



171 1425-1 -7. MAI 1983

# Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Bundesrepublik Deutschland

Merkblatt Nr. 58

1. Auflage

1983

## Rückstandsuntersuchungen – Richtlinie zur Durchführung der Analysen –

von

W. Weinmann

H.-G. Nolting

J. Siebers



# Inhalt

## Einleitung

### 1. Technische und personelle Voraussetzungen

- 1.1 Personal
- 1.2 Räumlichkeiten
- 1.3 Reagenzien und Chemikalien
- 1.4 Wirkstoffstandards
- 1.5 Glasapparaturen und Geräte
- 1.6 Entsorgung
- 1.7 Allgemeine Arbeitsanweisungen

### 2. Methodische Voraussetzungen

- 2.1 Richtigkeit
- 2.2 Präzision
- 2.3 Spezifität
- 2.4 Bestimmungsgrenze
- 2.5 Abfassung der Methoden

### 3. Durchführung der Rückstandsuntersuchung

- 3.1 Vorbereitung von Proben
- 3.2 Extraktion und Reinigung
- 3.3 Endbestimmung
  - 3.3.1 Gaschromatographie (GC)
  - 3.3.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)
  - 3.3.3 Photometrie
- 3.4 Auswertung

4. Qualitätssicherung

4.1 Voraussetzungen für Qualitätssicherung

4.2 Programm der Absicherung der Analysenwerte

5. Berichterstattung und Archivierung

5.1 Mitteilung der Analysenergebnisse

5.2 Zusammenstellung und Aufbewahrung von Aufzeichnungen  
und Daten

6. Kontrolluntersuchungen

6.1 Arbeitsweise von Laboratorien

6.2 Methodenüberprüfung

6.3 Vergleichsuntersuchungen

Literatur

Anhang

## Einleitung

=====

Bei der Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren werden unter anderem Unterlagen des Antragstellers über das Rückstandsverhalten des Mittels beurteilt und daraus wichtige Schlußfolgerungen über Einhaltung von Höchstmengen und dafür erforderliche Wartezeiten gezogen. Es ist daher notwendig, daß die Untersuchungen, auf denen diese Unterlagen basieren, von hoher Qualität und Zuverlässigkeit sind.

Für die geeignete Anlage und Durchführung von Rückstandsversuchen wurde von der Biologischen Bundesanstalt (BBA) mit Merkblatt Nr. 41 bereits eine Richtlinie herausgegeben<sup>(1)</sup>. Mit dem vorliegenden Merkblatt wird nun auch eine Richtlinie im Rahmen des Zulassungsverfahrens von Pflanzenschutzmitteln für die Durchführung von Rückstandsanalysen zur Verfügung gestellt.

Von der OECD wurden mit dem Ziel der internationalen Harmonisierung von experimentellen Untersuchungen "Grundsätze der Guten Laborpraxis" erarbeitet<sup>(2)</sup>. Diese Grundsätze haben ihren Schwerpunkt bei den toxikologischen Untersuchungen, sie sind ferner sehr allgemein gefaßt und geben kaum Hinweise, die auch für die Analytik von Pflanzenschutzmittelrückständen nutzbar wären.

Von der IUPAC (1982)<sup>(3)</sup> und vom Codex Committee on Pesticide Residues (1983)<sup>(4)</sup> wurden Empfehlungen zur Gewinnung und Absicherung von Rückstandsdaten herausgegeben, die aber nicht die bei der Analyse zu beachtenden Details enthalten.

Die vorliegende Richtlinie der Biologischen Bundesanstalt berücksichtigt die Grundsätze der IUPAC<sup>(3)</sup>, des Codex Committee<sup>(4)</sup> und des OECD-Dokumentes, soweit sie für die Rückstandsanalytik relevant sind. Einzelne Passagen basieren auf den Empfehlungen der VDLUFA<sup>(14)</sup>.

Die Richtlinie hat empfehlenden Charakter, die Verantwortung für die korrekte Durchführung der Analyse liegt beim Analytiker.

1. Technische und personelle Voraussetzungen  
=====

1.1 Personal

Die Rückstandsanalytik gehört in das Gebiet der Spurenanalytik, für die Durchführung sind daher hohe Anforderungen an die Ausbildung und Qualität des Personals zu stellen.

Die leitenden Wissenschaftler sollten ein abgeschlossenes naturwissenschaftliches Hochschulstudium (möglichst Fachrichtung Chemie oder Lebensmittelchemie) absolviert haben und über mehrjährige Erfahrung auf dem Gebiete der Rückstandsanalytik verfügen.

Für das technische Personal wird eine mindestens 2jährige Ausbildung, z. B. an einer Chemieschule, mit Abschluß als staatlich geprüfte/r chemisch-techn. Assistent/in oder Chemielaborant/in für erforderlich gehalten.

Eine sorgfältige Einarbeitung in dieses Spezialgebiet wird in der Regel notwendig sein, ehe man die Ergebnisse als hinreichend zuverlässig ansehen kann. Auch danach ist zunächst eine verstärkte - über die normale Qualitätssicherung (siehe Seite 30, Abschnitt 4) hinausgehende - Überprüfung der Analysenergebnisse notwendig.

Das Personal muß alle Abschnitte einer verwendeten Methode verstehen und sicher ausführen können. Die jeweiligen Unfallverhütungsvorschriften der gewerblichen Berufsgenossenschaften müssen bekannt sein und beachtet werden. Ferner sind die Mitarbeiter verpflichtet, an Vorsorgeuntersuchungen, die von der Laborleitung zu veranlassen sind, teilzunehmen.

...

## 1.2 Räumlichkeiten

Durch räumliche Trennung der verschiedenen Arbeitsabschnitte sollte gewährleistet sein, daß die Analysen störungsfrei und ohne Kontaminationen durchgeführt werden können. Es wird als vorteilhaft angesehen, wenn getrennte Räume vorhanden sind für

- Eingang und Vorbereitung der Rückstandsproben
- Extraktion, Reinigung, Derivatisierung der Rückstandsproben (Abzüge müssen vorhanden sein)
- Meßgeräte (GC, HPLC, Photometrie)
- Reinigung der Geräte (Spülraum)
- Archivierung
- Lagerung der Wirkstoffe und Chemikalien
- Lagerung der Lösungsmittel
- Lagerung der Gase
- Lagerung der Rückstandsproben

## 1.3 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien, Lösungen und Lösungsmittel, die bei der Analyse verwendet werden, sind so zu kennzeichnen, daß Identität und Konzentration, gegebenenfalls auch Eingangs-, Herstellungs- und/oder Verfallsdatum, ersichtlich sind. Die Haltbarkeit der Reagenzien muß für die Dauer der Prüfung gewährleistet sein. Ist die Haltbarkeit nicht bekannt, muß sie durch geeignete Untersuchungen bestimmt werden.

Diese Angaben - sowie jene über die Reinheit - sind in Arbeitsanweisungen niederzulegen.

Chemikalien, die in der Rückstandsanalytik Verwendung finden, müssen auf ihre Reinheit hin überprüft werden, um z. B. Blindwerte zu vermeiden.

Es ist daher empfehlenswert, für die benötigten Reagenzien Spezifikationen aufzustellen, und zwar für die speziellen Anwendungszwecke. Eine Verunreinigung, die einen Blindwert bei einer gaschromatographischen Bestimmung mit dem Elektroneneinfangdetektor verursacht, kann ohne Einfluß bei Bestimmung mit einem thermionischen Detektor sein.

Es ist sinnvoll, größere Chargen der jeweils benötigten Lösungsmittel (oder Reagenzien) zu kaufen und diese dann so zu reinigen (Destillation, Säulenchromatographie), daß sie den Spezifikationen entsprechen. Die Erfüllung der Reinheitsanforderung wird zweckmäßigerweise durch eine "Blind-Analyse" ohne Probe anhand der Blindwerte der Endmessung geprüft.

Zu beachten ist jedoch, daß nur kleinere Mengen der Chemikalien, insbesondere der Lösungsmittel, am Arbeitsplatz direkt aufbewahrt werden dürfen. Diesbezüglich sind die jeweils gültigen Laboratoriums-Richtlinien der gewerblichen Berufsgenossenschaften zu beachten.

Eine Kartei erleichtert die Lagerhaltung und rechtzeitige Nachbestellung der Chemikalien.

Hinweise und Empfehlungen hinsichtlich der eventuell notwendigen Reinigung der Reagenzien und Lösungsmittel können der Literatur entnommen werden<sup>(5,6)</sup>.

Adsorbentien müssen - falls erforderlich - gereinigt werden. Die eingestellten Aktivitäten sind in geeigneten Zeitabständen zu überprüfen.

Auch muß die Möglichkeit einer Kontamination der Probe, der Reagenzien und der Lösungsmittel durch Kunststoffe, Gummi sowie andere, im Labor vorhandene Chemikalien ausgeschlossen werden. Watte, Quarzwolle, evtl. auch Filterpapier, sollten mit n-Hexan oder einem in der Methode verwendeten Lösungsmittel extrahiert werden.

#### 1.4 Wirkstoffstandards

Als Standardsubstanzen für die Rückstandsanalyse von Pflanzenschutzmitteln sollen nur Wirkstoffe mit mindestens 95 %iger Reinheit verwendet werden. Viele Wirkstoffe zersetzen sich unter Einwirkung von Hitze, Licht, Sauerstoff und Wasserspuren; bei längerer Lagerung sind daher Reinheitsüberprüfungen der Standardsubstanzen und ihrer Lösungen unerlässlich. Hierzu können geeignet sein:

- Infrarotspektroskopie
- Massenspektrometrie
- Kernresonanzspektroskopie
- Gaschromatographie
- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
- Schmelzpunktbestimmung
- Brechungsindexmessung.

Um die Stabilität der Wirkstoffe zu erhöhen, sind sie im Kühlschrank aufzubewahren. Es ist sinnvoll, die Standards in Portionen (z. B. 0,1 g) aufgetrennt zu lagern, die, einmal aus dem Lager entnommen, verbraucht werden. Das wiederholte Öffnen eines gekühlten Vorratsgefäßes würde durch Wasserdampfkondensation und Luftzutritt Zersetzungen begünstigen.

Standardlösungen sind in Glasflaschen im Kühlschrank aufzubewahren; sie dürfen nicht längere Zeit dem Licht ausgesetzt sein. Die Stabilität der Standardlösungen ist zu belegen. Stammlösungen sind regelmäßig in geeigneten Abständen, z. B. alle vier Wochen, zu kontrollieren.

#### 1.5 Glasapparaturen und Geräte

Die verwendeten Glasgeräte sind zweckmäßigerweise nur in der Rückstandsanalytik einzusetzen und dürfen nicht für andere Untersuchungen, z. B. Präparateanalytik, verwendet werden.



In der Rückstandsanalytik eingesetzte Glasgefäße müssen sehr gründlich gereinigt werden, z. B. mit Chrom-Schwefelsäure oder anderen Spezial-Reinigungsmittel-Lösungen, und anschließend filmfrei sein. Danach sollten die Glasgeräte mit destilliertem Wasser und geeigneten organischen Lösungsmitteln, z. B. Aceton, gespült werden. Ein zusätzliches Ausspülen der Glasgeräte unmittelbar vor Gebrauch mit dem zu verwendendem Lösungsmittel kann in besonderen Fällen sinnvoll sein.

Glasgeräte sollten außer PTFE (Polytetrafluorethylen) keine Kunststoffteile enthalten.

Schliffe an Glasapparaturen müssen fettfrei bleiben.

Die für die Endbestimmung verwendeten Meßgefäße sind auf Abweichungen von  $\pm 5\%$  zu kontrollieren.

Beim Einengen von Lösungsmitteln im Rotationsverdampfer sind Wirkstoffverluste zu vermeiden:

Es ist darauf zu achten, daß durch die Gaszuleitungen, aus denen Stickstoff zum Einengen von Lösungsmitteln entnommen wird, keine Verunreinigungen in die Extrakte gelangen.

Waagen sind von Zeit zu Zeit zu eichen.

Vom Boden her angetriebene Zerkleinerungsgeräte müssen regelmäßig auf Lecks rund um den Antriebswellenzapfen überprüft werden (Explosionsgefahr!). Durch die Dichtungsringe dürfen keine Verunreinigungen entstehen.

Die Gaschromatographen, Hochleistungsflüssigkeitschromatographen und Spektrophotometer sollten dem Stand der Technik entsprechen und müssen in regelmäßigen Abständen gewartet und auf Funktionsfähigkeit überprüft werden.

Über Störungen und Wartungen der Geräte sollte ein Logbuch geführt werden.

## 1.6 Entsorgung

Lösungsmittel- und Chemikalienreste dürfen nicht dem Abwasser zugeführt werden, sondern sind ordnungsgemäß zu beseitigen, z. B. durch Verträge mit lösungsmittelaufarbeitenden Firmen, Sondermülldeponien oder Verbrennungsanlagen. Es ist in diesem Zusammenhang erforderlich, daß geeignete Abfallsammeleinrichtungen, z. B. Fässer für anfallende Lösungsmittel und Abfalltonnen für Chemikalienreste, in ausreichender Menge und mit guter Kennzeichnung zur Verfügung stehen.

Es ist dabei zu bedenken, daß beim Sammeln von Abfällen gefährliche chemische Reaktionen eintreten können; entsprechende Arbeitsanweisungen sind zu erstellen. Die Lösungsmittelfässer sind zu erden und evtl. mit Kipp- und Rollvorrichtungen zu versehen.

## 1.7 Standard-Arbeitsanweisungen

Für häufig wiederkehrende Arbeitsgänge sollten schriftliche Arbeitsanweisungen vorliegen. Die Arbeitsanweisungen müssen im jeweiligen Labor, wo derartige Arbeiten anfallen, abgelegt sein. Für folgende Arbeiten sollten z. B. Anweisungen vorhanden sein:

- Eingang, Identifizierung, Kennzeichnung, Handhabung, Lagerung und Haltbarkeit von Substanzen
- Probenahme
- Bedienung, Wartung, Reinigung, Kalibrierung von Geräten
- Reinigungs- und Derivatisierungsverfahren,  
z. B. Säurefällungen, Methylierungen mit Diazomethan,  
Destillation von Lösungsmitteln u. ä.
- Messung
- Auswertung.

Bei der Laborleitung sollte auch für die Qualitätssicherung eine schriftliche Arbeitsanweisung vorliegen.

Das technische Personal muß verpflichtet werden, die detaillierten Arbeitsvorschriften genau zu befolgen und gegebenenfalls Abweichungen davon ausführlich zu protokollieren.

## 2. Methodische Voraussetzungen

=====

Die für die Analyse vorgesehene Methode muß dem Stand der wissenschaftlichen Entwicklung entsprechen.

Es muß gewährleistet sein, daß mit der Methode die Bestimmung der Rückstände der jeweiligen Wirkstoffe und gegebenenfalls die der relevanten Abbau- und Reaktionsprodukte<sup>(22)</sup> (siehe auch Fußnote Seite 11) in Boden, Wasser und den Erntegütern, die durch die vorgesehene Anwendung kontaminiert werden, möglich ist.

Je nach Anwendung, Ernteprodukt und Rückstandssituation muß auch eine Bestimmung der Rückstände in den wichtigsten Verarbeitungsprodukten möglich sein.

Folgende Methodenparameter müssen beachtet werden:

### 2.1 Richtigkeit

Die Richtigkeit einer Methode beinhaltet, daß der mit ihr erhaltene Meßwert im Idealfall mit dem wahren Wert übereinstimmt<sup>(9)</sup>. Die Abweichung vom wahren Wert beruht auf systematischen Fehlern der Methode, unvermeidbarer Zufallsstreuung und/oder mangelhafter Durchführung der Analyse. Eine Abschätzung der Richtigkeit erlaubt die Bestimmung der Wiederfindungsrate mit Hilfe von Zusatzversuchen. Die Höhe des Zusatzes sollte den zu erwartenden Rückständen entsprechen. Soll die Untersuchung ausgewertet werden im Hinblick auf

Überschreitung oder Einhaltung einer Höchstmenge<sup>(22)</sup>, so sind dieser entsprechende Zusätze durchzuführen. Die Wiederfindungsrate sollte zwischen 70 und 110 % liegen.

Eine Unsicherheit dieses Verfahrens liegt darin, daß es nicht möglich ist, eine definierte Menge des Wirkstoffs so in eine Probe des Untersuchungsmaterials einzubringen, daß eine praktische Anwendung des Pflanzenschutzmittels simuliert wird. So können Rückstände auf/in "gewachsenen" Proben, z. B. aufgrund ihres Eindringens in innere Schichten, ein abweichendes Extraktionsverhalten zeigen und zu anderen Ausbeuten führen. Das genannte Verfahren kann jedoch als eine brauchbare Annäherung an praktische Verhältnisse angesehen werden.

## 2.2 Präzision

Die Präzision einer analytischen Methode ist definiert als Übereinstimmung von Ergebnissen wiederholter Analysen an identischem Probematerial<sup>(9)</sup>. Sie ist verbunden mit der Streuung der Meßwerte, die auf nichtsystematischen Fehlern beruht. Je größer die Präzision, um so geringer ist die Streuung. So kann die Präzision einer Methode durch die Standardabweichung quantifiziert werden. Wird die Präzision im selben Labor ermittelt, spricht man von Wiederholbarkeit<sup>(21)</sup>. Die Bestimmung der Wiederholbarkeit sollte jeweils in periodischen Zeitabständen durchgeführt werden. Hierzu werden Zusatzversuche analysiert oder Proben mit "gewachsenen" Rückständen, und zwar bei Konzentrationen in der Nähe der zu erwartenden Rückstände und in der Nähe der Höchstmenge. Wird die Präzision von verschiedenen Labors ermittelt, spricht man von Vergleichbarkeit<sup>(21)</sup>.

Sammlungen von Rückstandsmethoden, die in Ringversuchen getestet wurden, sind u. a. von der International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC)<sup>(3)</sup> und Association of Official Analytical Chemists (AOAC)<sup>(10)</sup> veröffentlicht. Die Methoden der Methodensammlung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)<sup>(11)</sup> wurden (seit der 3. Lieferung) von mindestens einem unabhängigen Kontrolllabor geprüft.

Ferner sei auf die Arbeitsgruppe "Pestizide" der Fachgruppe Lebensmittel- und gerichtliche Chemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker sowie die Fachgruppe "Umweltanalytik" des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten hingewiesen, die veröffentlichte Methoden in Ringversuchen auf ihre Qualität hin überprüfen.

### 2.3 Spezifität

Hinsichtlich der Spezifität sind folgende Anforderungen an eine Methode zu stellen:

Die Methode muß eine zweifelsfreie Bestimmung des jeweiligen Wirkstoffes und seiner relevanten Umwandlungsprodukte ermöglichen. Sie sollte möglichst keine oder nur sehr geringe Blindwerte liefern. Das Ergebnis sollte durch Bestätigungsverfahren gesichert werden, z. B. Gaschromatographie mit verschiedenen Säulen unterschiedlicher Polarität, Einsatz von Kapillarsäulen und Kopplung von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie. Ferner können Bestätigungsverfahren mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Photometrie und chemische Umsetzungen eingesetzt werden<sup>(4)</sup>.

### 2.4 Bestimmungsgrenze

Die untere Bestimmungsgrenze einer Methode muß für jede Art von Untersuchungsmaterial ermittelt und angegeben werden. Für eine Methode können für verschiedene Untersuchungsmaterialien unterschiedliche Bestimmungsgrenzen ermittelt werden. Auch auf dem Rückstandsberichtsbogen AP-08 bzw. AP-09 Seite 3 (vgl. Anhang 1) muß die jeweilige untere Bestimmungsgrenze angegeben werden.

Es ist darauf zu achten, daß die Bestimmungsgrenze einer Methode deutlich unter dem jeweiligen Höchstwert<sup>(22)</sup> liegt und höchstens ein Drittel, möglichst jedoch ein Fünftel oder weniger dieses Wertes\* beträgt<sup>(11)</sup>.

Liegt z. B. eine Höchstmenge von 0,05 mg/kg vor oder wird für diese Erntegut-/Wirkstoffkombination ein solcher Höchstmengenvorschlag gemacht, so sollte die Bestimmungsgrenze der Methode, mit der die entsprechenden Rückstandswerte erarbeitet wurden, bei 0,01 mg/kg liegen.

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgt zweckmäßigerweise nach Kap. XI der Methodensammlung der Deutschen Forschungsgemeinschaft<sup>(11)</sup>.

Ein Wirkstoff oder Metabolit ist dann als nachgewiesen anzusehen, wenn der gefundene Wert größer als die Nachweisgrenze (NG) ist. Für Werte über der Nachweisgrenze, aber noch unterhalb der Bestimmungsgrenze, kann kein exakter Zahlenwert angegeben werden; es kann nur die Größenordnung des Gehaltes abgeschätzt werden.

Die Bestimmungsgrenze (BG) wird in der Rückstandsanalytik gemäß der Methodensammlung der Deutschen Forschungsgemeinschaft<sup>(11)</sup> als der kleinste Wert des Gehaltes einer Substanz in der Analysenprobe definiert, der die folgenden drei Forderungen erfüllt:

---

\* Im Zulassungsverfahren Pflanzenbehandlungsmittel sind auch vorläufige Höchstmengen für Wirkstoffe und deren Metaboliten zu beachten, die noch nicht in der Pflanzenschutzmittel-Höchstmengenverordnung aufgeführt sind. Dies gilt insbesondere für pflanzliche Futtermittel und neue Wirkstoffe. Die vorläufigen Höchstmengen können bei der Zulassungsbehörde (Biologische Bundesanstalt) erfragt werden.

- größer als oder gleich groß wie die Nachweisgrenze  
( $BG \geq NG$ )
- eine Empfindlichkeit (s. u.), die gleich groß oder größer als  
0,70 ( $S \geq 0,70$ ) ist
- einen Variationskoeffizient (V), der gleich oder kleiner als  
0,2 (entsprechend 20 %) ist  
$$V = \frac{\bar{g}}{q} \leq 0,2, \text{ wobei}$$

q: vorgegebener Gehalt (z. B. in mg/kg)  
 $\bar{g}$ : Standardabweichung

Zur Berechnung von BG müssen also die Nachweisgrenze, die Empfindlichkeit und der Variationskoeffizient bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit führt man Zusatzversuche durch und bestimmt die Steigung der Eichgeraden, die den Zusammenhang zwischen Gehalt und Signalwerten wiedergibt (vgl. Kap. XI der DFG-Methodensammlung<sup>(11)</sup>).

Die Steigung der Eichgeraden stimmt mit der Empfindlichkeit des Analysenverfahrens, d. h., der Änderung des Signalwertes pro Änderung des Gehaltes, überein.\*

Die Wirkstoffzusätze - auf jeder Konzentrationsstufe werden mindestens vier Untersuchungen durchgeführt - zu Untersuchungsmaterial, das frei von den zu bestimmenden Rückständen ist, beginnen im Bereich der vermuteten Bestimmungsgrenze und enden im voraussichtlichen Arbeitsbereich. Im gesamten Meßbereich sollte die lineare Darstellung der Beziehung zwischen Konzentration und Signal gegeben sein.

---

\* Die Wiederfindungsrate (Ausbeute) stellt den in Zusatzversuchen wiedergefundenen Wirkstoffgehalt in % dar.

Mit den aus den Zusatzversuchen ermittelten Einzelwerten wird eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und die Parameter der Regressionsgeraden ermittelt.

$$\hat{y} = a_0 + \hat{s} \cdot q$$

q = vorgegebener Gehalt (z. B. in mg/kg)

$\hat{y}$  = das zu q gehörende Signal (z. B. in cm)

$\hat{s}$  = Steigung der Eichgeraden = Schätzwert für die Empfindlichkeit

$a_0$  = theoretischer Blindwert, der der Extrapolation der Regressionsgrade auf die Ordinate entspricht.  $a_0$  ist nicht notwendigerweise ein meßbarer Blindwert.

## 2.5 Abfassung von Methoden

Bei der Abfassung einer Rückstandsmethode empfiehlt es sich, die in der DFG-Methodensammlung im Abschnitt V erläuterte Form als Muster zu nehmen. Eine als Anlage beigefügte graphische Darstellung der einzelnen Analysenschritte kann die Übersicht erleichtern. Typische Chromatogramme tragen wesentlich zur Verdeutlichung der Messung bei. Es ist besonders wichtig, daß die Qualität der Methoden beurteilt werden kann, d. h., daß Richtigkeit, Präzision, Spezifität und Bestimmungsgrenze erkennbar sind. Das beinhaltet die Angabe der Wiederfindungsraten aus Zusatzversuchen, der Streuung der Wiederfindungsraten (bzw. Angabe von 4 Wiederfindungsraten für jedes Probenmaterial), der Blindwerte und der Bestimmungsgrenze. Ferner sollte angegeben werden, nach welchem Verfahren die Bestimmungsgrenze ermittelt wurde.

Die Methode sollte für Verweise - z. B. bei der Berichterstattung von Rückstandsuntersuchungen AP-08 - leicht und unverwechselbar zu zitieren sein, z. B. durch eine Numerierung und eine Kurzbezeichnung des Labors.



### 3. Durchführung der Rückstandsuntersuchung

Die Analyse ist grundsätzlich nach der jeweils beschriebenen Methode und den relevanten Arbeitsanweisungen durchzuführen; unter besonderen Umständen notwendige Abweichungen sind schriftlich festzuhalten. Alle anfallenden Daten müssen protokolliert werden.

#### 3.1 Vorbereitung von Proben

##### Feldprobe

Hinsichtlich der Erstellung der Feldprobe wird auf das Merkblatt Nr. 41 der BBA<sup>(1)</sup> "Rückstandsuntersuchungen, Richtlinie für Feldversuche und Probenahme" (vgl. jedoch auch Kap. VIII der Methodensammlung der DFG<sup>(11)</sup>) verwiesen.

Die Entnahme und Vorbereitung von Bodenproben ist dem Kap. IX, von Wasserproben dem Kap. X der DFG-Sammlung<sup>(11)</sup> zu entnehmen.

##### Laborprobe

Die Größe der Laborprobe, die dem Rückstandslabor übergeben wird, sowie die Vorbereitungen, die vor dem Versand der Probe getroffen werden müssen, z. B. Entfernung von Verunreinigungen, Pflanzenteilen, die vor der weiteren Verarbeitung aus der Laborprobe zu entfernen sind<sup>(12)</sup>, sind in der Richtlinie "Rückstandsuntersuchungen, Richtlinie für Feldversuche und Probenahme" (Merkblatt Nr. 41 der BBA<sup>(1)</sup>) sowie in der Methoden-Sammlung der DFG<sup>(11)</sup> (Kap. XII) beschrieben worden. Außerdem sind Besonderheiten bezüglich der zu analysierenden Pflanzenteile, die sich aus der Pflanzenschutzmittel-Höchstmengenverordnung<sup>(22)</sup> ergeben, zu berücksichtigen. Darüber hinaus ist zu beachten, daß Pflanzenteile auch als Futtermittel Verwendung finden können und daher auf Rückstände zu untersuchen sind.

Eine Liste der zu analysierenden Pflanzenteile befindet sich im Anhang 2.

Dem Merkblatt Nr. 41 können die beim Versand von Rückstandsproben zu beachtenden Fakten, wie z. B. Kennzeichnung der Proben, Ankündigung des Versandes, Verpackung und Transport, entnommen werden.

Die Laborprobe sollte sofort zum Versand gebracht werden, wenn die Untersuchung auf Rückstände nicht am gleichen Ort erfolgt. Analysenproben können eingefroren werden, wenn sie nicht sofort untersucht werden, das Einfrieren von Laborproben jedoch ist zu vermeiden. Notfalls sind bereits die Analysenproben vor dem Versand zu erstellen. Es ist schwierig bis unmöglich, von gefrorenen Laborproben repräsentative Analysenproben herzustellen.

Ferner werden beim Auftauen durch Zerstörung der pflanzlichen Zellen in besonderem Maße Fermente freigesetzt, die den Abbau beschleunigen könnten. Durch Austreten von Zellsaft werden unter Umständen zusätzliche Wirkstoffverluste bewirkt.

#### Analysenprobe

Der Eingang der Laborproben im Rückstandslabor wird in einem Eingangsbuch vermerkt. Jede Probe wird mit einer Nummer versehen, sowie Gewicht und Zustand der Probe protokolliert.

Die Laborprobe wird so gemischt, daß daraus repräsentative Analysenproben erhalten werden.

Bei weitgehend homogenen Erntegütern, wie z. B. Getreide, können die Analysenproben bereits nach sorgfältigem Mischen des Gutes gezogen werden.

Bei Erntegütern mit einem Durchschnittsgewicht der Individuen unter 25 g werden diese zur Erstellung der Analysenprobe grob zerkleinert.

Güter, die aus größeren Stücken bestehen, werden in Längsrichtung viergeteilt und 2 einander gegenüberliegende Sektoren grob zerkleinert.

Bei Produkten, die feste und flüssige Anteile enthalten, z. B. Obst- und Gemüsekonserven, werden die festen Anteile homogenisiert und mit dem flüssigen Anteil vermischt.

Als Zerkleinerungsgerät hat sich für die meisten Erntegüter ein Tischkutter, wie er in Fleischereibetrieben verwendet wird, bewährt. Obwohl dieser sich gut reinigen läßt, ist es zweckmäßig, jeweils die unbehandelten Proben zuerst zu verarbeiten.

Aus der grob zerkleinerten Laborprobe entnimmt man die benötigten Anteile für Analysenproben, und zwar mindestens zwei Analysenproben und eine Reserveprobe. Die Einwaage ist mit einer Genauigkeit von + 1 % durchzuführen.

Im Idealfall sollte die Analyse der Proben sofort nach dem Eintreffen im Labor durchgeführt werden. Dieses wird aber häufig nicht möglich sein, so daß die Analysenproben, in einem Behälter aus inertem Material verpackt, so rasch wie möglich auf  $\leq - 20^{\circ}\text{C}$  tiefzukühlen sind. Es ist Sorge zu tragen, daß die Identität der Proben gewahrt bleibt; Kennzeichnungen sind daher nicht nur auf dem Deckel anzubringen.

Es muß gewährleistet sein, daß keine Zersetzung des Probenmaterials und der Rückstände eintritt.

Bei längerer Lagerungszeit müssen über die Stabilität des zu untersuchenden Wirkstoffes Informationen vorliegen, die sodann zu berücksichtigen sind. Meistens wird eine Lagerung bis zu 6 Monaten ohne zusätzliche Untersuchung auf Beständigkeit möglich sein<sup>(13)</sup>. Ist mit längerer Lagerung zu rechnen und über das Zersetzungsverhalten (Stabilität) nichts bekannt, so muß dieses ermittelt und protokolliert werden.

Dieses kann auf zwei Wegen erfolgen:

- Miteinlagerung von Zusatzversuchen

Einigen unbehandelten Proben wird der Wirkstoff (und/oder dessen Umwandlungsprodukte) zugesetzt, und zwar in den Konzentrationen der zu erwartenden Rückstandswerte.

Man wiegt in Glasflaschen jeweils die für eine Analyse benötigte Probenmenge ein, setzt den Wirkstoff (und/oder seine Umwandlungsprodukte) als Lösung zu und bringt den Rückstand durch Schütteln möglichst gleichmäßig auf die Probe auf. Nach Abdampfen des Lösungsmittels werden die Flaschen verschlossen und tiefgefroren. In bestimmten Zeitabständen und zum Zeitpunkt der Rückstandsuntersuchung der Proben wird jeweils eine der Zusatzproben analysiert.

- Untersuchung einiger Rückstandsproben einer Serie unmittelbar nach der Probenahme und Analyse von eingelagerten Parallelproben in bestimmten Zeitintervallen und zum Zeitpunkt der Analyse der restlichen Proben der Abbaureihe.

Die Entscheidung, welches Verfahren gewählt wird, bleibt dem Analytiker überlassen.

Sonderfälle

In den Fällen, in denen die Wirkstoffe bei Zerkleinern der Laborprobe rasch zersetzt werden (z. B. Dithiocarbamate), muß die Reduzierung der Laborprobe zur Analysenprobe modifiziert werden.

Bei Planung der Untersuchung mit derartigen Wirkstoffen muß der Laborleiter das Laborpersonal auf diese Zersetzungsgefahr aufmerksam machen und entsprechende Verfahren beschreiben. Die Art der Herstellung der Analysenprobe ist zu protokollieren.

### 3.2 Extraktion und Reinigung

Vor Beginn der Analysen muß sich das Personal gründlich mit der Methode vertraut machen. Es werden Blindversuche mit unbehandeltem Probenmaterial und, falls erforderlich, mit den Reagenzien durchgeführt. Sodann wird in Zusatzversuchen zu dem zu untersuchenden Probenmaterial die Nachweisgrenze, die Empfindlichkeit, der Variationskoeffizient und daraus die Bestimmungsgrenze ermittelt (siehe Kap. 2.4). Erst jetzt sollte mit der Bearbeitung der Rückstandsproben begonnen werden.

Die tiefgefrorenen Analysenproben, in der Regel 50 g, sollten normalerweise vor dem Homogenisieren angetaut werden. Wenn nichts anderes in der Methode beschrieben, sollte jedes Homogenisieren mindestens zwei Minuten dauern.

Emulsionsbildung bei Flüssig-flüssig-Verteilungen kann durch Wahl geeigneter Lösungsmittel, durch vorsichtiges Schütteln und durch Filtration vor der Verteilung vermieden werden.

Auftretende halb feste Zwischenschichten sind nach Phasentrennung in der Phase zu belassen, die erneut extrahiert wird.

Die Fraktionierungsleistung der chromatographischen Trennsäulen sollte vor der Analyse ermittelt werden. Die Technik der Gelchromatographie wird vorteilhaft so durchgeführt, wie in der Methodensammlung der Deutschen Forschungsgemeinschaft<sup>(11)</sup> beschrieben.

Nicht immer lassen sich Analysen innerhalb eines Tages fertigstellen. Der Extrakt kann in diesem Fall in einem wasserfreien Lösungsmittel in einem gut verschlossenen Kolben über Nacht in einem Kühlschrank (0 - 5 °C) aufbewahrt werden.

...

Es bleibt zu überprüfen, ob durch längere Unterbrechung der Analyse Wirkstoffverluste auftreten. Wirkstoffverluste können auch dadurch entstehen, daß Extrakte in organischen Lösungsmitteln für einen längeren Zeitraum, z. B. > 1 Stunde über Natriumsulfat aufbewahrt werden. Extraktion, Filtration und Säulenchromatographie usw. dürfen nicht unterbrochen werden.

Besondere Vorsicht ist beim Einengen von Wirkstoffen in organischen Lösungsmitteln geboten. Wenn es nicht in der Methode speziell vorgeschrieben ist, dürfen die Lösungen nie bis zur völligen Trockene eingedampft werden. Ein letzter Lösungsmittelrest kann durch Drehen und Erwärmen des Kolbens in der Hand entfernt werden (vgl. Abschnitt 1.5).

### 3.3 Endbestimmung

Die Bestimmung des Wirkstoffgehaltes in dem gereinigten Extrakt erfolgt meistens mit Hilfe der Gaschromatographie. Außerdem können die Photometrie, die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie u. a. zum Einsatz kommen.

Wegen der Bedeutung dieser Techniken in der Rückstandsanalytik werden nachstehend einige diesbezügliche Empfehlungen gegeben.

Ziel dieses Merkblattes ist es dabei nicht, eine detaillierte Beschreibung dieser Verfahren zu geben, sondern auf allgemeine Grundsätze hinzuweisen (vgl. hierzu Literaturzitate 8, 14, 15, 18 und 19).

#### 3.3.1 Gaschromatographie (GC)

Das GC-System sollte über getrennte Heizungen für den Injektor, Detektor und den Säulenofen verfügen.

Auf folgendes ist zu achten<sup>(14)</sup>:

- Detektoren

Die verwendeten Detektoren müssen exakt nach den Betriebsanleitungen der Herstellerfirmen eingestellt und betrieben werden. Die Kalibrierung des Detektors ist mindestens täglich zu überprüfen.

- Säulen

Wegen der Zersetzungsgefahr der Wirkstoffe sind vorgereinigte Glassäulen zu verwenden, wenn möglich, sollten auch Kapillarsäulen eingesetzt werden.

Neu gefüllte und konditionierte Säulen sind mit Wirkstoffstandardlösungen auf ihre Eignung und Trennleistung hin zu testen.

- Betriebstemperatur

Die Temperatur des Einspritzblocks muß einerseits gewährleisten, daß die eingespritzten Substanzen augenblicklich verdampft werden. Andererseits sollte sie nur so hoch sein, daß Zersetzungen der eingespritzten Probe weitgehend vermieden werden. Bei Verwendung von Kapillarsäulen sind Besonderheiten der Einspritztechnik aus der Literatur ersichtlich, z. B. <sup>(16)</sup>.

Die Höhe der Detektortemperatur wird von der Art des Detektors bestimmt. Die Sicherheitstemperatur für die einzelnen Detektortypen ist zu berücksichtigen. Säulenausgang und Detektor sollten so heiß sein, daß eine Kondensation von Eluat oder stationärer Phase mit Sicherheit vermieden wird.

- Gase

Die Trägergase (Stickstoff, Helium- oder Argon/Methan-Gemisch) sollten frei von Feuchtigkeit, Sauerstoff und sonstigen Verunreinigungen sein. Es empfiehlt sich, die Ware der höchsten erhältlichen Reinheit einzukaufen oder gegebenenfalls einen Sauerstoff-Absorber (z. B. "Oxisorb") vor die Trägergas-Einlässe der Gaschromatographen zu schalten.

Einige Detektoren benötigen ferner Wasserstoff, Sauerstoff und Luft. Die Durchflußgeschwindigkeiten der Träger- und/oder Detektorgase sind je nach Gerätetyp und den Angaben des Herstellers einzustellen und bezüglich Detektorempfindlichkeit, Auflösung und Analysenzeit zu optimieren. Extreme Konstanz der Gasflüsse ist erforderlich und kann mit mehrstufigen Druckminderern erreicht werden.

In Gasleitungen sollten, je nach Reinheit der Gase, Filter (z. B. Molekularsievefilter) eingebaut werden. Die Filter sind von Zeit zu Zeit zu erneuern bzw. zu regenerieren.

Die gewählten GC-Bedingungen, d. h. Säulenlänge, Säulenmaterial und Füllung, Injektor-, Detektor- und Säulentemperatur sowie die Gasdurchflußrate müssen eine exakte Messung des jeweiligen Wirkstoffes ermöglichen.

- Lösungsmittel

Bei der Auswahl des Lösungsmittels für die einzuspritzenden Proben ist darauf zu achten, daß dessen Siedepunkt nicht zu niedrig liegt (Verdampfungsverluste!), daß es die für den Verwendungszweck notwendige spezielle Reinheit (Blindwert!) besitzt, daß es dem Meßsystem angepaßt ist (Detektoreignung) und daß es nach Möglichkeit gesundheitlich nicht bedenklich ist.



Zu empfehlen sind n-Hexan, n-Heptan, Isooctan oder Trimethylpentan. Für den Phosphor-Stickstoff-Detektor ist neben den genannten aliphatischen Kohlenwasserstoffen noch Aceton geeignet. Unbedingt zu vermeiden sind beim Phosphor-Stickstoff-Detektor aromatische Kohlenwasserstoffe wie Toluol und Benzol, da sie den Detektor verunreinigen. Die Probevorbereitung muß so erfolgen, daß der zur Bestimmung gelangende gereinigte Extrakt im gleichen Lösungsmittel gelöst ist wie der Standard.

In einigen Fällen ist die Löslichkeit des Wirkstoffes für das Ansetzen der Stammlösung zu gering. In diesem Falle können auch andere Lösungsmittel, z. B. Aceton oder Methanol verwendet werden. Das weitere Verdünnen der Stammlösung erfolgt dann mit den o. g. Lösungsmitteln.

- Einspritzblock

Für die Rückstandsanalytik sollten als Einspritzblockabdichtung nur Septa verwendet werden, deren Bluten minimal ist. Silicongummisepta sind sorgfältig zu konditionieren, z. B. durch 2-stündiges Extrahieren mit Hexan oder Aceton in einer Soxhlet-Apparatur oder durch 24-stündiges Erhitzen bei 250 °C im Trockenschrank im Stickstoffstrom.

- Septum

Das Septum darf nicht zu fest eingespannt werden. Es besteht sonst die Gefahr, daß die Spritzennadel zu leicht Propfen ausstanzt. Undichte Septa sind unverzüglich auszutauschen. Üblicherweise ist der Austausch nach ca. 50 Einspritzungen erforderlich. Gummiabrieb vom Septum und Zersetzungsprodukte aus den eingespritzten Probenlösungen können sich nach längerem Betrieb im Glaseinsatz des Einspritzblocks oder auf der Füllung der Trennsäule ablagern und zu vielfältigen Störungen führen. Sie sind daher in geeigneten Abständen zu entfernen.

- Dosierung

Für die Dosierung - manuell oder automatisch - muß innerhalb einer Meßreihe einschließlich der Eichungen immer das gleiche Volumen eingespritzt werden. Das Volumen sollte dabei zwischen 0,5  $\mu$ l und 5  $\mu$ l liegen. Innerhalb einer Meßreihe sollte dieselbe Spritze verwendet werden. Nach der manuellen Injektion ist zu prüfen, ob noch Reste der Lösung in der Spritze sind.

Die relative Standardabweichung sollte bei Dosierung von Lösungen im Konzentrationsbereich des Standards wenn möglich unter 2 % liegen; Schwankungen bis zu 6 % können toleriert werden.

- Verschleppungsfehler

Zur Vermeidung von Verschleppungsfehlern ist eine gründliche Reinigung der Dosierspritze zwischen zwei Einspritzungen notwendig. Verschleppungsfehler treten besonders nach Proben mit hohen Konzentrationen auf. Das Reinigungsverfahren der Spritze läßt sich wie folgt kontrollieren:

Nach der Analyse einer konzentrierten Standardlösung wird reines Lösungsmittel eingespritzt. Im Chromatogramm darf kein Signal des Standards auftreten.

- Auflösung

Die Auflösung kritischer Stoffpaare ist das entscheidende Kriterium bei der Beurteilung einer Trennung.

Die Auflösung eines Stoffpaares ist definiert als das Maß, wie stark sich die Peaks beider Stoffe überlagern. Als Maß der Auflösung werden R und  $\mathcal{J}$  verwendet<sup>(17)</sup>.

Um eine genaue Auswertung zu gewährleisten, sollte die Auflösung  $\mathcal{J}$  des zu untersuchenden Wirkstoffs und des nächstliegenden Störpeaks nicht kleiner als 0,8 sein.

- Linearität

Das Linearitätsverhalten ist ein wichtiger Detektorparameter. Eine fehlende oder ungenügende Kontrolle kann hier zu gravierenden Fehlern im Meßergebnis führen. Deshalb sollte für alle zu analysierenden Wirkstoffe das Linearitätsverhalten bestimmt werden und in Form der Funktion "Peakhöhe (bzw. -fläche) in Abhängigkeit von der injizierten Wirkstoffmenge" festzuhalten sein. Es empfiehlt sich eine tägliche Kontrolle der Eichkurve. Die Abweichung von der Linearität wird in der Darstellung im doppeltlogarithmischen Maßstab leicht übersehen. Es wird daher empfohlen, diese Darstellungsweise nicht zu verwenden. Eine Ausnahme bildet aufgrund der logarithmischen Abhängigkeit des Signals vom Logarithmus der Konzentration der Flammenphotometer-Detektor. Bei Werten außerhalb des linearen Bereichs ist zu prüfen, ob durch Verdünnen oder Konzentrieren der Probelösung Werte im linearen Bereich erhalten werden können. Beim Arbeiten im linearen Bereich ist nicht für jede Messung eine Eichkurve erforderlich. Die Auswertung kann anhand von Standardpeaks erfolgen, die etwa die gleiche Höhe (-fläche) haben, wie Probenpeaks.

- Peak-Asymmetrie

Die Peak-Asymmetrie ist ein weiteres Kriterium für die Bewertung des gaschromatographischen Systems hinsichtlich seiner Eignung für das Analysenproblem. Im Idealfall ist der Peak symmetrisch. Stark unsymmetrische Peaks deuten auf Fehler des GC-Systems hin und sind zu vermeiden.

- Wiederholbarkeit der Messung

Die Schwankungen der Peakhöhen (-flächen) innerhalb einer Meßreihe, d. h., der Wiederholung der Messung am selben Gerät und unter gleichen Bedingungen in kurzem Zeitabstand, z. B. während eines Arbeitstages, sollten möglichst gering sein. Als Maß der Streuung wird die relative Standardabweichung  $S_r$  herangezogen. Sie wird am Beginn einer Meßreihe ermittelt, indem mindestens 3 Meßwerte der gleichen Probelösung aufgenommen werden und daraus  $S_r$  berechnet wird. Als Bewertungshilfe für die Wiederholbarkeit der GC-Messung kann folgende Tabelle herangezogen werden:

relative Standardabweichung	Bewertung	empfohlene Zahl der Einspritzungen
< 2 %	sehr gut	2
2 - 4 %	gut	3
4 - 6 %	ausreichend	4
6 - 10 %	kritisch	im Einzelfall zu klären
> 10 %	unzureichend	

Tritt ein deutlicher Gang in den Meßwerten auf, so sollten die Einspritzungen wiederholt werden, bis Konstanz erreicht ist, oder die Einstellung des GC-Systems sollte überprüft werden. Tritt bei den Messungen während eines Arbeitstages ein schwacher Gang auf, so ist auch laufend Standardlösung zu injizieren und die Auswertung der Probe auf einen benachbarten Standardpeak zu beziehen.

### 3.3.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

In der Rückstandsanalytik gewinnt die HPLC immer mehr an Bedeutung. Folgendes ist bei dieser Technik zu beachten:

Die Pumpen müssen weitgehend pulsationsfrei und konstant fördern. Pulsationen im Eluentenstrom können die Detektoranzeige stören und die Lebensdauer von Trennsäulen verkürzen. Die Schwankungen der Fließgeschwindigkeit des Elutionsmittels sollten in allen Bereichen bei maximal + 1 % liegen. Das Auftreten von Luftblasen, das oft nach dem Entspannen des Eluenten im Niederdruckteil der Apparatur zu beobachten ist, beeinträchtigt die Detektorfunktion. Daher sind die Lösungsmittel vor Gebrauch zu entgasen<sup>(18)</sup>.

Die Probe wird entweder mit einer Spritze durch ein Injektionssystem in den Elutionsstrom gegeben oder es wird zur Substanzaufnahme eine Probeschleife verwendet. Das Druck- und Strömungsgleichgewicht darf durch die Probeaufnahme nicht beeinträchtigt werden. Bei der Einspritztechnik ist darauf zu achten, daß die Probelösung während der Injektion nicht am Kolben der Injektionspritze vorbei nach außen gedrückt wird. Die Septa können Weichmacher u. ä. Stoffe in die Elutionsmittel abgeben, brüchig werden und Krümelablagerungen im HPLC-System hervorrufen. Diesen Fehlern, erkenntlich an periodisch auftretenden Banden, Basisliniendrift, Druckanstieg, ist Beachtung zu schenken.

Das Säulenmaterial soll so inert sein, daß keine Wirkstoffadsorptionen oder -zersetzungen auftreten. Die Säulenanschlüsse werden zur Zurückhaltung von Abrieb der Säulenpackung, der zu Kapillarverstopfung und Detektorverschmutzung führt, und zum Schutz der Säulenfüllung von Verunreinigung mit Fritten ausgestattet. Jedes unnötige Totvolumen beim Montieren der Säule sollte vermieden werden.

Die Detektoren (in der Rückstandsanalytik meist der UV-Detektor) sollen einen möglichst geringen Rauschpegel haben. Ein Driften der Basislinie ist unerwünscht. Der zugrundeliegende Fehler, der z. B. in der Änderung der Umgebungstemperatur, der Strömungsgeschwindigkeit oder im Auswaschen der stationären Phase zu suchen ist, muß

unverzüglich beseitigt werden. Beim Auswerten der Chromatogramme von UV-Detektoren können die Literaturwerte der Extinktionskoeffizienten nicht verwendet werden, da in den üblichen Durchflußdetektoren andere Meßbedingungen zugrunde liegen als bei der Ermittlung der Literaturwerte.

Eine Ursache für schlechte Reproduzierbarkeit von HPLC-Messungen sind Verunreinigungen in den als Eluenten verwendeten Lösungsmitteln.

Spuren von Verunreinigungen können infolge Anreicherung auf der Trennsäule zur Verfälschung der Ergebnisse führen.

Bei Gradientenelution können die Verunreinigungen bei Übergang zu polaren Lösungsmitteln von der Säule eluiert werden und nicht vorhandene Probenbestandteile vortauschen.

Grundsätzlich sollten alle Eluenten vor der Verwendung gereinigt werden, sofern sie nicht vom Hersteller ausreichende Reinheitsspezifikationen haben. Die Reinigung kann durch Destillation oder adsorptive Filtration über Aluminiumoxid erfolgen. Die letztere Methode verbessert außerdem oft die UV-Durchlässigkeit der Lösungsmittel und erweitert damit den Bereich der linearen Anzeige.

Bei der Teilentnahme von Lösungsmitteln kann die restliche Lösungsmittelmenge leicht verunreinigt werden, z. B. durch kaum auszuscheidende Stoffe wie Wasser und Sauerstoff. Vor allem unter Lichteinfluß kann es zur Bildung von Verunreinigungen kommen. Sofortiges Verschließen der Flaschen und Neureinigung des Lösungsmittels bei längerer Lagerungsdauer sind zu empfehlen.

Wegen der Abhängigkeit der Intensität der Absorption des UV-Detektors von der Temperatur sollte die Temperatur der Säule und der Meßzelle möglichst konstant sein. Dies ist auch besonders bei der Gradientenelution zu beachten, bei der die Mischungswärme Bedeutung haben kann.

Die Ausführungen des Kapitels 3.3.1 zu Empfindlichkeitschwankungen des Detektors, Verschleppungsfehler, Auflösung, Linearität, Reproduzierbarkeit und Auswertung gelten auch für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.

### 3.3.3 Photometrie

Beim Betrieb des Photometers sind die Bedienungsanleitungen des Herstellers sorgfältig zu beachten. Die Temperatur des Meßraums sollte konstant und die zu messenden Lösungen temperiert sein, damit die Genauigkeit der Messung nicht durch Temperatureffekte beeinträchtigt wird.

Von entscheidender Bedeutung ist in der Regel das exakte Einhalten der in der Methode festgelegten Reaktionsbedingungen, da schon geringe Abweichungen bzw. Unterschiede bei der Reagenzzugabe, Reaktionszeit und Reaktionstemperatur sich im Ergebnis niederschlagen können. Auch auf Verunreinigungen in Reagenzien und Lösungsmitteln, die das Ergebnis verfälschen können, ist zu achten. Durch wiederholtes Messen der Eichkurve in geeigneten zeitlichen Abständen können diese Fehler aufgedeckt und beseitigt werden.

Zur Messung dürfen nur Küvetten verwendet werden, die sich in einwandfreiem Zustand befinden. Sie sind deshalb vor Beginn der Messung auf Verunreinigungen, Kratzer, Verätzungen oder andere Fehler zu überprüfen. Bei Zweistrahlphotometern dürfen nur aufeinander abgegliche Küvetten verwendet werden. Zur Reinigung sind vorzugsweise saure Reinigungsmittel zu verwenden, da alkalische und phosphathaltige Reinigungsmittel Glas und auch Quarz angreifen und somit die Küvettenqualität beeinträchtigen.

Auf keinen Fall dürfen kolloidale oder trübe Lösungen gemessen werden, da andernfalls neben der Absorption auch Streuung auftritt. Besonders in alkalischen Lösungen kann kolloidale Kieselsäure auftreten. In vielen Fällen sind Trübungen bei Durchsicht

nicht bemerkbar und lassen sich nur mittels des Tyndallkegels eines scharfen, begrenzten Lichtbündels feststellen. Auch submikroskopisch kleine Gasbläschen, die in den Küvetten durch Erwärmung luftgesättigter Lösungen entstehen können, rufen Streueffekte hervor und sind deshalb zu vermeiden<sup>(19)</sup>.

### 3.4 Auswertung

Voraussetzung für eine einwandfreie quantitative Auswertung bei chromatographischen Messungen sind

- sichere Identifizierung des Wirkstoffes. Dazu ist eine Übereinstimmung der Retentionszeiten von Standardpeak und Probenpeak auf etwa 1 % Genauigkeit erforderlich. Größere Abweichungen bedürfen der Klärung;
- Stabilität der Basislinie und eindeutig erkennbarer Verlauf (negative Peaks sollten durch sorgfältige Detektoreneinstellung und -wartung sowie durch ein geeignetes Clean-up-Verfahren vermieden werden);
- keine "Geisterpeaks" aus vorhergehenden Analysen bzw. aus dem Septum und den Zuleitungen (insbesondere bei temperaturprogrammierter Arbeitsweise). Letzteres ist besonders bei Kapillarsäulen wichtig.

#### Handauswertung

Für die manuelle Auswertung gibt es mehrere Möglichkeiten:

Bei schmalen, schlanken Peaks ist die Höhenmessung vorzuziehen. Bei breiten Peaks ist die Flächenmessung anzuwenden. Sie kann durch die Näherungsmethode "Höhe mal Halbwertbreite" mit Hilfe eines Planimeters, sowie durch Ausschneiden und Auswiegen ermittelt werden. Bei unsymmetrischen Peaks und Peaks mit tailing empfiehlt



sich die Näherungsmethode nach Condal-Bosch<sup>(7)</sup>. In Sonderfällen kann auch die Näherungsmethode "Höhe mal Gesamtretentionszeit" herangezogen werden.

#### Elektronische Auswertung

Die elektronische Auswertung erfolgt mit Integratoren oder Labor-datensystemen. Dabei sind die Angaben der Hersteller für die Auswertung zu beachten. Besonderes Augenmerk ist dabei auf die korrekte Berechnung der Basislinie und das Erkennen des Peakansfangs und -endes zu legen.

In geeigneten Zeitabständen sollte ein Vergleich mit vom Schreiber aufgezeichneten Chromatogrammen erfolgen.

#### 4. Qualitätssicherung

=====

##### 4.1 Voraussetzungen für Qualitätssicherung

Jedes Rückstandslabor hat durch ein Qualitätssicherungsprogramm zu gewährleisten, daß die Grundsätze dieser Richtlinie beachtet werden und die Meßwerte abgesichert sind. Es ist dies nach einem festgelegten System von einer oder mehreren Personen durchzuführen, die von der Leitung des Rückstandslabors hierzu beauftragt worden sind und ihr unmittelbar unterstehen. Diese Personen sollten, wenn irgend möglich, weder den Leitern der Einzellabors unterstehen noch an den Rückstandsuntersuchungen, insbesondere der Probenaufarbeitung und Messung beteiligt sein. Von ausschlaggebender Bedeutung ist die Unbefangenheit des Qualitätssicherungspersonals gegenüber der Erarbeitung der Rückstandswerte.

Das System schließt mindestens folgende Kontrollen ein:

- Vorliegen einer richtigen, ausführlichen und gut verständlichen Analysenmethode;

- Vorliegen des ausführlichen Untersuchungsplanes und der Arbeitsanweisungen für Routineoperationen, z. B. Bedienung von Geräten und Apparaturen, Probenvorbereitung, Umgang mit Standards und Reagenzien;
- Berichte über festgestellte Abweichungen von den Arbeitsanweisungen an den Laborleiter;
- Vorliegen von Wirkstoffen genügenden Reinheitsgrades und nicht zu alten Standardlösungen geeigneter Konzentrationen;
- Testchromatogramme bzw. Testwerte, die exakte Arbeitsweise der Geräte erkennen lassen;
- Vollständigkeit, richtige Kennzeichnung und einwandfreier Zustand von Proben und unbehandelten Kontrollproben;
- Einwandfreier Zustand und Wartung der Geräte und Apparaturen;
- Datenbehandlung, Datenverarbeitung und -interpretation.

#### 4.2 Programm der Absicherung der Analysenwerte

Die Kontrolle der Analysenwerte hat besondere Bedeutung, es ist daher ein Programm zur Sicherung zu erstellen.

Es gibt hierfür mehrere Wege, z. B.

- Untersuchung von Proben nach Zusatz mit für den Analytiker und dem Personal unbekanntem Gehalt an Rückständen, wie es bei Ringversuchen üblich ist

- Von Zeit zu Zeit werden Parallelproben, d. h., parallele Zweitproben (4 - 8 Proben verschiedener Versuchsansteller und Probenahmeterminen) nachträglich vom Qualitätssicherungspersonal chiffriert und nach Abschluß der normalen Untersuchungsreihe zur Untersuchung gegeben. Die Übereinstimmung dieser Werte mit den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchung der Parallelen gibt einen guten Einblick in die Schwankungsbreite bzw. Zuverlässigkeit der Analytik, soweit sie die Reproduzierbarkeit betrifft.

Eine Möglichkeit zur Absicherung der Messung liegt in der Wiederholung des Ansatzens der Standardlösung und der Messung einer für den Analytiker und dem Personal unbekanntem, vom Qualitätssicherungspersonal vorbereiteten Kontrolllösung.

## 5. Berichterstattung und Archivierung

=====

### 5.1 Mitteilung der Analysenergebnisse

Die Rückstandsergebnisse werden auf Seite 3 des BBA-Formblattes BBA AP-08 oder BBA AP-09 (siehe Anlage 1) berichtet. Hinweise zum Ausfüllen werden auf der Rückseite der Formblätter angegeben.

Alle Ergebnisse sind in der Einheit "mg/kg" anzugeben. Die Werte sollen gerundet werden; die angegebene Stellenzahl sollte der analytischen Streuung entsprechen.

Werte oberhalb der Bestimmungsgrenze werden wie folgt gerundet:

- Werte zwischen 0,001 und 0,010 werden auf 3 Stellen hinter dem Komma auf-/abgerundet;

...

- Werte zwischen 0,01 und 1,00 werden auf 2 Stellen hinter dem Komma auf-/abgerundet (z. B.:  $0,033 \approx 0,03$ ;  $0,076 \approx 0,08$ ;  $0,045 \approx 0,04^*$ ;  $0,055 \approx 0,06$ ,  $0,145 \approx 0,14$ ).
- Werte zwischen 1 und 10 werden auf eine Stelle hinter dem Komma auf-/abgerundet (z. B.  $2,15 \approx 2,2$ ;  $6,65 \approx 6,6$ ).
- Werte zwischen 10 und 100 werden auf die jeweilige ganze Zahl auf-/abgerundet (z. B.  $11,8 \approx 12$ ;  $15,3 \approx 15$ ;  $63,5 \approx 64$ ;  $34,5 \approx 34$ ).
- Werte  $> 100$  werden auf die 2. Stelle vor dem Komma auf-/abgerundet (z. B.  $152 \approx 150$ ;  $326 \approx 330$ ;  $555 \approx 560$ ;  $285 \approx 280$ ).

Der Analytiker entscheidet, welche Korrekturen des Analysenbefundes durchgeführt werden. Die eventuell durchgeführten Korrekturen müssen klar erkennbar und nachvollziehbar sein.

Der Blindwert ist jeweils mit dem Analysenergebnis anzugeben<sup>\*\*</sup>; wenn der Blindwert außerdem abgezogen wird, so ist dies zu begründen.

Liegt der ermittelte Rückstandswert bei oder über der Bestimmungsgrenze, ist der mit der Wiederfindungsrate<sup>\*\*</sup> korrigierte und gerundete Rückstandswert anzugeben.

Liegt der Wert unterhalb der Bestimmungsgrenze, aber oberhalb der Nachweisgrenze (NG), so wird angegeben

< "Zahlenwert von BG" nb z.B.  $< 0,05$  nb.

Ein Befund unterhalb der Nachweisgrenze wird angegeben

nn und Zahlenwert NG z.B. nn NG 0,01.

---

\* Folgt vor dem Runden auf die letzte Stelle, die noch anzugeben ist, nur noch eine 5, so hat es sich als zweckmäßig erwiesen, jeweils zu der nächsten geraden Zahl auf- oder abzurunden (SACHS, 1978) (20).

\*\* z.B. auf Seite 3 des BBA-Formblattes BBA-AP 08, siehe Anhang 1, anzugeben.

## 5.2 Zusammenstellung und Aufbewahrung von Aufzeichnungen und Daten

Rohdaten (z. B. Chromatogramme, Spektren), Versuchsprotokolle, Berichte über Laborinspektionen und Aufzeichnungen über Wartung und Eichung der verwendeten Geräte sind in Archiven aufzubewahren, und zwar so, daß ein schnelles Auffinden gewährleistet ist. Diese Unterlagen sollten mindestens 10 Jahre lang aufbewahrt werden. Es hat sich als sinnvoll herausgestellt, die Verantwortung für die ordnungsgemäße Führung der Archive einer Person zu übertragen.

Zu einer vollständigen Zusammenstellung der relevanten Versuchsunterlagen gehören z. B. folgende Unterlagen:

- Name und Unterschrift des Laborleiters und Namen der weiteren Personen, die an der Untersuchung beteiligt waren.
- Ablauf des Untersuchungsplanes und eventuell vorgenommene Änderungen und Ergänzungen.
- alle Unterlagen bezüglich Feldversuchsanstellung und Versand (z. B. BBA-Formblätter BBA AP-08, siehe Anhang 1).
- die vollständige Analysenmethode.
- Analysenprotokolle (vgl. Muster im Anhang 3).
- Zusammenstellung der Ergebnisse (z. B. BBA-Formblätter AP-08) und Auswertung der Ergebnisse mit Schlußfolgerung.
- Angaben der Aufbewahrungsorte von Mustern, Proben, Rohdaten, Chromatogramme.

...

## 6. Kontrolluntersuchungen

=====

### 6.1 Arbeitsweise von Laboratorien

Um Laboratorien hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit zu überprüfen, können Ringversuche eingesetzt werden. Vor allem bei Laboratorien, die mit Sammelmethode arbeiten, bietet sich diese Art der Kontrolle an. Bei den Arbeiten von Industrielabors oder Auftragsinstituten, die mit selbstentwickelten und z. T. unveröffentlichten Methoden arbeiten, ist die Situation anders zu beurteilen. Bei Ringversuchen hat sich nämlich herausgestellt, daß die Laboratorien die besten Ergebnisse mit den Methoden erzielten, mit denen sie vertraut waren. Da bei der Bearbeitung von Rückstandsergebnissen in der Regel nicht Sammelmethode, sondern wirkstoffspezifische Einzelmethoden angewandt werden, müßten sich viele Laboratorien bei Ringanalysen auf fremde und für sie nicht relevante Methoden einstellen. Dies setzt die Brauchbarkeit der Ringanalysen als Kontrollinstrument herab. Allerdings können sie in bestimmten Fällen sinnvoll sein. Außerdem ist der Nachweis auch der Industrielaboratorien wünschenswert, daß ihr Personal von Zeit zu Zeit an Ringversuchen erfolgreich teilgenommen hat.

### 6.2 Methodenüberprüfung

Die für die Erarbeitung der Rückstandswerte jeweils verwendeten Analysemethoden sind im Zulassungsverfahren vorzulegen. Sie werden von der Zulassungsbehörde in jedem Falle einer theoretischen und im gewissen Umfange einer experimentellen Überprüfung unterzogen.

...

### 6.3 Vergleichsuntersuchungen

Die Rückstandsdaten werden grundsätzlich theoretisch geprüft, insbesondere auch hinsichtlich Übereinstimmung mit vorgesehenen Anwendungsbedingungen, verwendeter Formulierung und Plausibilität.

Im gewissen Umfange werden im Auftrag der Zulassungsbehörde die entsprechenden Versuche wiederholt. Mögliche Fehlerquellen können bei diesen Vergleichsuntersuchungen in der Feldversuchsanlage, der Probenahme, den Rückstandsanalysemethoden und den praktischen Durchführungen der Analysen im Labor liegen.

In Stichproben werden grundsätzlich neue sowie unklare Rückstandssituationen vollständig experimentell nachuntersucht. Die Versuche werden von der Zulassungsbehörde auf den eigenen Versuchsfeldern sowie bei den verschiedenen Pflanzenschutzämtern angelegt, die Untersuchung erfolgt in den Laboratorien der Fachgruppe für chemische Mittelprüfung.

37

Literatur

1. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig, Rückstandsuntersuchungen, Richtlinie für Feldversuche und Probenahme, Merkblatt Nr. 41, 2. Auflage, Oktober 1977
2. Bundesanzeiger Nr. 42 a (1983): Bekanntmachung der OECD-Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) vom 4. Februar 1983
3. J.A.R. Bates, S. Gorbach, Pure Appl. Chem. 54, 1361-1450 (1982), IUPAC-Report on Pesticides:  
Recommended approaches to the production and evaluation of data on pesticide residues in food
4. Joint FAO/WHO Food Standards Programm, Codex Alimentarius Commission:  
Guidelines on good analytical practice in residue analysis, Technical monograph No 8 (1983) der GIFAP, S. 31-40
5. Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1974
6. Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1958
7. G. Schwedt, Chromatographische Trennmethode, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1979
8. K. Beyermann, Organische Spurenanalyse, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1982
9. H. Egan, J.A.O.A.C. 60, 260-267 (1977), Methods of Analysis: An Analysis of Methods



- 10. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13th edition, Washington 1980
  
- 11. Methodensammlung zur Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, Mitteilung VI der Senatskommission für Pflanzenschutz-, Pflanzenbehandlungs- und Vorratsschutzmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Methodensammlung der Arbeitsgruppe "Analytik", 1. - 6. Lieferung, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1982
  
- 12. Codex Committee on Pesticide Residues, Pesticide residues in food. Portion of Commodity to which Codes maximum residues limits apply, unveröffentlicht 1980
  
- 13. H. Egli, J. Agr. Food Chem. 30, 861-866 (1982), stability of pesticide residues
  
- 14. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, Fachgruppe XI Umweltanalytik: Interne Laborkontrolle in der Rückstandsanalytik von Chlorkohlenwasserstoffen, VDLUFA-Schriftenreihe, Darmstadt 1980
  
- 15. W. Ebing, Good analytical practice in pesticide residue analysis using gas liquid chromatography, Proceedings of the Fifth International IUPAC Congress of Pesticide chemistry, Vol. 4, S. 55-60, Pergamon Press New York - London 1983
  
- 16. E. Schulte, Praxis der Kapillargaschromatographie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1983
  
- 17. R. Kaiser, Chromatographie in der Gasphase, Bd. 1, Gas-Chromatographie, Bibliographisches Institut Mannheim (1965)
  
- 18. H. Engelhardt, Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1975

19. G. Kortüm, Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955
20. L. Sachs, Angewandte Statistik, 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1978
21. DIN ISO 5725, Präzision von Prüfverfahren, Bestimmung von Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit durch Ringversuche, November 1981, Beuth Verlag, Berlin
22. Bundesgesetzblatt 22, 745-783 (1982)  
Verordnung über Höchstmengen an Pflanzenschutz- und sonstigen Mitteln sowie anderen Schädlingsbekämpfungsmitteln in oder auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen (Pflanzenschutzmittel-Höchstmengenverordnung-PHMV) vom 24. Juni 1982
23. Arbeitsgruppe "Pestizide": 3. Empfehlung.  
Vorbereitung und Reduzierung der Proben im Rückstandslabor, Mitteilungsbl. GDCh-Fachgruppe Lebensmittelchem. gerichtl. Chem. 28, 219-223 (1974)

Anhang

1. Formblatt BBA AP-08-05, Seite 3  
Formblatt BBA AP-09-01, Seite 3
2. Liste der zu analysierenden Pflanzenteile
3. Muster von Formblättern zur Protokollführung



#### Hinweise zum Ausfüllen der Formblätter

- ① Hier die von der Firma im Zulassungsverfahren verwendete Abkürzung der Firmenbezeichnung eintragen.
- ② Kenn-Nr. = Zulassungsantrags-Nr. (ZA-Nr.)
- ③ Wenn zutreffend, ankreuzen.
- ④ Angaben von Ziffer 3.1, Seite 1, übernehmen.
- ⑤ Angaben soweit wie möglich von Seite 2 übernehmen.
- ⑥ Die verwendete Analysenmethode ist der Biologischen Bundesanstalt zusammen mit dem Rückstandsberichtsbogen vorzulegen. Falls die Methode bereits vorliegt, ist das unter den Ziffern 3.2 und 3.3 zu vermerken.
- ⑦ Die untere Bestimmungsgrenze (vgl. DFG) muß unterhalb der zulässigen Höchstmenge liegen.
- ⑧ Bei Vorhandensein mehrerer rückstandsrelevanter Stoffe (Wirkstoff + Metaboliten) kann es erforderlich sein, alle Rückstände auf einen dieser Stoffe umzurechnen (siehe Pflanzenschutzmittel-Höchstmengenverordnung – PHmV). Bei Dithiocarbamaten sind die Rückstände als  $CS_2$  berechnet anzugeben.
- ⑨ Hier ist mitzuteilen, ob die Rückstände nur auf die eßbaren Teile berechnet sind oder auf das Gesamtgewicht von eßbaren und nicht eßbaren Teilen (z.B. auf Kirschen ohne Steine oder auf Kirschen einschl. der Steine und ggf. der Stiele). Bei Erbsen müssen Schoten einschl. Körner auf Rückstände untersucht werden (siehe Pflanzenschutzmittel-Höchstmengenverordnung – PHmV).
- ⑩ Hier den ermittelten Blindwert der unbehandelten Vergleichsprobe eintragen. Der Blindwert wird bei der Berichterstattung des gefundenen Mittelwertes (unter 4.4) grundsätzlich nicht abgezogen.
- ⑪ Es ist grundsätzlich der mit der Wiederfindungsrate korrigierte Rückstandswert zu berichten.

Beispiel:

ermittelter Rückstandswert	0,6 mg/kg
Wiederfindungsrate:	80 %
gefundener Mittelwert (unter 4.4 anzugeben)	$= \frac{0,6 \times 100}{80} = 0,75 \text{ mg/kg}$

Die Wiederfindungsrate ist im Bereich des ermittelten Rückstandswertes zu ermitteln.

Firma:  73 ①  
 Lieferdatum:  19

Kenn-Nr.: ②  -  -

Handelsbezeichnung:  13

Anhang 1

Prüfvermerke:  
(nicht ausfüllen)

**Berichtsbogen für Rückstandsuntersuchungen mit Vorratsschutzmitteln**

(Für jeden untersuchten Wirkstoff/Metaboliten getrennt ausfüllen)

Seite 3 Rückstandsuntersuchung

Lfd.Nr.:  (bitte von Seite 1 übertragen)

1.1 Wirkstoff/Metabolit (Name): \_\_\_\_\_

1.2 BBA-Nr.: \_\_\_\_\_

1.3 Vorratsgut: ⑬ \_\_\_\_\_

2. Angaben pro Behandlung ⑭

2.1 Behandlungsjahr: 19 \_\_\_\_\_

	Maßeinheit ⑯	1	2	3	4	5
2.2 Datum (Tag, Monat)						
2.3 Wirkstoffaufwand						
2.4 Präparateaufwand						
2.5 Zeit zwischen Anwendung u. Lüftung						
2.6 Lüftungsdauer						

W

-  66

v

WA F 25

1

2

3. Analytische Daten

3.1 Methode (Autor, Literatur): ⑮ \_\_\_\_\_

3.2 Methode liegt vor? ⑯  Ja

3.3 Liefertermin: \_\_\_\_\_ zu ZA-Nr.:  -

3.4 Bestimmungsprinzip: \_\_\_\_\_

ZA

3.5 Untere Bestimmungsgrenze (mg/kg): ⑰ \_\_\_\_\_

a

3.6 Erfassung von Metaboliten (welche?): \_\_\_\_\_

b

3.7 Rückstände berechnet als ⑱ \_\_\_\_\_

w  f

4. Untersuchungsbefund berechnet auf: ⑲

	1	2	3	4	5	6	7
4.1 Datum der Probenahme							
4.2 Tage nach letzter Anwendung							
4.3 Mittelwert (mg/kg)							
4.4 Zahl der Einzelanalysen							
4.5 Wertebereich (mg/kg) von _____ bis _____							
4.6 Blindwert (mg/kg) ⑳							
4.7 Wiederfindungsrate (%) ㉑							

ZA

c

d

e

f

g

J/N

1  58

2  58

3  58

56

5. Probenbeschreibung:

5.1 Probenbezeichnung							
5.2 Versandtermin (Datum)							
5.3 Eingang im Labor (Datum)							
5.4 Datum der Analyse							
5.5 Zustand bei Eingang							
5.6 Lagertemperatur (°C)							
5.7 Gewicht der Analysenprobe (g)							

6. Abbeurkunde als Anlage beigefügt?  Ja  Nein ㉒ 7. Halbwertszeit d. Wirkstoffabbaus (Tage): \_\_\_\_\_

DAT

8. Anmerkungen (Raum für zusätzliche Angaben zu den obengenannten Punkten): \_\_\_\_\_

S

73

9. Ort (PLZ, Name): \_\_\_\_\_

10. Datum: \_\_\_\_\_

11. Untersuchungsstelle: \_\_\_\_\_

12. Unterschrift: \_\_\_\_\_

Ber. Nr.: \_\_\_\_\_

1 Blatt - weiß - BBA  
 2 Blatt - gelb - BGA  
 3 Blatt - blau - Antragssteller

#### Hinweise zum Ausfüllen der Formblätter

- ① Hier die von der Firma im Zulassungsverfahren verwendete Abkürzung der Firmenbezeichnung eintragen.
- ② Kenn-Nr. = Zulassungsantrags-Nr. (ZA-Nr.)
- ③ Beispiele: ml/100 m<sup>3</sup>, Beutel/10 m<sup>3</sup>, Tage, Stunden.
- ④ Angaben von Ziffer 3.1, Seite 1, übernehmen.
- ⑤ Angaben soweit wie möglich von Seite 2 übernehmen.
- ⑥ Die verwendete Analysenmethode ist der Biologischen Bundesanstalt zusammen mit dem Rückstandsberichtsbogen vorzulegen. Falls die Methode bereits vorliegt, ist das unter den Ziffern 3.2 und 3.3 zu vermerken.
- ⑦ Wenn zutreffend, ankreuzen.
- ⑧ Die untere Bestimmungsgrenze (vgl. DFG) muß unterhalb der zulässigen Höchstmenge liegen.
- ⑨ Bei Vorhandensein mehrerer rückstandsrelevanter Stoffe (Wirkstoff + Metaboliten kann es erforderlich sein, alle Rückstände auf einen dieser Stoffe umzurechnen (siehe Pflanzenschutzmittel-Höchstmengenverordnung – PFMV). Bei Dithiocarbamaten sind die Rückstände als CS<sub>2</sub> berechnet anzugeben.
- ⑩ Hier ist mitzuteilen, ob die Rückstände nur auf die eßbaren Teile berechnet sind oder auf das Gesamtgewicht von eßbaren und nicht eßbaren Teilen (z. B. bei Nüssen, Trockenpflaumen).
- ⑪ Hier den ermittelten Blindwert der unbehandelten Vergleichsprobe eintragen. Der Blindwert wird bei der Berichterstattung des gefundenen Mittelwertes (unter 4.3) grundsätzlich nicht abgezogen.
- ⑫ Es ist grundsätzlich der mit der Wiederfindungsrate korrigierte Rückstandswert zu berichten.

Beispiel: 
$$\begin{array}{l} \text{ermittelter Rückstandswert} \quad 0,6 \text{ mg/kg} \\ \text{Wiederfindungsrate} \quad 80\% \\ \text{gefundener Mittelwert} \quad = \frac{0,6 \times 100}{80} = 0,75 \text{ mg/kg} \\ \text{(unter 4.3 anzugeben)} \end{array}$$

Die Wiederfindungsrate ist in jedem Rückstandsbereich gesondert zu bestimmen.

Liste der zu analysierenden Pflanzenteile  
 =====

Die Liste berücksichtigt Empfehlungen von der FAO/WHO<sup>12)</sup>, der Gesellschaft deutscher Chemiker<sup>23)</sup>, der Deutschen Forschungsgemeinschaft<sup>11)</sup> und des Bundesgesundheitsamtes.

Besonderheiten ergeben sich noch aus den Bestimmungen der Pflanzenschutzmittel-Höchstmengenverordnung (PHmV)<sup>22)</sup>. Dort genannte Regelungen für einzelne Wirkstoffe sind zu beachten.

Erntegut	zu entfernende Teile	Bemerkungen
Blatt- und Sproßgemüse	anhaftende Wurzeln und Erde, verwelkte Blätter und ungenießbare Pflanzenteile	
Zwiebel	trockene Außenhaut	
Kohlrabi	Blätter	
Fruchtgemüse	ungenießbare Pflanzenteile	
Gemüsemais		ganzer Kolben
frische Erbsen		mit Hülsen
Wurzelgemüse	ungenießbare Pflanzenteile und anhaftende Erde	
Knollensellerie		Knolle und Laub getrennt
Wurzel-Petersilie		Knolle und Laub getrennt
Beerenobst	Stiele	aber Erdbeeren mit Stielen und Kelchblättern, Johannisbeeren mit Stielen
Kernobst	Stiele	
Steinobst	Stiele, Steine	Rückstand auf gesamte Frucht mit Stielen und Steinen beziehen
Weintrauben		mit Stielen und Kämmen
Nüsse	Schalen	Erdnüsse mit inneren Samenschalen
Getreide		Korn und Stroh getrennt
Rüben		Körper und Blatt getrennt
Kartoffeln	anhaftende Erde	mit Schalen (jedoch in Sonderfällen ohne Schalen)
<u>Sonstige Probematerialien:</u>		
Boden	Teile > 2 mm	
Wasser		nicht filtrieren



Falls in der Liste genannte, zu entfernende Pflanzenteile noch als Futtermittel verwendet werden (z. B. Stroh), kann es erforderlich sein, diese getrennt auf Rückstände zu untersuchen.

In den Berichtsbögen für Rückstandsuntersuchungen mit Pflanzenschutz- und Vorratsschutzmitteln (BBA AP-08 und AP-09, siehe Anhang 1) ist genau anzugeben, wie verfahren wurde.

So wird dort auf Seite 3 (Rückstandsuntersuchung) unter Ziffer 4.3 das Probematerial genannt, das zur Analyse gelangte (bei Kirschen also Kirschen ohne Stein und Stiel). Unter Ziffer 4 (Untersuchungsbefund berechnet auf:) ist in diesem Fall jedoch "Kirschen mit Stein und Stiel" anzugeben.

Muster für ein  
Versuchsprotokoll (GC/HPLC)  
Analysenproben

Vers.-Nr.: \_\_\_\_\_ Vers.-Ansteller: \_\_\_\_\_

Untersuchungsmaterial: \_\_\_\_\_ Analysendatum: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Untersucher(in): \_\_\_\_\_

Wirkstoff/Metabolit: \_\_\_\_\_ Derivatisierungsfaktor: \_\_\_\_\_

Methode: \_\_\_\_\_ Gerät: \_\_\_\_\_

Standardlösungen:

Wirkst./Derivat	Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lösungsmittel	angesetzt an

Probeneingangs-Nr.					
Tag nach letzter Behandlung					
Probenein- waage (g)					
Analysen- anteil (g)					
Endvol. (ml)					
Injiziertes Vol. ( $\mu\text{l}$ )					
Injizierte Probe (ng)					
Meßsignal (mm)					
(ng)					
unkorr. (mg/kg)					
Rückstände					
korr. (mg/kg)					
Eichkurve (ng)					
(mm)					

Bemerkungen:

## Versuchsprotokoll (Kolorimetrie)

## Analysenproben

Vers.-Nr.: \_\_\_\_\_ Vers.-Ansteller: \_\_\_\_\_

Untersuchungsmaterial: \_\_\_\_\_ Analysendatum: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Untersucher(in): \_\_\_\_\_

Wirkstoff/Metabolit: \_\_\_\_\_ Derivatisierungsfaktor: \_\_\_\_\_

Methode: \_\_\_\_\_ Gerät: \_\_\_\_\_

## Standardlösungen:

Wirkst./Derivat	Konzentration ( $\mu\text{g/l}$ )	Lösungsmittel	angesetzt am

Probeneingangs-Nr.							
Tag nach letzter Behandlung							
Probenein- waage (g)							
Analysen- anteil (g)							
Endvol. (ml)							
Schichtdicke der Küvette (cm)							
gemessene Probe (mg)							
Meßwert $\frac{\text{Extinktion}}{(\mu\text{g})}$							
unkorr. Rückstände (mg/kg)							
korr. (mg/kg)							
Eich- kurve $\frac{\text{Extinktion}}{(\mu\text{g})}$							

Bemerkungen:

Zusatzproben

Vers.-Nr.: \_\_\_\_\_ Vers.-Ansteller: \_\_\_\_\_

Untersuchungsmaterial: \_\_\_\_\_ Analysendatum: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Untersucher(in): \_\_\_\_\_

Wirkstoff/Metabolit: \_\_\_\_\_ Derivatisierungsfaktor: \_\_\_\_\_

Methode: \_\_\_\_\_ Gerät: \_\_\_\_\_

**Standardlösungen:**

Wirkst./Derivat	Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lösungsmittel	angesetzt am

Probeneingangs-Nr.					
Tag nach letzter Behandlung					
Zusatz ( $\mu\text{g}$ )					
( $\text{mg/kg}$ )					
Probenein- waage ( $\text{g}$ )					
Analysen- anteil (%)					
Endvol. ( $\text{ml}$ )					
Injiziertes Vol. ( $\mu\text{l}$ )					
Injizierte Wirkst.menge ( $\text{ng}$ )					
Meßsignal ( $\text{mm}$ )					
( $\text{ng}$ )					
Recovery (%)					
Eichkurve ( $\text{ng}$ )					
( $\text{mm}$ )					

**Bemerkungen:**

Untere Bestimmungsgrenze ( $\text{mg/kg}$ ): \_\_\_\_\_

Unterschrift: \_\_\_\_\_

Zusatzproben

Vers.-Nr.: \_\_\_\_\_ Vers.-Ansteller: \_\_\_\_\_

Untersuchungsmaterial: \_\_\_\_\_ Analysendatum: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Untersucher(in): \_\_\_\_\_

Wirkstoff/Metabolit: \_\_\_\_\_ Derivatisierungsfaktor: \_\_\_\_\_

Methode: \_\_\_\_\_ Gerät: \_\_\_\_\_

**Standardlösungen:**

Wirkst./Derivat	Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lösungsmittel	angesetzt am

Probeneingangs-Nr.					
Tag nach letzter Behandlung					
Zusatz ( $\mu\text{g}$ )					
( $\text{mg/kg}$ )					
Probenein- waage (g)					
Analysen- anteil (%)					
Endvol. (ml)					
Schichtdicke der Küvette (cm)					
gemessene Probe (mg)					
Meßwert $\frac{\text{Extinktion}}{(\mu\text{g})}$					
Recovery (%)					
Eichkurve $\frac{\text{Extinktion}}{(\mu\text{g})}$					

**Bemerkungen:**

Untere Bestimmungsgrenze ( $\text{mg/kg}$ ): \_\_\_\_\_



Bemerkungen (zu getesteten Säulen, Detektoren usw.):

Bereitgestellt (Datum, Kurzzeichen) .....

---

Meßbedingungen

Linearitätsbereich .....

Peaksymmetrie ..... Peakbreite .....

Störungen (mit Datum) .....

.....

.....

.....

.....

Änderungen von GC-Parametern .....

.....

.....

.....

Bemerkungen:

Ende der Messungen .....  
(Datum, Kurzzeichen)

Analysenbedingungen HPLC

Wirkstoff:

Probematerial:

Versuchsplan-Nr.:

Säulenfüllung:

Säulenlänge (cm):

Innendurchmesser (mm):

Elutionsmittel:

Durchfluß (ml/min):

Arbeitsdruck (bar):

Pumpe:

Detektor:

Verstärkung:

Wellenlänge (nm):

Ausgangsspannung (mV):

Schreiber:

Papiervorschub (cm/min):

Injektionsvolumen ( $\mu$ l):

Empfindlichkeit

- Menge ..... ng
- Peakfläche(-höhe) .....
- Signal/Rauschen .....

Linearitätsbereich:

Meßbereich:

Retentionszeiten

- Lösungsmittel:
- Wirkstoffe:

- Referenzverbindung:
- Störpeaks:

Peakbreite bei halber Höhe:

Auflösung:

Bemerkungen:

Störungen:

Zeitraum der Messungen:

Bearbeiter/in: .....

Datum: .....