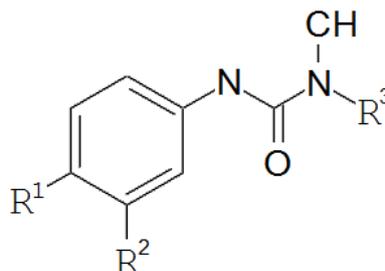


Abbildung 13: Allgemeine Strukturformel Phenylharnstoffe

Linuron enthält als R¹ und R² Chloratome am Phenylring und eine Methoxygruppe R³ am Methylharnstoff (Summenformel C₉H₁₀Cl₂N₂O₂).

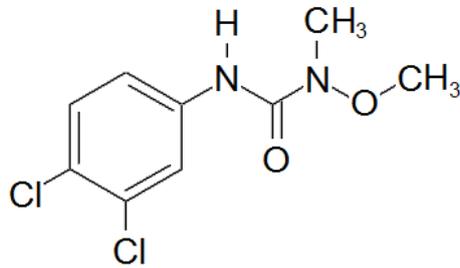


Abbildung 14: Strukturformel Linuron

Linuron bildet geruchlose, farblose Kristalle und ist mit 63,8 mg/l praktisch unlöslich in Wasser (20°C), jedoch gut löslich in organischen Lösungsmitteln (>100 g/kg). In wässriger Lösung bei pH-Wert 5,7 und 9 ist es bis zu einer Temperatur von 95°C stabil und besitzt, hinsichtlich des Abbauprozesses, eine Halbwertszeit von 945 Tagen bei allen drei pH-Werten. Linuron gehört zu den Herbiziden und wirkt als Inhibitor im Photosystem II. Dort inhibiert es den bei der Photosynthese erforderlichen Elektronentransport. Es wirkt als selektiv systemisch wirkendes Herbizid, wird vor der Aussaat der Kulturpflanze oder kurze Zeit später bei dem Feldanbau von beispielsweise Kartoffeln, Sojabohnen, Sonnenblumen, Kaffee und Tee dazugegeben und hauptsächlich über die Wurzeln und das Blattwerk aufgenommen [37].

4.3.2.3 MCPB

IUPAC Name: 4-(4-Chloro-2-methylphenoxy)butyric acid

MCPB ist eine Säure und gehört damit zu der Gruppe der sauren Herbizide.

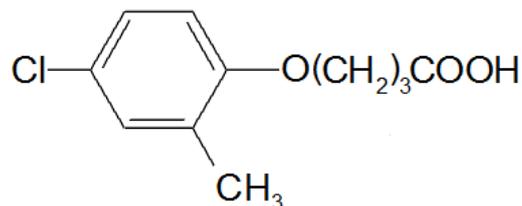


Abbildung 15: Strukturformel MCPB

MCPB bildet farblose Kristalle, welche in wässriger Lösung bei pH-Wert 5 mit 0,11 g/l sehr schwer, bei pH 7 mit 4,4 g/l schwer und bei pH 9 mit 444 g/l leicht löslich sind. In gelöster Form weist der Zerfallsprozess eine Halbwertszeit (DT₅₀) von 2,2 Tagen auf. MCPB gehört zu den Herbiziden und wirkt als Inhibitor im Photosystem II. Dort inhibiert es den bei der Photosynthese erforderlichen Elektronentransport. Es ist ebenfalls ein selektiv und systemisch wirkendes Herbizid und wird über die Wurzeln und das Blattwerk aufgenommen [37].

4.4 Analysemethode

4.4.1 LC-MS/MS - Analyseparameter

Bei der Analyse der fetthaltigen Lebensmittel wurde die HPLC-Anlage der Firma Agilent Technologies mit dem Massenspektrometer AB Sciex QTrap® 5500 gekoppelt. Für die Probennahme und -injektion wurde das PAL System der Firma CTC Analytics AG verwendet. Alle Geräte waren mit der Analyst® 1.5.2 Instrument Control and Data Processing Software der Firma AB SCIEX verbunden. Über diese Software wurden alle Analyseparameter eingestellt und automatisch von den Geräten übernommen. Der Autosampler des Typs HTC PAL System (Abb. 16) besteht aus einer beweglichen Injektionseinheit (2) mit Spritzenhalterung (3), einer temperierbaren Probenaufbewahrungseinheit (5,6) und einem Injektionsventil mit 6 Anschlüssen (4). Es besitzt ein Bedienpanel (1) für spezifische Geräteeinstellungen, die mithilfe der Analyst Software nicht eingestellt werden können, wie beispielsweise die Eintauchtiefe der Injektionsspritze in die Probenvials.



Abbildung 16: HTC PAL Systems Autosampler der Fa. CTC Analytics

Im Autosampler wurden die Proben in eine der 6 Racks gestellt, die sich in der Probenaufbewahrungseinheit befinden und bei 10°C gelagert. Jeder Probe wurde in der Analyst Software eine bestimmte Platzierungsnummer im jeweiligen Rack zugeordnet. Mittels Injektionsspritze wurde ein Probenvolumen von 20 µl entnommen und diese in das Injektionsventil injiziert. Bei der Injektionsspritze handelte es sich um ein 25 µl-Spritze des Typs Gastight der Hamilton Company. Die injizierte Probe wurde im Probeloop des Injektionsventils aufbewahrt bis die Probe, durch Öffnen des Ventils zur

HPLC, in dessen Fließmittelstrom zugegeben wurde. Als Spülmittel des Injektionsventils wurden reines Acetonitril und Methanol verwendet.

Die HPLC-Anlage der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, Vereinigte Staaten) besteht im Allgemeinen aus 4 Grundbauteilen (Abb. 17), wozu der Fließmittelvorrat (1), der Entgaser (2), das Pumpsystem mit der Mischkammer (3) sowie die Einheit zur Installation und Temperierung der Vor- und Hauptsäule (4) gehören.

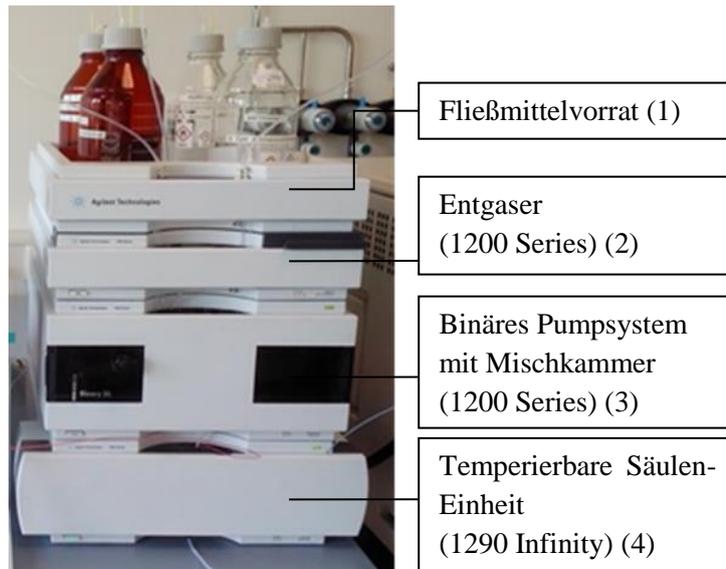


Abbildung 17: Agilent Technologies HPLC-Anlage

Für die Trennung mittels HPLC wurden die in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellten Parameter verwendet.

Tabelle 3: HPLC-Parameter

Parameter	Einstellung
Hauptsäule	Synergie 2u Fusion RP
Vorsäule	Synergie 2u Fusion RP (Vorsäule)
Säulenofentemperatur	30 °C
Flussrate	0,37 ml/min

Bei der Hauptsäule handelt es sich um die Synergie 2u Fusion RP der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland). Die Vorsäule sollte aus dem gleichen Material wie die Hauptsäule bestehen und ist ebenfalls vom gleichen Typ und Hersteller wie die Hauptsäule. Die Hauptsäule ist 10 cm lang und weist einen Durchmesser von 2 mm auf. Da es sich bei den untersuchten Analyten um polare und unpolare Verbindungen handelt, wurde mit C18-

Material gearbeitet, welches ebenfalls einem „Endcapping“ unterzogen wurde und „embedded-polar-groups“ enthält. Damit die polaren Analyten nicht zu zeitig eluieren und die unpolaren Analyten nicht zu spät von der Säule kommen, wurde mit einer Gradientenelution gearbeitet (Tab. 4). Die Fließmittelkomponenten waren MilliQ-Wasser und Methanol, welche zusätzlich 5 mM Ammoniumformiat enthielten. Das Ammoniumformiat wurde als Modifier für das Trennverfahren verwendet. Es verändert den pH-Wert des Fließmittels leicht in den sauren Bereich (pH-Wert: 5,5) und trägt so zu einer kürzeren Retentionszeit von sauren Analyten bei. Jedoch ist der pH-Wert nicht zu sauer und führt somit nicht zur Zersetzung bestimmter pH-empfindlicher Pestizidwirkstoffe oder zu stark erhöhten Retentionszeiten von basischen Analyten. Zusätzlich findet bei Verwendung von Ammoniumformiat keine erhöhte Ionensuppression im Massenspektrometer statt.

Tabelle 4: Einstellung der Gradientenelution

Zeit [min]	Methanol + 5mM Ammoniumformiat [%]	Wasser + 5mM Ammoniumformiat [%]
0	78	22
2	78	22
14	20	80
16	0	100
19	0	100
19,5	78	22
22	78	22

Zu Beginn war das Fließmittel stark unpolar durch 78% Methanol, wodurch die stark polaren Pestizidwirkstoffe länger auf der Säule gehalten wurden, da die Wechselwirkung zwischen dem Analyten und der Säule größer war. Ansonsten wären einige Analyten bereits in der Totzeit und somit zu früh für die anschließende massenspektrometrische Untersuchung eluiert. Damit die unpolaren Pestizide optimal getrennt werden, wurde nach 2 Minuten und innerhalb von 12 Minuten ein Verhältnis von 80% Wasser und 20% Methanol eingestellt. Nach 16 Minuten wurde in einem Zeitraum von 3 Minuten mit 100% Wasser gearbeitet, da stark unpolare Analyten ansonsten zur gleichen Zeit eluieren. Nach 19 Minuten eluieren alle Pestizide von der Säule, sodass das Anfangsverhältnis von 80% Wasser und 20% Methanol für anschließende Probentrennungen eingestellt wurde. Da es sich bei den Standardlösungen um neu hergestellte Mixe handelte, wurden die Retentionzeiten der Analyten überprüft und festgelegt (Tab. 5).

Tabelle 5: Retentionszeiten der Modellanalyten in Minuten

Analyt	Retentionszeit [min]
Butoxycarboxim	1,3
Linuron	12,2
MCPB	10,0

Nach der Trennung der Analyten wurde die Probe im Massenspektrometer QTrap® 5500 der Firma AB Sciex analysiert. Die Probe wurde über das Probeventil und den Probezulauf zum Ionisator geleitet (Abb. 18).

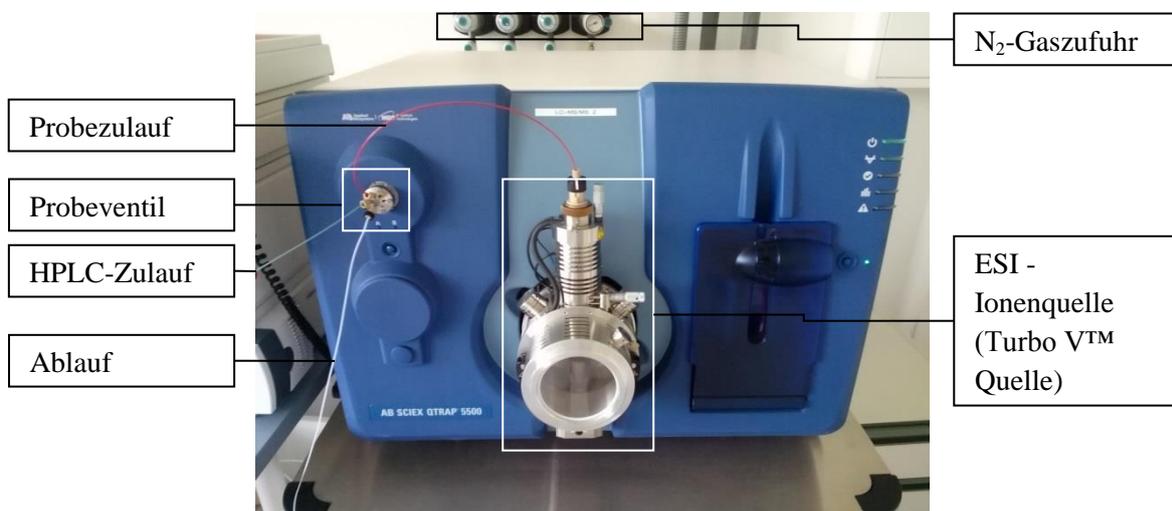


Abbildung 18: QTrap® 5500 Massenspektrometer der Fa. AB Sciex

Die Elektrosprayionisation erfolgt mit der Turbo V™ Quelle unter Hochspannung. Diese besitzt zwei Heizer, wodurch die Probe schneller verdampft. Das Curtain Gas (Stickstoff) wird über die Gaszufuhr in das Massenspektrometer geleitet. Die Trennung der Ionen erfolgt nach den Masse-Ladungszahlen im jeweiligen ESI-Modus (Tab. 6).

Tabelle 6: Masse-Ladungszahl der Modellanalyten nach Übergang

Analyt	Massenübergang 1 (m/z)	Massenübergang 2 (m/z)	ESI-Modus
Butoxycarboxim	106	63	Positiv
Linuron	160	182	Positiv
MCPB	140	-	Negativ

4.4.2 Akzeptanzkriterien der Validierungsparameter

Linearität

Zur Überprüfung der Linearität der analytischen Methode wurden 7 Bezugslösungen mit Konzentrationen, die den Arbeitsbereich der Methode abdecken, hergestellt und analysiert (0,25 ng/ml; 0,5 ng/ml; 1 ng/ml; 2 ng/ml; 4 ng/ml; 6 ng/ml; 8 ng/ml). Die Lösungen wurden mit dem Lösungsmittel Wasser:Methanol (Verhältnis 5:3) hergestellt. Die Prüfung auf Linearität wurde mit der Qualitätssicherungs- und Statistiksoftware QSM (Qualitätssicherung mit statistischen Methoden) Netzwerkversion 4.01 durchgeführt. Das Akzeptanzkriterium ist erfüllt, wenn die Kalibrierungen nach dem Mandel-Test linear sind.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wurde für jede Matrix im Validierungsplan auf 0,020 mg Pestizidrückstand je 1 kg Lebensmittelprobe festgelegt, was einer Konzentration von 0,8 ng Pestizidrückstand je 1 ml aufgereinigter Probe entspricht. Mit dieser Konzentration wurden die Proben mit den Pestizid-Standard-Lösungen dotiert. Zu der jeweiligen dotierten Probe erfolgte eine Blank-Messung der Matrix. Das Akzeptanzkriterium für die Bestimmungsgrenze ist erfüllt, wenn der Analytenpeak 9 mal größer ist als das Rauschen des Matrix-Blanks [22].

Richtigkeit

In diesem Fall wurden Proben mit einer Konzentration von 4,0 ng/ml dotiert und 7fach analysiert. Es wurden ebenfalls Blank-Proben der jeweiligen Matrix vermessen und von den ermittelten Konzentrationen abgezogen. Das Akzeptanzkriterium der Wiederfindung liegt im Bereich von 70% - 120%, das des Varianzkoeffizienten bei $\pm 20\%$.

Präzision

a. Wiederholpräzision

Für die jeweilige Matrix wurden 7 Proben mit einer Analytkonzentration von 0,8 ng/ml und 7 weitere Proben mit 4,0 ng/ml dotiert und vermessen. Die Akzeptanzkriterien für die Wiederholbarkeit liegen bei einer Wiederfindung im Bereich von 70% - 120% sowie einem Varianzkoeffizienten von $\pm 20\%$.

b. Intermediäre Präzision

Für die intermediäre Präzision wird der Versuch von einem zweiten Mitarbeiter an einem weiteren Arbeitstag durchgeführt. Dazu wird der Mitarbeiter 7 Proben der jeweiligen Matrix

mit der Analytkonzentration von 0,8 ng/ml und 7 weitere Proben mit 4,0 ng/ml dotieren und vermessen. Die Validierung hinsichtlich der intermediären Präzision ist erfolgreich, wenn die folgenden Akzeptanzkriterien erfüllt sind. Die Wiederfindungsrate soll im Bereich von 70% - 120% liegen, der Varianzkoeffizient soll einen Wert von $\pm 20\%$ aufweisen und die Abweichung zwischen dieser Messserie und der aus *a. Wiederholpräzision* durchgeführten Messerie soll höchstens 25% betragen beziehungsweise eine Standardabweichung von $\pm 2\%$ aufweisen.

Da die intermediäre Präzision zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wird, wird dieser Punkt in der Auswertung der Ergebnisse nicht betrachtet.

c. Systempräzision

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine 7fach-Messung einer Probe der jeweiligen Matrix mit einer dotierten Analytkonzentration von 4,0 ng/ml. Aus den ermittelten Wiederfindungsraten wurde der Varianzkoeffizient des jeweiligen Dotierungslevels berechnet. Als Akzeptanzkriterium für die Systempräzision wird ein Varianzkoeffizient von $\pm 20\%$ festgelegt.

Selektivität

Zur Überprüfung der Selektivität wurden eine Lösung, die den Analytstandard enthält, eine Probe der jeweiligen Matrix mit zudotiertem Analyten sowie ein Matrix-Blank analysiert. Das Akzeptanzkriterium ist erfüllt, wenn die Signalstärke des Matrix-Blanks einen Wert $< 20\%$ der dotierten Probe aufweist.

4.5 Durchführung

Herstellung der Standardlösungsmixe

Die in der Routine verwendeten 287 Analyten befanden sich bereits in unterschiedlichen Lösungsmixen. Eingeteilt nach der Wirkstoffgruppe, der jeweiligen Ionisierungsart und der Häufigkeit der Kundenanfrage auf Analyse dieser Pestizide wurden diese als 3 Standardlösungsmixe zusammengefasst, welche eine Konzentration von 1 µg/l aufwiesen.

Im Mix „LC1+PHH“ befanden sich zunächst unterschiedliche Wirkstoffgruppen (LC1) und Vertreter der Phenylharnstoffgruppen (PHH). Im Mix „CA+LC2+Sofia_pos“ befanden sich

hauptsächlich Pestizide der Carbamatgruppe (CA) und unterschiedliche Wirkstoffgruppen (LC2+Sofia). Diese beiden Mixe wurden im positiven ESI-Modus ionisiert (pos). Der dritte Mix „LC3+SH+Sofia_neg“ beinhaltete unterschiedliche Wirkstoffgruppen (LC3+Sofia) und Pestizide, die zur Gruppe der sauren Herbizide gehören und wurde im negativen ESI-Modus gemessen (neg). Die Mixe wurden alle in Acetonitril gelöst und auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt. Da es sich bei den Pestizidlösungen um neu hergestellte Lösungen handelte, wurden diese zunächst mit einer Konzentration von 10 ng/ml vermessen. Mit dieser Messung wurden die Retentionszeiten für die einzelnen Analyten und für die Validierung festgelegt. Jeder der Pestizidlösungsmixe wurde für die jeweilige Matrix an einem Tag untersucht. Das bedeutet, dass der Lösungsmix einmal hergestellt wurde und dann für die Zeit von mindestens 6 Werktagen verwendet wurde. Die Kalibrierungen wurden mit dem jeweiligen Mix jeden Versuchstag neu hergestellt.

Butoxycarboxim befand sich im Mix „CA+LC2+Sofia_pos“, Linuron im Mix „LC1+PHH“ und MCPB im Mix „LC3+SH+Sofia_neg“. Die analytischen Standards sind von Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Deutschland).

Herstellung der Kalibrierlösungen

Aus dem jeweiligen 1 µg/l Standard-Mix wurde eine Verdünnung mit der Konzentration von 100 ng/ml und eine Verdünnung mit der Konzentration von 10 ng/ml mit dem Lösungsmittel Acetonitril hergestellt. Anschließend wurden die Kalibrierlösungen mit dem Lösungsmittel Wasser:Methanol (Verhältnis 5:3) nach folgendem Schema hergestellt:

Tabelle 7: Herstellschema der Kalibrierlösung

Konzentration der Kalibrierung [ng/ml]	0,25	0,5	1	2	4	6	8
Zugabe-Volumen Standard-Mix [µl]	25	50	100	200	40	60	80
Verwendeter Standard-Mix	10ng/ml-Lösung				100 ng/ml-Lösung		
Volumen-Zugabe Wasser:Methanol (5:3) [µl]	975	950	900	800	960	940	920

Dotierung

1.Level 0,8 ng/ml

Die in Kapitel 4.3.2 geschätzte Bestimmungsgrenze musste in dieser Validierung bewiesen werden. Deshalb wurden die Proben so dotiert, dass bei der Analyse ein Soll-Wert der Analytkonzentration von 0,8 ng/ml untersuchter Probelösung bestand. Dieser Wert entsprach der Bestimmungsgrenze von 0,02 mg Analyt in 1 kg Probe. Dazu wurden den 2 g Proben vor der QuEChERS-Aufarbeitung 40 µl des Pestizidlösungsmixes mit einer Konzentration von 1 µg/ml zugeben. Dies entsprach einer Pestizidanalytmenge von 40 ng in 2 g Probe. Durch die Zugabe von 10 ml Wasser beziehungsweise Extraktion mit 10 ml Acetonitril, entsprach dies einer Konzentration von etwa 4 ng/ml. Von dieser Lösung wurden für die LC-MS/MS-Analyse 200 µl entnommen und mit MilliQ-Wasser auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Diese Lösung hatte dann eine Konzentration von 0,8 ng/ml. Für die Kontrollprobe des 1. Levels wurden 200 µl des Matrix-Blanks entnommen und 80 µl einer Pestizidlösung mit der Konzentration von 10 ng/ml zugegeben. Diese Lösung wurde anschließend mit MilliQ-Wasser auf 1 ml aufgefüllt und besaß nun eine Soll-Konzentration von 0,8 ng/ml.

2.Level 4,0 ng/ml

Zusätzlich erfolgte eine Dotierung mit der Konzentration von 4,0 ng/ml, da die Methode auf mindesten 2 unterschiedliche Konzentrationen hin geprüft werden musste. Dies entsprach einem Wert von 0,1 mg Analyt in 1 kg Lebensmittelprobe. Dazu wurden der 2 g Probe vor der QuEChERS-Aufarbeitung 200 µl des Pestizidlösungsmixes mit einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben. Dies entsprach einer Pestizidanalytmenge von 200 ng in 2 g Probe. Durch die Zugabe von 10 ml Wasser, beziehungsweise Extraktion mit 10 ml Acetonitril, entsprach dies einer Konzentration von etwa 200 ng/ml. Von dieser Lösung wurden für die LC-MS/MS-Analyse 200 µl entnommen und mit MilliQ-Wasser auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Diese Lösung hatte dann eine Konzentration von 4 ng/ml. Für die Kontrollprobe des 2. Levels wurden 200 µl des Matrix-Blanks entnommen und 40 µl einer Pestizidlösung mit der Konzentration von 100 ng/ml zugegeben. Diese Lösung wurde anschließend mit MilliQ-Wasser auf 1 ml aufgefüllt und besaß nun eine Soll-Konzentration von 4,0 ng/ml.

Probenvorbereitung

Die zu validierenden Matrices wurden, wenn nötig, zerkleinert und homogenisiert. Sonnenblumenöl ist bereits eine homogene Flüssigkeit und wurde direkt eingewogen, während die Kürbiskerne mit einem Mixer für 20 Sekunden bei 850 U/min zerkleinert und vermischt wurden (Grindomix des Typs GM 200, Firma Retsch – Abb. 19).



Abbildung 19: Grindomix GM 200 der Fa. Retsch

Es wurden jeweils 2 g der Matrix in vierzehn 50 ml- Zentrifugenröhrchen eingewogen und die jeweiligen Dotierungslevel hinzugegeben (Abb. 20).

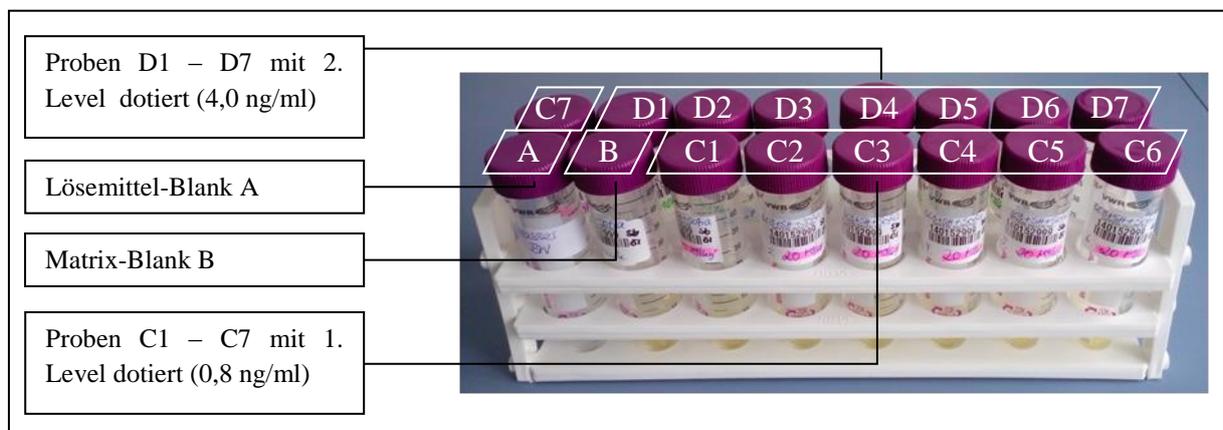


Abbildung 20: Probenübersicht

Zusätzlich wurden 2 g der Matrix eingewogen (Abb. 20 – Matrix-Blank B). Diese Probe wurde direkt auf mögliche Pestizidverunreinigungen analysiert. Nach der Dotierung wurden die Proben mit dem Vortexer des Typs Vortex-Genie®2 der Firma Scientific Industries (New York, Vereinigte Staaten) geschüttelt und anschließend für 30 Minuten stehen gelassen, sodass sich die Pestizidanalyten in der Matrix verteilen konnten. Die weiteren Probenvorbereitungsschritte sind am Beispiel von Sonnenblumenöl veranschaulicht (Abb. 21). Es wurden 10 ml Wasser für das Herauslösen der Pestizide zu der Probe gegeben (2) und gevortext, sodass sich die fetthaltige Probe so gut wie möglich im Wasser verteilt. Es wurde

ein Lösemittelblank mit 10 ml Wasser in einem Zentrifugenröhrchen hergestellt (Abb. 20 – Lösemittel-Blank A). Dieser dient der Überprüfung, ob sich bestimmte Störstoffe oder Pestizidverunreinigungen in den Lösemitteln befinden. Die Mischungen wurden erneut für 30 Minuten stehen gelassen und anschließend erfolgte eine Zugabe von 10 ml Acetonitril für den Schritt der Flüssig-Flüssig-Extraktion (3).

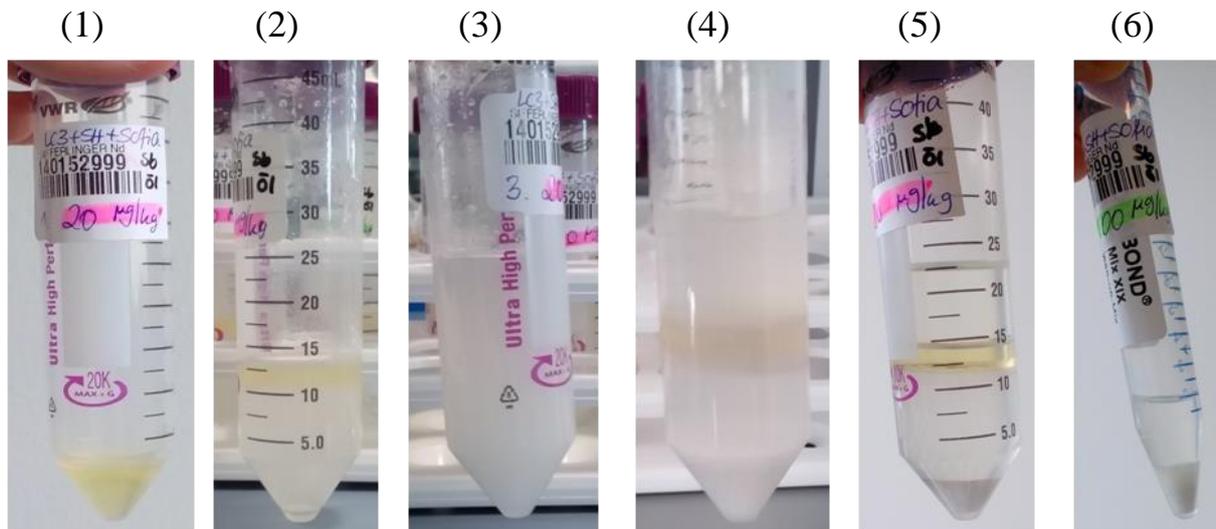


Abbildung 21: Probenvorbereitungsschritte am Beispiel von Sonnenblumenöl

Die Proben wurden mithilfe eines Rüttlers der Firma Fast&Fluid und des Typs Skandex 450 (Sassenheim, Niederlande) für 1 Minute maschinell geschüttelt. Dieser besitzt ein Bedienpanel zur Auswahl der Schüttelzeit und eine automatische Anpassung an das zu schüttelnde Gut, sodass beispielsweise Zentrifugenröhrchen unterschiedlicher Größe darin geschüttelt werden können. Anschließend wurde der Chromabond® QuEChERS Citrat-Extraktionsmix (Mix I) zugegeben und erneut für 1 Minute maschinell geschüttelt (4). Die durchmischten Proben wurden dann bei 10°C für 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert (5). Die Phasentrennung ist deutlich zu erkennen (Abb. 22).

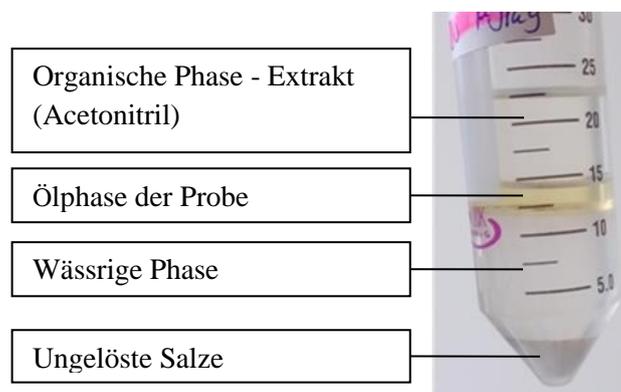


Abbildung 22: Phasentrennung

Vom Extrakt wurden 2 ml mithilfe einer 2 ml-Glasspipette entnommen und in die in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen, welches die Chromabond® Quechers Clean-up-Mischung (Mix XIX) enthält, gegeben. Diese Mischung wurde ebenfalls maschinell geschüttelt und dann für 10 Minuten bei 10°C und 4000 U/min mit der Heraeus Multifuge des Typs X3R der Firma Thermo Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten) zentrifugiert (Abb. 23, Abb. 21 - 6).



Abbildung 23: Multifuge X3R der Fa. Thermo Scientific

Jeweils 200 µl wurden von jeder Probe entnommen und in HPLC-Vials gegeben. Von dem Matrix Blank wurden zusätzlich zweimal 200 µl entnommen und davon jeweils 200 µl in ein HPLC-Vial gegeben. Zu einer dieser Matrix-Blank-Proben wurden 80 µl mit einer Konzentration von 10 ng/ml und zu der zweiten Probe 40 µl mit einer Konzentration von 100 ng/ml zugegeben. Diese Proben wurden als Kontrollproben für die jeweiligen Dotierungslevel hergestellt. Nun wurden alle Proben mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Die Proben wurden mit Membran-Deckeln verschlossen, gevortext und anschließend mittels LC-MS/MS analysiert.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die Auswertung der Analytchromatogramme erfolgte mithilfe der AB Sciex Analyst® 1.6.2 Instrument Control and Data Processing Software der Firma AB SCIEX. Die Integrierung der Peakflächen erfolgte automatisch durch die Software. Bei fälschlicher Integration wurde manuell verbessert.

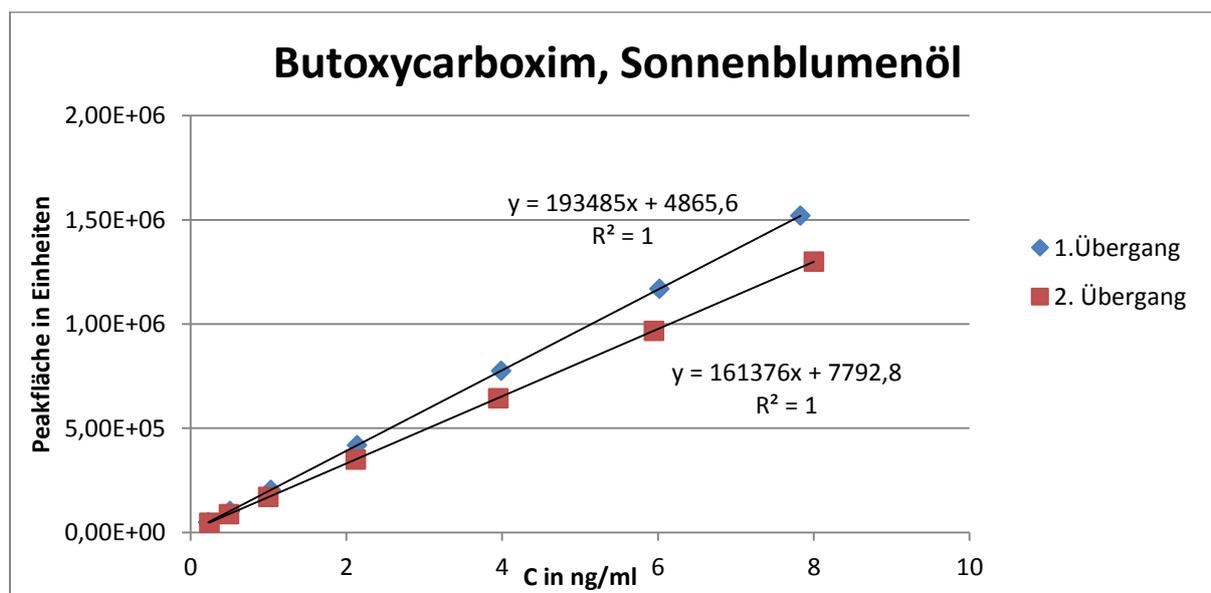
5.1 Butoxycarboxim

5.1.1 Sonnenblumenöl

Linearität

Für jeden Versuchstag wurde eine neue Kalibriergerade hergestellt, um mögliche Matrixeinflüsse auf die Säule sowie weitere äußere Einflüsse auf die Analysemethode und dadurch auf die Berechnung der Wiederfindung zu berücksichtigen. Während der Analyse wurden nach jeder Messreihe (0,8 ng/ml, 4,0 ng/ml, 7fach Injektion 0,4 ng/ml) die Kalibrierlösungen vermessen, um Einflüsse während des Analysezeitraums zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit wird nur die Kalibriergerade nach der ersten Messreihe (0,8 ng/ml) betrachtet, da sich die Ergebnisse der Kalibrierungen nur geringfügig verändert haben und diese Kalibrierung für den Beweis der Linearität repräsentativ für die gesamte Messung des jeweiligen Analyten ist.

Diagramm 7: Kalibriergeraden Butoxycarboxim des Versuchstags mit Sonnenblumenöl



Die Kalibriergeraden der jeweiligen Massenübergänge von Butoxycarboxim weisen für den Versuchstag mit *Sonnenblumenöl* ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 1 auf. Mithilfe der QSM-Software konnte bestätigt werden, dass es sich um lineare Kalibrierfunktionen handelt

(Anhang 2). Somit wurde die Linearität der Analysemethode für Butoxycarboxim am Versuchstag mit *Sonnenblumenöl* bestätigt.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Das Signal H des Butoxycarboxim-Peaks in der Matrix *Sonnenblumenöl* betrug zur Retentionszeit von 1,3 Minuten ca. $1,25 \cdot 10^4$ Einheiten (Abb. 24).

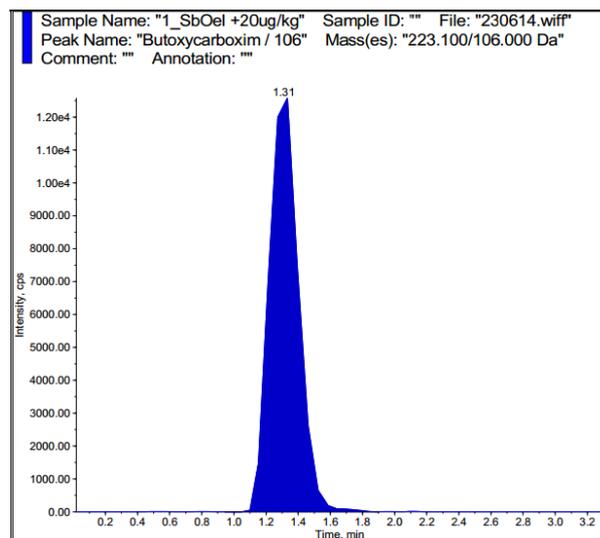


Abbildung 24: Butoxycarboxim-Peak in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)

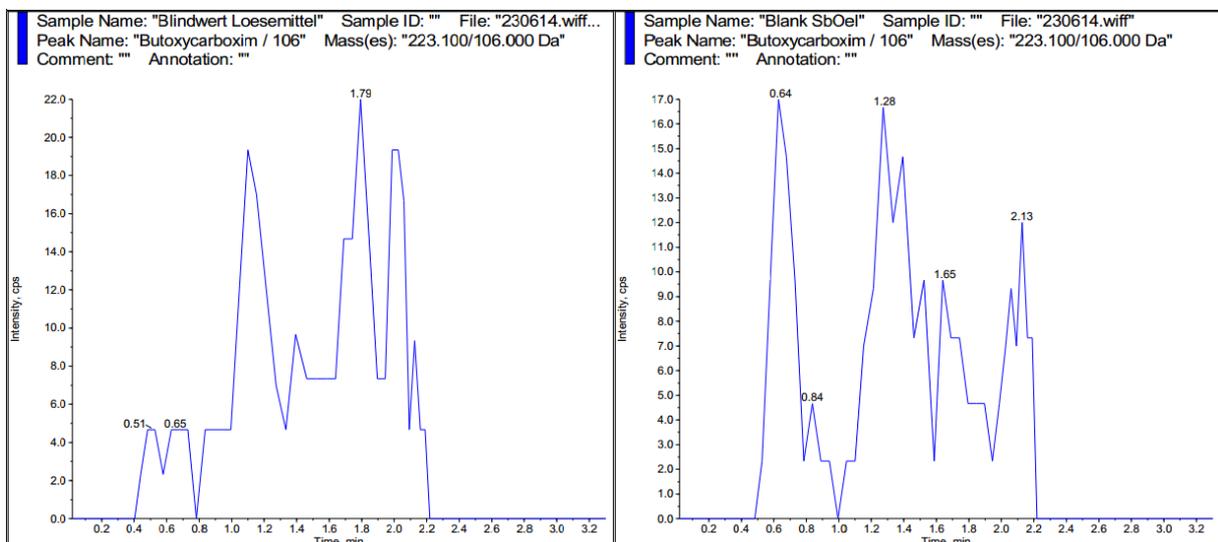


Abbildung 25: Lösemittel- und Matrix-Blank von Butoxycarboxim in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)

In diesem Fall wies die Peakhöhe des Matrix-Blanks zur Retentionszeit von 1,3 Minuten einen Wert von 16,5 Einheiten auf (Abb. 25 rechts)

$$\frac{S}{N} = \frac{12500}{16,5} = \frac{757}{1}$$

Das Signal-Rausch-Verhältnis für Butoxycarboxim im *Sonnenblumenöl* beträgt 757:1 und liegt somit im Akzeptanzbereich des Signal-Rausch-Verhältnisses von mindestens 9:1. Die Nachweisgrenze liegt somit bei einer Signalintensität von 4166 Einheiten.

Richtigkeit

Tabelle 8: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%
1	0,8	100,0	erfüllt
2	0,8	100,0	erfüllt
3	0,8	100,0	erfüllt
4	0,8	100,0	erfüllt
5	0,8	100,0	erfüllt
6	0,7	87,5	erfüllt
7	0,8	100,0	erfüllt
Mittelwert:		98,21	erfüllt
VK (%):		4,810	AK : ≤20% erfüllt

Alle Wiederfindungen der mit 0,8 ng/ml dotierten Proben sowie deren Mittelwert liegen im Akzeptanzbereich (Rohdaten Anhang 1). Der Varianzkoeffizient der Messreihe beträgt 4,81% und liegt somit ebenfalls im Akzeptanzbereich.

Tabelle 9: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Sonnenblumenöl (4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%
1	3,6	90,0	erfüllt
2	3,7	92,5	erfüllt
3	3,8	95,0	erfüllt
4	3,8	95,0	erfüllt
5	3,7	92,5	erfüllt
6	3,8	95,0	erfüllt
7	3,8	95,0	erfüllt
Mittelwert:		93,57	erfüllt
VK (%):		2,100	AK : ≤20% erfüllt

Auch die Wiederfindungen der Proben mit einer Dotierung von 4,0 ng/ml sowie der Varianzkoeffizient liegen im Akzeptanzbereich.

Präzision

a. Wiederholpräzision

Für die Wiederholpräzision werden dieselben Messwerte betrachtet, welche auch im Punkt *Richtigkeit* dargelegt sind (Tab. 8, Tab. 9). Alle Wiederfindungen der mit 0,8 ng/ml und 4,0

ng/ml dotierten Proben sowie deren Mittelwerte liegen im Akzeptanzbereich. Die jeweiligen Varianzkoeffizienten weisen ebenfalls Werte im Akzeptanzbereich auf. Dadurch kann die Präzision der Methode innerhalb der Messreihen beider Dotierungslevel von Butoxycarboxim in *Sonnenblumenöl* bestätigt werden.

c. Systempräzision

In Tab. 10 sind die Ergebnisse der 7fach-Analyse der mit 4,0 ng/ml dotierten Probe aufgezeigt.

Tabelle 10: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Sonnenblumenöl (7fach Injektion 4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%	
1	3,7	92,5	erfüllt	
2	3,7	92,5	erfüllt	
3	3,8	95,0	erfüllt	
4	3,8	95,0	erfüllt	
5	3,8	95,0	erfüllt	
6	3,7	92,5	erfüllt	
7	3,8	95,0	erfüllt	
Mittelwert:		93,93	erfüllt	
VK (%):		1,420	AK : ≤20%	erfüllt

Der Varianzkoeffizient erfüllt mit einem Wert von 1,42% das Akzeptanzkriterium. Die Messinstrumente arbeiten somit sehr präzise und robust bei der Analyse von Butoxycarboxim in *Sonnenblumenöl*.

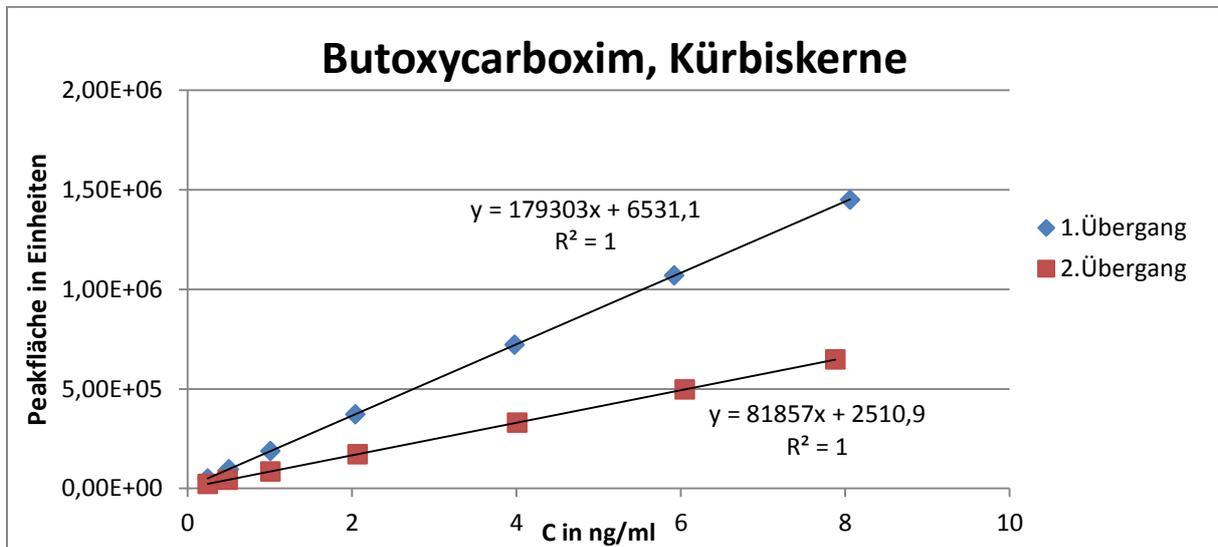
Selektivität

Die Signalstärke von Butoxycarboxim beträgt $1,25 \cdot 10^4$ Einheiten (Abb. 24). Das Akzeptanzkriterium von < 20 % liegt somit bei einem Wert von < 2500 Einheiten. Der Matrix-Blank weist einen Wert von 16,5 Einheiten auf und liegt somit im Akzeptanzbereich. Das bedeutet, die Methode ist selektiv für den Analyten Butoxycarboxim in der Matrix *Sonnenblumenöl*.

5.1.2 Kürbiskerne

Linearität

Diagramm 8: Kalibriergeraden Butoxycarboxim des Versuchstags mit Kürbiskernen



Alle Kalibriergeraden von Butoxycarboxim weisen für den Versuchstag mit *Kürbiskernen* ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 1 auf. Mithilfe der QSM-Software konnte bestätigt werden, dass es sich in allen Fällen um lineare Kalibrierfunktionen handelt (Anhang 4). Somit wurde die Linearität der Analysemethode für Butoxycarboxim bestätigt.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

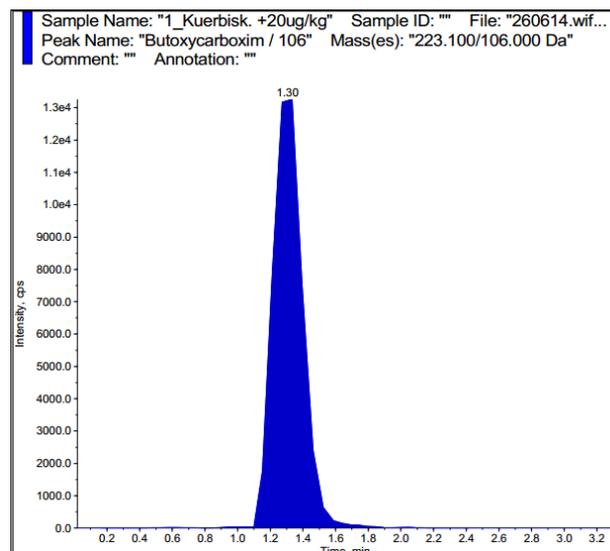


Abbildung 26: Butoxycarboxim-Peak in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)

Das Signal H des Butoxycarboxim-Peaks in der Matrix *Kürbiskerne* betrug zur Retentionszeit von 1,3 Minuten ca. $1,34 \cdot 10^4$ Einheiten (Abb. 26).

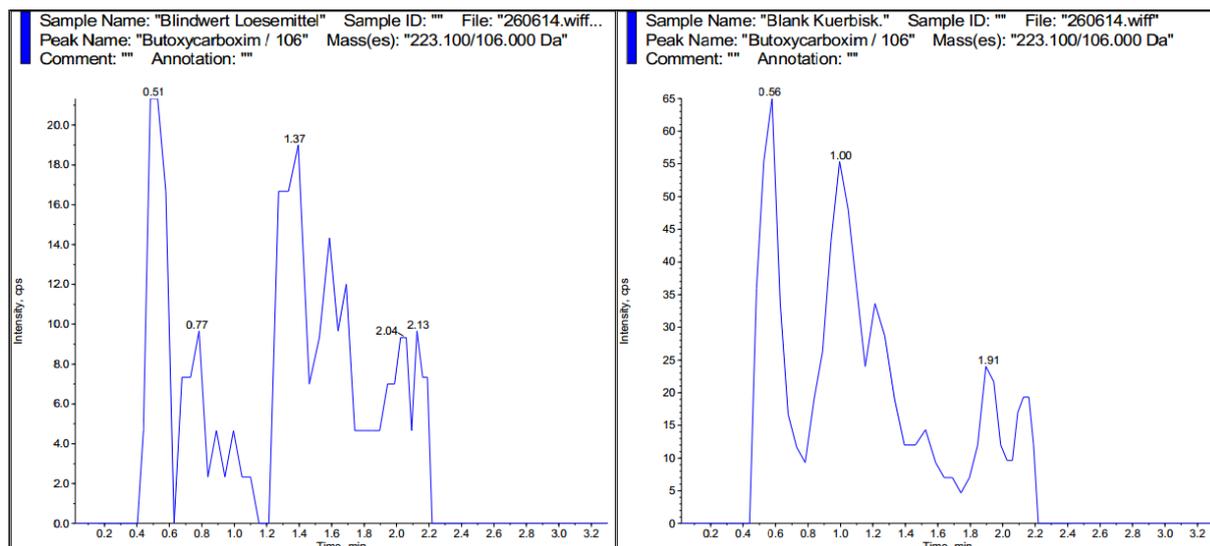


Abbildung 27: Lösemittel- und Matrix-Blank von Butoxycarboxim in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)

In diesem Fall wies die Peakhöhe des Matrix-Blanks zur Retentionszeit von 1,3 Minuten einen Wert von ca. 30 Einheiten auf (Abb. 27 rechts).

$$\frac{S}{N} = \frac{13400}{30} = \frac{446}{1}$$

Das Signal-Rausch-Verhältnis für Butoxycarboxim in Kürbiskernen beträgt 446:1 und liegt somit im Akzeptanzbereich. Die Nachweisgrenze liegt bei einer Signalintensität von 4466 Einheiten.

Richtigkeit

Alle Wiederfindungen der mit 0,8 ng/ml dotierten Proben sowie deren Mittelwert liegen im Akzeptanzbereich (Rohdaten Anhang 3). Der Varianzkoeffizient der Messreihe beträgt 10,39% und liegt somit ebenfalls im Akzeptanzbereich.

Tabelle 11: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%	
1	0,9	112,5	erfüllt	
2	0,8	100,0	erfüllt	
3	0,8	100,0	erfüllt	
4	0,7	87,5	erfüllt	
5	0,7	87,5	erfüllt	
6	0,7	87,5	erfüllt	
7	0,7	87,5	erfüllt	
Mittelwert:		94,64	erfüllt	
VK (%):		10,390	AK : ≤20%	erfüllt

Auch die Wiederfindungen der Proben mit einer Dotierung von 4,0 ng/ml sowie der Varianzkoeffizient mit 1,51% liegen im Akzeptanzbereich.

Tabelle 12: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Kürbiskernen (4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%	
1	3,5	87,5	erfüllt	
2	3,6	90,0	erfüllt	
3	3,5	87,5	erfüllt	
4	3,5	87,5	erfüllt	
5	3,5	87,5	erfüllt	
6	3,6	90,0	erfüllt	
7	3,6	90,0	erfüllt	
Mittelwert:		88,57	erfüllt	
VK (%):		1,510	AK : ≤20%	erfüllt

Da die Werte beider Konzentrationen die Akzeptanzkriterien erfüllen, kann die Richtigkeit der Methode für die Analyse von Butoxycarboxim in *Kürbiskernen* bestätigt werden.

Präzision

a. Wiederholpräzision

Alle Wiederfindungen der mit 0,8 ng/ml und 4,0 ng/ml dotierten Proben sowie deren Mittelwerte liegen im Akzeptanzbereich (Tab.11, Tab.12 – Richtigkeit). Die jeweiligen Varianzkoeffizienten weisen ebenfalls Werte im Akzeptanzbereich auf. Dadurch kann die Präzision der Methode innerhalb der Messreihen beider Dotierungslevel von Butoxycarboxim in *Kürbiskernen* bestätigt werden.

b. Systempräzision

Tabelle 13: Wiederfindung von Butoxycarboxim in Kürbiskernen (7fach Injektion 4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%	
1	3,7	92,5	erfüllt	
2	3,7	92,5	erfüllt	
3	3,6	90,0	erfüllt	
4	3,7	92,5	erfüllt	
5	3,7	92,5	erfüllt	
6	3,6	90,0	erfüllt	
7	3,8	95,0	erfüllt	
Mittelwert:		92,14	erfüllt	
VK (%):		1,870	AK : ≤20%	erfüllt

Der Varianzkoeffizient erfüllt mit einem Wert von 1,87% das Akzeptanzkriterium. Die Messinstrumente erzielen somit genaue und robuste Ergebnisse bei der Analyse von Butoxycarboxim in *Kürbiskernen*.

Selektivität

Wie bereits bei der Nachweis- und Bestimmungsgrenze veranschaulicht, beträgt die Signalstärke von Butoxycarboxim $1,34 \cdot 10^4$ Einheiten (Abb.26). Das Akzeptanzkriterium von $< 20\%$ liegt somit bei einem Wert von < 2680 Einheiten. Der Matrix-Blank weist einen Wert von 30 Einheiten auf und liegt somit im Akzeptanzbereich. Das bedeutet, die Methode ist selektiv für den Analyten Butoxycarboxim in der Matrix *Kürbiskerne*.

5.1.3 Auswertung Butoxycarboxim

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse von Butoxycarboxim

Butoxycarboxim				
Matrix	Sonnenblumenöl		Kürbiskerne	
Dotierungslevel	0,8 ng/ml	4,0 ng/ml	0,8 ng/ml	4,0 ng/ml
Kontrollprobe WDF [%]	113	100	131	89
Mittelwert WDF [%]	98,21	93,57	94,64	88,57

Mit Werten im Bereich von 88,57% bis 98,21% weist die Analysemethode für Butoxycarboxim sehr gute Wiederfindungen (WDF) auf. Diese Werte können durch die chemischen Eigenschaften des Butoxycarboxims begründet werden. Aufgrund seiner Polarität konnte der Analyt zunächst mithilfe der 10 ml Wasser gut aus den fetthaltigen Matrices herausgelöst werden. Nachdem das Acetonitril zugegeben wurde, sollte der Analyt sich weiterhin in der wässrigen Phase befinden und anschließend, durch die Phasentrennung, sehr gut in die organische Phase übergehen. Während des Aufreinigungsschritts ist es nicht mit dem C18-Material in Wechselwirkung getreten und da Butoxycarboxim keine starke Säureeigenschaften aufweist, wurde es nicht an die Diaminophase gebunden. Dadurch ist es während der dispersiven SPE zu keinen Verlusten des Analyten gekommen. Da Matrixeinflüsse die Analyse stören und somit verfälschen können, können die Wiederfindungen der Kontrollproben als Bestätigung der Wiederfindungen des Analyten herangezogen werden. Diese wurden erst nach der Probenvorbereitung dotiert und zeigen somit Ergebnisse unabhängig von der Probenvorbereitung. Für die Matrix *Sonnenblumenöl* weisen diese ebenfalls sehr gute WDF im Bereich von 113% bis 110% auf. Die Analyse

wurde somit nicht durch Matrixkomponenten im *Sonnenblumenöl* gestört. Betrachtet man die WDF der Kontrollproben in der Matrix *Kürbiskerne*, ist eine Abhängigkeit vom Dotierungslevel zu erkennen. Bei der Konzentration 0,8 ng/ml zeigt die WDF der Kontrollprobe einen Wert von 131% auf, welcher über dem Akzeptanzbereich liegt. Es besteht die Möglichkeit, dass Komponenten der *Kürbiskerne* die massenspektrometrische Analyse verfälscht haben können. Da der Wert ca. 10% über dem Akzeptanzkriterium von 120% liegt, würde die Wiederfindung von Butoxycarboxim mit ca. 84% weiterhin im Akzeptanzkriterium liegen und hat somit keine große Auswirkung auf das Analyseergebnis. Die WDF der Kontrollprobe mit der Konzentration 4,0 ng/ml weist jedoch einen Wert im Akzeptanzbereich auf, was nicht auf den Einfluss von Matrixkomponenten deutet. Es besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass es bei der Dotierung der Kontrollprobe mit der Konzentration von 0,8 ng/ml zu einem Pipettierfehler gekommen ist, wodurch sich unterschiedliche Wiederfindungen der Kontrollproben zwischen den Dotierungsleveln ergeben.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Methode für die Analyse von Butoxycarboxim in den Matrices *Sonnenblumenöl* und *Kürbiskerne* die im Rahmen dieser Arbeit ausgewerteten Akzeptanzkriterien erfüllt.

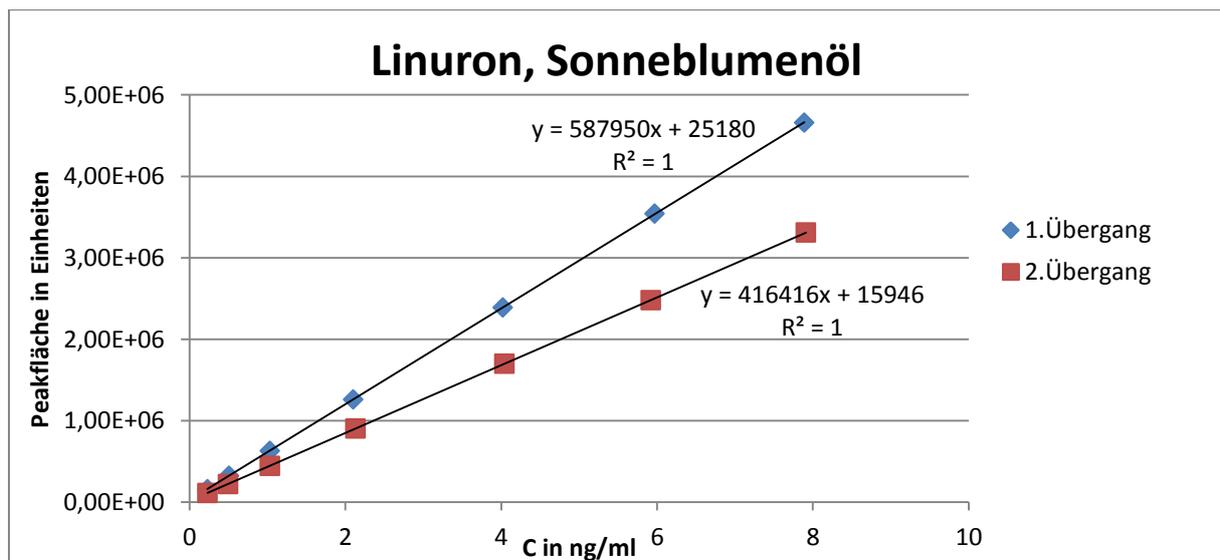
5.2 Linuron

Linuron befand sich während der Analyse im Standardmix „LC1+PHH“. Während der Analyse dieses Standardmixes ist es zu Verschleppungen einiger Analyten gekommen, was durch mögliche Matrixkomponenten zustande gekommen sein könnte. Deshalb wurde eine erneute Messung für die Analyten in diesem Mix durchgeführt und festgelegt, dass zwischen jeder Probenmessreihe und jeder Messung der Kalibrierung fünf Proben mit einer Wasser/Methanol-Lösung (Verhältnis 5:3) zur Spülung der Messgeräte gemessen werden sollten. Diese Änderung kann als unkritisch betrachtet werden, da sie Probenvorbereitungs- oder Analyseschritten nicht beeinflusst.

5.2.1 Sonnenblumenöl

Linearität

Diagramm 9: Kalibriergeraden Linuron des Versuchstags mit Sonnenblumenöl



Alle Kalibriergeraden von Linuron weisen für den Versuchstag mit *Sonnenblumenöl* ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 1 auf. Mithilfe der QSM-Software konnte bestätigt werden, dass es sich in allen Fällen um lineare Kalibrierfunktionen handelt (Anhang 6). Somit wurde die Linearität der Analysemethode für Linuron bestätigt.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Das Signal H des Butoxycarboxim-Peaks in der Matrix *Sonnenblumenöl* betrug zur Retentionszeit von 12,2 Minuten ca. $3,8 \cdot 10^4$ Einheiten (Abb. 28).

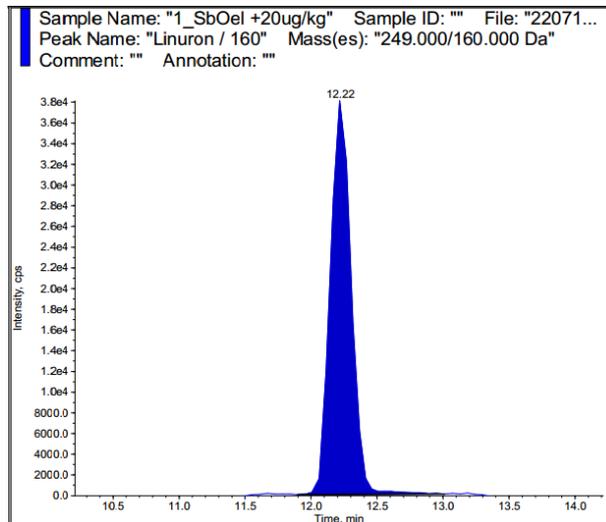


Abbildung 28: Linuron-Peak in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)

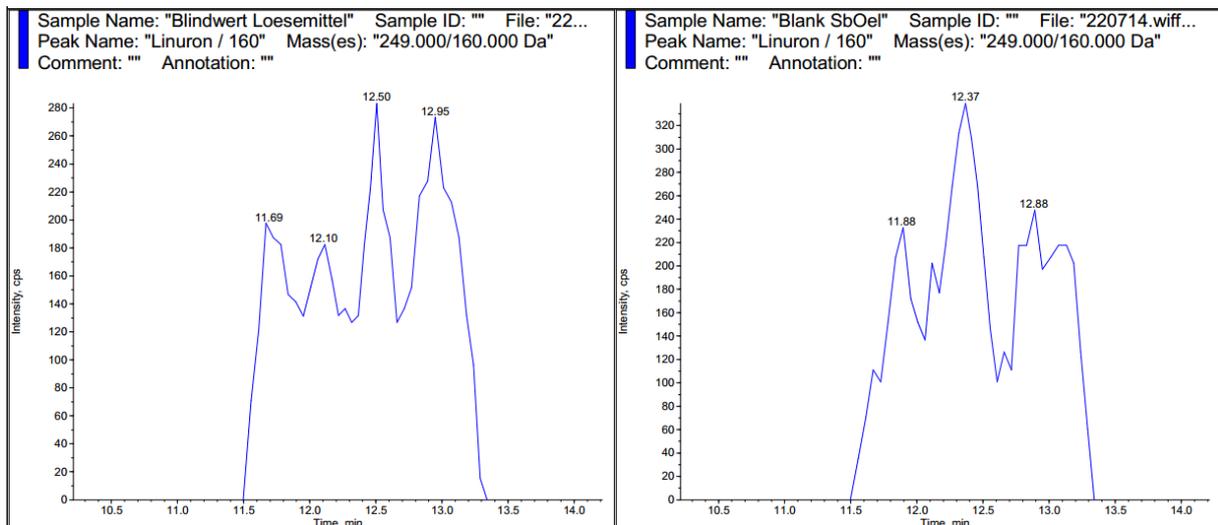


Abbildung 29: Lösemittel- und Matrix-Blank von Linuron in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)

In diesem Fall wies die Peakhöhe des Matrix-Blanks zur Retentionszeit von 12,2 Minuten einen Wert von ca. 200 Einheiten auf (Abb. 29 rechts).

$$\frac{S}{N} = \frac{38000}{200} = \frac{190}{1}$$

Das Signal-Rausch-Verhältnis für Linuron im Sonnenblumenöl beträgt 190:1 und liegt somit im Akzeptanzbereich. Die Nachweisgrenze liegt bei einer Signalintensität von 12666 Einheiten.

Richtigkeit

Tabelle 15: Wiederfindung von Linuron in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium	
			70,0%	- 120,0%
1	0,7	87,5	erfüllt	
2	0,7	87,5	erfüllt	
3	0,7	87,5	erfüllt	
4	0,7	87,5	erfüllt	
5	0,7	87,5	erfüllt	
6	0,6	75,0	erfüllt	
7	0,7	87,5	erfüllt	
Mittelwert:		85,71	erfüllt	
VK (%):		5,510	AK: ≤20%	erfüllt

Alle Wiederfindungen der mit 0,8 ng/ml dotierten Proben sowie deren Mittelwert liegen im Akzeptanzbereich (Rohdaten Anhang 5). Der Varianzkoeffizient der Messreihe beträgt 5,51% und liegt somit ebenfalls im Akzeptanzbereich.

Tabelle 16: Wiederfindung von Linuron in Sonnenblumenöl (4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium	
			70,0%	- 120,0%
1	3,4	85,0	erfüllt	
2	3,3	82,5	erfüllt	
3	3,4	85,0	erfüllt	
4	3,4	85,0	erfüllt	
5	3,4	85,0	erfüllt	
6	3,4	85,0	erfüllt	
7	3,3	82,5	erfüllt	
Mittelwert:		84,29	erfüllt	
VK (%):		1,450	AK: ≤20%	erfüllt

Auch die Wiederfindungen der Proben mit einer Dotierung von 4,0 ng/ml sowie der Varianzkoeffizient mit 1,45% liegen im Akzeptanzbereich. Da die Werte beider Konzentrationen die Akzeptanzkriterien erfüllen, kann die Richtigkeit der Methode für die Analyse von Linuron in *Sonnenblumenöl* bestätigt werden.

Präzision

a. Wiederholpräzision

Alle Wiederfindungen der mit 0,8 ng/ml und 4,0 ng/ml dotierten Proben sowie deren Mittelwerte liegen im Akzeptanzbereich (Tab. 15, Tab.16 – Richtigkeit). Die jeweiligen Varianzkoeffizienten weisen ebenfalls Werte im Akzeptanzbereich auf. Dadurch kann die Präzision der Methode innerhalb der Messreihen beider Dotierungslevel von Linuron in *Sonnenblumenöl* bestätigt werden.

c. Systempräzision

Tabelle 17: Wiederfindung von Linuron in Sonnenblumenöl (7fach Injektion 4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%	
1	3,3	82,5	erfüllt	
2	3,4	85,0	erfüllt	
3	3,4	85,0	erfüllt	
4	3,4	85,0	erfüllt	
5	3,4	85,0	erfüllt	
6	3,4	85,0	erfüllt	
7	3,4	85,0	erfüllt	
Mittelwert:		84,64	erfüllt	
VK (%):		1,120	AK: ≤20%	erfüllt

Der Varianzkoeffizient erfüllt mit einem Wert von 1,2% das Akzeptanzkriterium. Die Messinstrumente arbeiten somit sehr präzise und robust für die Analyse von Linuron in *Sonnenblumenöl*.

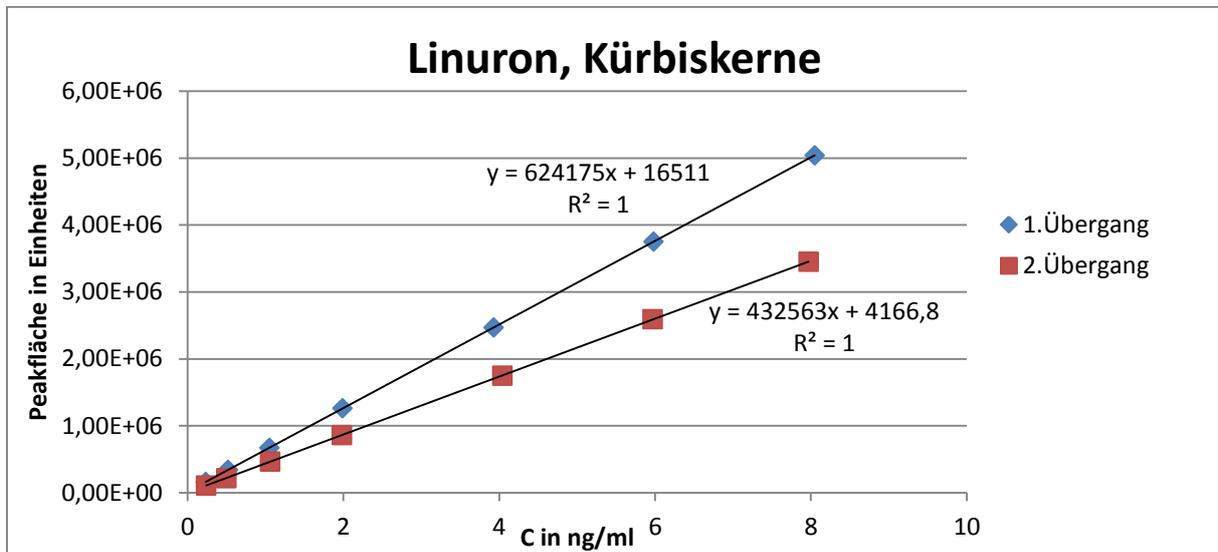
Selektivität

Wie bereits bei der Nachweis- und Bestimmungsgrenze veranschaulicht, beträgt die Signalstärke von Linuron $3,8 \cdot 10^4$ Einheiten (Abb. 28). Das Akzeptanzkriterium von < 20 % liegt somit bei einem Wert von < 7600 Einheiten. Der Matrix-Blank weist einen Wert von 200 Einheiten auf und liegt somit im Akzeptanzbereich. Das bedeutet, die Methode ist selektiv für den Analyten Linuron in der Matrix *Sonnenblumenöl*.

5.2.2 Kürbiskerne

Linearität

Diagramm 10: Kalibriergeraden Linuron des Versuchstags mit Kürbiskernen



Alle Kalibriergeraden von Linuron weisen für den Versuchstag mit *Kürbiskernen* ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 1 auf. Mithilfe der QSM-Software konnte bestätigt werden, dass es sich in allen Fällen um lineare Kalibrierfunktionen handelt (Anhang 8). Somit wurde die Linearität der Analysemethode für Linuron bestätigt.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

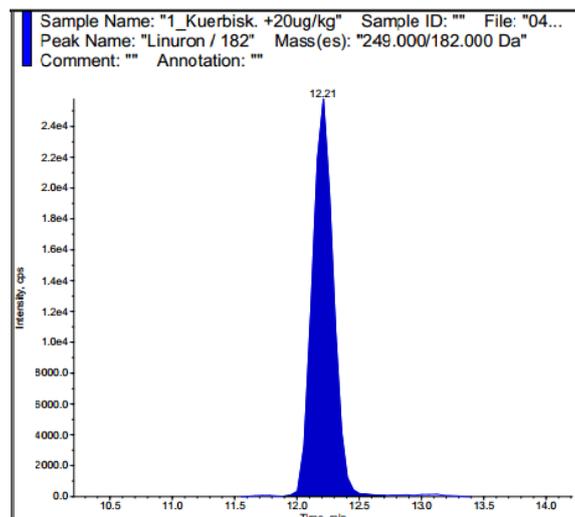


Abbildung 30: Linuron-Peak in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)

Das Signal H des Butoxycarboxim-Peaks in der Matrix *Kürbiskerne* betrug zur Retentionszeit von 12,2 Minuten ca. $2,4 \cdot 10^4$ Einheiten (Abb. 30).

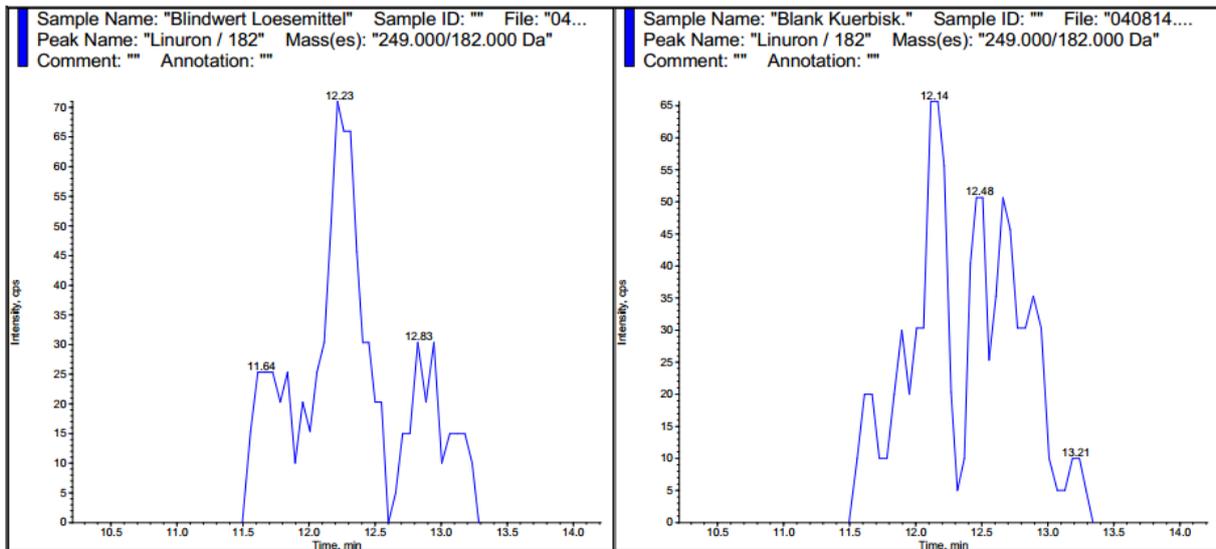


Abbildung 31: Lösemittel- und Matrix-Blank von Linuron in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)

In diesem Fall wies die Peakhöhe des Lösemittel-Blanks zur Retentionszeit von 12,2 Minuten einen Wert von 70 Einheiten auf (Abb. 31 links)

$$\frac{S}{N} = \frac{24000}{70} = \frac{342}{1}$$

Das Signal-Rausch-Verhältnis für Butoxycarboxim im Sonnenblumenöl beträgt 342:1 und liegt somit im Akzeptanzbereich. Die Nachweisgrenze liegt bei einer Signalintensität von 8000 Einheiten.

Richtigkeit

Alle Wiederfindungen der mit 0,8 ng/ml dotierten Proben sowie deren Mittelwert liegen im Akzeptanzbereich (Rohdaten Anhang 7).

Tabelle 18: Wiederfindung von Linuron in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium	
			70,0%	- 120,0%
1	0,7	87,5	erfüllt	
2	0,7	87,5	erfüllt	
3	0,7	87,5	erfüllt	
4	0,7	87,5	erfüllt	
5	0,7	87,5	erfüllt	
6	0,7	87,5	erfüllt	
7	0,7	87,5	erfüllt	
Mittelwert:		87,50	erfüllt	
VK (%):		0,000	AK: ≤20%	erfüllt

Der Varianzkoeffizient der Messreihe beträgt 0% und liegt somit ebenfalls im Akzeptanzbereich.

Tabelle 19: Wiederfindung von Linuron in Kürbiskernen (4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%	
1	3,4	85,0	erfüllt	
2	3,3	82,5	erfüllt	
3	3,3	82,5	erfüllt	
4	3,3	82,5	erfüllt	
5	3,3	82,5	erfüllt	
6	3,3	82,5	erfüllt	
7	3,3	82,5	erfüllt	
Mittelwert:		82,86	erfüllt	
VK (%):		1,140	AK:≤20%	erfüllt

Auch die Wiederfindungen der Proben mit einer Dotierung von 4,0 ng/ml sowie der Varianzkoeffizient mit 1,14% liegen im Akzeptanzbereich. Da die Werte beider Konzentrationen die Akzeptanzkriterien erfüllen, kann die Richtigkeit der Methode für die Analyse von Linuron in *Kürbiskernen* bestätigt werden.

Präzision

a. Wiederholpräzision

Alle Wiederfindungen der mit 0,8 ng/ml und 4,0 ng/ml dotierten Proben sowie deren Mittelwert liegen im Akzeptanzbereich (Tab.17, Tab. 18 – Richtigkeit). Die jeweiligen Varianzkoeffizienten weisen ebenfalls Werte im Akzeptanzbereich auf. Dadurch kann die Präzision der Methode innerhalb der Messreihen beider Dotierungslevel von Linuron in *Kürbiskernen* bestätigt werden.

b. Systempräzision

Der Varianzkoeffizient erfüllt mit einem Wert von 1,49% das Akzeptanzkriterium. Die Messinstrumente erzielen somit genaue und robuste Ergebnisse für die Analyse von Linuron in der Matrix *Kürbiskerne*.

Tabelle 20: Wiederfindung von Linuron in Kürbiskernen (7fach Injektion 4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%	
1	3,2	80,0	erfüllt	
2	3,3	82,5	erfüllt	
3	3,2	80,0	erfüllt	
4	3,3	82,5	erfüllt	
5	3,3	82,5	erfüllt	
6	3,3	82,5	erfüllt	
7	3,3	82,5	erfüllt	
Mittelwert:		81,79	erfüllt	
VK (%):		1,490	AK:≤20%	erfüllt

Selektivität

Wie bereits bei der Nachweis- und Bestimmungsgrenze veranschaulicht, beträgt die Signalstärke von Linuron $2,4 \cdot 10^4$ Einheiten (Abb. 30). Das Akzeptanzkriterium von $< 20\%$ liegt somit bei einem Wert von < 4800 Einheiten. Der Lösemittel-Blank weist einen Wert von 70 Einheiten auf und liegt somit im Akzeptanzbereich. Das bedeutet, die Methode ist selektiv für den Analyten Linuron in der Matrix *Kürbiskerne*.

5.2.3 Auswertung Linuron

Tabelle 21: Zusammenfassung der Wiederfindungen von Linuron

Linuron				
Matrix	Sonnenblumenöl		Kürbiskerne	
Dotierungslevel	0,8 ng/ml	4,0 ng/ml	0,8 ng/ml	4,0 ng/ml
Kontrollprobe WDF [%]	100	100	99	101
Mittelwert WDF [%]	85,71	84,29	87,5	82,86

Mit Werten im Bereich von 82,86% bis 87,5% weist die Analysemethode für Linuron gute Wiederfindungen auf, was auf geringe Verluste des Analyts während der Probenvorbereitung schließen lässt. Da Linuron schlecht in Wasser, aber gut in organischen Lösungsmitteln löslich ist, wurde es während der Extraktion mit Acetonitril direkt aus den fetthaltigen Matrices herausgelöst. Der Schritt der Phasentrennung beeinflusst die Wiederfindung des Analyten nicht und kann außer Betracht gelassen werden. Da es sich bei Linuron jedoch um einen unpolaren Analyten handelt, können geringe Mengen während des Aufreinigungsschritts mit dem C18-Kieselgelmaterial in Wechselwirkung getreten sein. Es handelt sich dabei nur um geringe Mengen, da Fettbestandteile und unpolare Analyten

stärker an die C18-Phase gebunden wurden und mit Linuron in Konkurrenz getreten sind. Betrachtet man die WDF der Kontrollproben hinsichtlich der Matrixeinflüsse auf die Analysemethode, so erkennt man, dass die Matrixkomponenten des *Sonnenblumenöls* und der *Kürbiskerne* die Methode nicht stören. Die WDF der Kontrollproben liegen im Bereich von 99% bis 101% und zeigen damit sehr gute Werte auf.

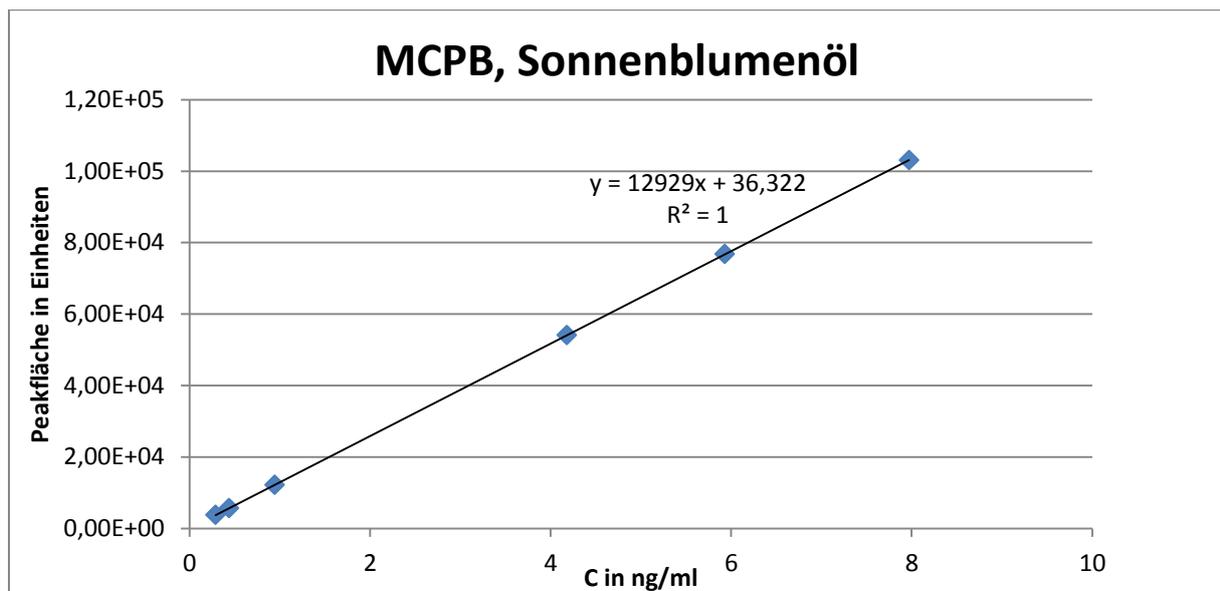
Die Methode für die Analyse von Linuron in den Matrices *Sonnenblumenöl* und *Kürbiskerne* erfüllt somit die im Rahmen dieser Arbeit ausgewerteten Akzeptanzkriterien

5.3 MCPB

5.3.1 Sonnenblumenöl

Linearität

Diagramm 11: Kalibriergeraden MCPB des Versuchstags mit Sonnenblumenöl



Die Kalibriergeraden von MCPB weisen für den Versuchstag mit Sonnenblumenöl ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 1 auf. Der Kalibrierpunkt der Konzentration von 2 ng/ml hatte eine zu große Abweichung, weshalb er nicht für die Kalibriergerade verwendet wurde. Eine mögliche Fehlerquelle könnte ein Pipettierfehler bei der Herstellung der Kalibrierlösung sein. Trotzdem ist die Gerade mit sechs Punkten im Akzeptanzbereich, da mindestens fünf unterschiedliche Konzentrationen vorhanden sein müssen. Mithilfe der QSM-Software konnte bestätigt werden, dass es sich um lineare Kalibrierfunktionen handelt (Anhang 10). Somit wurde die Linearität der Analysemethode für MCPB bestätigt.

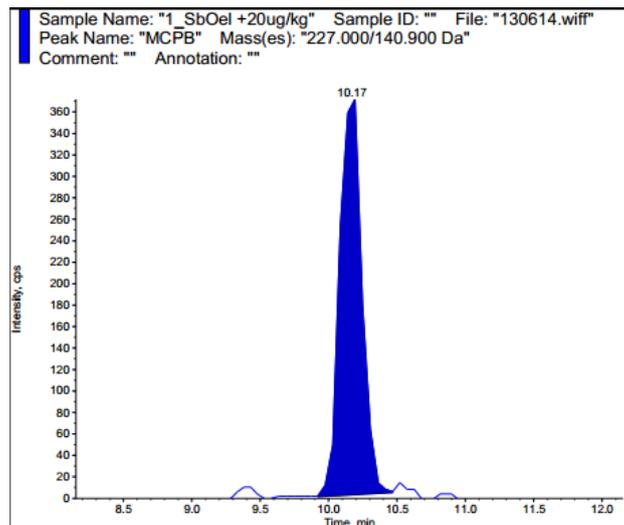
Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Abbildung 32: MCPB-Peak in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)

Das Signal H des MCPB-Peaks in der Matrix *Sonnenblumenöl* betrug zur Retentionszeit von 10,2 Minuten ca. 370 Einheiten (Abb. 32).

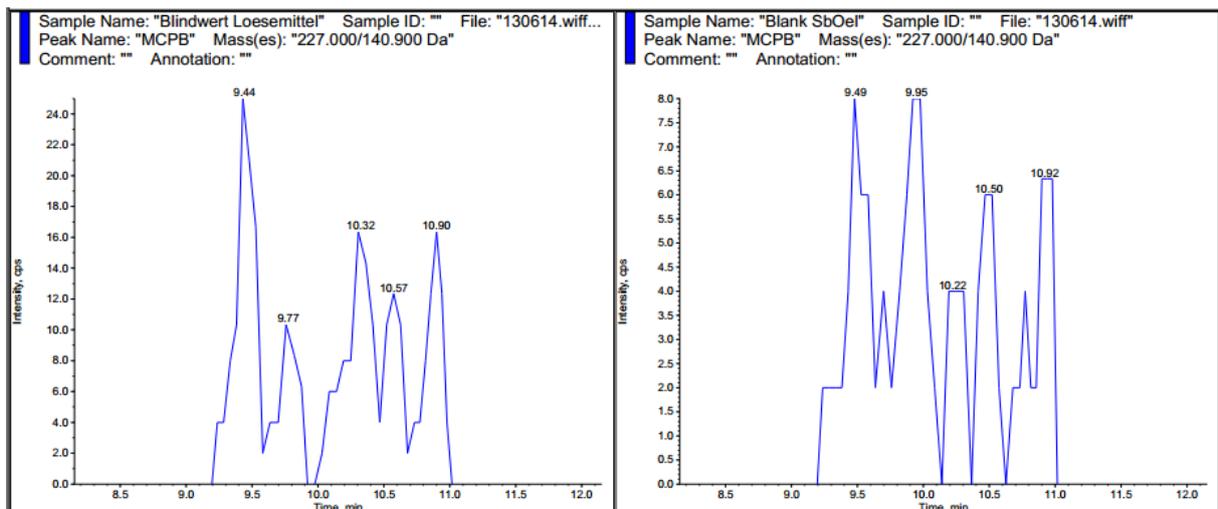


Abbildung 33: Lösemittel- und Matrix-Blank von MCPB in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)

In diesem Fall wies die Peakhöhe des Lösemittel-Blanks zur Retentionszeit von 10,2 Minuten einen Wert von 8 Einheiten auf (Abb. 33 links).

$$\frac{S}{N} = \frac{370}{8} = \frac{46}{1}$$

Das Signal-Rausch-Verhältnis für MCPB im *Sonnenblumenöl* beträgt 46:1 und liegt somit im Akzeptanzbereich. Die Nachweisgrenze liegt bei einer Signalintensität von 123 Einheiten.

Richtigkeit

Tabelle 22: Wiederfindung von MCPB in Sonnenblumenöl (0,8 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%	
1	0,3	41,3	nicht erfüllt	
2	0,4	43,8	nicht erfüllt	
3	0,3	38,8	nicht erfüllt	
4	0,3	38,8	nicht erfüllt	
5	0,3	36,3	nicht erfüllt	
6	0,2	28,8	nicht erfüllt	
7	0,4	43,8	nicht erfüllt	
Mittelwert:		38,800	nicht erfüllt	
VK (%):		13,410	AK: ≤20%	erfüllt

Alle Wiederfindungen der mit 0,8 ng/ml dotierten Proben sowie deren Mittelwert liegen unterhalb von 70% und erfüllen damit nicht das Akzeptanzkriterium (Rohdaten Anhang 9).

Tabelle 23: Wiederfindung von MCPB in Sonnenblumenöl (4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%	
1	1,5	38,0	nicht erfüllt	
2	1,8	45,8	nicht erfüllt	
3	1,4	36,0	nicht erfüllt	
4	1,5	36,8	nicht erfüllt	
5	1,7	42,0	nicht erfüllt	
6	1,9	46,8	nicht erfüllt	
7	1,6	40,5	nicht erfüllt	
Mittelwert:		40,84	nicht erfüllt	
VK (%):		10,450	AK: ≤20%	erfüllt

Auch die Wiederfindungen der Proben mit einer Dotierung von 4,0 ng/ml liegen ebenfalls unterhalb des Akzeptanzkriteriums von 70%. Somit kann die Richtigkeit der Analysemethode für MCPB im *Sonnenblumenöl* nicht bestätigt werden.

Präzision

a. Wiederholpräzision

Zwar liegen die jeweiligen Varianzkoeffizienten der mit 0,8 ng/ml und 4,0 ng/ml dotierten Proben im Akzeptanzbereich, wodurch eine Präzision bei der Analyse der Messreihen bestätigt werden könnte, jedoch weisen die Wiederfindungen Werte unterhalb des Akzeptanzkriteriums von 70% auf (Tab.20, Tab. – Richtigkeit). Deshalb kann die Wiederholpräzision für MCPB in Sonnenblumenöl nicht bestätigt werden.

b. Systempräzision

Tabelle 24: Wiederfindung von MCPB in Sonnenblumenöl (7fach Injektion 4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium	
			70,0%	120,0%
1	1,46	36,5	nicht erfüllt	
2	1,48	37,0	nicht erfüllt	
3	1,56	39,0	nicht erfüllt	
4	1,49	37,3	nicht erfüllt	
5	1,65	41,3	nicht erfüllt	
6	1,54	38,5	nicht erfüllt	
7	1,53	38,3	nicht erfüllt	
Mittelwert:		38,27	nicht erfüllt	
VK (%):		4,190	AK: ≤20%	erfüllt

Die Messinstrumente arbeiten sehr präzise, was man daran erkennt, dass der Varianzkoeffizient mit einem Wert von 4,19% das Akzeptanzkriterium erfüllt.

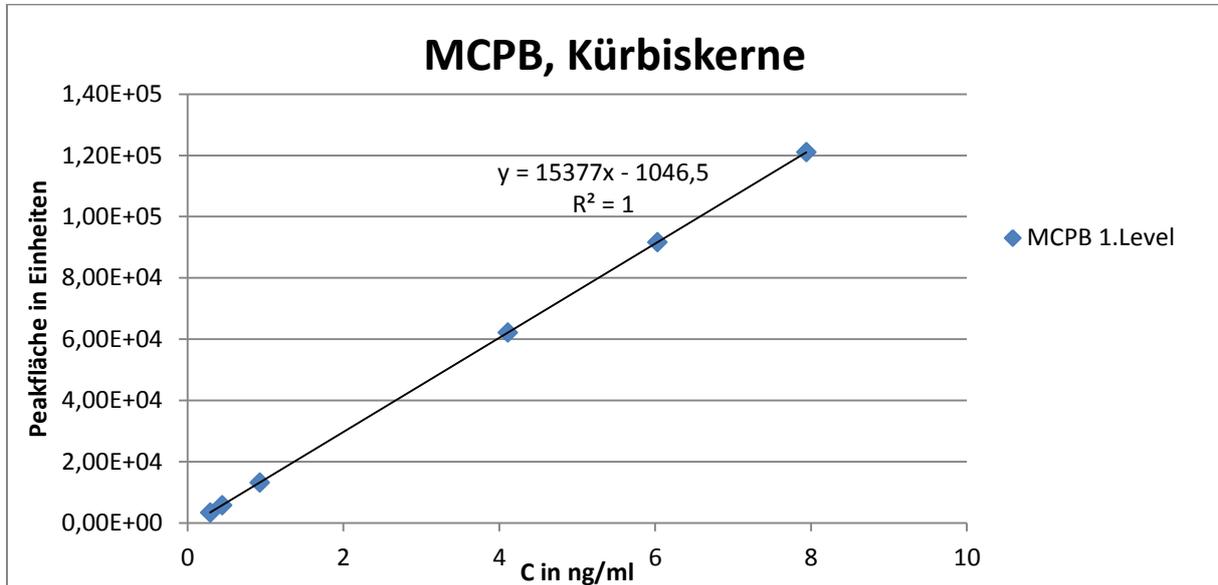
Selektivität

Wie bereits bei der Nachweis- und Bestimmungsgrenze veranschaulicht, beträgt die Signalstärke von MCPB 370 Einheiten (Abb. 32). Das Akzeptanzkriterium von < 20 % liegt somit bei einem Wert von < 74 Einheiten. Der Matrix-Blank weist einen Wert von 8 Einheiten auf und liegt somit im Akzeptanzbereich. Das bedeutet, die Methode ist selektiv für den Analyten MCPB in der Matrix *Sonnenblumenöl*.

5.3.2 Kürbiskerne

Linearität

Diagramm 12: Kalibriergeraden MCPB des Versuchstags mit Kürbiskernen



Die Kalibriergeraden von MCPB weisen für den Versuchstag mit *Kürbiskernen* ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 1 auf. Der Kalibrierpunkt der Konzentration von 2 ng/ml hatte eine zu große Abweichung, weshalb er nicht für die Kalibriergerade verwendet wurde. Auch hier könnte eine mögliche Fehlerquelle ein Pipettierfehler bei der Herstellung der Kalibrierlösung sein. Trotzdem ist die Gerade mit sechs Punkten im Akzeptanzbereich, da mindestens fünf unterschiedliche Konzentrationen vorhanden sein müssen. Mithilfe der QSM-Software konnte bestätigt werden, dass es sich um lineare Kalibrierfunktionen handelt (Anhang 12). Somit wurde die Linearität der Analysemethode für MCPB bestätigt.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Das Signal H des MCPB-Peaks in der Matrix *Kürbiskerne* betrug zur Retentionszeit von 10 Minuten ca. 520 Einheiten.

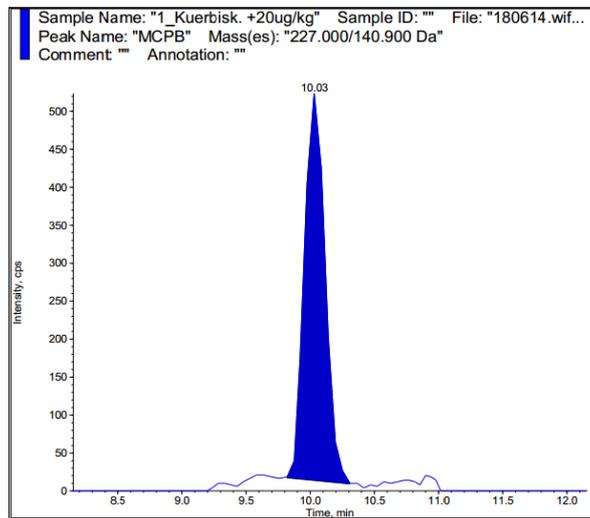


Abbildung 34: MCPB-Peak in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)

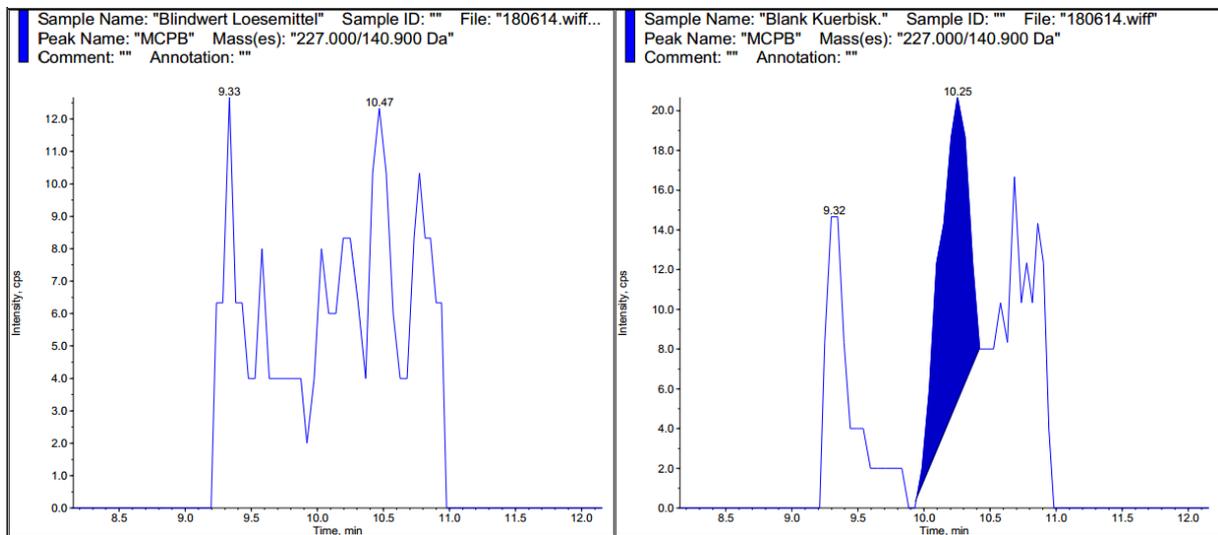


Abbildung 35: Lösemittel- und Matrix-Blank von MCPB in Kürbiskernen (0,8 ng/ml)

In diesem Fall wies die Peakhöhe des Matrix-Blanks zur Retentionszeit von 10 Minuten einen Wert von 21 Einheiten auf (Abb. 35 rechts).

$$\frac{S}{N} = \frac{520}{21} = \frac{25}{1}$$

Das Signal-Rausch-Verhältnis für MCPB in *Kürbiskernen* beträgt 25:1 und liegt somit im Akzeptanzkriterium. Die Nachweisgrenze liegt bei einer Signalintensität von 173 Einheiten.

Richtigkeit

Tabelle 25: Wiederfindung von MCPB in Kürbiskernen (7fach Injektion 4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%
1	0,4	45,0	nicht erfüllt
2	0,4	43,8	nicht erfüllt
3	0,4	52,5	nicht erfüllt
4	0,4	50,0	nicht erfüllt
5	0,4	43,8	nicht erfüllt
6	0,3	38,8	nicht erfüllt
7	0,4	46,3	nicht erfüllt
Mittelwert:		45,74	nicht erfüllt
VK (%):		9,790	AK: ≤20% erfüllt

Alle Wiederfindungen der mit 0,8 ng/ml dotierten Proben sowie deren Mittelwert liegen nicht im Akzeptanzbereich (Rohdaten Anhang 11). Der Varianzkoeffizient der Messreihe beträgt 9,79% und liegt somit im Akzeptanzbereich.

Tabelle 26: Wiederfindung von MCPB in Kürbiskernen (4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%
1	2,0	49,3	nicht erfüllt
2	2,3	56,8	nicht erfüllt
3	2,2	54,3	nicht erfüllt
4	2,0	50,8	nicht erfüllt
5	1,8	46,0	nicht erfüllt
6	1,9	47,5	nicht erfüllt
7	1,9	47,0	nicht erfüllt
Mittelwert:		50,24	nicht erfüllt
VK (%):		7,990	AK: ≤20% erfüllt

Auch die Wiederfindungen der Proben mit einer Dotierung von 4,0 ng/ml liegen ebenfalls unterhalb des Akzeptanzkriteriums von 70%. Somit kann die Richtigkeit der Analysemethode für MCPB in *Kürbiskernen* nicht bestätigt werden.

Präzision

a. Wiederholpräzision

Zwar liegen die jeweiligen Varianzkoeffizienten der mit 0,8 ng/ml und 4,0 ng/ml dotierten Proben im Akzeptanzbereich, wodurch eine Präzision bei der Analyse der Messreihen angenommen werden kann, jedoch weisen die Wiederfindungen Werte unterhalb des Akzeptanzkriteriums von 70% auf (Tab.25, Tab. 26 – Richtigkeit). Deshalb konnte die Wiederholpräzision für MCPB in *Kürbiskernen* nicht bestätigt werden.

c. Systempräzision

Tabelle 27: Wiederfindung von MCPB in Kürbiskernen (7fach Injektion 4,0 ng/ml)

Proben-Nr.	Konzentration ng/mL	Wiederfindung [%]	Akzeptanzkriterium 70,0% - 120,0%	
1	2,0	50,5	nicht erfüllt	
2	2,0	50,0	nicht erfüllt	
3	2,1	51,5	nicht erfüllt	
4	2,0	50,0	nicht erfüllt	
5	2,1	52,5	nicht erfüllt	
6	2,0	50,5	nicht erfüllt	
7	2,0	50,0	nicht erfüllt	
Mittelwert:		50,71	nicht erfüllt	
VK (%):		1,880	AK: ≤20%	erfüllt

Die Messinstrumente arbeiten sehr präzise, da der Varianzkoeffizient mit einem Wert von 1,88% das Akzeptanzkriterium erfüllt.

Selektivität

Wie bereits bei der Nachweis- und Bestimmungsgrenze veranschaulicht, beträgt die Signalstärke von MCPB 520 Einheiten. Das Akzeptanzkriterium von < 20 % liegt somit bei einem Wert von < 104 Einheiten. Der Matrix-Blank weist einen Wert von 21 Einheiten auf und liegt somit im Akzeptanzbereich. Das bedeutet, die Methode ist selektiv für den Analyten MCPB in der Matrix *Kürbiskerne*.

5.3.3 Auswertung MCPB

Tabelle 28: Zusammenfassung der Wiederfindungen von MCPB

MCPB				
Matrix	Sonnenblumenöl		Kürbiskerne	
Dotierungslevel	0,8 ng/ml	4,0 ng/ml	0,8 ng/ml	4,0 ng/ml
Kontrollprobe WDF [%]	115	103	98	112
Mittelwert WDF [%]	38,8	40,84	45,74	50,24

Die WDF bei der Analyse von MCPB weist sehr schlechte Werte im Bereich von 38,8% bis 50,24% auf, was auf Verluste des Analyten bei der Probenvorbereitung schließen lässt. Da das MCPB im Neutralen schwer löslich in Wasser ist, wurde es bei dem Extraktionsschritt mit Acetonitril aus den fetthaltigen Matrices extrahiert. Während der Phasentrennung sollte es zu keinen Verlusten gekommen sein, der Schritt der dispersiven SPE ist jedoch kritisch. Es handelt sich bei dem MCPB um eine Säure, welche mit der Diaminophase wechselwirkt und somit nur geringe Mengen des zudotierten MCPB in Lösung bleiben. Die Methode für die Analyse von MCPB in den Matrices Sonnenblumenöl und *Kürbiskerne* erfüllt nicht alle Akzeptanzkriterien. Jedoch weist sie bei der Untersuchung der Wiederholpräzision und der Systempräzision Varianzkoeffizienten im Akzeptanzbereich auf. Das bedeutet, dass, trotz der schlechten Wiederfindungen, die Probenvorbereitung reproduzierbare Ergebnisse liefert und die Analysemethode präzise Ergebnisse erzielt. Da auch durch die WDF der Kontrollproben im Bereich von 98% bis 115% Einflüsse der Matrixkomponente ausgeschlossen werden können, besteht die Möglichkeit, bei zukünftiger Analyse des MCPB mit der Methode, die richtige Konzentration über einen Faktor zu bestimmen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die QuEChERS-Methode bietet durch die einfache Handhabung, den geringen Lösemittelverbrauch und dem geringen Zeitaufwand für die Probenvorbereitung viele Vorteile für die Rückstandsanalyse von Pestiziden in Lebensmitteln. Da bei der SGS Institut Fresenius GmbH die QuEChERS-Methode bisher nur für nicht fetthaltige Lebensmittel Anwendung fand und fetthaltige Lebensmittel bislang mit hohem Zeitaufwand und Lösemittelverbrauch analysiert wurden, war es das Ziel dieser Arbeit, die QuEChERS-Methode für die Pestizidrückstandanalyse in fetthaltigen Lebensmitteln mittels LC-MS/MS anzupassen. Aufgrund der störenden Fettbestandteile für die Analyse wurden der Schritt der Einwaage und der Schritt der Aufreinigung verändert. Um die Menge an Störstoffen der

Matrix so gering wie möglich zu halten, wurde eine bisherige Einwaage von 10 g auf 2 g reduziert. Der bisherige Aufreinigungsschritt beinhaltete die Verwendung von modifiziertem Kieselgelmaterial mit primären und sekundären Aminen, welche Zucker und organische Säuren, jedoch keine Fette entfernen. Der Schritt des Cleanup wurde so angepasst, dass zusätzlich unpolare Stoffe, wie Fette, mithilfe eines C18-Kieselgelmateriale entfernt werden sollten. Die Problematik bei der Verwendung dieser beiden Materialien ist, dass ebenso unpolare als auch saure Pestizidanalyten gebunden werden können. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden die Pestizidanalyten Butoxycarboxim, Linuron und MCPB in Betracht gezogen. Butoxycarboxim ist eine polare Substanz, welche leicht in Wasser löslich ist. Linuron ist stark unpolar und löst sich sehr schwer in Wasser, während das MCPB durch seinen sauren Charakter je nach pH-Wert leicht bis schwer löslich in Wasser ist. Die Anpassung konnte für die Pestizidanalyten Butoxycarboxim und Linuron erfolgreich durchgeführt werden, da die in dieser Arbeit ausgewerteten Validierungsparameter der beiden Analyten Werte in den Akzeptanzbereichen aufwiesen. Die Wiederfindungen von Butoxycarboxim lagen im Akzeptanzbereich, da es bei dem Aufreinigungsschritt nicht an die Diamino- oder C18-Phase gebunden wurde. Wider Erwarten lagen die Wiederfindungen von Linuron ebenfalls im Akzeptanzbereich. Es wurde vermutet, dass nur geringe Mengen an die C18-Phase gebunden wurden, da nur geringe Mengen für den Aufreinigungsschritt verwendet wurden und die Fettbestandteile stärker mit der unpolaren C18-Phase wechselwirken. Die Wiederfindungen von MCPB lagen jedoch außerhalb des Akzeptanzbereichs. Hier wurde eine starke Wechselwirkung mit der Diaminophase vermutet, da es sich bei MCPB um eine Säure handelt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Pestizidanalyten sind nur ein Ausschnitt der 287 zu validierenden Analyten für die QuEChERS-Methode. Die Problematik bei der Anpassung von Multimethoden an beispielsweise neue Matrices ist, dass bei der Vielzahl der zu analysierenden Pestizide, nicht alle chemischen und physikalischen Eigenschaften berücksichtigt werden können und somit Pestizidanalyten, die zuvor gute Wiederfindungen aufwiesen, nicht mehr analysiert werden können. Die Entscheidung, ob eine validierte Methode im Routinebetrieb angewendet wird, muss deshalb hinsichtlich der analysierbaren Pestizide erfolgen.

Damit die Validierung der QuEChERS-Methode für fetthaltige Lebensmittel abgeschlossen werden kann, ist die Untersuchung der Methode auf die intermediäre Präzision erforderlich.

Literaturverzeichnis

- [1] Wheeler, Willis B. / Lee, S. Mark / Richman, Sylvia J.: Pesticides in Agriculture and the Environment, Basel, 2002, S. 204.
- [2] Verordnung (EG) Nr. 396/2005 des europäischen Parlaments und Rates vom 23. Februar 2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs und zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG des Rates, 16.03.2005, elektronisch verfügbar: URL:<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0396&from=DE>, [Stand 21.10.2014]
- [3] Offizielle Seite der QuEChERS-Methode des Informationsdienstes der Chemischen und Veterinäruntersuchungsämter (CVUA), <http://quechers.cvua-stuttgart.de/>, [Stand 21.10.2014]
- [4] Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit, 01.02.2002 elektronisch verfügbar: http://www.bfr.bund.de/cm/343/2002_178_de_efs.pdf, [Stand 21.10.2014]
- [5] Offizielle Seite des Bundesinstituts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Amtliche Lebensmittelüberwachung, URL: http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/01_SichereLM/lm_SichereLM_node.html, [Stand 21.10.2014]
- [6] Offizielle Seite des Bundesinstituts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Lebensmittelüberwachung, http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/01_WerMachtWas/lm_WerMachtWas_node.html, [Stand 21.10.2014]
- [7] Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates, 24.11.2009, elektronisch verfügbar: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1107&from=DE>, [Stand 21.10.2014]
- [8] Heitefuss, R., Pflanzenschutz: Grundlagen der praktischen Phytomedizin, Taschenbuch, 1.08.2000, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, S.159 ff
- [9] Martin, K., Sauerborn, J., Agrarökologie, 01.03.2006, Taschenbuch, 1. Auflage, Verlag UTB, S.168

-
- [10] Fuhrmann, G.F., Toxikologie für Naturwissenschaftler: Einführung in die Theoretische und Spezielle Toxikologie, 15.03.2006, Taschenbuch, 1. Auflage, Verlag Vieweg+Teubner
- [11] Becker, H., Pflanzenzüchtung, 20.04.2011 2.Auflage, Verlag UTB, Stuttgart, S.231
- [12] Eisenbrand, G (Hrsg.), Schreier, P. (Hrsg.), Meyer, A.H., RÖMPP Lexikon Lebensmittelchemie, 24.05.2006, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 404
- [13] Bahadir, M. (Hrsg.), Parlar, H. (Hrsg.) Spiteller, M. (Hrsg.), Springer Umweltlexikon, 18.02.2000, 2.Auflage, Verlag Springer, S. 469
- [14] Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB), § 9 Pflanzenschutz- oder sonstige Mittel, 01.09.2005, elektronisch verfügbar: http://www.gesetze-im-internet.de/lfgb/_9.html, [Stand 21.10.2014]
- [15] Cammann, K. (Hrsg.): Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren – Anwendungen - Qualitätssicherung, 2001, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, S. 5-1 ff
- [16] Gey, M., Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, 05.08.2008, 2.Auflage, Springer Verlag, Berlin
- [17] Otto, M., Analytische Chemie, 18.04.2011, 4.Auflage, Wiley-VCH Verlag, S.416
- [18] Unger, K. K., Handbuch der HPLC, Teil.2, Präparative Säulenflüssig-Chromatographie, 01.01.1994, Git Verlag
- [19] Budzikiewicz, H., Schäfer, M., Massenspektrometrie - Eine Einführung, 2005, Auflage 5, Verlag Wiley-VCH Verlag, S.11 ff
- [20] Plätzer, M., Einsatz moderner Analysenmethoden in der Biopharmazie – Kappillarelektrophoretische Untersuchungen und Kopplung zwischen Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie, 2002, Schaker Verlag, Aachen
- [21] Schröder, E., Massenspektrometrie, Begriffe und Definitionen, 1991, Springer Verlag, Heidelberg, Band 260
- [22] Standardarbeitsanweisung M 000, Validierung von Analyseverfahren, Version 1, 2005, SGS Institut Fresenius GmbH, Berlin
- [23] Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC, Herausgeber Stavros Kromidas, Hans-Joachim Kuss, Verlag Wiley-VCH, Auflage 1, 28.02.2012
-

-
- [24] Kromidas, S., Validierung in der Analytik, , 25.Mai 2011, 2.Auflage, Verlag Wiley-VCH
- [25] Anastassiades, M., Barba, A., Paya, P., et al, Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas an liquid chromatography an tandem mass spectrometric detection, 2007, Springer Verlag
- [26] Lorchel, B., Einführung in die thermischen Trennverfahren, Trennung von Gas, Dampf und Flüssigkeitsgemischen, 25.07.2012, 2. Auflage, Oldenburg Wissenschaftsverlag, S. 21
- [27] Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006, Natriumcitrat dibasisch Sesquihydrat, 21.05.2014, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- [28] Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006, Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 21.02.2012, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- [29] Riedel, E., Janiak, C., Anorganische Chemie, 2007, 7. Auflage, Verlag Walter de Gruyter, Berlin
- [30] Brandenburger, T., Königshoff, M., Kurzlehrbuch Biochemie, 21.03.2012,3. Auflage, Verlag Thieme,S.95
- [31] ChemgaPedia, Magnesiumsulfat, http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/6/ac/bibliothek/_vlu/magnesiumsulfat.vlu.html, [Stand 21.10.2014]
- [32] ChemgaPedia, Magnesium, <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/ac/elemente/vlu/12.vlu/Page/vsc/de/ch/16/ac/elemente/erdalkalimetalle/magnesium/mg06.vscml.html>, [Stand 21.10.2014]
- [33] Chemie für Einsteiger und Durchsteiger, Verlag Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1.Auflage, 19.12.2012 Autor Thomas Wurm, S.248
- [34] Cunha, S.C., Lehotay, S.J., Mastovska, K., et al, Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives, 2007, Journal of Separation Science
- [35] Horton, R., Moran, L.A., Biochemie - Das Basislehrbuch, 01.07.2008, 4. Auflage, Addison-Wesley Verlag, S. 51
- [36] Nollet, L.M.L. (Hrsg.), Handbook of Water Analysis, 29.08.2013, 3. Auflage, Verlag Crc Press Inc., S. 27 ff
- [37] The Pesticide Manual, 2003, 13. Auflage, British Crop Protection Council
- [38] Standardarbeitsanweisung M 2069, Pestizid- Multimethode nach QuEChERS, Version 2, 2010, SGS Institut Fresenius GmbH, Berlin
-

Anhangsverzeichnis

Anhang 1 – Ergebnisse der Wiederfindung (Butoxycarboxim/Sonnenblumenöl).....	76
Anhang 2 – Linearitätstest (Butoxycarboxim/ Sonnenblumenöl).....	77
Anhang 3 – Ergebnisse der Wiederfindung (Butoxycarboxim/Kürbiskernen).....	79
Anhang 4 – Linearitätstest (Butoxycarboxim/ Kürbiskerne).....	80
Anhang 5 – Ergebnisse der Wiederfindung (Linuron/Sonnenblumenöl).....	82
Anhang 6 – Linearitätstest (Linuron/ Sonnenblumenöl).....	83
Anhang 7 – Ergebnisse der Wiederfindung (Linuron/Kürbiskerne).....	85
Anhang 8 – Linearitätstest (Linuron/ Kürbiskerne).....	86
Anhang 9 – Ergebnisse der Wiederfindung (MCPB/Sonnenblumenöl).....	88
Anhang 10 – Linearitätstest (MCPB/ Sonnenblumenöl).....	89
Anhang 11 – Ergebnisse der Wiederfindung (MCPB/Kürbiskerne).....	90
Anhang 12 – Linearitätstest (MCPB/ Kürbiskerne).....	91

Anhang 1 – Ergebnisse der Wiederfindung (Butoxycarboxim/Sonnenblumenöl)

Analyt	Butoxycarboxim					
Matrix	Sonnenblumenöl					
Level	0,8 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2.Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
Lösemittel-Blank	-	-	-	-	-	-
Matrix-Blank	-	-	-	-	-	-
Dot. Matrix-Blank	0,93	116	0,88	110	0,90	113
1	0,81	102	0,75	94	0,78	98
2	0,75	94	0,78	97	0,76	95
3	0,74	92	0,79	98	0,76	95
4	0,75	94	0,77	97	0,76	95
5	0,77	96	0,77	96	0,77	96
6	0,72	90	0,71	89	0,72	89
7	0,77	96	0,78	98	0,77	97
Level	4,0 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2.Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
Lösemittel-Blank	-	-	-	-	-	-
Matrix-Blank	-	-	-	-	-	-
Dot. Matrix-Blank	4,05	101	3,97	99	4,01	100
1	3,64	91	3,60	90	3,62	91
2	3,72	93	3,64	91	3,68	92
3	3,79	95	3,76	94	3,78	94
4	3,75	94	3,81	95	3,78	95
5	3,71	93	3,72	93	3,72	93
6	3,81	95	3,73	93	3,77	94
7	3,77	94	3,74	94	3,76	94
Level	7-fach Injektion 4,0 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2.Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
1	3,67	92	3,65	91	3,66	92
2	3,63	91	3,77	94	3,70	93
3	3,78	95	3,81	95	3,80	95
4	3,75	94	3,86	97	3,81	95
5	3,78	95	3,77	94	3,78	94
6	3,64	91	3,80	95	3,72	93
7	3,76	94	3,92	98	3,84	96

Anhang 2 – Linearitätstest (Butoxycarboxim/ Sonnenblumenöl)

1.Übergang

Butoxycarboxim/Sonnenblumenöl 1.Übergang (106) Kalibrierfunktionen/Anpassungstest		
Methode : CA+LC2+Sofia_pos		
Parameter (x) : Konzentration [ng/ml]		
Messwert (y) : Peakfläche [Einheiten]		
LINEARE KALIBRIERUNG :		
Achsenabschnitt (a): 4865.6258 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x)
Steigung (b): 193485 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1061 [ng/ml]	
Reststandardabw. (sy): 454.831 [Einheiten]	ym: 605857.143 [Einheiten]	
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0023507 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.08 %		
lin. Korrelationskoeff. : 1.000000		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.01092 [ng/ml] ; yp: 5922.1411 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 5922.1411 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.00546 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.01092 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.08859 [ng/ml]		
KALIBRIERFUNKTION 2. GRADES :		
a: 5161.8135 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x + c*x ²)
b: 193157 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1061 [ng/ml]	
c: 42.3177 [Einheiten]/[ng/ml] ²	ym: 605857.143 [Einheiten]	
Reststandardabw. (sy): 412.22 [Einheiten]		
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0021312 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.07 %		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.01142 [ng/ml] ; yp: 6264.9997 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 6264.9997 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.00571 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.01142 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.09234 [ng/ml]		
MANDEL-ANPASSUNGSTEST : Prüfwert PW = 2.09 (p=77.79%) (Prüfwert <= Vergleichs-Wert : Lineare Kalibrierung ist besser!)		
Vergleichswert F(1,4,99%) = 21.2		

2.Übergang

Butoxycarboxim/Sonnenblumenöl 2.Übergang (63)		
Kalibrierfunktionen/Anpassungstest		
Methode : CA+LC2+Sofia_pos		
Parameter (x) : Konzentration [ng/ml]		
Messwert (y) : Peakfläche [Einheiten]		
LINEARE KALIBRIERUNG :		
Achsenabschnitt (a): 1009.3088 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x)
Steigung (b): 89025.9 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1056 [ng/ml]	
Reststandardabw. (sy): 304.137 [Einheiten]	ym: 277485.714 [Einheiten]	
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0034163 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.11 %		
lin. Korrelationskoeff. :0.999999		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.01586 [ng/ml] ; yp: 1715.1822 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 1715.1822 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.00793 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.01586 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.10058 [ng/ml]		
KALIBRIERFUNKTION 2. GRADES :		
a: 816.4841 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x + c*x²)
b: 89246.1 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1056 [ng/ml]	
c: -28.6376 [Einheiten]/[ng/ml]²	ym: 277485.714 [Einheiten]	
Reststandardabw. (sy): 285.144 [Einheiten]		
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0032014 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.10 %		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.01722 [ng/ml] ; yp: 1584.7188 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 1584.7188 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.00861 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.01722 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.10346 [ng/ml]		
MANDEL-ANPASSUNGSTEST : Prüfwert PW = 1.69 (p=73.63%) (Prüfwert <= Vergleichs-Wert : Lineare Kalibrierung ist besser!)		
Vergleichswert F(1,4,99%) = 21.2		

Anhang 3 – Ergebnisse der Wiederfindung (Butoxycarboxim/Kürbiskernen)

Analyt	Butoxycarboxim					
Matrix	Kürbiskerne					
Level	0,8 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2.Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
Lösemittel-Blank	-	-	-	-	-	-
Matrix-Blank	-	-	-	-	-	-
Dot. Matrix-Blank	1,04	130	1,06	133	1,05	131
1	0,93	116	0,937	117	0,93	117
2	0,85	106	0,826	103	0,84	105
3	0,80	99	0,757	95	0,78	97
4	0,74	93	0,706	88	0,72	90
5	0,73	92	0,727	91	0,73	91
6	0,74	92	0,708	89	0,72	90
7	0,70	87	0,712	89	0,71	88
Level	4,0 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2.Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
Lösemittel-Blank	-	-	-	-	-	-
Matrix-Blank	-	-	-	-	-	-
Dot. Matrix-Blank	3,54	89	3,57	89	3,56	89
1	3,40	85	3,52	88	3,46	87
2	3,59	90	3,56	89	3,58	89
3	3,46	87	3,54	89	3,50	88
4	3,43	86	3,54	89	3,49	87
5	3,48	87	3,6	90	3,54	89
6	3,52	88	3,61	90	3,57	89
7	3,58	90	3,62	91	3,60	90
Level	7-fach Injektion 4,0 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2.Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
1	3,57	89,25	3,77	94	3,67	92
2	3,81	95,25	3,60	90	3,71	93
3	3,52	88	3,63	91	3,58	89
4	3,66	91,5	3,66	92	3,66	92
5	3,85	96,25	3,55	89	3,70	93
6	3,64	91	3,64	91	3,64	91
7	3,56	89	3,95	99	3,76	94

Anhang 4 – Linearitätstest (Butoxycarboxim/ Kürbiskerne)

1.Übergang

Butoxycarboxim/Kürbiskerne 1.Übergang (106) Kalibrierfunktionen/Anpassungstest

Methode : CA+LC2+Sofia_pos
Parameter (x) : Konzentration [ng/ml]
Messwert (y) : Peakfläche [Einheiten]

LINEARE KALIBRIERUNG :

Achsenabschnitt (a): 6531.0517 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x)
Steigung (b): 179303 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1083 [ng/ml]	
Reststandardabw. (sy): 1276.05 [Einheiten]	ym: 563857.143 [Einheiten]	
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0071167 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.23 %		
lin. Korrelationskoeff. :0.999998		

Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.03299 [ng/ml] ; yp: 9488.3371 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !

Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):

Kritischer Wert yk: 9488.3371 [Einheiten]
Nachweisgrenze xNG: 0.01649 [ng/ml]
Erfassungsgrenze xEG: 0.03299 [ng/ml]
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.13201 [ng/ml]

KALIBRIERFUNKTION 2. GRADES :

a: 5547.4393 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x + c*x²)
b: 180366 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1083 [ng/ml]	
c: -133.799 [Einheiten]/[ng/ml]²	ym: 563857.143 [Einheiten]	
Reststandardabw. (sy): 1011.61 [Einheiten]		
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0056346 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.18 %		

Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.02988 [ng/ml] ; yp: 8242.2607 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !

Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):

Kritischer Wert yk: 8242.2607 [Einheiten]
Nachweisgrenze xNG: 0.01494 [ng/ml]
Erfassungsgrenze xEG: 0.02988 [ng/ml]
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.12763 [ng/ml]

MANDEL-ANPASSUNGSTEST : Prüfwert PW = 3.96 (p=88.24%) (Prüfwert <= Vergleichs-Wert : Lineare Kalibrierung ist besser!)
Vergleichswert F(1,4,99%) = 21.2

2.Übergang

Butoxycarboxim/Kürbiskerne 2.Übergang (63)		
Kalibrierfunktionen/Anpassungstest		
Methode : CA+LC2+Sofia_pos		
Parameter (x) : Konzentration [ng/ml]		
Messwert (y) : Peakfläche [Einheiten]		
LINEARE KALIBRIERUNG :		
Achsenabschnitt (a): 2510.8611 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x)
Steigung (b): 81857.3 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1077 [ng/ml]	
Reststandardabw. (sy): 419.562 [Einheiten]	ym: 256900.000 [Einheiten]	
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0051255 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.16 %		
lin. Korrelationskoeff. :0.999999		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.02379 [ng/ml] ; yp: 3484.3603 [Einheiten] (p=95%)		
Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 3484.3603 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.01189 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.02379 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.11544 [ng/ml]		
KALIBRIERFUNKTION 2. GRADES :		
a: 2675.9913 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x + c*x²)
b: 81673.9 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1077 [ng/ml]	
c: 23.5427 [Einheiten]/[ng/ml]²	ym: 256900.000 [Einheiten]	
Reststandardabw. (sy): 438.532 [Einheiten]		
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0053597 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.17 %		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.02870 [ng/ml] ; yp: 3847.9253 [Einheiten] (p=95%)		
Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 3847.9253 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.01435 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.02870 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.12386 [ng/ml]		
MANDEL-ANPASSUNGSTEST :		
Prüfwert PW = 0.58	(p=51.01%)	(Prüfwert <= Vergleichs-Wert : Lineare Kalibrierung ist besser!)
Vergleichswert F(1,4,99%) = 21.2		

Anhang 5 – Ergebnisse der Wiederfindung (Linuron/Sonnenblumenöl)

Analyt	Linuron					
Matrix	Sonnenblumenöl					
Level	0,8 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2. Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
Lösemittel-Blank	-	-	-	-	-	-
Matrix-Blank	-	-	-	-	-	-
Dot. Matrix-Blank	0,80	99	0,80	100	0,80	100
1	0,67	84	0,67	84	0,67	84
2	0,67	84	0,69	86	0,68	85
3	0,67	83	0,67	84	0,67	83
4	0,65	81	0,66	82	0,65	81
5	0,67	84	0,65	81	0,66	82
6	0,64	80	0,64	79	0,64	80
7	0,66	83	0,64	80	0,65	81
Level	4,0 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2. Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
Lösemittel-Blank	-	-	-	-	-	-
Matrix-Blank	-	-	-	-	-	-
Dot. Matrix-Blank	3,91	98	4,05	101	3,98	100
1	3,38	85	3,38	85	3,38	85
2	3,33	83	3,28	82	3,31	83
3	3,39	85	3,36	84	3,38	84
4	3,37	84	3,37	84	3,37	84
5	3,41	85	3,42	86	3,42	85
6	3,36	84	3,37	84	3,37	84
7	3,31	83	3,28	82	3,30	82
Level	7-fach Injektion 4,0 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2. Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
1	3,31	83	3,32	83	3,32	83
2	3,34	84	3,35	84	3,35	84
3	3,36	84	3,39	85	3,38	84
4	3,38	85	3,41	85	3,40	85
5	3,39	85	3,43	86	3,41	85
6	3,39	85	3,39	85	3,39	85
7	3,41	85	3,42	86	3,42	85

Anhang 6 – Linearitätstest (Linuron/ Sonnenblumenöl)

1. Übergang

Linuron/Sonnenblumenöl 1.Übergang (160) Kalibrierfunktionen/Anpassungstest		
Methode : LC1+PHH		
Parameter (x) : Konzentration [ng/ml]		
Messwert (y) : Peakfläche [Einheiten]		
LINEARE KALIBRIERUNG :		
Achsenabschnitt (a): 4865.6258 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x)
Steigung (b): 193485 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1061 [ng/ml]	
Reststandardabw. (sy): 454.831 [Einheiten]	ym: 605857.143 [Einheiten]	
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0023507 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.08 %		
lin. Korrelationskoeff. : 1.000000		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.01092 [ng/ml] ; yp: 5922.1411 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 5922.1411 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.00546 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.01092 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.08859 [ng/ml]		
KALIBRIERFUNKTION 2. GRADES :		
a: 5161.8135 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x + c*x ²)
b: 193157 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1061 [ng/ml]	
c: 42.3177 [Einheiten]/[ng/ml] ²	ym: 605857.143 [Einheiten]	
Reststandardabw. (sy): 412.22 [Einheiten]		
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0021312 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.07 %		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.01142 [ng/ml] ; yp: 6264.9997 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 6264.9997 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.00571 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.01142 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.09234 [ng/ml]		
MANDEL-ANPASSUNGSTEST : Prüfwert PW = 2.09 (p=77.79%) (Prüfwert <= Vergleichs-Wert : Lineare Kalibrierung ist besser!)		
Vergleichswert F(1,4,99%) = 21.2		

2. Übergang

Linuron/Sonnenblumenöl 2.Übergang (182)		
Kalibrierfunktionen/Anpassungstest		
Methode : LC1+PHH		
Parameter (x) : Konzentration [ng/ml]		
Messwert (y) : Peakfläche [Einheiten]		
LINEARE KALIBRIERUNG :		
Achsenabschnitt (a): 1009.3088 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x)
Steigung (b): 89025.9 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1056 [ng/ml]	
Reststandardabw. (sy): 304.137 [Einheiten]	ym: 277485.714 [Einheiten]	
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0034163 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.11 %		
lin. Korrelationskoeff. : 0.999999		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.01586 [ng/ml] ; yp: 1715.1822 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 1715.1822 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.00793 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.01586 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.10058 [ng/ml]		
KALIBRIERFUNKTION 2. GRADES :		
a: 816.4841 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x + c*x²)
b: 89246.1 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1056 [ng/ml]	
c: -28.6376 [Einheiten]/[ng/ml]²	ym: 277485.714 [Einheiten]	
Reststandardabw. (sy): 285.144 [Einheiten]		
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0032014 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.10 %		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.01722 [ng/ml] ; yp: 1584.7188 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 1584.7188 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.00861 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.01722 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.10346 [ng/ml]		
MANDEL-ANPASSUNGSTEST : Prüfwert PW = 1.69 (p=73.63%) (Prüfwert <= Vergleichs-Wert : Lineare Kalibrierung ist besser!)		
Vergleichswert F(1,4,99%) = 21.2		

Anhang 7 – Ergebnisse der Wiederfindung (Linuron/Kürbiskerne)

Analyt	Linuron					
Matrix	Kürbiskerne					
Level	0,8 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2. Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
Lösemittel-Blank	-	-	-	-	-	-
Matrix-Blank	-	-	-	-	-	-
Dot. Matrix-Blank	0,78	98	0,81	101	0,79	99
1	0,64	80	0,68	85	0,66	83
2	0,67	84	0,67	84	0,67	84
3	0,64	80	0,68	85	0,66	82
4	0,66	83	0,67	84	0,67	83
5	0,65	81	0,68	85	0,66	83
6	0,64	81	0,67	84	0,66	82
7	0,65	81	0,65	81	0,65	81
Level	4,0 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2. Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
Lösemittel-Blank	-	-	-	-	-	-
Matrix-Blank	-	-	-	-	-	-
Dot. Matrix-Blank	4,05	101	4,03	101	4,04	101
1	3,41	85	3,37	84	3,39	85
2	3,33	83	3,27	82	3,30	83
3	3,30	83	3,26	82	3,28	82
4	3,34	84	3,28	82	3,31	83
5	3,34	84	3,40	85	3,37	84
6	3,30	83	3,25	81	3,28	82
7	3,31	83	3,31	83	3,31	83
Level	7-fach Injektion 4,0 ng/ml					
Probe	1. Übergang [ng/ml]	1. WDF [%]	2. Übergang [ng/ml]	2. WDF [%]	MW Übergänge [ng/ml]	MW WDF [%]
1	3,22	81	3,19	80	3,21	80
2	3,23	81	3,28	82	3,26	81
3	3,28	82	3,20	80	3,24	81
4	3,24	81	3,31	83	3,28	82
5	3,24	81	3,26	82	3,25	81
6	3,25	81	3,24	81	3,25	81
7	3,45	86	3,14	79	3,30	82

Anhang 8 – Linearitätstest (Linuron/ Kürbiskerne)

1.Übergang

Linuron/Kürbiskerne 1.Übergang (160) Kalibrierfunktionen/Anpassungstest		
Methode : LC1+PHH		
Parameter (x) : Konzentration [ng/ml]		
Messwert (y) : Peakfläche [Einheiten]		
LINEARE KALIBRIERUNG :		
Achsenabschnitt (a): 16510.8660 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x)
Steigung (b): 624175 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1073 [ng/ml]	
Reststandardabw. (sy): 1040.19 [Einheiten]	ym: 1956000.000 [Einheiten]	
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0016665 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.05 %		
lin. Korrelationskoeff. : 1.000000		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.00772 [ng/ml] ; yp: 18921.1468 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 18921.1468 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.00386 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.00772 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.06150 [ng/ml]		
KALIBRIERFUNKTION 2. GRADES :		
a: 15591.6826 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x + c*x²)
b: 625165 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1073 [ng/ml]	
c: -124.443 [Einheiten]/[ng/ml]²	ym: 1956000.000 [Einheiten]	
Reststandardabw. (sy): 705.161 [Einheiten]		
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0011294 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.04 %		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.00602 [ng/ml] ; yp: 17474.7034 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 17474.7034 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.00301 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.00602 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.03698 [ng/ml]		
MANDEL-ANPASSUNGSTEST : Prüfwert PW = 6.88 (p=94.14%) (Prüfwert <= Vergleichs-Wert : Lineare Kalibrierung ist besser!)		
Vergleichswert F(1,4,99%) = 21.2		

2.Übergang

Linuron/Kürbiskerne 2.Übergang (182) Kalibrierfunktionen/Anpassungstest		
Methode : LC1+PHH		
Parameter (x) : Konzentration [ng/ml]		
Messwert (y) : Peakfläche [Einheiten]		
LINEARE KALIBRIERUNG :		
Achsenabschnitt (a): 4166.8184 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x)
Steigung (b): 432563 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1080 [ng/ml]	
Reststandardabw. (sy): 2004.02 [Einheiten]	ym: 1348571.429 [Einheiten]	
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0046329 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.15 %		
lin. Korrelationskoeff. : 0.999999		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.02149 [ng/ml] ; yp: 8814.1154 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 8814.1154 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.01074 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.02149 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.11276 [ng/ml]		
KALIBRIERFUNKTION 2. GRADES :		
a: 3684.1046 [Einheiten]	N: 7	(y=a + b*x + c*x²)
b: 433091 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.1080 [ng/ml]	
c: -67.207 [Einheiten]/[ng/ml]²	ym: 1348571.429 [Einheiten]	
Reststandardabw. (sy): 2186.78 [Einheiten]		
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0050541 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.16 %		
Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.02696 [ng/ml] ; yp: 9523.0682 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !		
Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):		
Kritischer Wert yk: 9523.0682 [Einheiten]		
Nachweisgrenze xNG: 0.01348 [ng/ml]		
Erfassungsgrenze xEG: 0.02696 [ng/ml]		
Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.12214 [ng/ml]		
MANDEL-ANPASSUNGSTEST : Prüfwert PW = 0.20 (p=32.15%) (Prüfwert <= Vergleichs-Wert : Lineare Kalibrierung ist besser!)		
Vergleichswert F(1,4,99%) = 21.2		

Anhang 9 – Ergebnisse der Wiederfindung (MCPB/Sonnenblumenöl)

Analyt	MCPB	
Matrix	Sonnenblumenöl	
Level	0,8 ng/ml	
Probe	Konzentration [ng/ml]	WDF [%]
Lösemittel-Blank	-	-
Matrix-Blank	-	-
Dot. Matrix-Blank	0,92	115
1	0,33	41
2	0,35	44
3	0,31	39
4	0,31	39
5	0,29	37
6	0,23	28
7	0,35	44
Level	4,0 ng/ml	
Probe	Konzentration [ng/ml]	WDF [%]
Lösemittel-Blank	-	-
Matrix-Blank	-	-
Dot. Matrix-Blank	4,14	104
1	1,52	38
2	1,83	46
3	1,44	36
4	1,47	37
5	1,68	42
6	1,87	47
7	1,62	41
Level	7-fach Injektion 4,0 ng/ml	
Probe	Konzentration [ng/ml]	WDF [%]
1	1,46	37
2	1,48	37
3	1,56	39
4	1,49	37
5	1,65	41
6	1,54	39
7	1,53	38

Anhang 10 – Linearitätstest (MCPB/ Sonnenblumenöl)

MCPB/Sonnenblumenöl (140)

Kalibrierfunktionen/Anpassungstest

Methode : CA+LC2+Sofia_pos
 Parameter (x) : Konzentration [ng/ml]
 Messwert (y) : Peakfläche [Einheiten]

LINEARE KALIBRIERUNG :

Achsenabschnitt (a): 36.3220 [Einheiten]	N: 6	(y=a + b*x)
Steigung (b): 12928.9 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.2915 [ng/ml]	
Reststandardabw. (sy): 63.9253 [Einheiten]	ym: 42591.667 [Einheiten]	
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0049444 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.15 %		
lin. Korrelationskoeff. : 0.999999		

Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.02471 [ng/ml] ; yp: 196.0360 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !

Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):

Kritischer Wert yk: 196.0360 [Einheiten]
 Nachweisgrenze xNG: 0.01235 [ng/ml]
 Erfassungsgrenze xEG: 0.02471 [ng/ml]
 Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.13437 [ng/ml]

KALIBRIERFUNKTION 2. GRADES :

a: -5.1100 [Einheiten]	N: 6	(y=a + b*x + c*x ²)
b: 12984.1 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.2915 [ng/ml]	
c: -7.17281 [Einheiten]/[ng/ml] ²	ym: 42591.667 [Einheiten]	
Reststandardabw. (sy): 47.6523 [Einheiten]		
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0036835 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.11 %		

Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.02153 [ng/ml] ; yp: 134.6694 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !

Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):

Kritischer Wert yk: 134.6694 [Einheiten]
 Nachweisgrenze xNG: 0.01077 [ng/ml]
 Erfassungsgrenze xEG: 0.02153 [ng/ml]
 Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.13125 [ng/ml]

MANDEL-ANPASSUNGSTEST : Prüfwert PW = 4.20 (p=86.71%) (Prüfwert <= Vergleichs-Wert : Lineare Kalibrierung ist besser!)
 Vergleichswert F(1,3,99%) = 34.1

Anhang 11 – Ergebnisse der Wiederfindung (MCPB/Kürbiskerne)

Analyt	MCPB	
Matrix-Blank	Kürbiskerne	
Level	0,8 ng/ml	
Probe	Konzentration [ng/ml]	WDF [%]
Lösemittel-Blank	-	-
Matrix-Blank	0,08	-
Dot. Matrix-Blank	0,79	98
1	0,36	45
2	0,35	44
3	0,42	52
4	0,40	49
5	0,35	43
6	0,31	39
7	0,37	46
Level	4,0 ng/ml	
Probe	Konzentration [ng/ml]	WDF [%]
Lösemittel-Blank	Kein Peak	-
Matrix-Blank	Kein Peak	-
Dot. Matrix-Blank	4,47	112
1	1,97	49
2	2,27	57
3	2,17	54
4	2,03	51
5	1,84	46
6	1,90	48
7	1,88	47
Level	7-fach Injektion 4,0 ng/ml	
Probe	Konzentration [ng/ml]	WDF [%]
1	2,02	51
2	2,00	50
3	2,06	52
4	2,00	50
5	2,10	53
6	2,02	51
7	2,00	50

Anhang 12 – Linearitätstest (MCPB/ Kürbiskerne)

MCPB/Kürbiskerne (140)

Kalibrierfunktionen/Anpassungstest

Methode : LC3+SH+Sofia_neg
 Parameter (x) : Konzentration [ng/ml]
 Messwert (y) : Peakfläche [Einheiten]

LINEARE KALIBRIERUNG :

Achsenabschnitt (a): -1046.4682 [Einheiten]	N: 6	(y=a + b*x)
Steigung (b): 15376.6 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.2898 [ng/ml]	
Reststandardabw. (sy): 37.9013 [Einheiten]	ym: 49540.000 [Einheiten]	
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.0024649 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.07 %		
lin. Korrelationskoeff. : 1.000000		

Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.01231 [ng/ml] ; yp: -951.8053 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !

Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):

Kritischer Wert yk: -951.8053 [Einheiten]
 Nachweisgrenze xNG: 0.00616 [ng/ml]
 Erfassungsgrenze xEG: 0.01231 [ng/ml]
 Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.10319 [ng/ml]

KALIBRIERFUNKTION 2. GRADES :

a: -1078.9405 [Einheiten]	N: 6	(y=a + b*x + c*x ²)
b: 15420.2 [Einheiten]/[ng/ml]	xm: 3.2898 [ng/ml]	
c: -5.66335 [Einheiten]/[ng/ml] ²	ym: 49540.000 [Einheiten]	
Reststandardabw. (sy): 3.47293 [Einheiten]		
Verfahrens-Stdabw. (sxo): 0.00022577 [ng/ml]		
rel. Verf.-Stdabw. (Vxo): 0.01 %		

Untere Arbeitsbereichsgr.: xp: 0.00132 [ng/ml] ; yp: -1068.7412 [Einheiten] (p=95%) Nur vorläufige Werte, da xp<xmin/2 !

Nachweis- und Erfassungsgrenze aus Kalibrierfunktion (p=95%, m=1):

Kritischer Wert yk: -1068.7412 [Einheiten]
 Nachweisgrenze xNG: 0.00066 [ng/ml]
 Erfassungsgrenze xEG: 0.00132 [ng/ml]
 Bestimmungsgrenze (Fehler <= 25%, k=4): 0.01530 [ng/ml]

MANDEL-ANPASSUNGSTEST : Prüfwert PW = 473.4 (p=99.98%) (Prüfwert > Vergleichs-Wert : Kalibrierung 2. Grades ist besser!)
 Vergleichswert F(1,3,99%) = 34.1