

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische
Lebensmitteltechnologie

Bewertung von rückstandsanalytischen Laborkompetenzen anhand experimenteller Daten

Silke E. Bruns

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Rychlik
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Parlar
2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Die Dissertation wurde am 10.11.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 07.05.2012 angenommen.

Vorbemerkung / Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 2009 bis Juni 2011 im Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München am Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie in Zusammenarbeit mit dem Rückstandslabor Friedle GmbH (Regensburg) in Freising-Weihenstephan durchgeführt.

Dem Institutsleiter Prof. Dr. Dr. H. Parlar möchte ich dafür danken, die Promotion an diesem Lehrstuhl ermöglicht zu haben. Er hat die Arbeit stets durch konstruktive Anregungen und Ideen unterstützt.

Den Mitarbeitern der Labor Friedle GmbH gilt mein besonderer Dank für die wissenschaftliche Unterstützung der Arbeit. Die Möglichkeit, in Kooperation mit einem privaten Rückstandslaboratorium zu arbeiten, hat einen wertvollen Beitrag zum fachlichen Verständnis sowie zur methodischen Weiterentwicklung geleistet. Besonders erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang Herrn Albrecht Friedle, Herrn Athanasios Nitsopoulos, Frau Beate Humm, Frau Angela Blender, Frau Michaela Hoffmann, Frau Conny Dietz sowie Frau Theresa Wallner.

Im Verlauf der Arbeit haben mich auch die Institutsmitarbeiter der MPA Eberswalde - Materialprüfanstalt Brandenburg sehr unterstützt. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Peter Schumacher sowie Herrn Michael Hantke.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinem Mann Dennis Ehrhardt, bei dem nicht mehr wegzudenkenden Familienmitglied Sebasitan Hopf sowie bei meinen Freunden Christian Langmann und Holger Hustedt, die stets Verständnis für meine limitierte zeitliche Verfügbarkeit zeigten, und somit durch ihre Geduld und Zustimmung die Erstellung dieser Arbeit sehr unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Kollegen Herrn Dr. Günter Lach, der mir vielfach mit wertvollem Rat zur Seite stand und meinen Wissensdurst immer wieder aufs Neue herausfordert hat.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	2
2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	9
3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	12
3.1 PFLANZENSCHUTZMITTEL: DEFINITIONEN, HISTORIE UND ANWENDUNGEN.....	13
3.2 PFLANZENSCHUTZMITTEL: ZULASSUNG, ÖFFENTLICHE ÜBERWACHUNG UND PRIVATWIRTSCHAFTLICHE KONTROLLE (LEH)	16
3.2.1 Zulassungsverfahren	16
3.2.2 Herleitung und Überwachung von Rückstandshöchstgehalten in Lebensmitteln	17
3.2.3 Kontrolle von Rückstandshöchstgehalten in Lebensmitteln durch den LEH	21
3.3 ANALYTIK VON PFLANZENSCHUTZMITTELN: DIE GRUNDLAGEN DER MULTIMETHODEN	25
3.3.1 Die Multimethode DFG S 19.....	27
3.3.2 Die Multimethode L 00.00–115 (QuEChERS)	50
3.3.3 Die Multimethode L 00.00–113 (BfR-Methode).....	52
3.3.4 Multimethoden im Vergleich: DFG S 19, QuEChERS und BfR-Methode	54
3.4 ETABLIERTE SYSTEME ZUR BEWERTUNG DER LABORKOMPETENZ	55
3.4.1 Akkreditierungsanforderungen für Multimethoden.....	55
3.5 LABOREIGNUNGSTESTS / LABORVERGLEICHSUNTERSUCHUNGEN.....	68
3.5.1 Anforderungen, Zielsetzungen und die Aussagekraft von Laboreignungstests.....	70
3.5.2 Angebote von Laboreignungstests (Proficiency Testings)	77
4 MATERIAL UND METHODEN	80
4.1 GERÄTE UND HILFSMITTEL.....	80
4.2 VERWENDETE MATERIALIEN (CHEMIKALIEN, LÖSUNGSMITTEL UND STANDARDSUBSTANZEN).....	82
4.3 VERWENDETE METHODEN.....	84
4.3.1 Zielsetzung 1: Herstellung von Testmaterial (8 kg Traubenhomogenat).....	84
4.3.2 Zielsetzung 2: Überprüfung der Homogenität des Testmaterials	87
4.3.3 Zielsetzung 3: Analyse des Testmaterials mit unterschiedlichen Methoden und Kalibrierungen	95
4.3.4 Zielsetzung 4: Analyse des Testmaterials in unterschiedlichen Laboratorien unter Routinebedingungen	100
4.3.5 Zielsetzung 5: Gegenüberstellung der analytischen Kompetenz bei der Analytik von Einzelwirkstoffen und der Analytik von Multimethoden.....	101

5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	102
5.1	ZIELSETZUNG 1: HERSTELLUNG VON TESTMATERIAL (8 KG TRAUBENHOMOGENAT).....	102
5.2	ZIELSETZUNG 2: ÜBERPRÜFUNG DER HOMOGENITÄT DES TESTMATERIALS.....	103
5.3	ZIELSETZUNG 3: ANALYSE DES TESTMATERIALS MIT UNTERSCHIEDLICHEN METHODEN UND KALIBRIERUNGEN.....	107
5.3.1	<i>Multimethode L-00.00-115 „QuEChERS“ [10]</i>	107
5.3.2	<i>Multimethode L-00.00-113, „BfR-Methode“ [9]</i>	122
5.3.3	<i>Multimethode L 00.00-34, Sammelmethode DFG S 19 [57]</i>	126
5.3.4	<i>QuEChERS, BfR und S 19 im direkten Vergleich</i>	130
5.4	ZIELSETZUNG 4: ANALYSE DES TESTMATERIALS IN UNTERSCHIEDLICHEN LABORATORIEN UNTER ROUTINEBEDINGUNGEN.....	134
5.4.1	<i>Analysenzeiten der getesteten Labore</i>	134
5.4.2	<i>Prüfkriterien für die Beurteilung der Laborkompetenzen</i>	135
5.4.3	<i>Gegenüberstellung der Richtigkeit und der Vergleichbarkeit</i>	143
5.4.4	<i>Zusammenfassung der Diskussion</i>	166
5.5	ZIELSETZUNG 5: ANALYTIK VON EINZELWIRKSTOFFEN VERSUS ANALYTISCHER KOMPROMISS VON MULTIMETHODEN.....	168
5.5.1	<i>Methodenringversuch zum Wirkstoff Ethephon – Hintergründe</i>	168
5.5.2	<i>Durchführung (Ethephon)</i>	169
5.5.3	<i>Ergebnisse des Methodenringversuches (Ethephon)</i>	170
5.5.4	<i>Zusammenfassung der Diskussion (Ethephon)</i>	173
5.5.5	<i>Methodenringversuch zur Analytik von Chlormequat und Mepiquat in Pilzen</i>	174
5.5.6	<i>Zusammenfassung der Diskussion</i>	177
6	SCHLUßFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	178
	LITERATURVERZEICHNIS.....	182
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	197
	TABELLENVERZEICHNIS.....	201
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	205
	ANHANG.....	207
	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	237
	LEBENS LAUF.....	238

Zusammenfassung

Die Zuverlässigkeit und Validität von Analysenergebnissen sind von großer Bedeutung für alle Beteiligten der Lebensmittelkette und entsprechend von den Laboratorien mit der notwendigen Sorgfalt sicherzustellen.

Dem gegenüber steht die analytische Herausforderung der Multimethoden, durch deren Anwendung mehrere hundert Pestizide im Rahmen eines analytischen Trennungsganges erfasst werden können. Hierbei kann nur ein bestmöglicher analytischer Kompromiss erzielt werden, da Multimethoden nicht mit der erforderlichen Sorgfalt auf alle möglichen Wirkstoff-/Substrat-Kombinationen eingehen können.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Testmaterial (Trauben) entworfen, produziert und auf Homogenität überprüft, um anschließend einen Methodenvergleich an diesem Testmaterial mit etablierten Multimethoden (QuEChERS-, BfR- und S 19-Methode) vorzunehmen. Hierbei werden die analytischen Stärken und Schwächen der jeweiligen Methode sowie der Einfluß der einzelnen Module einer Multimethode (Aufarbeitung, Aufreinigung, Chromatographie und Detektion) auf das Analysenergebnis analysiert und gegenübergestellt.

Weiterhin wurden durch Schwachstellenanalysen von a) bestehenden Normen und Prüfsystemen (Akkreditierung nach ISO 17025) und b) Auswertungskriterien von Laboreignungstests Optimierungsansätze hinsichtlich der Laborkompetenzbewertung identifiziert und entwickelt. Durch einen Praxistest, bei dem das Trauben-Testmaterial verdeckt (aufgemacht als Routineprobe) an 19 internationale, akkreditierte Labore verschickt und dort analysiert wurde, konnten die neu entwickelten Optimierungsansätze bereits getestet werden. Die Bewertung der Analysenergebnisse nach ihrer Richtigkeit (Wiederfindung des Dotierungsniveaus der Testproben) sowie die Berücksichtigung des Einflusses der Laborroutine auf die Qualität der Analysenergebnisse sind für die Bewertung der analytischen Kompetenz unerlässlich, da durch sie erhebliche analytische Schwachstellen identifiziert werden, die durch die bisherigen Prüfsysteme nicht erkannt werden können. Daher wurde folgender Ansatz für ein angemessenes Beurteilungskriterium entwickelt:

$$\text{Dotierter Gehalt im Testmaterial} \pm 25\%$$

Schließlich konnte durch zwei Methodenringversuche gezeigt werden, dass die Analytik von Einzelwirkstoffen (Ethephon in Tomaten sowie Chlormequat und Mepiquat in Pilzen), bei der kein analytischer Kompromiss einzugehen ist, gute Ergebnisse zeigt, da sich die zur Anwendung kommenden Methoden auf eine analytische Fragestellung konzentrieren können.

1 Einleitung

Die Arbeit von Laboratorien im Bereich der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln bedarf einer ausgewiesenen Qualität und Sorgfalt, um sichere und belastbare Analysenergebnisse zu erzielen [1]. Die Laborergebnisse stellen eine entscheidende Grundlage dar, um Maßnahmen im Rahmen des Verbraucherschutzes und der Lebensmittelsicherheit zu treffen.

So wird z.B. in Bezug auf die öffentliche Lebensmittelüberwachung die jährlich erscheinende „Nationale Berichterstattung Pflanzenschutzmittelrückstände“ [2] erstellt, in der Ergebnisse von Untersuchungsämtern zusammengefasst werden, die an frischem und gefrorenem Obst und an Gemüse, an Getreide und an Kleinkindernahrung durchgeführt wurden. Eingeschlossen sind dabei auch die Ergebnisse des koordinierten Überwachungsprogramms der Europäischen Gemeinschaft [3,4]. Die Überwachungsprogramme sollen eine Abschätzung der Pestizidexposition der Bevölkerung in der Europäischen Union ermöglichen. Hierzu werden die Laborergebnisse in Bezug auf unterschiedliche Fragestellungen betrachtet: Lebensmittelbezogene Betrachtungen, Obst und Gemüse mit den wenigsten Beanstandungen, Obst und Gemüse mit den meisten Beanstandungen, Betrachtung von Produkten aus dem Ausland, Wirkstoffbezogene Betrachtung, Gesamtübersicht über die untersuchten Wirkstoffe, Wirkstoffe mit den häufigsten Höchstmengenüberschreitungen, Auftreten von Mehrfachrückständen sowie Betrachtung der Lebensmittel mit den meisten Mehrfachrückständen [2].

Weiterhin werden im Rahmen privatwirtschaftlich gesteuerter Überwachungsprogramme die ermittelten Ergebnisse von Pflanzenschutzmittel-Rückstandsbefunden (in Lebensmitteln) in Datenbanken zusammengestellt und entsprechend ausgewertet. Beispiele hierfür sind z.B. die Monitoringdatenbank des Lebensmittel-Discounters „Lidl“ [5] sowie die Rückstandsdatenbank der QS Fachgesellschaft Obst-Gemüse-Kartoffeln GmbH [5]. Die Auswertung der Analysedaten dient der Überwachung der Qualität und Sicherheit der Lebensmittel, die von den Lebensmittelunternehmen in den Verkehr gebracht werden. Darüber hinaus sollen mögliche Risiken rechtzeitig erkannt und minimiert werden. Der Respekt vor Imageschäden, verursacht durch Studien seitens der Verbraucherschützer, fördert schließlich das starke Bedürfnis des Lebensmitteleinzelhandels (LEH) und des Lebensmittel-Discounts nach sicheren Lebensmitteln [6].

Insofern können die aus Laborergebnissen abgeleiteten möglichen Maßnahmen zu gravierenden wirtschaftlichen Folgen bei den betroffenen Organisationen führen:

So stellte z.B. das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Stuttgart „Isophenphos Methyl“ in spanischer Paprika fest und entdeckte damit die illegale Anwendung dieses in der EU unerlaubten Wirkstoffes [7]. Eine verstärkte Überwachung spanischer Paprika / Paprikaerzeugnisse sowie der Rückgang der Abnahme dieser Produkte durch den LEH waren die Folge.

Veröffentlichungen der Verbraucher- und Umweltschutzorganisation „Greenpeace“ über Pestizid-Rückstandsgehalte in Obst- und Gemüseerzeugnissen des Discounters „Lidl“ [8] hatten Imageverluste des Unternehmens zur Folge und resultierten in deutlichen Änderungen hinsichtlich der qualitätssichernden Maßnahmen bei Lidl.

Daher ist es unerlässlich, dass die Akteure in der Rückstandsanalytik ein Höchstmaß an Sorgfalt und Integrität in Bezug auf die Qualität der gelieferten Ergebnisse walten lassen, die das Vertrauen in die Arbeit der Analytiker rechtfertigen. Die in der Pestizidanalytik vielfach eingesetzten Multimethoden spielen hierbei eine zentrale Rolle aufgrund ihrer Robustheit und Validität. Bis Ende der 90-er Jahre wurden die Multimethoden durch gaschromatographische (GC) Trennverfahren, gekoppelt mit selektiven Detektoren, charakterisiert:

Der Elektroneneinfangdetektor (Electron Capture Detector, ECD) eignet sich für die Detektion halogener Pestizide wie z.B. DDT und Lindan. Der Detektor reagiert selektiv auf elektronegative Verbindungen, besonders auf chlorierte, fluorierte oder bromierte Moleküle. Somit können mit dem Modul GC-ECD die Organochlorpestizide im Rahmen einer Multimethode analytisch erfasst werden. Auch Pyrethroide sind mit dem GC-ECD Verfahren trenn- und detektierbar. Der flammenphotometrische Detektor (Flame Photometric Detector, FPD), der im Aufbau dem Flammenionisationsdetektor (Flame Ionisation Detector FID) entspricht, reagiert auf die Wellenlänge der durch die Flamme emittierten Strahlung, wenn die entsprechende Pestizidverbindung in der Detektorkammer verbrannt wird. So können Organophosphorpestizide (z.B. Dichlorphos und Omethoat) selektiv erfasst werden, wenn der Filter auf eine geeignete Wellenlänge (z.B. $\lambda=526$ nm) eingestellt ist. Schließlich kommt die Kopplung der gaschromatographischen Trennung mit massenselektiven Detektoren (MSD) insbesondere bei der Analytik von stickstoffhaltigen Pestiziden (z.B. Chlorpropham und Imazalil) zum Einsatz.

In den letzten Jahren wurden durch die Entwicklung und Veröffentlichung neuer Pestizid-Multimethoden (Amtliche Analysenverfahren für Rückstände von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln in Lebensmitteln nach §64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB), L-00.00-113 [9] und L-00.00-115 [10]) weitreichende Möglichkeiten

geschaffen, um eine Vielzahl bisher nicht oder nur mit großem Aufwand analysierbare Wirkstoffe innerhalb eines analytischen Trennungsganges erfassen und bestimmen zu können. Gaschromatographische sowie flüssigkeitschromatographische Trennverfahren gekoppelt mit massenspektrometrischen Detektoren – auch multidimensional (MS/MS) – sind seither verstärkt im Einsatz im Rahmen „neuerer“ Multimethoden. Diese Entwicklungen haben gleichzeitig den Wunsch der „Abnehmer“ (=Laborkunden) dieser analytischen Dienstleistungen nach immer schnellerer und kostengünstigerer Analytik verstärkt und beschleunigt. Nicht zuletzt aus diesem Grund hat die Zahl an diesbezüglichen Veröffentlichungen und firmenbezogenen Darstellungen stark zugenommen.

Die Glaubwürdigkeit und analytische Kompetenz von Prüflaboratorien soll durch die Akkreditierung nach der Norm ISO/IEC 17025:2005 – Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien” [11] – sichergestellt werden.

Die erste Ausgabe (1999) dieser Internationalen Norm ist das Ergebnis der Erfahrungen mit der Umsetzung von ISO/IEC Guide 25 und EN 45001. Beide wurden durch die ISO / IEC 17025:2005 ersetzt. Sie enthält alle Anforderungen, die Prüf- und Kalibrierlaboratorien erfüllen müssen, wenn sie nachweisen wollen, dass sie ein Managementsystem betreiben sowie technisch kompetent und fähig sind, robuste und valide Analysenergebnisse zu erzielen. Akkreditierungsstellen, die die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien anhand der Prüfkriterien der Norm begutachten, nutzen diese Internationale Norm als Grundlage für Ihre Akkreditierungsverfahren.

Die internationalen Akkreditierungsverbände ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) und IAF (International Accreditation Forum) haben zusammen mit der internationalen Normungsorganisation ISO im Juni 2005 ein Kommuniqué unterzeichnet. Darin wird zum Ausdruck gebracht, dass eine Akkreditierung nach ISO/IEC 17025 sowohl die Anforderungen an die technische Kompetenz des Laboratoriums als auch Anforderungen an sein Qualitätsmanagementsystem umfasst, das hinsichtlich der Prüf- und Kalibriertätigkeiten gleichzeitig den Grundsätzen der ISO 9001:2000 entspricht. Der Abschnitt 4 der Norm ISO / IEC 17025:2005 legt die Anforderungen für ein solides Management fest. Abschnitt 5 beschreibt die Anforderungen zum Nachweis der technischen Kompetenz für die Art von Prüfungen bzw. Kalibrierungen, die das Laboratorium durchführt.

Die Akzeptanz von Prüf- oder Kalibrierergebnissen zwischen Staaten soll erleichtert werden, wenn Laboratorien dieser Internationalen Norm entsprechen und von Stellen akkreditiert sind,

die gegenseitigen Anerkennungsvereinbarungen mit gleichwertigen Stellen in anderen Staaten getroffen haben, welche ebenfalls diese Internationale Norm anwenden.

Der theoretische Zweck der ISO-Norm 17025 besteht auch darin, die Kooperation zwischen Laboratorien und anderen Stellen (z.B. Laborkunden) zu erleichtern sowie den Austausch von Informationen und Erfahrungen und die Harmonisierung von Normen und Verfahren zu fördern.

Schließlich soll die Einhaltung der Anforderungen der ISO-Norm 17025 eine Garantie darauf geben, dass ein Labor technisch kompetent und fähig ist, fachlich fundierte Ergebnisse zu erzielen [11].

Bislang gabe es in Deutschland mehrere staatliche und privatwirtschaftliche Akkreditierungsstellen für verschiedene Tätigkeitsbereiche. Mit der Gründung der Deutschen Akkreditierungsstelle GmbH (DAkkS) werden nun die Aufgaben dieser Akkreditierungsstellen in einer neuen Struktur gebündelt. Die EU-Verordnung (EG) Nr. 765/2008 [12] fordert seit 01.01.2010 für jedes EU-Mitgliedsland eine Nationale Akkreditierungsstelle, weshalb es in diesem Bereich Umstrukturierungen gegeben hat. Grundsätzlich verfolgt die DAkkS das Ziel, bestehende Fachkompetenzen von Akkreditierungsstellen zu nutzen, da diese Kompetenzen bereits in den derzeit bestehenden Akkreditierungs- und Anerkennungsstellen vorhanden sind. Deshalb sind in dieser GmbH u.a. die bisherigen Akkreditierungsstellen DACH (Deutsche Akkreditierungsstelle Chemie) und DAP (Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen) aufgegangen, die in der Vergangenheit insbesondere im sektorspezifischen Bereich der Akkreditierung von Pestizidrückstandslaboratorien tätig gewesen sind. Staatliche Akkreditierungsstellen wie die AKS (Staatliche Akkreditierungsstelle Hannover) sowie die SAL (Staatliche Anerkennungsstelle der Lebensmittelüberwachung Hessen), die ebenfalls im Bereich der Akkreditierung von Pestizidrückstandslaboratorien tätig sind, werden durch die DAkkS mit der Begutachtung und Überwachung beauftragt, um Akkreditierungen wie auch Anerkennungen/Notifizierung in Abstimmung mit diesen Stellen vornehmen zu können.

Als Anforderungsprofil für die Überprüfung der Einhaltung der ISO-Norm 17025 werden deshalb (aufgrund der Umstrukturierung) die Kataloge der „verschmolzenen“ Organisationen DACH sowie DAP (ggf. AKS / SAL) herangezogen. Prüfkriterien, die von den Akkreditierungsstellen im Rahmen (angekündigter) Laboraudits kontrolliert werden, sind z.B. die sorgfältige und umfassende Validierung [13] bzw. Verifizierung [14] der verwendeten Methoden und Substrat-/Analyt-Kombinationen.

Weiterhin ist die Aufnahme von Wirkstoffen in den Analysenumfang von Multi- oder Gruppenmethoden nur nach vorheriger umfassender Validierung der relevanten Wirkstoff-/ Substrat-Kombinationen unter Berücksichtigung einzuhaltender Verfahrenskenngrößen vorgesehen, wie z.B. Präzision (Standardabweichungen), Richtigkeit (Wiederfindungsrate), Robustheit (Wiederholbarkeit anhand von Resultaten aus Regelkarten), Bestimmungsgrenzen sowie Messunsicherheit [13].

Schließlich ist die regelmäßige Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen (LVU), Ringversuchen (RV), Einzeleignungsprüfungen und Eignungsprüfungssystemen (EPS) im Rahmen der normativen Vorgaben in ausreichendem Umfang verpflichtend [15] und während des Akkreditierungsaudits zu überprüfen.

Dieses komplexe und umfassende Anforderungsprofil zur Erlangung einer Akkreditierung nach ISO 17025 sollte bei konsequenter Umsetzung und Einhaltung der akkreditierten Laboratorien ein sicherer Garant für die Zuverlässigkeit der Analysenergebnisse sein. Sowohl die Ergebnisse von Laborvergleichsuntersuchungen, die von Ringversuchsanbietern wie z.B. dem Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) [16] angeboten und ausgewertet werden, als auch die Ergebnisse von Kompetenztests, die von privatwirtschaftlichen Organisationen durchgeführt werden (z.B. das Labor-Zulassungssystem nach den Anforderungskriterien der QS Fachgesellschaft Obst Gemüse Kartoffeln GmbH) [17]), haben jedoch aufgezeigt, dass es signifikante Unterschiede hinsichtlich der analytischen Laborkompetenz gibt, obwohl alle Prüflabore über eine Akkreditierung nach ISO 17025 verfügen. Der prozentuale Anteil an Laboratorien, die die angelegten Prüfkriterien der Testausrichter nicht einhalten, liegt teilweise bei 50 – 80 %. Weiterhin stellen die Labore eine steigende Anzahl von Gegenanalysen fest, die von verunsicherten Laborkunden zur Absicherung in Auftrag gegeben werden.

Die Verunsicherung der Laborkunden (aus den Bereichen LEH/Discount) äußert sich auch in dem Wunsch nach Testinstrumenten, die über das Design aktueller Laborvergleichsuntersuchungen hinausgehen und dabei insbesondere Aspekte der Laborkompetenz unter Routinebedingungen abprüfen sollen.

Designs üblicher Laborvergleichsuntersuchungen sehen vor, dass die Laborteilnehmer über den Versand der Testprobe vorab (mittelfristig) informiert werden, dass bei Bedarf auch Blank Material (die entsprechende Probenmatrix ohne zugesetzte Pestizide) von dem Ringversuchsveranstalter zur Verfügung gestellt wird, dass der Umfang der zu analysierenden

Pestizide bekannt gegeben wird und dass die zur Verfügung gestellte Analysezeit mindestens eine Arbeitswoche oder sogar mehrere Wochen beträgt. Routineproben hingegen durchlaufen ein anderes Procedere, da sie in der Regel nicht vorab angekündigt werden, der Umfang der zu prüfenden Pestizide nicht bekannt ist (da der Laborkunde ja gerade von dem Labor wissen möchte, welche Pestizide in der Probe enthalten sind) und die Analysezeit immer kürzer wird (24-Stunden-Analytik). Darüber hinaus werden Ringversuchsproben in der Regel mit einer anderen Sorgfalt abgesichert als Routineproben, da dem teilnehmenden Labor bekannt ist, dass die Analytik durch eine Ringversuchsprobe getestet wird und ein unbefriedigendes Ergebnis ggf. Rechtfertigungen (z.B. gegenüber Kunden, Akkreditierern etc.) nach sich zieht.

Die Art der Auswertung von Laborvergleichsuntersuchungen hinsichtlich ihrer Aussagekraft für die Laborkunden wird ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit kritisch hinterfragt. Ein bekanntes Modell zur Auswertung von Laborvergleichsuntersuchungen ist das z-score Modell [18]. Das z-score Modell vergleicht Analysenergebnisse hinsichtlich der berichteten Gehalte/Konzentrationen. Bei diesem Berechnungsverfahren wird ein Mittelwert („assigned value“) bestimmt, der den statistischen Durchschnittswert der Ergebnisse aller Teilnehmer darstellt. Sofern Laborteilnehmer auffällige und stark abweichende Ergebnisse oder keine Ergebnisse berichten, werden diese bei der Ermittlung des statistischen Mittelwertes nicht berücksichtigt. Weicht ein Labor von vorab definierten Grenzen zum Mittelwert ab, so wird das Laborergebnis als nicht befriedigend beurteilt. Ein etabliertes Verfahren zur Festlegung der Abweichungsgrenze ist die zweifache Zielstandardabweichung nach Horwitz ($\hat{\sigma}$) [19] – die unter Berücksichtigung des Mittelwertes errechnet wird. Die Standardabweichung nach Horwitz beträgt im Konzentrationsbereich von 10ppb bis 1ppm ca. 18–22% des Mittelwertes und ist von der jeweiligen Analytkonzentration abhängig. Wird der Mittelwert unter Berücksichtigung der zweifachen Abweichung nach oben bzw. nach unten (assigned value $\pm 2 \times \hat{\sigma}$) über- bzw. unterschritten, dann wird das Laborergebnis als nicht zufriedenstellend bewertet.

Ein weiteres Verfahren zur Auswertung von Laborvergleichsuntersuchungen ist die Fit-For-Purpose Relative Standard Deviation (FFP RSD). Hierbei wird eine Abweichung von $\pm 25\%$ vom Median zugelassen. Überschreitungen dieser Grenzen (nach oben oder unten) führen zu einer Abwertung des Ergebnisses.

Eigen ist diesen Bewertungssystemen, dass das individuelle Laborergebnis mit einem Durchschnittswert aller Teilnehmer verglichen wird. Haben die Teilnehmer jedoch im Durchschnitt unbefriedigende Ergebnisse berichtet (z.B. stark abweichende Gehalte im

Vergleich zur tatsächlich zugesetzten Menge des Wirkstoffes), dann werden u.a. Laborergebnisse als nicht zufriedenstellend bewertet, die nahe am tatsächlich zugesetzten Wert liegen, aber zu stark vom statistischen Durchschnittswert abweichen.

Darüber hinaus werden bei Realproben (nicht Ringversuchsproben) die Analysenergebnisse der jeweiligen Labore von den Laborkunden isoliert betrachtet – und nicht im Vergleich zu einem Mittelwert, so dass Ringversuche und deren Auswertung für die Laborkunden nur wenig Aussagekraft haben.

Falsch-positive sowie falsch-negative Analysenergebnisse werden zwar in Auswertungen von Ringversuchen aufgeführt, haben jedoch keine Konsequenz im Sinne einer Sanktion zur Folge (z.B. Verlust der Akkreditierung). Für die Laborkunden kann ein falsch-positives Ergebnis jedoch zu einer Sperrung der betroffenen Ware oder sogar zu einem Rückruf führen, was möglicherweise erheblichen wirtschaftlichen Schaden für den Kunden bedeutet. Ein falsch-negatives Ergebnis kann zur Folge haben, dass Risiken nicht rechtzeitig erkannt werden oder zu spät in der Verarbeitungskette aufgedeckt werden.

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit dem analytischen Kompromiss etablierter Multimetoden für die Analytik von Pestiziden in Obst- und Gemüseerzeugnissen auseinander und setzt diese in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Anforderungen/Eignungen der Beurteilung von rückstandsanalytischen Laborkompetenzen. Die Arbeit hat zum Ziel, etablierte Systeme zur Prüfung der Laborkompetenz zu evaluieren, Optimierungsansätze aufzuzeigen und diese neuen Ansätze in der Laborroutine zu überprüfen und weiterzuentwickeln.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Validität und Zuverlässigkeit von Laborergebnissen im Routinebetrieb der Rückstandslaboratorien, die Schnelligkeit der Analytik (z.B. 24-Stunden-Analytik) sowie das vorgebliche umfassende Wirkungsspektrum stehen oft im Widerspruch zu der notwendigen analytischen Sorgfalt, welche sich u.a. durch eine umfangreiche Extraktreinigung und eine sehr sorgfältige Auswahl der instrumentell-analytischen Messbedingungen definiert.

Nicht zuletzt müssen besondere stoffspezifische Eigenschaften der zu analysierenden Wirkstoffe berücksichtigt werden, um die im Rahmen einer Multimethode immer einzugehenden Kompromisse einschätzen und abwägen zu können. Dies betrifft sowohl das Verhalten dieser Analyten während der Extraktion und Aufreinigung als auch bei der chromatographischen und (in der Regel) massenspektrometrischen Detektion und Quantifizierung („Matrix-Effekt“) [20, 21, 22]. Ein Methodenvergleich etablierter Multimethoden (QuEChERS-, BfR- und DFG S 19-Methode [9,10,57]) wird vorgenommen, um den analytischen Kompromiss der Multimethoden aufzuzeigen und um die daraus gewonnenen Erkenntnisse in einen Zusammenhang mit bestehenden Beurteilungskriterien der analytischen Kompetenz zu setzen. Weiterhin werden Methodenringversuche an Einzelwirkstoffen (Ethephon, Chlormequat und Mepiquat) durchgeführt und ausgewertet. Da bei der Einzelwirkstoffanalytik kein analytischer Kompromiss wie bei den Multimethoden einzugehen ist, soll herausgearbeitet werden, inwieweit unterschiedliche Methoden zu richtigen Ergebnissen führen können, wenn sie sich auf eine einzige analytische Fragestellung (Einzelwirkstoff) konzentrieren.

Sowohl durch eine Schwachstellenanalyse bestehender Normen und Prüfsysteme wie

- den Akkreditierungsanforderungen nach ISO 17025 und
- etablierter Laborvergleichsuntersuchungs-Programme wie u.a. FAPAS, Bipea (Bureau InterProfessionnel d'Etude Analytique) und anderen

als auch durch das Aufgreifen aktueller Diskussionen hinsichtlich der Beurteilung von Laborkompetenzen (z.B. das Labor-Zulassungssystem nach den Anforderungskriterien der QS Fachgesellschaft Obst Gemüse Kartoffeln GmbH) werden Optimierungsansätze hinsichtlich der Laborkompetenzbewertung identifiziert und entwickelt.

Diese Ansätze werden in Form von weiterentwickelten Prüfelementen, die die Erkenntnisse der Schwachstellenanalyse und die Aspekte der aktuellen Diskussionen berücksichtigen, experimentell umgesetzt und anschließend ausgewertet. Zentraler Aspekt ist hierbei die Aussagekraft der Prüfergebnisse in Bezug auf die Laborkompetenz unter Real- bzw. Routinebedingungen. Methodische Aspekte, die Einflüsse auf die Laborleistung ausüben und die

Qualität der Analysenergebnisse tangieren, werden darüber hinaus in der Laborpraxis geprüft und bei der Beurteilung der Laborkompetenz berücksichtigt. Insbesondere im Bereich der Pestizidrückstandsanalytik sind zahlreiche Matrix-Wirkstoff-Kombinationen, die im Rahmen von Multimethoden analysiert werden, nicht durch entsprechende Validierungen abgesichert, so dass der methodisch-analytische Einfluss unterschätzt wird. Dies führt auch zu widersprüchlichen Ergebnissen insbesondere bei Gegenproben, da z.B. matrixvalidierte Befunde im Rahmen von Multimethoden basierend auf gaschromatographischen Modulen (GC-MS(MS)) oder auf flüssigkeitschromatographischen LC-MS/MS-Modulen zu signifikant unterschiedlichen Werten führen können als Befunde, denen eine Validierung der vermessenen Proben gegen einen externen (Lösungsmittel-)Standard zugrunde liegt. Konkret werden Laborkompetenztests unter Berücksichtigung neuer und weiterentwickelter Aspekte durchgeführt:

- Erstellung des Designs des Testmaterials (Auswahl der zu testenden Matrix, sowie Auswahl der Anzahl und Art der Wirkstoffe sowie deren Konzentrationsbereiche) unter Berücksichtigung der analytischen Herausforderungen, bedingt durch die chemisch-physikalischen Matrix-/Wirkstoff-Eigenschaften;
- Überprüfung möglicher Fehlerquellen bei der Testmaterialherstellung in der Praxis: Einflüsse der Temperatur durch Hitze / Kälte (Trockeneis) während der Homogenisierung, Einfluss der entsprechenden Homogenisierungsleistung und -ausstattung;
- Überprüfung des Testmaterials auf Homogenität (Homogenitätstest mit statistischer Auswertung und Beurteilung) und Stabilität;
- Überprüfung methodischer Einflüsse auf die Analysenergebnisse sowie die Routine-tauglichkeit der Analytik im Rahmen der experimentellen Laborpraxis dieser Arbeit;
- Verschickung des erstellten, homogenisierten Testmaterials an die zu testenden Labore; hierbei wird das für den oben genannten Methodenvergleich hergestellte und auf Homogenität überprüfte Testmaterial „verdeckt“ (aufgemacht als Routineprobe und somit nicht als Testprobe) an 19 internationale Labore verschickt.
- Statistische Auswertung der von den verdeckt getesteten Laboratorien berichteten Analysenergebnisse (z-score-Ermittlung, Bestimmung der sog. „assigned values“, Standardabweichungen, Berücksichtigungen von Wiederfindungsraten und anderen Verfahrenskenngrößen etc.);
- Zusammenstellung und Auswertung der Ergebnisse sowie der Methodendetails (u.a. zur Proben-Aufbereitung, zu verwendeten Säulen, Eluenten, Ionenübergängen);

- Abgleich der angewendeten Methoden, Identifizierung von Abweichungen, Herausarbeiten von Zusammenhängen zwischen Methodik und berichtetem Ergebniswert;
- Beurteilung der Kompetenz der Teilnehmer unter methodischen und statistischen Aspekten sowie unter Berücksichtigung der Richtigkeit der berichteten Ergebnisse (Wiederfindung des tatsächlich dotierten Gehaltes).

Somit ist die vorliegende Arbeit darauf ausgerichtet, die bisher etablierten Prüfsysteme zur Beurteilung von Laborkompetenzen kritisch zu hinterfragen. Insbesondere wird die Aussagekraft der Prüfsysteme für die Bewertung der Laborkompetenz im Laborroutinebetrieb anhand experimenteller Daten überprüft. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse werden für die Etablierung neu entwickelter Prüfelemente herangezogen, die im Rahmen dieser Arbeit in der Laborroutine geprüft und beurteilt werden.

Ziel ist somit die Entwicklung eines Systems zur optimierten Laborkompetenz-Bewertung und damit einhergehend eine transparent-kommunizierbare Darstellung der tatsächlichen Laborkompetenz, was nachhaltiges Vertrauen und Glaubwürdigkeit schafft:



Abb. 1: Problemstellung und Zielsetzung

3 Theoretische Grundlagen

Der theoretische Teil der vorliegenden Arbeit fokussiert sich auf die analytischen Herausforderungen der Pflanzenschutzmittelrückstandsanalytik von Lebensmitteln.

Bei dieser Analytik kommen insbesondere die so genannten Multimethoden zur Anwendung, die dadurch charakterisiert sind, dass sie mehrere hundert Pestizide im Rahmen eines analytischen Trennungsganges erfassen können. Die Wirkstoffe werden im weiteren Verlauf des methodischen Verfahrens heute in der Regel durch massenspektrometrische Detektion (MS) identifiziert und quantifiziert. Pestizide, die sich im Rahmen dieser Multimethoden schwer oder gar nicht erfassen lassen, müssen durch andere Analyseverfahren bestimmt werden [23,24]. Hierzu zählen z.B. die so genannten „Gruppen“-Methoden, bei denen jeweils eine Gruppe von Pflanzenschutzmitteln mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften in einem Analyselauf erfasst werden können. Die jeweiligen „Gruppen“ umfassen hierbei etwa 5 bis 20 Wirkstoffe. Sind die Pestizide aufgrund ihrer individuellen (physikalisch-chemischen) Eigenschaften nicht im Rahmen von Multi- oder Gruppenmethoden erfassbar, so ist für jeden dieser Pestizid-Wirkstoffe eine entsprechende Einzelmethode heranzuziehen, die darauf ausgerichtet ist, nur diesen einen Wirkstoff erfassen und quantitativ bestimmen zu können:

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Multi-, Gruppen- und Einzelmethode (beispielhaft)

	Multi- methode	Gruppen- methode	Einzel- methode
Name der Methode	L-00.00-34 (DFG S 19)	Rückstände ausgewählter Herbizide in Lebensmitteln nach alkalischer Hydrolyse mit Hilfe der GC/MS	Gaschromatogra- phische Bestimmung von Ethephon
Analysenumfang	200 – 300 Wirkstoffe	Phenylharnstoffgruppe (6 Wirkstoffe)	1 Wirkstoff
Auswahl der durch die Methode erfass- baren Wirkstoffe	Wirkstoffe z.B. aus den Gruppen der Or- ganochlorpestizide, Organophosphor- säureester, stickstoff- haltiger Pestizide u.a.	Diuron, Linuron, Neburon (über 3,4-Dichloranilin); Procymidon, Vinclozolin, Iprodion (über 3,5-Dichlor- anilin), Isoproturon (über 4- Isopropylanilin)	Ethephon

Sowohl die Vielfalt der chemisch-physikalischen Eigenschaften der Pflanzenschutzmittelrückstände selbst, als auch der individuelle Einfluss der untersuchten Lebensmittelmatrices (z.B. saures Obst, trockenes Getreide, zuckerreiche Trockenfrüchte, Gewürze mit hohem Anteil an ätherischen Ölen) auf das Ergebnis der Analytik sind die Ursache für die Komplexität und damit einhergehend die analytischen Kompromisse der Multimethoden.

3.1 Pflanzenschutzmittel: Definitionen, Historie und Anwendungen

Wenngleich Lebensmittel landwirtschaftlichen Ursprungs seit vielen Jahrtausenden für die menschliche Nahrung kultiviert werden, hat die Sicherstellung der entsprechenden Erntemengen seit der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts stark an Bedeutung gewonnen [25]. Monokulturen haben zugenommen, so dass die auf immer größeren Flächen angebauten Kulturen anfälliger wurden für Insektenfraß, Schimmelbefall und andere Gefahren (z.B. Konkurrenz mit Unkräutern). Gleichzeitig entwickelte die Pflanzenschutzmittel-Industrie chemisch-synthetische Wirkstoffe, welche als so genannte Pflanzenschutzmittel gegen diese Gefahren großflächig und wirkungsvoll zum Einsatz gekommen sind. Über diese Pflanzen- und Schädlingsbekämpfungsmittel (PSM) - im Allgemeinen auch Pestizide genannt - handelt dieser Abschnitt.

Der Ausdruck Pestizide (pest (engl.) = Schädling) dient als Oberbegriff für sämtliche Mittel bzw. Wirkstoffe, die als Schädlingsbekämpfungsmittel zum Einsatz kommen. Die Wirkung von Pflanzenschutzmitteln auf Organismen kommt vor allem durch deren Einfluss auf die Energiegewinnung, die Biosynthese, das Wachstum und das Nervensystem zum Ausdruck [26].

Je nach Verwendungszweck unterscheidet man folgende Pestizid-Gruppen (Auswahl) [27]:

Tabelle 2: Pestizidgruppen nach Verwendungszweck.

Gruppe	Aktion gegen	Beispiele
Akarizide	Milben	Carbamate, Pyrethroide
Fungizide	Pilze	Dithiocarbamate, Benzimidazole
Herbizide	Unkräuter, Gräser	Harnstoffderivate, Phenoxyalkancarbonsäurem
Insektizide	Insekten	Organochlorpestizide, Organophosphorpestizide
Molluscizide	Schnecken	Metaldehyd, Methiocarb
Nematizide	Würmer (Nematoden)	Carbamate, Organophosphorpestizide
Rodentizide	Nagetiere	Cumarinderivate
Synergisten	Verstärker/Aktivatoren	Piperonylbutoxid (PBO)
Wachstums-Regulatoren	zu starken Wuchs	Chlormequat, Ethephon
Keim-Hemmer	Keimung	Chlorpropham, Propham

Weitere Gruppen bilden darüber hinaus die Algizide (Mittel gegen Algenbewuchs „Anti-Fouling-Mittel“), Bodenentwesungsmittel (z.B. Methylbromid) sowie Aphizide (Mittel gegen Blattläuse) [28, 29].

Die ältesten Pflanzenschutzmittel stammen aus der so genannten Chlorchemie (Industriezweig, der sich mit der Gewinnung von Chlor aus Natriumchlorid sowie der Chlor-Verarbeitung befasst [30]). Die bekanntesten Pflanzenschutzmittel auf Chlorbasis werden gegen Insektenbefall eingesetzt – daher auch der Name „Organochlorinsektizide“.

Überschüssiges Chlor, welches bei der Herstellung von Natronlauge aus Kochsalz anfiel, wurde erstmals im ersten Weltkrieg als chemischer Kampfstoff verwendet [31]. Die Entdeckung der insektiziden Wirkung der Chlorkohlenwasserstoffe erfolgte während des Zweiten Weltkrieges, als nach damaliger Auffassung eine verhältnismäßig kostengünstige und einfache vollsynthetische Herstellung eines wenig toxischen und breit wirksamen Insektizides gelungen [32] war, mit dessen Hilfe das giftige Arsen im Pflanzenschutz ersetzt werden konnte [33]. Der tatsächliche Beginn des „modernen Pflanzenschutzes“ erfolgte 1939, als die insektiziden Eigenschaften des DDT durch PAUL MÜLLER [34, 35] entdeckt wurden. Nach dem 2. Weltkrieg begann das „Zeitalter der chemischen Schädlingsbekämpfung“ in welchem der Einsatz chemisch-synthetischer Pflanzenschutzmittel deutlich anstieg. Im Laufe der Zeit erwiesen sich allerdings einige Chlorkohlenwasserstoffe als stabil und schwer abbaubar und somit persistent in der Umwelt. Die Langzeiteffekte waren nicht absehbar. Weiterhin wirkten die Organochlorpestizide toxisch auf die gewollten Nützlinge in der Landwirtschaft [36]. Ebenso wurden Resistenzen der Schädlinge gegenüber der Organochlorpestizide beobachtet. Aus diesen Gründen wurde der Einsatz von Organochlorpestiziden reduziert, sobald andere Wirkstoffe mit vergleichbarer Effektivität verfügbar waren [32]. In der frühen Nachkriegszeit wurden somit Organophosphorverbindungen als chemisch-synthetische Pflanzenschutzmittel entwickelt [37]; zwischen 1950 und 1960 trat eine zweite Generation organophosphatischer Insektizide in Erscheinung, wie z.B. die Phosphorthionate Malathion und Parathion. Sie sind selektiver und wirken weniger toxisch auf höhere Lebewesen im Vergleich zu den ursprünglichen Organophosphorverbindungen [32]. 1956 kamen insektizide Carbamate (wie z.B. Carbaryl, Methomyl, Aldicarb) zum Einsatz. 1975 folgten synthetische Pyrethroide (z.B. Cypermethrin und Deltamethrin) sowie Benzoylharnstoffe (z.B. Diflubenzuron, Flufenoxuron, Lufenuron sowie Triflumuron [37]).

Einen großen Anteil am Pflanzenschutzmittel-Weltumsatz hatten bis Ende der 80-er Jahre die sechs Länder USA, Bundesrepublik Deutschland, Schweiz, Großbritannien, Japan und Frankreich [36]. Während die Insektizide über viele Jahre die umsatzstärksten Pflanzenschutzmittel darstellten, überwiegt seit Anfang der 90-er Jahre der Anteil der Herbizide mit über 40 % am Weltmarkt [35, 36].

Diese Entwicklung ist auch in der Bundesrepublik zu erkennen:

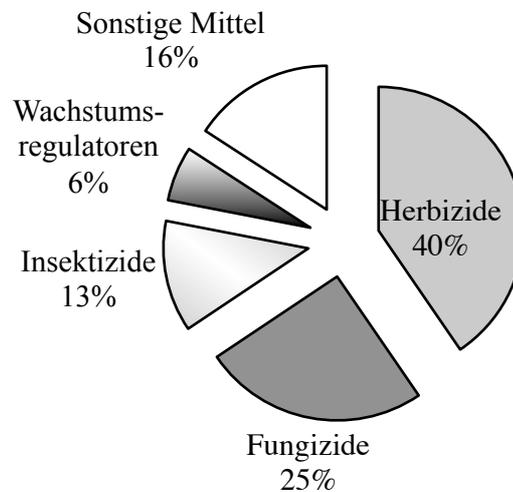


Abb. 2: Marktanteile der verschiedenen Pestizidgruppen in der Bundesrepublik Deutschland: Inlandsabgabe an Wirkstoffen im Jahr 2009 [38].

Die Suche nach neuen Wirkstoffen ist nicht abgeschlossen, zumal die Entwicklung von Resistenzen neue Wirkstoffe erfordert. Aufgrund der zunehmenden ökologisch-chemischen und hygienisch-toxikologischen Anforderungen an die Pflanzenschutzmittel geht die Forschung nach neuen Prinziplösungen der Insektenbekämpfung in Richtung z.B. des Einsatzes biologischer Bekämpfungsmethoden [39]: Pheromone zur Anlockung von Insekten; Repellents zu deren Abschreckung; Insektenhormone zur Metamorphosebeeinflussung; Bakterien-, Pilze oder Viren zur spezifischen und umweltfreundlichen Schadinsektenbekämpfung.

Die Etablierung des biologischen Anbaus in den 80-er / 90-er Jahren und damit die Schaffung der Möglichkeit, landwirtschaftlich erzeugte (Bio-)Lebensmittel auch ohne den Einsatz chemisch-synthetischer Pflanzenschutzmittel erzeugen zu können, haben ebenfalls den Einsatz von Pestiziden zunehmend in Frage gestellt [40]. Die allgemein kritische Verbraucherauffassung hinsichtlich toxikologischer Langzeit- und Kombinationseffekten von Pestiziden stellen überdies den Einsatz der Pflanzenschutzmittel wiederholt zur Diskussion [41]. Schließlich haben Verbraucherschutzorganisationen (wie z.B. Greenpeace) mit ihren Kampagnen zu einer verstärkten Verbrauchersensibilisierung beigetragen. Der LEH hat entsprechend auf diese Entwicklungen reagiert, indem die jeweiligen Handelshäuser (z.B. Lidl, Aldi, Edeka etc.) für die von ihnen bezogenen Lebensmittel Qualitätsprofile (Produktpässe / Spezifikationen) einfordern, die über die lebensmittelrechtlichen Anforderungen hinausgehen und strenger gefasst sind.

3.2 Pflanzenschutzmittel: Zulassung, öffentliche Überwachung und privat-wirtschaftliche Kontrolle (LEH)

3.2.1 Zulassungsverfahren

Am 24.11.2009 wurde die Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln im Amtsblatt veröffentlicht [42]. Die Verordnung ersetzt die bislang geltende Richtlinie 91/414/EWG über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln [43]. Wirkstoffe dürfen demzufolge zukünftig nur noch zugelassen werden, wenn sie für den Menschen keine krebserzeugende, erbgutschädigende, die Fortpflanzung schädigende oder hormonell schädigende Wirkung haben. Im Hinblick auf die Umwelt werden folgende Ausschlusskriterien festgelegt:

- keine Einstufung als persistente organische Schadstoffe (POP),
- nicht persistent, bioakkumulierbar und toxisch (PBT),
- keine Einstufung als sehr persistente und sehr bioakkumulierbare Stoffe (vPvB),
- keine hormonell schädigende Wirkung auf Nicht-Zielorganismen.

Die EU bleibt weiterhin für die Bewertung von Wirkstoffen und die Festsetzung von Rückstandshöchstgehalten zuständig, während die Zulassung der Pflanzenschutzmittel und deren Anwendungen (wie bisher) in die Zuständigkeit der Mitgliedstaaten fallen. Die Zulassung von Wirkstoffen wird auf maximal 10 Jahre begrenzt. Verlängerungen sind bis höchstens 15 Jahre möglich. Die Verordnung trat am 14. Dezember 2009 in Kraft und gilt ab dem 14. Juni 2011.

Anhand der aufgeführten Zulassungskriterien für Pestizide ist festzuhalten, dass diese aufgrund ihrer toxikologischen Eigenschaften zugelassen bzw. abgelehnt werden. Dieser Sachverhalt trägt dazu bei, dass die chemisch-physikalischen Eigenschaften weitgehend unberücksichtigt bleiben. Dies führt dazu, dass zur Überwachung von Pestiziden in (diversen) Lebensmitteln eine Vielzahl an chemisch-physikalisch unterschiedlichen Pestiziden zu berücksichtigen ist. Diese Diversität wird durch die individuellen Eigenschaften der Lebensmittel (süß, sauer, alkalisch, wässrig, ölig etc.), die auf Pestizide zu prüfen sind, um ein Vielfaches erhöht [20, 21, 22].

3.2.2 Herleitung und Überwachung von Rückstandshöchstgehalten in Lebensmitteln

In der konventionellen Landwirtschaft sollen Pestizide bewusst und aktiv nach den Regeln der Guten Landwirtschaftlichen Praxis (GLP) eingesetzt werden. Darunter versteht man die Einhaltung der Fachgesetze – wie z.B. die Düngeverordnung, sowie das Bodenschutz- und Pflanzenschutzgesetz. Nach dem Pflanzenschutzgesetz soll beim Einsatz von Pflanzenschutzmitteln ein hohes Schutzniveau für Mensch, Tier und Naturhaushalt garantiert sein. Sofern diese GLP-Regeln eingehalten werden, sollten die Rückstände der dabei eingesetzten Pestizide die in der europäischen Rückstandshöchstgehaltverordnung [44] festgelegten Gehalte nicht überschreiten, zumal die Festsetzung der Rückstandshöchstgehalte dem Minimierungsprinzip folgt, wonach diese Gehalte „so niedrig wie möglich, nicht mehr als für die angestrebte Verwendung nötig und niemals höher als gesundheitlich vertretbar“ festgelegt werden (ALARA-Prinzip: As Low As Reasonably Achievable) [45]. Rückstandshöchstgehalte werden festgesetzt, um den Verbraucher vor möglichen schädlichen Wirkungen von Pflanzenschutzmitteln in oder auf Lebensmitteln zu schützen. Die Festsetzung eines Rückstandshöchstgehaltes orientiert sich allerdings in der Regel nicht an der Menge, die aus gesundheitlicher Sicht noch vertretbar wäre, sondern vielmehr an der Menge, die gemäß guter landwirtschaftlicher Praxis erforderlich ist.

Demgegenüber steht jedoch die Beauftragung des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR, Berlin) durch § 15 des Pflanzenschutzgesetzes [46]. Das BfR ist demnach mit der Bewertung der potentiellen Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf die Gesundheit von Mensch und Tier beauftragt. Voraussetzung für die Zulassung eines Pflanzenschutzmittels ist u. a., dass das Produkt *„bei bestimmungsgemäßer und sachgerechter Anwendung ... keine schädlichen Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch und Tier und auf das Grundwasser hat“*. Grundlage für die gesundheitliche Bewertung sind insbesondere die vom Antragsteller erarbeiteten toxikologischen Untersuchungen, die entsprechend der Richtlinie 91/414/EWG hinreichend sein müssen, um eine Bewertung des Risikos für den Anwender des betreffenden Pflanzenschutzmittels sowie des Risikos für den Verbraucher durch Rückstände in Nahrung und Wasser zu ermöglichen. Die Angaben müssen ausreichen, um den Wirkstoff hinsichtlich der potentiellen Gesundheitsgefahren bewerten und Expositionsgrenzwerte (wie ADI und ARfD – siehe unten) ableiten zu können. Die für die Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln erforderlichen Expositionsgrenzwerte werden in Deutschland und in der EU sowie von internationalen Organisationen (Weltgesundheitsorganisation, WHO) in aller Regel nach dem NOAEL / Sicherheitsfaktor-Konzept abgeleitet. Bei der Ermittlung der chronischen

Toxizität wird in Tierversuchen die Wirkstoffmenge bezogen auf ein Kilogramm Körpergewicht ermittelt, die in Langzeitversuchen ohne unerwünschte Wirkungen bleibt (NOAEL = No Observed Adverse Effect Level) [47]. Der NOAEL wird durch einen Sicherheitsfaktor von 100 dividiert, um die duldbare tägliche Aufnahmemenge – ADI (= Acceptable Daily Intake) [47] – zu ermitteln. Dieser Sicherheitsfaktor berücksichtigt sowohl Unterschiede, die zwischen Tier und Mensch (Faktor 10: Interspezies) auftreten können, als auch Unterschiede zwischen einzelnen Individuen (Faktor 10: Intraspezies). Der in den sechziger Jahren eingeführte ADI-Wert gibt die Menge des Stoffes an, die ein Mensch täglich ein Leben lang ohne erkennbare schädigende Wirkungen aufnehmen kann [47]. Zur Bewertung von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen, die eine hohe akute Toxizität aufweisen und schon bei einmaliger oder kurzzeitiger Aufnahme gesundheitsschädliche Wirkungen auslösen können, eignet sich der ADI-Wert nur eingeschränkt. Mitte der 1990er Jahre wurde deshalb neben dem ADI-Wert die so genannte Acute Reference Dose (akute Referenzdosis, ARfD [48]) eingeführt, die die akute Toxizität bei einmaliger Aufnahme ermittelt:

Pflanzenschutzmittelrückstand

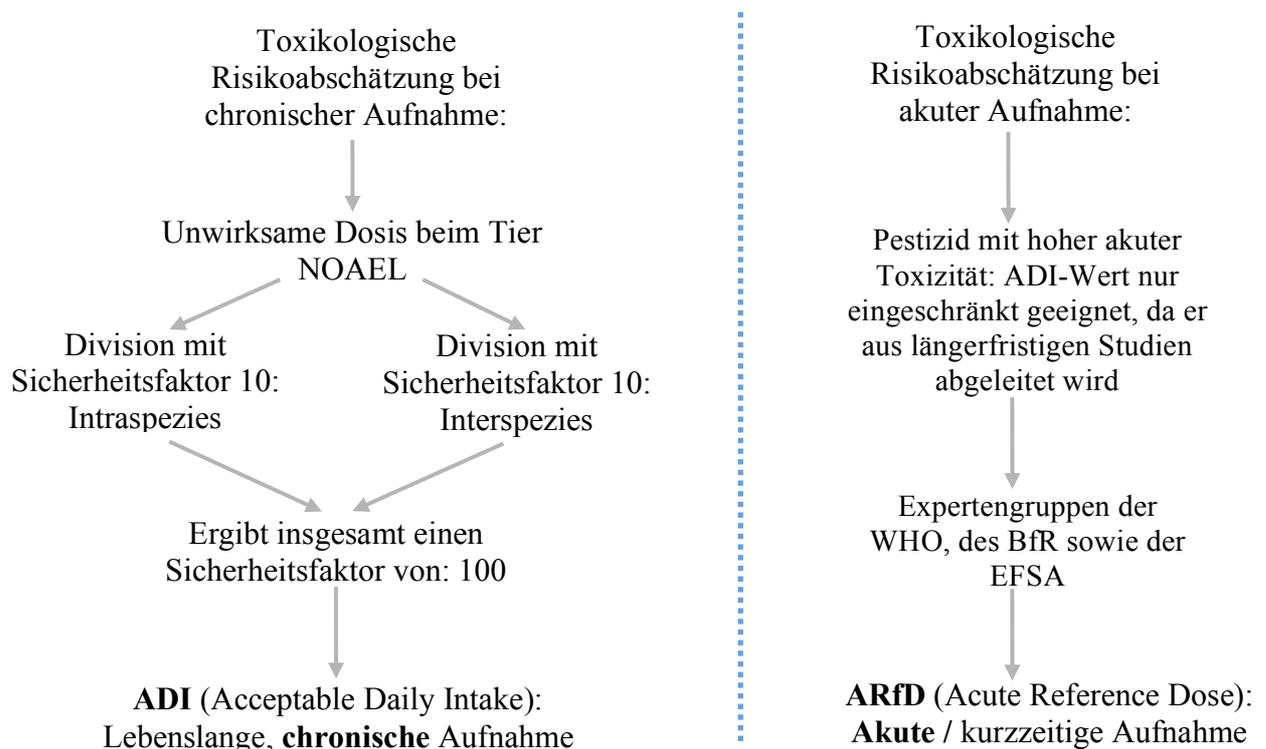


Abb. 3: Zusammenhänge zwischen NOAEL, ADI sowie ARfD

Als ARfD wird die Menge bezeichnet, die ein Mensch über einen Tag ohne erkennbares Risiko aufnehmen kann [48]. Mit dem prozentualen Ausschöpfungsgrad der akuten Referenzdosis (ARfD) lässt sich ein potentiell gesundheitliches Risiko beim einmaligen

Verzehr einer hohen Menge von Obst oder Gemüse während einer Mahlzeit bzw. an einem Tag zahlenmäßig erfassen und vergleichen. Ein Ausschöpfungsgrad von mehr als 100 % zeigt an, dass ein mögliches Risiko mit der geforderten Sicherheit nicht mehr auszuschließen ist. Die Berechnungen zur Ausschöpfung der ARfD werden mit Verzehrdaten für Kinder unter Berücksichtigung ihres Körpergewichtes vorgenommen, weil hier das Verhältnis von Nahrungsaufnahme zum Körpergewicht am ungünstigsten ist. Die Basis für das Verzehr-Modell liefert in Deutschland die so genannte VELS-Studie (Verzehrstudie zur Ermittlung der Lebensmittelaufnahme von Säuglingen und Kleinkindern für die Abschätzung eines akuten Toxizitätsrisikos durch Rückstände von Pflanzenschutzmitteln) [48], die zwischen Juni 2001 und September 2002 durchgeführt wurde. Für 816 Säuglinge und Kleinkinder im Alter von 6 Monaten bis unter 5 Jahren wurden aus Deutschland Daten ermittelt. Als mittleres Körpergewicht für 2- bis unter 5-jährige Kinder werden 16,15 kg angenommen. Außerdem erfolgt bei großstückigen Produkten zusätzlich die Multiplikation mit dem Variabilitätsfaktor 3 bis 7, um mögliche höhere Belastungen von Einzelstücken gegenüber der untersuchten Mischprobe zu erfassen [48]:

Exp = Aufnahme/Exposition

c = gemessener Rückstandsgehalt

VM = Verzehrsmenge

VF = Variabilitätsfaktor

KG = Körpermasse

RHG = Rückstandshöchstgehalt (siehe unten)

$$\text{Exp} = \frac{c \times \text{VM} \times \text{VF}}{\text{KG}} \quad (1)$$

Beispiel: Tebufenpyrad in Mandarinen

→ RHG	= 0,5 mg/kg	}	Exposition =	}	Ausschöpfung = 10%			
→ Messwert	= 0,02 mg/kg					0,0020 mg/kg Körpergewicht		
→ VM	= 231,0 g						ARfD =	
→ VF	= 7							0,02 mg/kg Körpergewicht
→ KG	= 16,15 kg = 16.150g							

Abb. 4: Berechnungsmodell zur ARfD-Wert Ausschöpfung

Um die Verbrauchersicherheit zu gewährleisten, kontrolliert die deutsche amtliche Lebensmittelüberwachung der Bundesländer die Einhaltung der in der Verordnung (EG) Nr. 396/2005 [44] festgelegten Rückstandshöchstgehalte. Hierzu werden insbesondere Lebensmittel untersucht, bei denen ein erhöhtes Risiko für den Verbraucher (risikoorientierte

Beprobung) vermutet wird - z.B. aufgrund aktueller Lebensmittelskandale. Die im Rahmen dieser Kontrolle ermittelten Pflanzenschutzmittelrückstände der untersuchten Lebensmittel werden von den Bundesländern an das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) übermittelt und dort ausgewertet.

Weiterhin wertet das BVL auch die Ergebnisse des so genannten Lebensmittel-Monitorings aus. Im Rahmen des Lebensmittel-Monitorings wird eine für jedes Untersuchungsjaar festgelegte Gruppe von Lebensmitteln von den Bundesländern untersucht, um z.B. repräsentative Daten über das Vorkommen gesundheitlich unerwünschter Stoffe in diesen Lebensmitteln zu gewinnen. Dieses so genannte „Warenkorb“-Monitoring umfasst dabei innerhalb eines Jahres nicht die gesamte Breite der angebotenen Lebensmittel, sondern einen festgelegten Ausschnitt des Warenkorbes. Die Proben werden nach einem definierten Probenahmeplan gezogen, der auch biostatistische Aspekte enthält. Die Probenahmepläne werden jährlich vom BVL gemeinsam mit den Bundesländern festgelegt.

Die Labore der Untersuchungsämter verfügen über eine Akkreditierung der Staatlichen Anerkennungsstelle der Lebensmittelüberwachung (z.B. AKS / SAL, siehe Seite 4). Sie haben sich verpflichtet, regelmäßig an qualitätssichernden Maßnahmen teilzunehmen - wie z.B. an Ringversuchen und Laborvergleichsuntersuchungen [15]. Weiterhin werden über die analytische Kompetenz hinaus auch hohe Anforderungen an die Beurteilungskompetenz der Labore gestellt. Die Messwerte an sich sind hierbei in einen ganzheitlichen Zusammenhang zu setzen, der sich u.a. aus den lebensmittelrechtlichen Anforderungen ergibt.

3.2.3 Kontrolle von Rückstandshöchstgehalten in Lebensmitteln durch den LEH

Der LEH hat u.a. aufgrund der sensibilisierten Verbraucher-Wahrnehmung hinsichtlich der gesundheitlichen Bedenklichkeit von Pestiziden reagiert und fordert von seinen Lieferanten Qualitätsprofile (Produktpässe / Spezifikationen), die über die lebensmittelrechtlichen Anforderungen hinausgehen. Hierbei ist keine einheitliche Vorgehensweise zu erkennen. Vielmehr entwickeln die einzelnen Handelshäuser stark differenzierte Anforderungen bei der Spezifikationserstellung. So sind auch hinsichtlich der maximalen Anzahl von Pestiziden in Lebensmittel unterschiedliche Anforderungen aufgestellt worden. Auch die Ausschöpfungsgrenzen von RHG, ADI- und ARfD-Werten sind je nach Handelsunternehmen unterschiedlich:

Tabelle 3: Spezifikationen des LEH in der Übersicht [49]

	ALDI Süd	EDEKA	KAUF- LAND	KAISERS	LIDL	METRO	REWE
Stand	01.08.08	30.05.07	01.09.08	22.05.09	03.04.06	15.02.07	02.02.07
Max. Anzahl Wirkstoffe	3-5*						
Ausschöpfung Höchstgehalt Einzelwirkstoff	70%	70% bzw. 50%**	33%	70%	33% bzw. 66%	70%	70%
Ausschöpfung Höchstgehalt Σ Wirkstoffe	80%			150%			
Auslastung ARfD Einzelwirkstoff	100%		70%	70%	100%	100%	70%
Ausschöpfung Σ ARfD	80%		100%	100%			
Ausschöpfung RHG/Messwert 0,01 mg/kg	nein		nein	nein	ja	nein	nein

*Produktspezifisch / **Eigenmarken

Neben der Ermittlung der Anzahl und Menge von Pestiziden wird folglich von den Laboratorien erwartet, die Befunde hinsichtlich der Ausschöpfungen der Höchstgehalte sowie der Expositionsgrenzwerte (ADI / ARfD) zu überprüfen.

Anforderungen an die analytische Kompetenz

Neben der Beurteilungskompetenz wird die analytische Kompetenz der Labore grundsätzlich vorausgesetzt. Eine Akkreditierung der Prüflaboratorien nach ISO 17025 [11] gilt nach wie vor als Qualitätskriterium für verlässliche Analytik– ebenso wie die Verpflichtung der Labore, an Laborvergleichsuntersuchungen, Kompetenztests sowie Ringversuchen teilzunehmen [5]. Neben etablierten Ringversuchsanbietern wie FAPAS und Bipea hat seit 2006 ein weiteres Prüfsystem an Bedeutung gewonnen. Dieses Prüfsystem sieht für Laboratorien eine Zulassungsverfahren vor, welches die Aufnahme von Laboren in das System sowie die Aufrechterhaltung der System-Anerkennung u.a. durch so genannte Laborkompetenztests einfordert. Dieser privatwirtschaftliche Laborstandard („QS-Anerkennung“) richtet sich an Labore, die Ware aus dem System der QS Fachgesellschaft Obst-Gemüse-Kartoffeln GmbH auf Pestizidrückstände untersuchen und die Ergebnisse in die QS-Rückstandsdatenbank stellen:

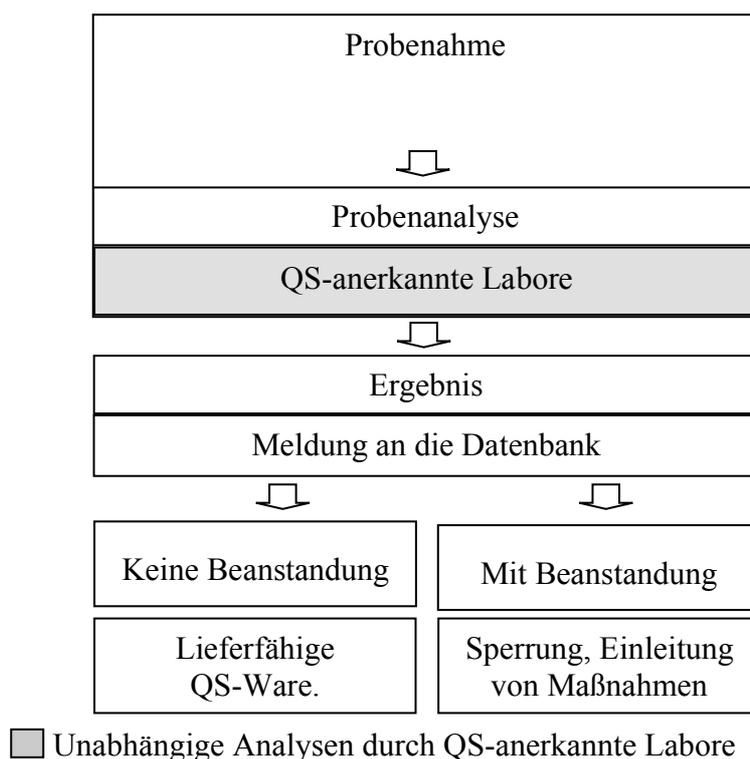


Abb. 5: Überwachung von QS-Produkten durch QS-erkannte Labore

Seit der Einführung der QS-Anerkennung hat die Anzahl der zugelassenen Laboratorien stetig zugenommen. Zurzeit (Juni 2011) werden etwa 50 Labore (aus Europa, der Türkei und Ägypten) auf der Liste der QS-erkannten Labore geführt.

Anforderungen an die Beurteilungskompetenz

Es werden neben der analytischen Kompetenz auch hohe Erwartungen an die Beurteilungskompetenz der Labore gestellt. Diese Kompetenz wird insbesondere im Rahmen des Laboranerkennungsverfahrens des Bundesverbandes Naturkost Naturwaren (BNN) Herstellung und Handel e.V. überprüft. Zentrale Frage ist hierbei die Beurteilung von Pflanzenschutzmittelrückstandsbefunden in Bio-Lebensmitteln, da der Einsatz von chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmitteln im Bio-Anbau nicht erlaubt ist – Abdrift oder ungewollte Kontaminationen z.B. durch verunreinigtes Beregnungswasser allerdings auch zu Rückstandsbefunden führen können.

Die Beurteilungskompetenz kann jedoch aufgrund der zum Teil intransparenten und unklaren Regulierungen auch für konventionell erzeugte Lebensmittel nur mit erhöhtem Aufwand von den Laboratorien nachgehalten werden [50]. Rückstandshöchstgehalte werden auf EU-Ebene beschlossen (s. S. 18). Die Zulassung von Pflanzenschutzmittelformulierungen (Pflanzenschutzmittel enthalten neben dem eigentlichen Wirkstoff (= aktive Substanz) auch Begleit- und Füllstoffe, die dazu dienen, die Wirkung und Handhabung eines Präparates zu optimieren) wird auf nationaler Ebene (EU-Mitgliedstaat) vorgenommen. Dies führt zu unbefriedigenden Umständen für alle Beteiligten, weil z.B. eine auf nationaler Ebene zugelassene Pflanzenschutzmittelformulierung einen Beistoff enthält, der für die zur Anwendung vorgesehene Kultur (z.B. Petersilie) mit einem strengen Rückstandshöchstgehalt geregelt ist:

Tabelle 4: Biphenyl-haltige Pflanzenschutzmittelformulierung SCORE für frische Kräuter

Pflanzenschutzmittelformulierung: SCORE	Wirkstoff	Rückstandshöchstgehalt für frische Kräuter
Fungizid (zu etwa 23,9% in der Formulierung Score enthalten)	Difenoconazol	10 mg/kg
Beistoff (zu etwa 1% in der Formulierung Score enthalten)	Biphenyl	0,01 mg/kg (allgemeiner Höchstgehalt)

Obwohl die Pflanzenschutzmittelformulierung SCORE für den Einsatz bei frischen Kräutern zugelassen war, führten bereits geringe Anwendungsmengen zu einer Überschreitung des allgemeinen Höchstgehaltes von 0,01 mg/ kg. Insofern sind die Beurteilungsgrundlagen für Biphenyl-Rückstände in frischen Kräutern unglücklich und erfordern eine intensive Auseinandersetzung bezüglich einer kompetenten Beurteilung des Rückstandes, zumal ein vorsätzlicher Einsatz des Biphenyls in Petersilie bei Verwendung des Mittels Score nicht unmit-

telbar ableitbar ist. Das BVL hat im April 2009 als Konsequenz dieser Problematik das Ruhen der Anwendung des Pflanzenschutzmittels SCORE angeordnet.

Weiterhin stellt sich die Situation hinsichtlich zugelassener Pflanzenschutzmittel-formulierungen insbesondere in der Bundesrepublik Deutschland bedingt durch das föderale System sehr intransparent dar und erschwert eine kompetente Beurteilung von Pestiziden in den jeweiligen Produkten. Seit dem 1. Juli 2001 gilt in Deutschland die Indikationszulassung. Die Pflanzenschutzmittelformulierungen werden über eine so genannte Hauptindikation gemäß §15 Pflanzenschutzmittelgesetz (PflSchG) [51] abgedeckt. Danach dürfen Pflanzenschutzmittel nur noch in den in der Gebrauchsanweisung angegebenen Anwendungsgebieten (Kulturen) und nur zu den entsprechenden Anwendungsbestimmungen (z.B. nur bei bestimmten Erkrankungen) eingesetzt werden. Anwendungen außerhalb der in der Zulassung genannten Gebiete sind verboten.

Sämtliche Anwendungsgebiete, die nicht über eine Hauptindikation gemäß §15 PflSchG abgedeckt sind, können in der Regel nicht nach §18,18a PflSchG für eine Lückenindikation (Anwendungsgebiete von geringfügigem Umfang bzw. geringer gesamtwirtschaftlicher Bedeutung) beantragt werden, sondern müssen nach Einzelfallgenehmigung nach §18b PflSchG von dem jeweiligen Betreiber bzw. der ausführenden Person bei den zuständigen Behörden (Länderebene) beantragt werden. § 18b PflSchG regelt die Genehmigung im Einzelfall. Somit können auf Länderebene Einzelfall-Zulassungen für bestimmte Betriebe und deren Anbaugelände erlassen werden. Eine zentrale Stelle, die bundesweit über solche Einzelfall-Genehmigungen informiert ist, existiert nicht.

3. 3 Analytik von Pflanzenschutzmitteln: Die Grundlagen der Multimethoden

Die grundsätzlichen Anforderungen an Multimethoden für die Pestizidanalytik von pflanzlichen Lebensmitteln sind in der Norm DIN EN 12393 [52, 53, 54] geregelt. Diese Norm mit dem Titel „Pflanzliche Lebensmittel – Multiverfahren zur gaschromatographischen Bestimmung von Pestizidrückständen“ ist in drei Teile gegliedert:

Teil 1: Allgemeines

Anwendungsbereich; Kurzbeschreibung; Anforderungen an Chemikalien, Geräte, Durchführung, Bestimmung, Absicherungsverfahren sowie an Untersuchungsberichte.

Teil 2: Verfahren zur Extraktion und Reinigung

- Extraktion mit Aceton, Flüssig/flüssig-Verteilung mit Dichlormethan und Reinigung an einer Kieselgel-/ Aktivkohle-Säule
- Extraktion mit Aceton und Flüssig/flüssig-Verteilung mit Dichlormethan / Petroleumbenzin, ggf. weitere Aufreinigung
- Extraktion mit Aceton, Flüssig/flüssig-Verteilung mit Dichlormethan oder Cyclohexan/Ethylacetat und Reinigung durch Gelpermeations- und Kieselgel-Chromatographie
- Extraktion mit Ethylacetat und, falls erforderlich, Reinigung durch Gelpermeations-Chromatographie

Teil 3: Verfahren zur Bestimmung und Absicherung

Absicherungsverfahren (übliche GC-Bedingungen); Untersuchungen mittels Massenspektrometrie; Literaturhinweise

Diese grundsätzlichen Anforderungen sind in der Praxis von den Laboratorien unterschiedlich umgesetzt worden. Gleichwohl streben alle Multimethoden nach der Überwindung nachfolgender Herausforderungen:

- Wie können möglichst viele Wirkstoffe mit unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften mit möglichst wenig Aufwand im Bereich der Probenvorbereitung, -aufreinigung, instrumenteller Messanalytik und Auswertung erfasst werden [20]?
- Wie kann möglichst viel Matrix abgetrennt werden (um Störeffekte zu minimieren) bei gleichzeitiger Bewahrung der zu untersuchenden Wirkstoffe, die durch die Abtrennungsprozesse der Matrix nicht beschädigt werden dürfen [20, 21]?

Vor dem Hintergrund

- der signifikanten Anzahl weltweit patentierter Pestizide (etwa 1.350) [8],
- der sich daraus ergebenden Vielzahl ihrer unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften,
- der Vielfalt an Lebensmitteln mit ganz unterschiedlichen Matrixeigenschaften (Fettgehalt, Wassergehalt, pH-Wert, Zuckergehalt, Chlorophyllgehalt, Gehalt an ätherischen Ölen usw.)

kann eine Multimethode nur einen analytischen Kompromiss darstellen, da diese Vielfalt nicht in einer Methode unter standardisierten Bedingungen abgedeckt werden kann [20].

Um bestmögliche Analysenkompromisse bei der Durchführung von Multimethoden zu erzielen, wurden unterschiedliche Verfahren für die einzelnen Methodenschritte der „Probenvorbereitung, Probenaufreinigung sowie der instrumentellen Analytik (Chromatographie / Detektion)“ entwickelt und kombiniert.

Die Prinzipien der Multimethoden sowie deren Umsetzungen in die Praxis werden anhand der (insbesondere in Deutschland etablierten) Sammelmethode DFG S 19 [55, 56] vorgestellt. Sie ist auch als offizielle amtliche Analysenmethode in Deutschland in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB unter der Methodenummer L 00.00-34 [57] aufgeführt und wird für die Pestizidanalytik fettarmer Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs verwendet. Weiterhin werden weitere neu entwickelte Multimethoden (QuEChERS / BfR) [9, 10] vorgestellt, um die unterschiedlichen Ansätze im Umgang mit den analytischen Kompromissen von Multimethoden darzustellen.

3.3.1 Die Multimethode DFG S 19

Bei dieser Multimethode erfolgt die Extraktion und Aufreinigung durch Extraktion mit Aceton, Flüssig/flüssig-Verteilung mit Cyclohexan/Ethylacetat und Reinigung durch Gelpermeations- und Kieselgel-Chromatographie. Nach der Extraktreinigung kann die Probe nach gaschromatographischer Trennung der Wirkstoffe erstmalig gemessen werden. Hierbei können unterschiedliche Detektoren zum Einsatz kommen - z.B. ECD, FPD, NPD sowie massenselektive Detektoren:

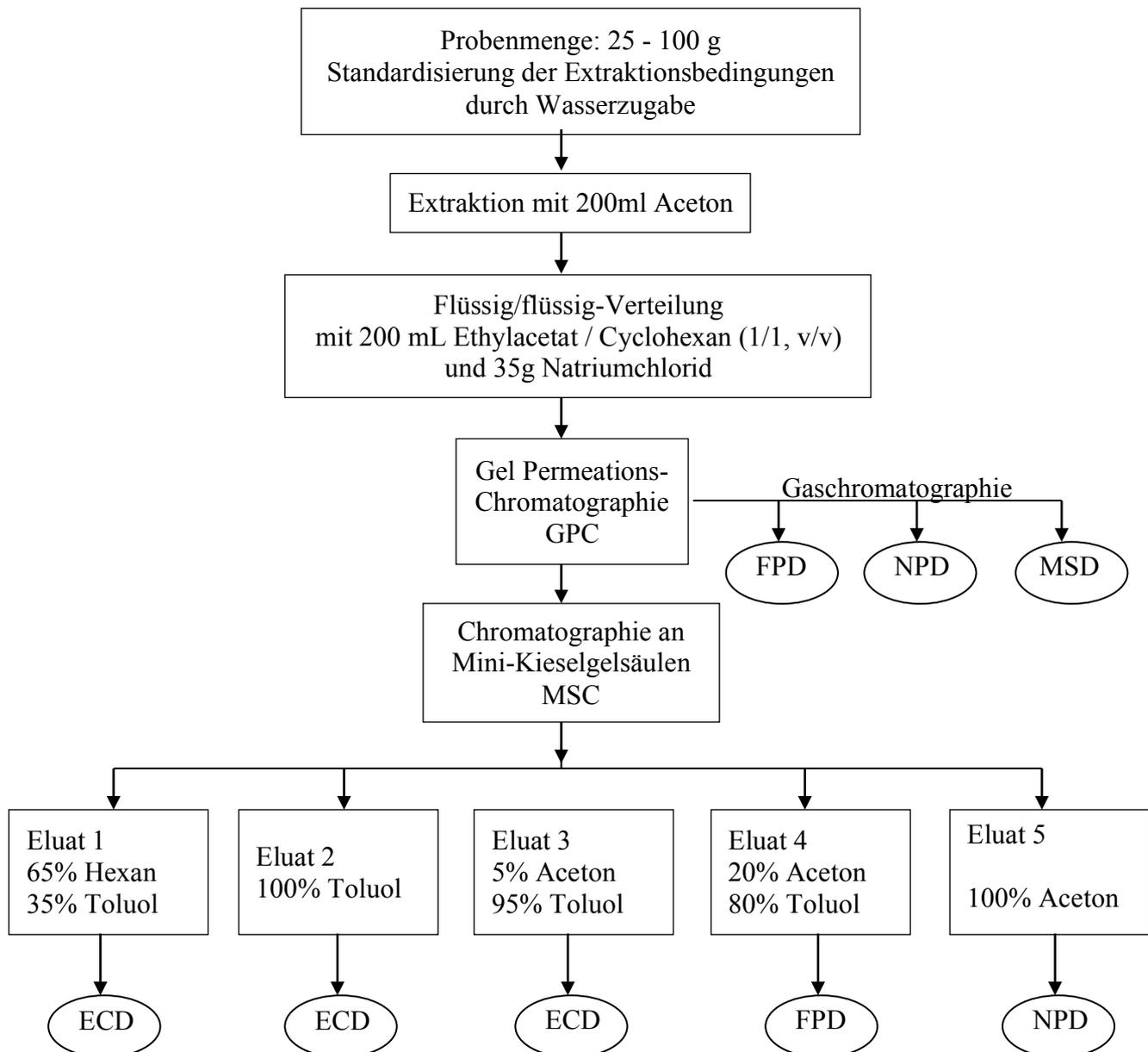


Abb. 6: Ablaufschema der Multimethode DFG S 19 [57]

Probenvorbereitung

Ziel der Probenvorbereitung ist es, die Homogenität der Analyten in der Matrix sicherzustellen. Da nicht das komplette Probenmaterial, sondern eine relativ geringe Probenmenge (25 – 50 g) bei der Multimethode DFG S 19 aufgearbeitet werden, ist der Anspruch an die Repräsentativität der Laborprobe ebenfalls sehr hoch. So werden die für die Untersuchung vorgesehenen Probenteile z.B. nach dem Sektorverfahren [58] entnommen. Hierbei werden die Proben (Obst / Gemüse) in Längsrichtung geviertelt, und zwei diagonal gegenüberliegende Sektoren werden für die weitere Probenaufbereitung verwendet. Mit Hilfe von Mörsermühlen, Cuttern, Mixern oder Rührern werden diese Probenteile anschließend homogenisiert [59].

Probenaufreinigung

Die Aufreinigung verfolgt das Ziel, die Pestizidrückstände quantitativ zu extrahieren und gleichzeitig möglichst wenig (störende) Matrixsubstanzen aus der Probe in den Extrakt übergehen zu lassen. Weiterhin hat sie zum Ziel, niedrige Stoffkonzentrationen durch Anreicherungsschritte nachweisbar zu machen.

Die Polarität der Pestizide sowie ihr Löslichkeitsverhalten sind hierbei von Relevanz, denn je vielfältiger die Polarität der Pestizide ist, desto mehr Matrixmoleküle werden mit extrahiert. Eine Probenaufreinigung, die alle potentiellen Pestizide aus allen möglichen Matrices extrahieren kann, ist praktisch nicht möglich [60]. Bei der Pestizidanalytik fettarmer Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs werden in der Regel als Extraktionsmittel organische Lösungsmittel (auch Gemische) verwendet. Hierzu zählen beispielsweise Methanol, Aceton, Acetonitril sowie Ethylacetat [61].

Nachfolgend werden die einzelnen Bausteine der Multimethode DFG S 19 detailliert vorgestellt und in Zusammenhang gesetzt:

Standardisierung der Extraktionsbedingungen

Unterschiedliche Lebensmittel enthalten unterschiedlich viel Wasser. So enthält z.B. eine Salatgurke etwa 96-97% Wasser, wohingegen Sojabohnen nur zu etwa 23% Wasser enthalten [62]. Um vergleichbare Extraktionsbedingungen zu schaffen – und somit auch reproduzierbare Wiederfindungsraten für die Pestizide unabhängig vom Wassergehalt des zu untersuchenden Lebensmittels zu erhalten – orientiert man sich an wassereichen pflanzlichen Lebensmitteln (wie den aufgeführten Salatgurken) und standardisiert den Wassergehalt wasserärmerer Lebensmittel auf diese vergleichbaren Wasserbedingungen. Das eingewogene Sojabohnen-Homogenat wird deshalb vor der Extraktion mit Aceton mit einer entsprechenden

Wassermenge versehen, damit ähnliche Extraktionsbedingungen wie bei Salatgurken gegeben sind. Ein weiteres Ziel ist die Erhöhung der Extraktionsausbeute.

Aufreinigungsschritt: Extraktion mit Aceton

Die Multimethode DFG S 19 verwendet Aceton als Extraktionsmittel, welches aufgrund seiner geringeren Toxizität im Vergleich zu anderen organischen Lösungsmitteln (wie beispielsweise Acetonitril, Methanol sowie Dichlormethan), seiner höheren Flüchtigkeit (Siedepunkt: 56,5°C) [63], der Ermöglichung eines breiteren Pestizid-Polaritätsspektrums sowie seinen niedrigeren Beschaffungskosten bevorzugt wird [56]. Aceton hat insbesondere die Funktion als Lösungsvermittler. Durch den osmotischen Druck werden die Pflanzenzellen aufgesprengt und die in den Zellen enthaltenden Pestizide können so extrahiert werden.

Aufreinigungsschritt: LLE (Liquid-Liquid Extraction) - Flüssig/flüssig-Verteilung

Bei dieser Verteilungsart werden zwei nicht miteinander mischbare Lösungsmittel verwendet – eine wässrige Lösung sowie eine Lösung aus organischen Lösungsmitteln (Verteilungschromatographie). Die zu extrahierenden Pestizide lassen sich somit von einem Großteil störender mit-extrahierter Matrixsubstanzen abtrennen. Grundvoraussetzung der LLE ist es, dass sich die organische Phase sowie die wässrige (Proben-)Lösung sich bei der LLE nicht mischen dürfen.

Die Verteilung erfolgt nach dem Nernstschen Verteilungssatz: Das Verhältnis der Konzentrationen eines gelösten Stoffes ist in beiden Phasen konstant:

$$K = \frac{C_1}{C_2} \quad \begin{array}{l} C_1/2 = \text{Konzentration des Analyten in Phase 1 bzw. Phase 2} \\ K = \text{Nernstscher Verteilungskoeffizient} \end{array} \quad (2)$$

Die Konzentration des Analyten in der organischen Phase C_1 wird umso höher, je größer der Verteilungskoeffizient K ist.

Die Multimethode DFG S 19 sah in ihrer ersten veröffentlichten Version [55] Dichlormethan als Lösungsmittel für die LLE vor. Aufgrund des toxikologischen Profils von Dichlormethan (u.a. R-Satz 40: Verdacht auf krebserzeugende Wirkung) wurde nach Alternativen gesucht. In der modifizierten Methode [56, 64] wird deshalb ein Lösungsmittelgemisch aus Ethylacetat / Cyclohexan (1/1, v/v) verwendet. Das Aussalzen durch Zugaben von NaCl verbessert den Übergang der Pestizide in die organische Phase bzw. verschlechtert deren Löslichkeit in der wässrigen Phase („Aussalzen“) und optimiert so die Extraktionsausbeute. Stark polare Pflanzeninhaltsstoffe wie beispielsweise Mono- und Disaccharide, Proteine sowie Salze

befinden sich in der wässrigen Phase – wohingegen Fette und Fettbegleitstoffe sowie die mittelpolaren bis unpolaren Pestizide in der organischen Phase enthalten sind.

Aufreinigungsschritt: GPC (Gel Permeationschromatographie)

Die GPC ist eine Flüssigkeitschromatographie (Verdrängungschromatographie), die automatisiert an Trennsäulen durchgeführt wird. Sie ist ein schonendes Reinigungsverfahren, welches für unpolare und polare Pestizidrückstände sowie für thermisch empfindliche Wirkstoffe geeignet ist. Die flüssige Phase (Probenextrakt) wird über Trenngele (feste Phase) aus porösen Gelperlen gegeben. Aufgrund sterischer Eigenschaften, die mit der Molekülgröße korrelieren, dringen kleinere Moleküle in die Poren ein, während größere Moleküle an dem Trenngel vorbeilaufen und die Säule zuerst verlassen. Da Pestizide eher geringere Molmassen aufweisen als jene von natürlichen Pflanzenbestandteilen, werden die Pestizide erst nach den Begleitsubstanzen eluiert. Die GPC bietet daher die Möglichkeit, einen Probenextrakt von Matrixbestandteilen größerer Molekülmassen – wie z.B. Proteine, Fette sowie Fettbegleitstoffe – zu trennen. Bei der Untersuchung von über 400 Pestiziden und deren Metaboliten konnten keine Substanzverluste durch die GPC festgestellt werden [55].

Wechselwirkungen zwischen Gel, Lösungsmittel und chromatographierten Pestiziden sind jedoch zu berücksichtigen, da sie die Reihenfolge der Eluate beeinflussen [65]. Weiterhin ist bei der GPC die Flusskonstanz ein einflussreicher Faktor. Kleinste Änderungen im Fluss haben große Auswirkungen auf die berechneten Molekulargewichte und damit auf die Reinigungseffizienz.

Wie Hemmerling et al. [20] bei einem Vergleich von Multimethoden feststellen konnte, enthalten die GPC-Extrakte noch zu viele Matrixbegeleitstoffe, wodurch die Messwerte verfälscht werden können. Wirkstoffe wie Propamocarb und Pymetrozin ließen sich in keiner der getesteten Matrices (Zitrone, Gurke, Rosine, Mehl, Haselnuss, Milch und Ei [15]) mit einer zufriedenstellenden Wiederfindung feststellen. Die kann allerdings auch auf andere Eigenschaften der Wirkstoffe zurückzuführen sein, zumal das Pymetrozin säure-labil ist, und das Propamocarb nahezu zeitgleich mit dem Todvolumen bei der LC-M/MS-Analytik eluiert [20, 21].

In der Praxis werden sequentielle Verfahren angewendet, bei denen die Pestizide nacheinander (und nicht gleichzeitig) von dem Trenngel eluiert werden. Der Aufreinigungsschritt mittels GPC wird allerdings nicht routinemäßig von allen Laboren (privat / öffentlich) betrieben, da er relativ zeitaufwendig ist, obgleich er das zentrale Modul dieser Multimethode darstellt.

Chromatographie an Mini-Kieselgelsäulen (MSC – Mini Silicar Column)

Bei diesem Clean-up-Schritt handelt es sich um eine Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) an einer so genannten Normalphase. Bei der Normalphasen-SPE werden typischerweise polare stationäre Phasen (hier: Kieselgel) verwendet. Das Prinzip der Festphasenextraktion besteht in diesem Fall darin, dass die in der mobilen Probenextrakt-Phase gelösten Analyten in reversible physikalische Wechselwirkung mit dem Festphasenmaterial (Sorbens / stationäre Phase) treten und dort angereichert werden. Zu den Wechselwirkungen zählen apolare (Van-der-Waals-Kräfte), polare (Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Kräfte) sowie ionische (elektrostatische) Kräfte. Die Wechselwirkungen sollten reversibel sein, damit die Pestizide mit einem geeigneten Lösungsmittel desorbiert werden können. Die Probenmatrix sollte möglichst keine bis wenige Wechselwirkungen mit der Festphase eingehen.

Die Elution der Pestizide erfolgt wiederum sequentiell, d.h. die Pestizide werden entsprechend ihrer Polarität nacheinander mit fünf verschiedenen Lösungsmitteln (zunehmender Polarität: Hexan/Toluol → Aceton) von den Mini-Kieselgelsäulen desorbiert.

Die vereinfachte Variante der Säulen- SPE ist die dispersive SPE, bei der das Sorbens direkt mit dem Extrakt vermischt und anschließend durch Zentrifugation entfernt wird [10].

Instrumentelle Analytik

Nach dem GPC-Aufreinigungsschritt ist bereits die erste chromatographische Trennung der Pestizide mit anschließender Detektion der Analyten möglich. Die nachfolgenden beschriebenen chromatographischen Trennverfahren verfolgen grundsätzlich das gleiche Ziel: Sicherstellung der analytischen Selektivität sowie der Sensitivität bei möglichst kurzer Analysenzeit:

- Die Selektivität ist die Fähigkeit, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Pestizide ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren [66].
- Die Sensitivität (Empfindlichkeit) ist die Fähigkeit, Pestizide hinsichtlich ihrer Bestimmungsgrenze so empfindlich wie möglich zu quantifizieren (Quantifizierung geringster Gehalte) [66].

Hierzu muss bei allen Verfahrensschritten die Trennung der Analyten optimal sein bei optimaler Auflösung. Während der Migration der Analyte durch die Trennsäule findet eine Zonenverbreiterung (Dispersion) statt, d.h. die Peaks werden im aufgezeichneten Chromatogramm breiter. Die Dispersion ist stärker ausgeprägt, je länger die Verweilzeit in der

Trennsäule d.h. je länger die Retentionszeit ist. Somit sind zwei Effekte mit gegenteiliger Wirkung vorhanden, die im Rahmen des angewendeten chromatographischen Verfahrens optimal abgewogen werden müssen, um insbesondere die Selektivität des Trennverfahrens sicherzustellen:

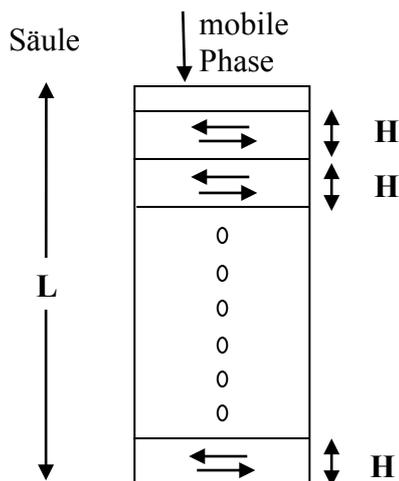
- unterschiedliche Retentionszeiten bilden die Basis für die Auftrennung,
- Dispersion (Peakverbreiterung) führt zu Überlappung der Peaks.

Eine optimale Peakform der jeweiligen Peaks hängt von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase ab, von Diffusionseffekten und dem eigentlichen chromatographischen Effekt (Probenaustausch zwischen stationärer und mobiler Phase). Dieser Zusammenhang wird in der Van-Deemter-Gleichung ausgedrückt:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \times u = HETP \quad (3)$$

H = Bodenhöhe
 $HETP$ = Höhenequivalent eines theoretischen Bodens
 A = Eddy-Diffusion
 B = Diffusion
 C = Stofftransport
 u = Fließgeschwindigkeit

Die Van-Deemter-Gleichung erklärt sich durch die so genannte *Theorie der Böden*:



H = theoretische Trennstufenhöhe
 L = Säulenlänge

Eine Trennstufe "theoretischer Boden" ist ein Teilstück der chromatographischen Trennstrecke, in dem gerade mal eine Gleichgewichtseinstellung des Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase stattfindet.

Abb. 7: Theorie der Böden

Ist die Höhe der theoretischen Böden am kleinsten, dann ist die Anzahl der Böden in einer stets gleichlangen Säule am größten. Unter diesen Randbedingungen ist deshalb die Trennstärke der Säule am größten. Da eine Trennstufe eine gewisse Zeit benötigt, begünstigen

geringe Flussraten den Stoffaustausch. Allerdings verstärken geringe Flussraten den gegenläufigen Prozess der Diffusion / Eddy-Diffusion (Peakdispersion), so dass der optimale Kompromiss zwischen den beschriebenen Einflüssen zu finden ist, um die schmalsten Peaks bei optimaler Auflösung zu erreichen:

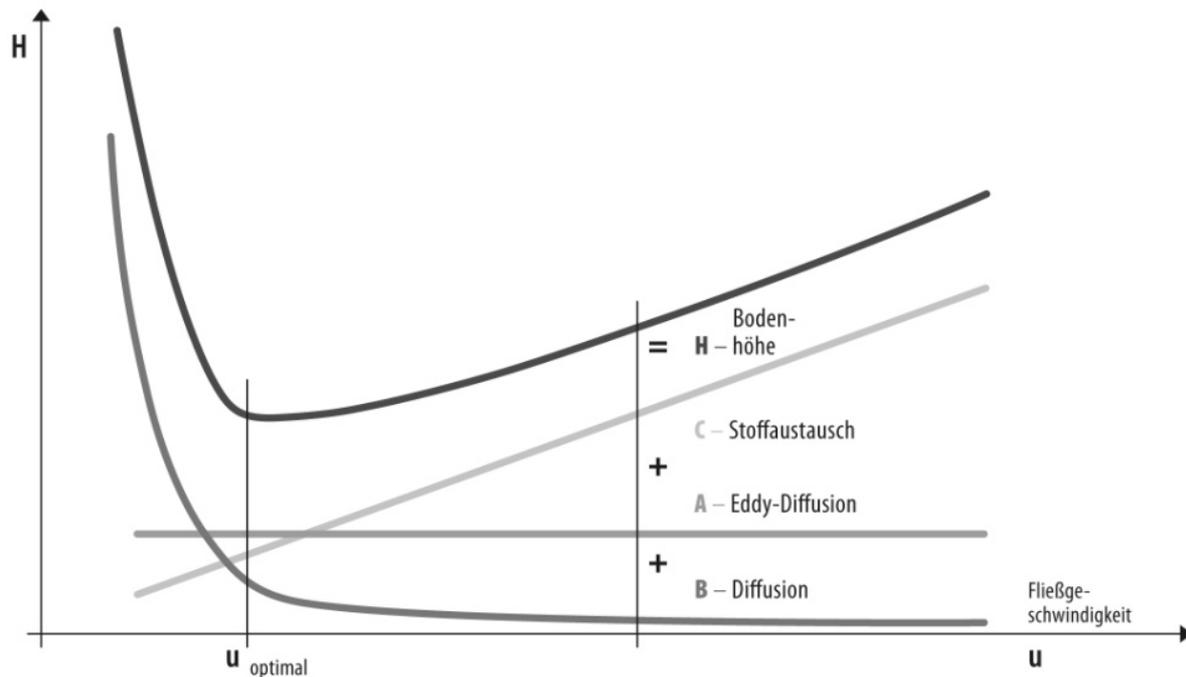


Abb. 8: Van-Deemter-Diagramm

Die resultierende Funktion zeigt ein Minimum der Bodenhöhe bei einer bestimmten Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase. In diesem Minimum sind also die größte Trennstärke der Säule und die schmalsten Peaks zu erreichen (Optimum der Van-Deemter-Kurve).

Die Selektivität wird insbesondere durch die Effektivität der Aufreinigungs- und Anreicherungsschritte beeinflusst. Die den chromatographischen Trennungen nachgeschaltete Detektion ist schließlich entscheidend für die Sensitivität der angewendeten Methode.

Gaschromatographische Verfahren

Gaschromatographische Trennverfahren setzen voraus, dass die Analyten bei 50 bis 300°C thermostabil und ausreichend flüchtig sind, weil die Trennung durch eine Verteilung in der gasförmigen (mobilen) Phase und der stationären Phase erfolgt (Verteilungschromatographie). Die stationäre Phase ist entweder ein poröser, polymerer Feststoff oder eine viskose Flüssigkeit, die in Form eines dünnen Films mit unterschiedlichen Schichtdicken (0,1 – 5 μm) auf die Säulenwandung gebracht wird. Der Innendurchmesser der Säule beträgt etwa 200-300 μm . Aufgrund ihrer Robustheit werden unpolare stationäre Phasen (z.B. Silicone) bevorzugt [67]. Die Kapillargaschromatographie mit Quarzkapillarsäulen (engl: fused silica columns)

von geringem Innendurchmesser ist in der Pestizidanalytik weit verbreitet [68] und hat in den 90-er Jahren die Verwendung gepackter Säulen nahezu ersetzt [69, 70].

Die Wahl des Trägergases hängt von dem Detektor ab. Verwendet werden He, Ar, N₂ sowie H₂. Helium ist aufgrund seiner inerten Eigenschaften und sicheren Handhabung universell einsetzbar. Während der Chromatographie wird die mobile Phase bei kontrolliertem Druck über den Injektor in die Trennsäule überführt, durchläuft diese entlang der stationären Phase und verlässt das chromatographische System durch den Detektor.

Die Probe wird mit Hilfe einer Spritze in den Injektor eines Injektorsystems gebracht und mit dem Trägergasstrom auf die Trennsäule gespült, die sich in einem beheizten und temperaturprogrammierbaren Ofen befindet. Die Trennung der Substanzen erfolgt durch wiederholte Verteilung der Einzelkomponenten zwischen mobiler und stationärer Phase (Adsorptionschromatographie bei fester stationärer Phase, Verteilungschromatographie bei flüssiger stationärer Phase). Der Transport der Probe erfolgt ausschließlich in der mobilen Phase, wohingegen die Trennung nur in der stationären Phase stattfindet. Die Trennung der Verbindungen einer Probe erfolgt aufgrund unterschiedlicher Dampfdrücke (Temperaturprogramm) und unterschiedlich starker Wechselwirkungen mit der stationären Phase. So halten sich Verbindungen mit hohem Dampfdruck und/oder niedriger Affinität zur stationären Phase nur für kurze Zeit in der Trennsäule auf. Umgekehrt werden Verbindungen mit niedrigem Dampfdruck und / oder höherer Affinität zur stationären Phase langsamer eluiert.

Durch die Anwendung eines Temperaturprogrammes werden die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Trägergases (Viskosität, Kompressibilität) verändert und der Trägergasfluss sowie dessen Geschwindigkeit darüber hinaus beeinflusst.

Parameter zur maßgeblichen Beeinflussung der Trennleistung – und damit der Selektivität – sind folglich die Wahl der stationären Phase sowie das entsprechende Temperaturprogramm während des Trennlaufes.

Phenylharnstoffe und Carbamate sind thermisch zu labil und Carbonsäuren zu polar, um sie gaschromatographisch analysieren zu können. Deshalb werden für diese Substanzen z.B. Derivate hergestellt, die für die GC-Trennung besser geeignet sind, weil sie flüchtiger und unpolarer als die Ausgangssubstanzen sind [71, 72, 73]. Auch die LC-MS/MS-Analytik ermöglicht die Analytik von Pestiziden, die aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften nicht mittels GC analysiert werden können.

Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC)

Im Bereich der Pestizidanalytik wurde die High Performance Liquid Chromatography ursprünglich nur ergänzend zur GC-Analytik eingesetzt. Pestizide, die aufgrund ihrer geringen Flüchtigkeit, Thermolabilität sowie aufgrund ihrer hohen Polarität nicht gaschromatografisch erfasst werden konnten, wurden deshalb mittels HPLC untersucht.

Bei der HPLC wird das Laufmittel durch die chromatographische Trennsäule (i.d.R mit 50-300mm Länge und einem Innendurchmesser von 2-4mm) geführt. Die Trennung wird thermostatisiert bei einem Druck zwischen 50 und 250bar vorgenommen. Zur Erzielung einer hohen Trennleistung bei gleichzeitiger Minimierung der Peakdispersion wird im Analytikbereich mit kleinen Teilchen stationärer Phase (Größe: 3-10µm) und entsprechenden Flussraten (0,5-2ml/min) gearbeitet [74, 75].

Bei der Flüssigchromatographie wird je nach Polarität der stationären Phase zwischen Normalphasen- (NP) und Umkehrphasen- (RP) Chromatographie unterschieden. Bei der NP-Chromatographie wird als stationäre Phase hochporöses Material mit großer spezifischer Oberfläche, oft Kieselgel (SiO₂) oder Aluminiumoxid (Al₂O₃) verwendet (Adsorptionschromatographie). Um die Trenneigenschaften weiter zu modifizieren, können diese Materialien durch Einbringen funktioneller Gruppen (z.B. NO₂-, NH₃-) verändert werden. Die Analyten werden durch unterschiedlich starke Adsorption an die stationäre Phase getrennt. Als mobile Phase werden unpolare Lösungsmittel, z.B. n-Hexan eingesetzt [71].

Im Bereich der Rückstandsanalytik wird häufig die Reversed-Phase-HPLC verwendet bei der die Polarität der stationären Phase durch chemische Anbindung einer unpolaren Verbindung an das Basismaterial umgekehrt wird. Die ODS-Phase (Abkz.: Octadecyl Silica) auf Kieselgelbasis, bei der an das Kieselgel durch Reaktion mit Alkyldimethylchlorsilan eine lange apolare C18-Alkylgruppe chemisch gebunden wird, ist hier sehr verbreitet.

Als mobile Phase dienen wässrig-organische Lösungsmittel [76, 77], die binäre Gemische aus Wasser und organischen Lösungsmitteln (z.B. Acetonitril) sind. Für Untersuchungen sehr polarer Moleküle werden polare RP-Sorbentien eingesetzt. Bei diesen Phasen werden zwischen hydrophober Alkylkette und Kieselgeloberfläche polare Gruppen eingebunden, die vorhandene Restsilanole „deaktivieren“ und sogar den Einsatz rein wässriger Eluenten ermöglichen.

In der HPLC wird die Auftrennung der Analyten im Wesentlichen durch die Variation der Eluentenzusammensetzung beeinflusst. Neben der isokratischen Elution, bei der die Zusammensetzung des Eluenten konstant bleibt, ist auch eine Gradientenelution möglich, bei der sich der organische Lösungsmittelanteil mit fortschreitender Analysendauer kontinuierlich er-

höht. Dadurch können stärker retardierte Analyten schneller eluieren (Verbesserung der Peak-schärfe), und weniger stark retardierte Analyten können trotzdem noch ausreichend aufgetrennt werden. Somit können durchaus kürzere Analysezeiten mit schärferen Peaks und ggf. besserer Auflösung erzielt werden. Insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von Multimethoden ist die Gradientenelution der Isokratischen überlegen [78]. Die Selektivität des Trennverfahrens kann auch durch Veränderungen der Eigenschaften der mobilen und stationären Phasen (z.B. Polarität, pH-Wert, Hydrophobizität, Partikelgröße, Porenvolumen) beeinflusst werden [79].

Die Anwendung flüssigkeitschromatographischer Trennverfahren in Kombination mit massenspektrometrischer Detektion (MS) hat im Bereich der Pestizidanalytik deutlich zugenommen. Zu den untersuchten Substanzgruppen zählen Benzoylharnstoffe [80], Benzimidazole [81, 82], Carbamate [83], Imidazole [84, 85], Sulfonylharnstoffe [86], Phenylharnstoffe [87], Triazine [88], hochpolare Pestizide wie u.a. Chlormequat, Daminozid, Ethephon, Glufosinat und Glyphosat [89] sowie quartäre Ammoniumverbindungen wie Paraquat und Diquat [90].

Detektionsverfahren

Nach Verlassen der Trennsäule werden die Substanzen detektiert. Mit Hilfe der verschiedenen Detektoren können die Wirkstoffe in Abhängigkeit von ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften selektiv nachgewiesen werden.

Die Multimethode S 19 sieht bereits nach der GPC-Aufreinigung eine gaschromatographische Trennung der Pestizide mit nachfolgender Detektion vor. Die verwendeten Detektoren müssen mit ausreichender Robustheit und Spezifität messen können, denn im Probenextrakt befinden sich auch nach der GPC-Aufreinigung noch Matrixbestandteile, die die analytischen Signale beeinflussen können [20]. Der Elektronen-Einfang-Detektor (ECD) erfüllt diese Anforderungen nicht. Eine Messung des Probenextraktes unmittelbar im Anschluss an die GPC-Aufreinigung würde zu zahlreichen Störsignalen (Messung von Matrix-Verschmutzung) führen, die die Auswertung erschweren. Deshalb werden die für die ECD-Messung vorgesehen Probenextrakte mit Mini-Kieselgelsäulen nochmals aufgereinigt.

NPD (Nitrogen phosphorus detector):

Der Stickstoff-Phosphor-Detektor ist aufgrund seiner hohen Spezifität gegenüber Stickstoff und Phosphor für die Analyse von Pestiziden (die diese Elemente enthalten) besonders geeignet. Man unterscheidet zwischen dem Alkali-Flammenionisationsdetektor (AFID) und dem Thermoionischen Detektor (TID).

Der AFID ist ein modifizierter Flammenionisationsdetektor und enthält eine Alkaliquelle (z.B. Rubidium-Salz). Die Alkaliquelle wird durch eine Flamme erhitzt, so dass Alkaliatome in die Gasphase übergehen und ionisiert werden. Die Alkali-Ionen bilden den Grundstrom des Detektors. Probenmoleküle, die in den AFID gelangen, werden in der Flamme verbrannt. Sofern stickstoff- und/oder phosphorhaltige Verbrennungsprodukte anwesend sind, steigt der Grundstrom an. Dieser Stromanstieg wird als Detektorsignal gemessen. Die Ursache für die Spezifität des AFID gegenüber Stickstoff und Phosphor sind nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass stickstoff- und phosphorhaltige Verbrennungsprodukte – wie Cyanid- und Phosphat-Radikale – die Ionisierungsrate der Alkaliatome, die sich in der Gasphase befinden, deutlich erhöhen [91].

Bei dem TID wird die Alkaliquelle elektrisch beheizt und Wasserstoff nur in so geringen Mengen zugeführt (1-5ml statt 30ml/min) [92], dass die Ionisierung der Alkaliatome abseits der Flamme im flammenlosen Modus erfolgt. Ein Vorteil des TID gegenüber dem AFID besteht darin, dass dieser Detektor ausschließlich stickstoff- und phosphorhaltige Komponenten anzeigt, während der AFID zusätzlich auf halogenhaltige Substanzen reagiert [93].

ECD (Electron Capture Detector)

Der ECD zeigt Verbindungen an, die Elektronen einfangen. Er reagiert deshalb selektiv auf elektronegative Verbindungen, besonders auf chlorierte, fluorierte oder bromierte Moleküle. Radioaktives Nickel-63 im Detektor emittiert Elektronen (β -Strahlung), die das Trägergas ionisieren. Es entsteht eine Elektronenwolke, über die ein konstanter Strom mit Hilfe periodischer Spannungspulse aufrechterhalten wird. Das heißt, bei der Kollision der ionisierten Gasmoleküle entstehen Sekundärelektronen, die aufgrund ihres Energieniveaus (0,02-0,05eV) als „thermische Elektronen“ bezeichnet werden.

Alle geladenen Komponenten bilden gemeinsam den Grundstrom des Detektors. Sobald elektronegative Komponenten in den Detektor gelangen, reagieren diese direkt mit den Elektronen aus der Elektronenwolke. Die elektronegativen Probenverbindungen, die in der Lage sind, „thermische Elektronen“ einzufangen, setzen den Grundstrom herab. Es kommt zu einer kurzfristigen Abnahme der Elektronendichte in der Elektronenwolke. Diese Änderungen werden in ein Signal übertragen, das das entsprechende Pestizid identifiziert und dessen Intensität für die Quantifizierung herangezogen wird [93].

FPD (Flame Photometric Detector)

Dieser Detektor reagiert selektiv auf Phosphorverbindungen. Die Probe trifft auf eine wasserstoffreiche Flamme (Knallgasflamme) und regt Phosphor zu einer elementspezifischen Emission an. Der Detektor misst die Wellenlänge (Extinktion) der durch die Flamme emittierten Strahlung, wenn die entsprechende Verbindung verbrannt wird. Um phosphorhaltige Verbindungen zu analysieren, ist ein Filter mit einer Wellenlänge von $\lambda=526$ nm erforderlich. Mit dem FPD sind auch Schwefelverbindungen detektierbar, sofern der entsprechende Filter verwendet wird [94].

Massenselektive Detektoren

MS-Detektoren werden der GC- sowie HPLC-Trennung nachgeschaltet. Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Ionisierung der Analytmoleküle oder Atome, welche anschließend anhand ihres Masse/Ladungsverhältnisses m/z getrennt und detektiert werden. Der generelle Aufbau der Geräte setzt sich aus einem Einlasssystem, einer Ionenquelle, einem Trennsystem und einem Detektor zusammen [96].

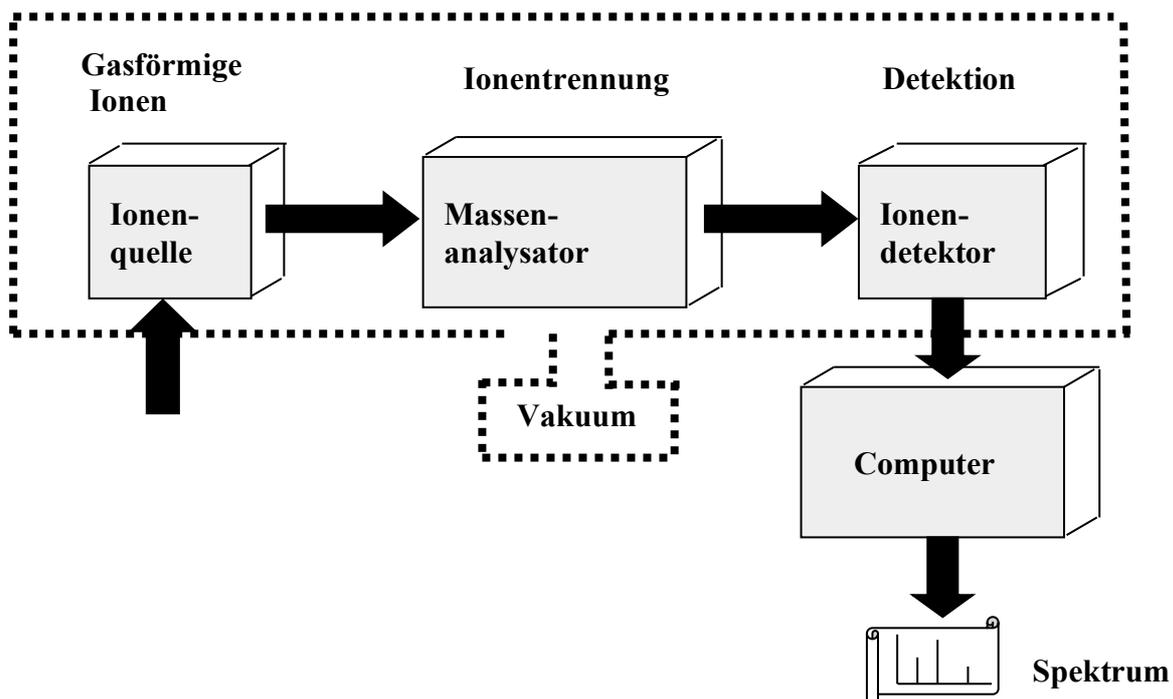


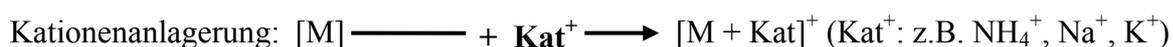
Abb. 9: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers [96]

Die zu bestimmenden Substanzen gelangen nach Verlassen der chromatographischen Trennsäule über ein Interface in die Ionenquelle des Massenspektrometers. Die Bedingungen eines Massenspektrometers (Hochvakuum, hohe Temperatur, Ionen in Gasphase) sind denen der HPLC gegenläufig (flüssige Phase, hoher Druck, niedrige Temperaturen). Aufgrund dieser Gegensätzlichkeit waren Kopplungen dieser Trennverfahren mit MS-Systemen anfangs nicht möglich. Erst Ende der 90-er wurden Ionisierungsverfahren entwickelt, die bei Atmosphären-

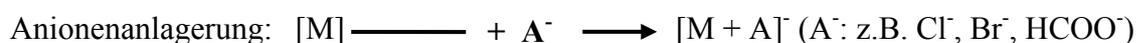
druck (Atmospheric Pressure Ionisation) arbeiten [97], so dass auch „GC-untaugliche“ thermolabile und schwerflüchtige Substanzen mit LC-MS-Kopplungen analysiert werden konnten.

In der Ionenquelle werden die Verbindungen im Vakuum unter festgelegten Bedingungen ionisiert. Charakteristisch für die Ionisierungstechniken ist die geringe Energie, die auf die Analyten übertragen wird. Hieraus resultieren nur eine geringe Fragmentierung und einfache Spektren, deren Basispeak dem protonierten (im positiven Modus) bzw. deprotonierten (im negativen Modus) Molekül der Fragmente entspricht. Es werden auch Addukte der Analyten mit Ammonium- und Natriumionen im positiven Modus oder Chloridionen im negativen Modus beobachtet. Diese chemischen Reaktionen sind Gleichgewichtsreaktionen und damit von der Gasphasen-Säure-Base-Chemie der beteiligten Moleküle abhängig [98, 99]:

positiv:



negativ:



Die Überführung in die Gasphase und die Ionisierung der Analyten erfolgen in einer dem hochevakuierten Massenanalysator vorgeschalteten Ionenquelle. Bei GC-MS-Kopplungen kommen insbesondere folgende Ionisierungstechniken zum Einsatz:

1. Elektronenstoßionisation (EI = *electron impact*)
2. Chemische Ionisation (CI).

Die Ionisierungstechniken bei LC-MS-Kopplungen sind üblicherweise

3. Electrospray-Ionisation (ESI) sowie
4. APCI (atmospheric pressure chemical ionisation).

Bei der Elektronenstoßionisation werden Elektronen durch ein elektrisches Feld auf eine kinetische Energie von 5-200eV (i. d. R. 70eV) beschleunigt und über eine Gaswolke zu den zu ionisierenden Molekülen geführt. Bei der chemischen Ionisation wird ein Gas zugeführt, welches zuvor durch Elektronenstoßionisation ionisiert wurde. Die aus dem Gas gebildeten Ionen reagieren schließlich mit dem Analyten und ionisieren diesen. Der Fragmentierungsgrad ist hier geringer als bei der Elektronenionisation. Die chemische Ionisation gehört zu den schonenden Ionisierungstechniken – ebenso wie die nachfolgenden beschriebenen zwei Verfahren [98].

Elektronenspray-Ionisierung (ESI)

Bei der Elektronenspray-Ionisierung werden die Ionen, die in der flüssigen Phase vorgebildet wurden, in die Gasphase überführt [100]. Hierzu wird die flüssige Probe mit Hilfe von Stickstoffgas in einem Hochspannungsfeld vernebelt, wobei kleine positiv (ESI positiv Modus) oder negativ geladene Tröpfchen (ESI negativ Modus) entstehen. Durch anschließende Lösungsmittelverdampfung verkleinert sich der Tropfenradius, wodurch sich die Oberflächenspannung bis zu einer kritischen Größe erhöht und der Tropfen schließlich platzt (Coulomb-Explosion). Nach komplettem Verdampfen und Absaugen des Lösungsmittels liegen die geladenen Teilchen gasförmig in der Ionenquelle vor. Bei Molekülen mit großem Molekulargewicht (z.B. Peptide) entstehen mehrfach geladene (protonierte) Molekülionen [100]:

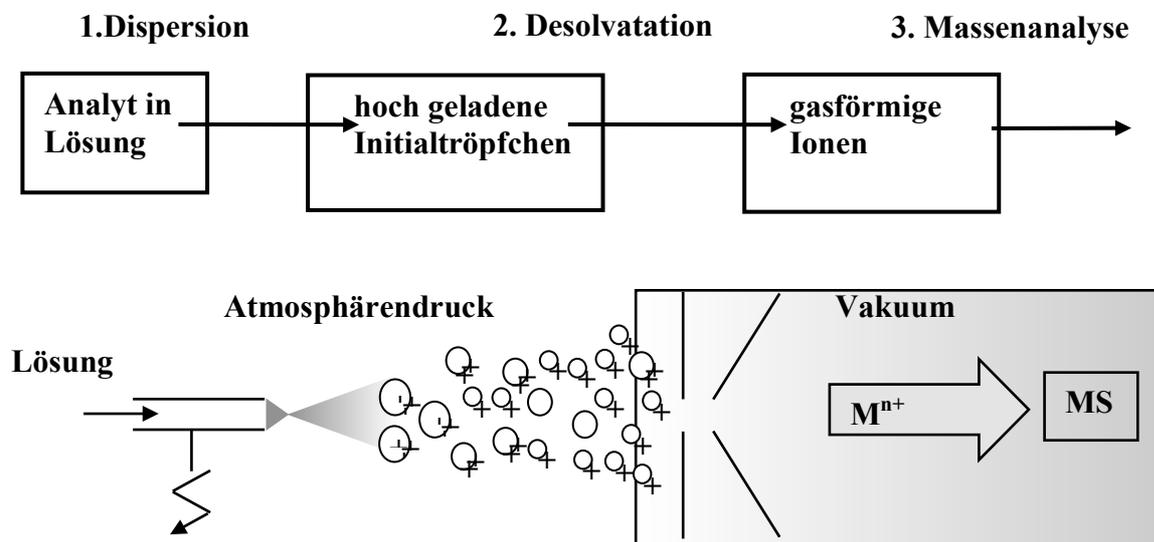


Abb. 10: Aufbau einer ESI-Ionenquelle [100]

Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)

Bei der APCI sind die Ionisationsbedingungen härter als bei der ESI-Technik, so dass auch die Ionisierung weniger polarer Verbindungen möglich ist. Es findet eine chemische Ionisierung statt, bei der die Ladung mittels eines Reaktands auf die Analyten übertragen wird. Die Mischung aus Lösungsmittel und Analyten wird unter Temperaturen von bis zu 600°C durch eine Kapillare versprüht und komplett verdampft. Eine unter Spannung stehende Stahlnadel erzeugt Entladungen, in deren Folge die im Überschuss vorhandenen Bestandteile des Lösungsmittels (wie z.B. Methanol oder Wasser) protoniert bzw. deprotoniert werden.

Anschließend erfolgt ein Protonentransfer zu (positiver Modus) oder von (negativer Modus) den Analytmolekülen. Die Analytionen werden anschließend in einen Vakuumbereich überführt [98, 99]:

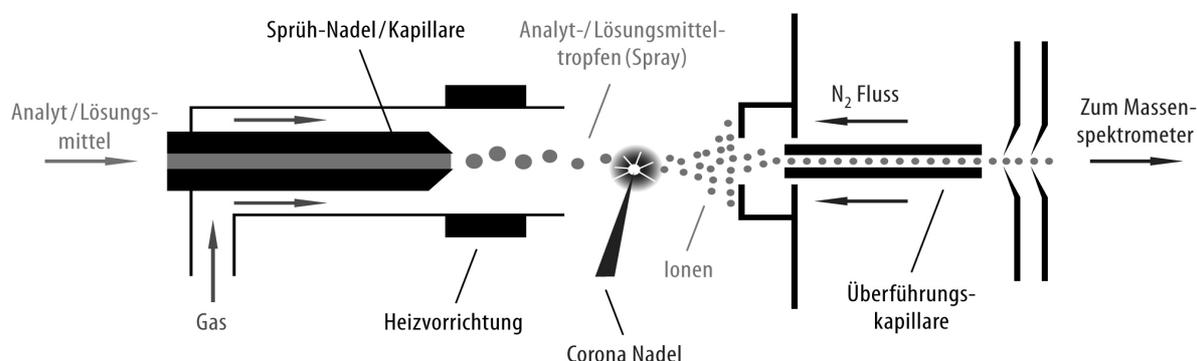


Abb. 11: Atmospheric Pressure Chemical Ionisation [98, 99]

Massenspektrometersysteme

Es werden vier Massenspektrometertypen nach ihren Massentrennsystemen unterschieden: Die einfach oder doppelt fokussierenden magnetischen Sektorfeldgeräte, die Quadrupol-Geräte, Ionenfallen (Ion traps) und Time-of-Flight-Geräte [96]. In Abhängigkeit von ihrem Masse/Ladung-Verhältnis werden die Gasphasenionen im Massenanalysator physikalisch getrennt und dann zum Detektor (Sekundärelektronenvervielfacher) weitergeleitet. Um ein Massenspektrum zu erhalten, werden die gebildeten Ionen nach ihren Massen getrennt. Hierzu werden die Ionen durch ein schwaches Feld aus der Ionisierungsregion der Quelle entfernt und anschließend über ein Potentialgefälle beschleunigt. Die Geschwindigkeit v der einzelnen Ionen hängt von der Ladung e und der Masse m der Ionen sowie von der Beschleunigungsspannung U ab:

$$e \times U = \frac{m \times v^2}{2} \quad (4)$$

beziehungsweise

$$v = \sqrt{\frac{2 \times e \times U}{m}} \quad (5)$$

Beim Sektorfeld-Massenspektrometer werden die Ionen mit Hochspannung beschleunigt, dann in ein Magnetfeld entsprechend ihres Masse-/Ladungsverhältnisses getrennt. In einem weiteren Sektorfeld werden die Fragmente bezüglich ihrer Energiedispersion klassifiziert. Nur Ionen, die eine Kreisbahn mit einem bestimmten Radius beschreiben, können den Kollektorspalt passieren.

Quadrupol-Massenspektrometer

Der Quadrupol ist ein Massenfilter aus vier parallelen Metallstäben. Unter vorgegebenen physikalischen Bedingungen erreichen nur Ionen mit bestimmten m/z -Werten den Detektor (elektromagnetische Wechselwirkungen). Die Metallstäbe sind kreuzweise miteinander leitend verbunden. Die Ionentrennung erfolgt mit Hilfe elektrischer Felder. An je zwei gegenüberliegende Stäbe werden jeweils eine Wechselspannung und eine positive bzw. eine negative Gleichspannung angelegt. Die Wechselspannung bewirkt, dass relativ zur Mittelachse abwechselnd positive und negative Felder entstehen. Durch das Stabsystem fliegende positive Ionen werden während der positiven Phase zur Mittelachse, während der negativen zu den Stäben hin beschleunigt.

Die seitliche Ablenkung hängt von der angelegten Spannung, der Frequenz und der Masse der Ionen ab. Die positive Gleichspannung bewirkt eine generelle Ablenkung zur Mittelachse hin und unterstützt damit schwere Ionen, die das System passieren können. Leichte Ionen schwingen aus und werden entladen, indem sie die Stäbe treffen. Eine umgekehrte Wirkung hat die negative Gleichspannung, die Ionen über eine bestimmte Masse zu den Stäben hin ablenkt. Das positive Feld der entsprechenden Wechselspannung reicht aus, um Ionen mit geringer Masse zur Mitte des Stabsystems zu bringen. Zwei gegenüberliegende Stäbe sperren somit für geringe Massen, die anderen zwei für hohe Massen. Durch geeignete Abstimmungen dieser Spannungen wird erreicht, dass jeweils nur Ionen einer Masse das Stabsystem durchfliegen können [96]:

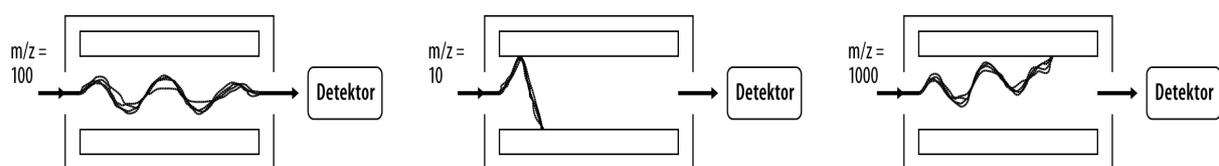


Abb. 12: Ablenkung der Ionen mit bestimmten m/z -Werten im Quadrupol-Massenspektrometer

Tandem Massenspektrometer (MS-MS)

Da die ESI schonend ist, entstehen bei der Ionisierung in der Regel keine Fragmente. Um dennoch Informationen über die Struktur eines Moleküls zu gewinnen, werden die Moleküle in Tandem-Massenspektrometern gezielt zur Fragmentierung angeregt. Das Tandem-MS umfasst 3 Quadrupole (Triple-Quadrupol), wobei nur beim ersten und beim dritten eine Messung erfolgt. Man verwendet hierbei zwei Stufen der Massenanalyse: In der ersten wird eine Ionensorte aus einer Mischung ausgewählt, und in der zweiten Stufe werden die z.B. durch Stoß mit Inert-Gasmolekülen (z.B. Helium) induzierten Fragmente analysiert. Diese Doppelanalyse kann sowohl räumlich als auch zeitlich getrennt ablaufen [100].

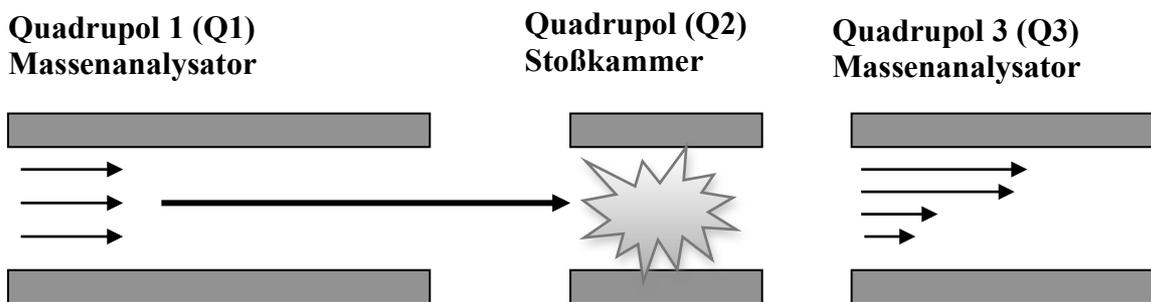


Abb. 13: Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie [100]

Flugzeit-Massenspektrometer (Time of Flight, ToF)

TOF-Analysatoren nutzen unterschiedlich lange Flugzeiten von Ionen mit unterschiedlichen m/z -Werten durch den evakuierten Raum. Leichtere Ionen erreichen das Ende des Flugrohres schneller als schwerere, und so können beide nacheinander registriert werden. Die Analysatoren werden nur mit einer gepulsten Ionenerzeugung und nicht mit einem kontinuierlich gebildeten Ionenstrahl betrieben. Die Messung findet gepulst statt, um die gleichzeitige Ankunft von Ionen mit unterschiedlichen m/z -Werten zu vermeiden [98]:

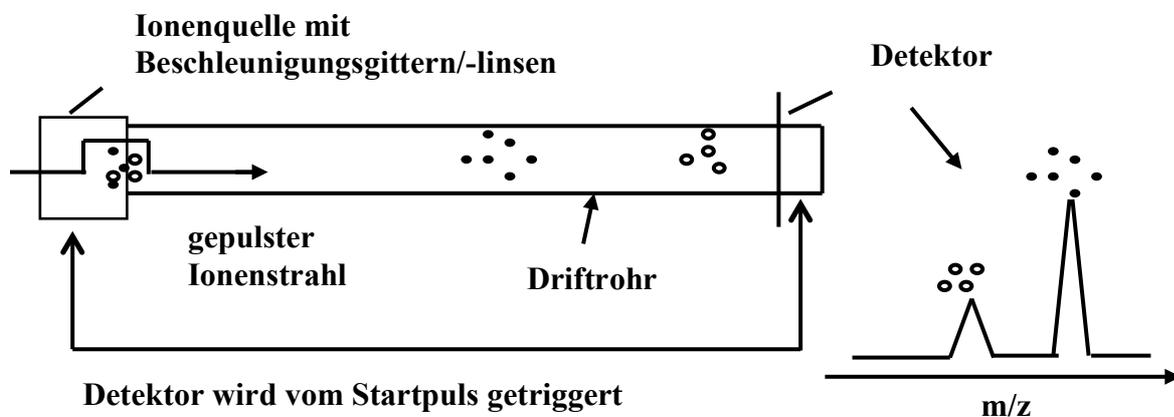


Abb. 14: Ionentrennung in einem Flugzeit-Massenspektrometer [98]

Die MS-TOF Technik wurde beispielsweise in einer Studie zum Multimethodenvergleich von Hemmerling et al. [20] verwendet. Aufgrund der punktgenauen Selektion der einzelnen Fragmentationen war es im Rahmen der Studie möglich, in den meisten Fällen ein (von Matrixeffekten) ungestörtes Ion zur Quantifizierung komplexer Wirkstoff-/Matrix-Gemische zu extrahieren. Hierzu wurden fünf Lebensmittel – die entsprechend dem „Document No. SANCO/10684/2009“ [15] Lebensmittelkategorien mit unterschiedlichen Eigenschaften (fettreich, sauer etc.) repräsentieren sollen – mit insgesamt 88 Wirkstoffen dotiert und auf ihre Wiederfindungsraten überprüft.

Einfluss der Messzeit: Full Scan und Selected Ion Monitoring

Die Messung der Ionen kann durch die Aufnahme eines kompletten Spektrums (sogenannter Full Scan Modus) oder durch eine empfindlichere massenselektive Detektion (Selected Ion Monitoring, sogenannter SIM-Modus) erfolgen.

Im Full Scan Modus wird während des Laufs ein vom Anwender festgelegter Massenbereich vermessen. Die Ionenströme der einzelnen Massen werden mit Hilfe der elektronischen Datenverarbeitung aufsummiert und als TIC-Chromatogramm (Total-Ionen-Chromatogramm) dargestellt, aus dem sowohl die jeweiligen Massenspektren (bei einer bestimmten Retentionszeit) oder die rekonstruierten Ionen-Chromatogramme (RICs) der einzelnen Ionen (über einen bestimmten Zeitbereich) extrahiert werden können.

Im SIM-Modus werden innerhalb eines Messzyklus wenige vom Anwender individuell ausgewählte Ionen gemessen. Im Gegensatz zum Full Scan Modus, bei dem innerhalb eines Messzyklus (etwa 1 s) der gesamte Massenbereich detektiert wird, steht im SIM fast die ganze Messzeit für diese wenigen ausgewählten Ionen zur Verfügung. Die Verlängerung der individuellen Messzeiten (dwell time) der Ionen auf 100 bis 300 ms führt im Vergleich zum Full Scan Modus zu einem deutlich verbesserten Signal / Rauschen-Verhältnis. Damit kommt es zu einer erheblichen Empfindlichkeitssteigerung um einen Faktor von etwa 100. Aus der Beschränkung auf wenige charakteristische Ionen resultiert aber auch ein Informationsverlust. Die Ionenströme aller Analyten werden anschließend zu einem sogenannten Multiple Ion Detection (MID)-Chromatogramm aufsummiert.

Ein grundsätzliches Problem bei der Detektion mittels MS ist der Umstand, dass die dwell time und damit die Zeitfenster, innerhalb derer die Massenübergänge gemessen werden, vom Anwender individuell angelegt werden. Laufen ausgewählte Ionen außerhalb ihres charakteristischen Zeitfensters in den Detektor, ist die Gefahr groß, dass sie übersehen werden. Sind die Fragmente in geringer Konzentration vorhanden (wenn ein Pestizid nur im Bereich der

Bestimmungsgrenze von etwa 10 ppb in der Ausgangsprobe enthalten ist), so kommt darüber hinaus die Schwierigkeit hinzu, dass die Signale im Full Scan Modus nicht gesehen werden (nicht-ausreichende Sensitivität) und die Verstärkung der Signalintensität auch im SIM-Modus hier keinen Vorteil mit sich bringt, da sich der Analytiker (aus Unwissenheit) nicht auf das entsprechende Zeitfenster setzt (nicht ausreichende Selektivität).

Einfluss und Berücksichtigung der Matrixeffekte / Laborroutine

Der Matrixeffekt ist in seinen Ursachen sehr vielfältig. Durch konkurrierende Ionisierungen zwischen Matrixkomponenten und Analyten kann es z.B. zu Ionen-Suppressionen und damit zu reduzierten Gehaltbestimmungen kommen. Weiterhin können Matrixkomponenten auch die Oberflächenspannung beeinträchtigen und mit den Analyten Addukte bilden. Dabei werden andere Ionen gebildet als bei Proben in organischem Lösungsmittel. So bildet der Pestizid-Standard beispielsweise $[M+H]^+$ Molekülonen, während das gleiche Pestizid in der aufgearbeiteten Matrix $[M+Na]^+$ Molekülonen bildet [102]. Matrixeffekte können auch zu gegenteiligen Effekten führen (Signalverstärkung), d.h. auch erhöhte Ionenausbeuten konnten bei Anwesenheit von Störmatrixen bereits festgestellt werden [103]. Hemmerling et al. hat die Beobachtungen der Peaksuppression sowie der Signalverstärkung im Rahmen seines Multimethodenvergleiches bei allen drei Multimethoden (DFG S 19, QuEChERS und BfR-Methode) festgestellt. Dabei konnte er zeigen, dass der Matrixeinfluss bei höheren Konzentrationen schwächer in Erscheinung tritt, da das Signal des gesuchten Analyten entsprechend stärker auftritt:

Tabelle 5: Einfluss der Matrix auf die Peakverstärkung (Hemmerling et al. [20])

Wirkstoff	Wiederfindung (Dotierung: 0,01 mg/kg)	Wiederfindung (Dotierung: 0,1 mg/kg)
Buprofezin	168 %	111 %
Pirimiphos-ethyl	176 %	147%
Propagit	174 %	128 %
Trifloxystrobin	184 %	158 %

Vergleichbare Effekte für Peaksuppressionen stellt Hemmerling et al. gleichermaßen dar, und auch hier nimmt der Matrixeffekt bei höheren Konzentrationen ab [20].

Im zweiten Teil der Hemmerling-Trilogie [21] wird im Rahmen einer Interlaborstudie am Beispiel von Pirimicarb und Cyprodinil die Ursache für einen auffällig hohen Befund dieses Wirkstoffes bei der Methode DGF S 19 im Vergleich zur QuEChERS- und BfR-Methode

herausgearbeitet. Während im BfR- und QuEChERS-Extrakt die coeluiierende Matrix ähnlich klein ist, wird die Pirimicarb-Elution im DFG S 19-Extrakt durch einen großen Matrixpeak gestört:

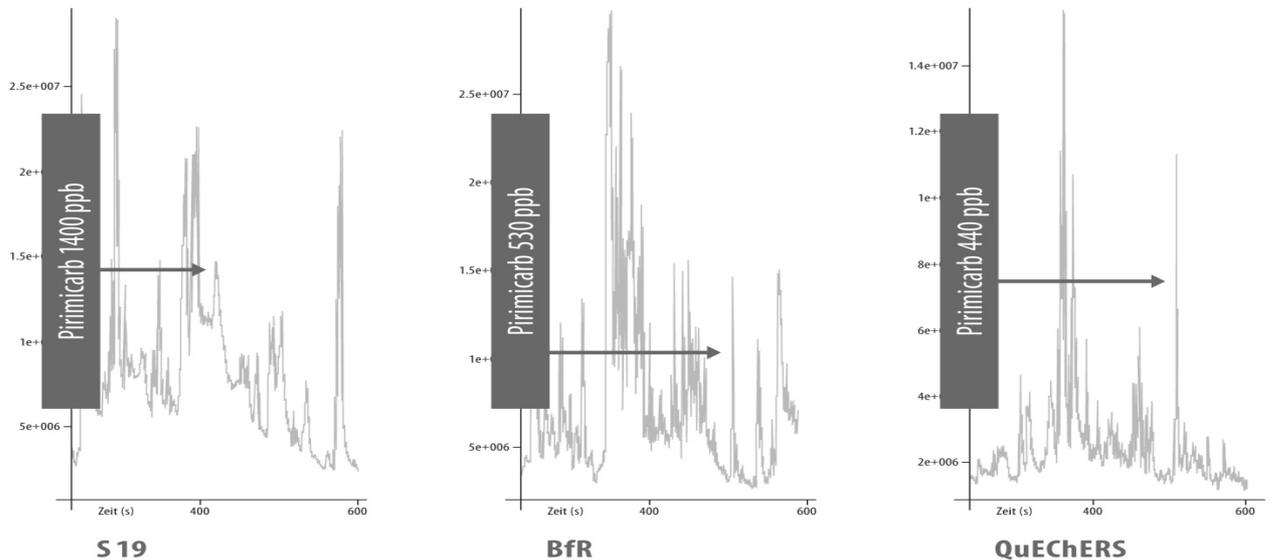


Abb. 15: Elutionsbereich von Pirimicarb in der Matrix Süßkirsche [21]

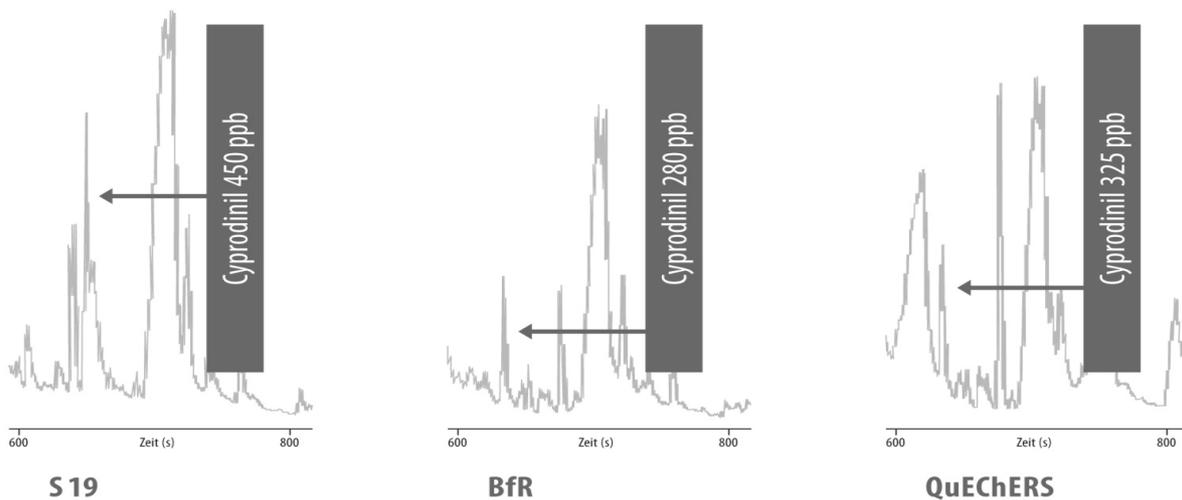


Abb. 16: Elutionsbereich von Cyprodinil in der Matrix Johannisbeere [21]

Schließlich führt ein wenig gereinigter Probenextrakt zu einer zusätzlichen Belegung der Trennsäule (hier: GC) und damit zu einer erheblichen Verschiebung der Retentionszeit. Eine Identifizierung des Wirkstoffes anhand herkömmlicher Mittel (Retentionszeittabellen,

Ionenspur im SIM-Fenster) würde zu einer Fehlinterpretation und somit zu einem falsch-negativen Befund führen:

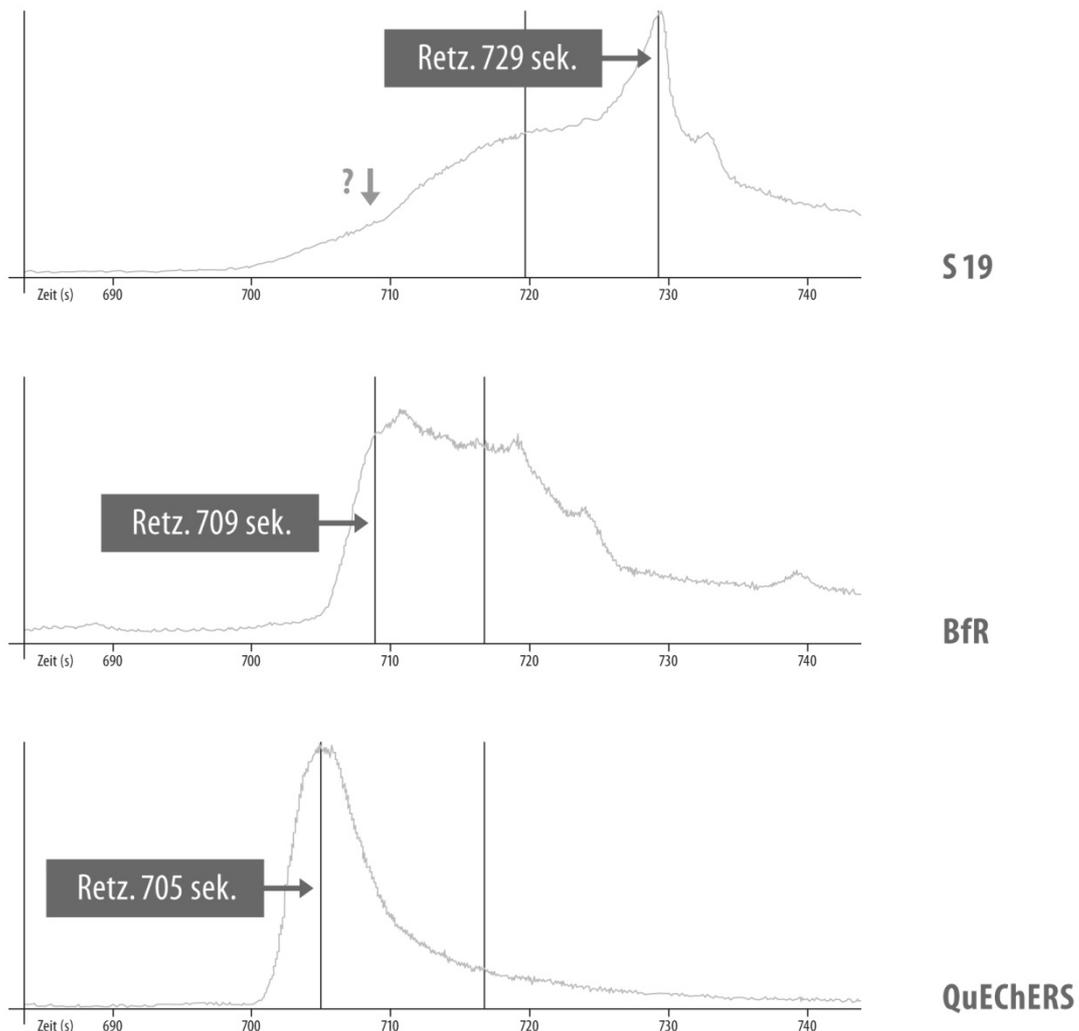


Abb. 17: Retentionszeitverschiebungen von 20 µg/kg Mepanipyrim in Gurke [21]

Zur Reduzierung des Matrixeffektes bei der Quantifizierung werden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Neben einer effektiven Probenaufreinigung sowie Analytanreicherung durch die einzelnen Module der Multimethoden wird der Matrixeffekt darüber hinaus durch nachfolgende Verfahren simuliert und somit abgeschätzt:

- Standardaddition [100]: Hierbei wird das Signal der Probe gemessen, anschließend wird eine bekannte Menge des zu quantifizierenden Analyten zugegeben (Standardaddition), und die Probe wird erneut gemessen. Die zu erwartende Konzentration der Analyten in der Probe muss bekannt sein, weil die Konzentration des addierten Mischstandards in demselben Konzentrationsbereich liegen sollte, um

möglichst reale Bedingungen zu schaffen. Dieses Verfahren ist arbeitsaufwendig und wird durch die Komplexität insbesondere bei der Anwendung von Multimethoden (unterschiedliche Pestizide mit unterschiedlichen Bestimmungsgrenzen je nach Matrix) erschwert.

- Externe Matrixkalibrierung [100]: Der Extrakt einer unbelasteten Probe wird in Analogie zur Probe aufgearbeitet und mit den Kalibrierlösungen versetzt. Die aufgearbeitete Matrix des „Blanks“ beinhalten im besten Fall identische Matrixkomponenten wie die unbekannte Probe. Die Matrixeffekte betreffen dadurch die Analyten im Kalibrierstandard und die Analyten in der Probe gleichermaßen, was zu richtigen Ergebnissen führt. Die Methode ist zeit- und arbeitsaufwendig, wird jedoch in der Pestizidanalyse häufiger eingesetzt [10, 102].
- Quantifizierung über interne isotope markierte Standards [96]: Als interne Standards werden ¹³C- oder ²D-markierte Wirkstoffe verwendet. Die Matrixeffekte werden dadurch nicht verhindert, sie beeinflussen aber die nativen und markierten Substanzen gleichermaßen und können somit effektiv simuliert werden. Verluste, die während der Aufarbeitung auftreten, werden durch die Berechnung der Ergebnisse über isotope markierte interne Standards genau ausgeglichen.

Alle drei beschriebenen Verfahren stellen in der Routineanalytik einen erhöhten Aufwand dar (Kosten z.B. für (isotope markierte) Standards sowie erhöhter Zeitaufwand durch Wiederholanalysen und zusätzliche Aufarbeitung von „Blank“-Proben). Weiterhin ist nicht jeder Wirkstoff als isotope markierter Standard erhältlich. Insofern sind zwar Möglichkeiten gegeben, die vielfältigen Matrixeinflüsse zu reduzieren. Ihr Einsatz in der Laborroutine ist deswegen jedoch nicht sichergestellt.

Mit der Etablierung der Multimethode nach QuEChERS wurde auch ein neuer Ansatz aufgegriffen, der insbesondere im Bereich der Gaschromatographie die Reduzierung des Matrixeffektes zum Ziel hat: Durch die Zugabe von so genannten „Analyte Protectants“ (AP) [104] zum Probenextrakt soll der Matrixeffekt nivelliert werden. Das Prinzip der Analyte Protectants basiert auf der Annahme, dass Matrixmoleküle so genannte „aktive Stellen“ in der Trennsäule / Liner (z.B. Siloxane oder abgelagerte Matrixbestandteile) blockieren, wodurch die Analyten nicht mehr mit diesen wechselwirken können und ihre Peaks dementsprechend weniger zum Tailing neigen und saubere sowie größere Signale im Chromatogramm zeigen (matrixinduzierte Peakvergrößerung). Sind keine Matrixbestandteile anwesend (z.B. in einer Standard-Kalibrierlösung, in der der Standard des Analyten nur im Lösungsmittel vorliegt), so

tritt dieser Matrixeffekt nicht ein, das Signal wird kleiner und der Peak tailt. Bei Verwendung von Kalibrierstandards in reinem Lösungsmittel führt dies bei der Quantifizierung der Analyten deshalb zu Fehlern. Analyte Protectants sind Substanzen, die mit aktiven (freien) Stellen im Gaschromatographen in Wechselwirkung treten und diese weitestgehend blockieren, so dass die Analyten geschützt werden und einen schärferen ggf. auch größeren Peak frei von Peak-Tailing im Chromatogramm zeigen. Durch die Zugabe von Analyte Protectants zur Probelösung und Kalibrierlösung (in reinem Lösungsmittel) werden die Matrix-Effekte sowie die der Analyte Protectants nivelliert [104, 105]. Der beste Schutz wurde mit Polyhydroxy-Verbindungen wie Zucker und Zuckerderivaten erzielt [104]. Weiterhin wird auch der Ansatz optimaler AP-Kombinationen verfolgt [106].

3.3.2 Die Multimethode L 00.00–115 (QuEChERS)

Aufgrund der geringen Probeneinwaage von 10g (Risiko von Inhomogenität) wird die Probe im tiefgekühlten Zustand unter Zugabe von Trockeneis homogenisiert. Die Extraktion erfolgt mit Acetonitril unter Zugabe von Salzen und einem Zitratpuffer. Die Extraktaufreinigung wird mit einer dispersiven SPE mit primärer und sekundärer Aminfunktion (PSA) zur Entfernung von insbesondere Zuckern und organischen Säuren vorgenommen. Aufgrund der alkalischen Eigenschaften des PSA sollen eventuell enthaltene alkali-labile Pestizide durch Säurezugabe vor Abbau geschützt werden. Die Konzentration des Probenextraktes beträgt 1,0g/ml. Dieser wird schließlich instrumentell analytisch (z.B. GC- und LC-Trennung/MS-Detektion) vermessen:

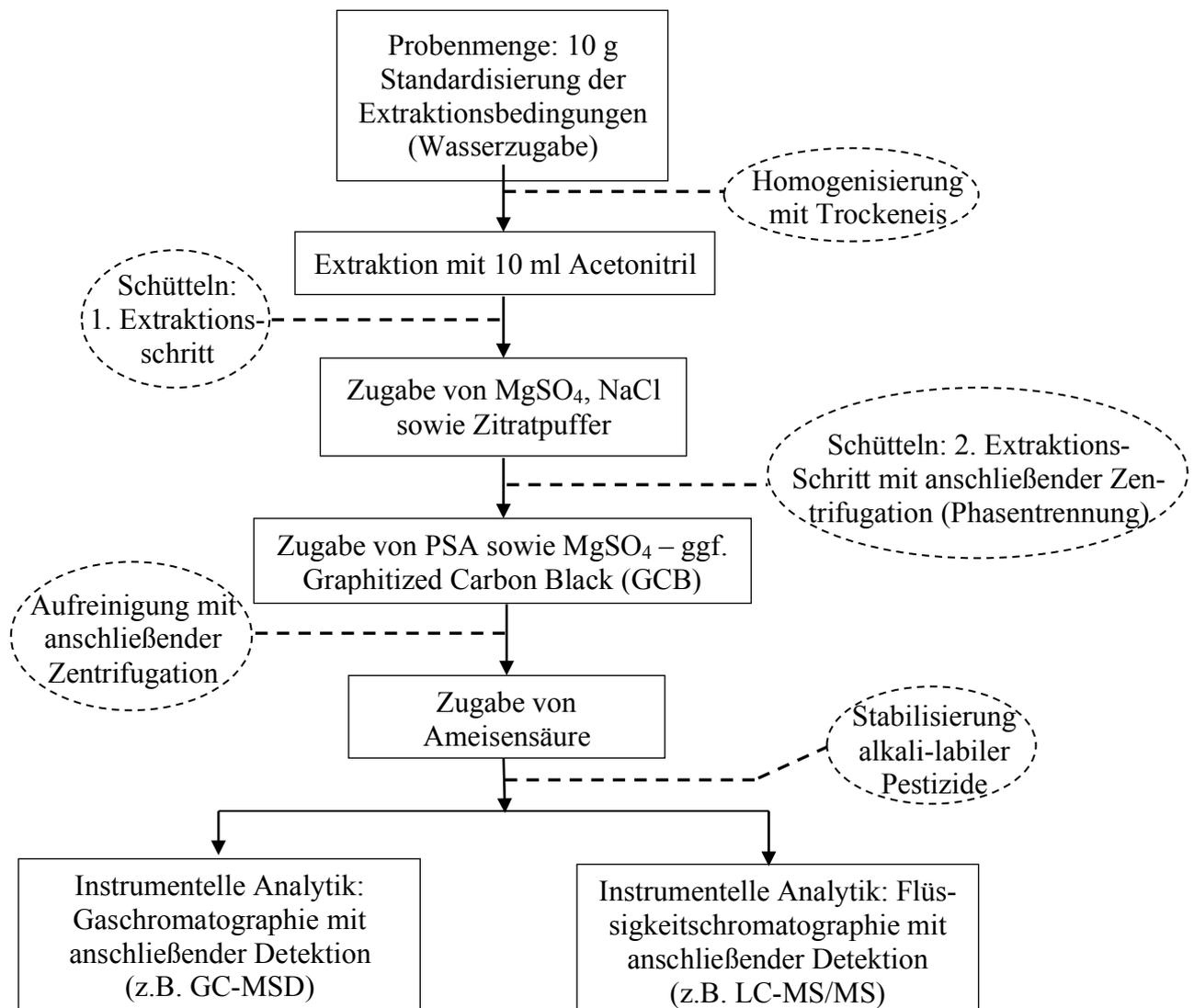


Abb. 18: Ablaufschema der Multimethode L 00.00-115 (QuEChERS, [10])

Aufgrund der geringen Probeneinwaage wird in der Methodenvorschrift darauf hingewiesen, die Variabilität (zufällige Abweichung von Werten um einen Mittelwert [13]) zu überprüfen, indem man mehrere Sub-Proben des gleichen Ausgangsmaterials untersucht und die Abweichungen entsprechend überwacht [10]. Die Methodenvorschrift weist auch darauf hin, dass Pestizide mit bestimmten Eigenschaften unter den Randbedingungen der Methode nicht erfasst werden können, weshalb alternative Vorgehensweisen beschrieben werden:

- Phenoxyalkancarbonsäuren (z.B. Fluazifop, Bromoxynil): Da diese mit dem PSA reagieren, sind sie in dem NICHT aufgereinigten Extrakt, d. h. nach der 1. Zentrifugation des Rohextraktes zu überprüfen.
- Der Zitratpuffer erreicht i. d. R. einen pH-Wert Bereich von 5-5,5. Dieser stellt einen Kompromiss dar, um einerseits alkali-labile Pestizide (z.B. Captan, Folpet) vor Abbau zu schützen, und um andererseits säure-labile Wirkstoffe (z.B. Pymetrozin, Dioxacarb) in einem leicht säuerlichen pH-Bereich noch stabilisieren zu können. Sofern die Matrix selbst saure Eigenschaften aufweist (z.B. Zitronen), ist davon auszugehen, dass durch die Zitratpuffer-Zugabe der pH-Wert auf einen Bereich $< \text{pH } 3$ fällt, so dass durch eine entsprechende Zugabe von Natronlauge diesem Effekt entgegengewirkt werden soll.
- Wachse und Fette, die entsprechende Proben (z.B. mit Wachs behandelte Zitrusfrüchte) enthalten, können durch Ausfrieren vor oder nach der PSA-Aufreinigung entfernt werden, um die Robustheit der Methode nicht zu gefährden. Weiterhin können Fette auch durch Zugaben von Sorbentien (basierend auf C18- sowie C8-Umkehrphasen) im Rahmen der PSA-Aufreinigung entfernt werden.
- Für Proben, die reich an Carotinoiden (z.B. Paprika, Karotten) oder Chlorophyll (z.B. Spinat, Salat) sind, soll bei der Aufreinigung ein „Kombinations“-Sorbens aus PSA sowie Graphitized Carbon Black (GCB=graphitisierter Kohlenstoff) verwendet werden, um die entsprechende Störmatrix zu entfernen. Hierbei werden allerdings auch planare Pestizide (z.B. Coumaphos, Thiabendazol, Quintozen) aus dem Extrakt entfernt.
- Durch die PSA-Zugabe erhöht sich der pH-Wert kurzzeitig auf $\text{pH} > 8$, so dass die Stabilität von alkali-sensitiven Pestiziden (z.B. Captan, Folpet, Dichlofluanid sowie Chlorothalonil) gefährdet wird. Deshalb sollte durch Zugabe von Ameisensäure der pH-Wert auf 5 herabgesetzt werden. In diesem pH-Wert-Bereich kann jedoch die Stabilität der säure-labilen Pestizidgruppen (z.B. der Sulfonyl-Harnstoffe, Carbosulfa-

ne und Benfuracarb) nicht sichergestellt werden, weshalb empfohlen wird, einen nicht mit Ameisensäure behandelten Extrakt auf diese Wirkstoffe zu untersuchen.

- Um die erforderliche Sensitivität (Empfindlichkeit) der Analytik sicherstellen zu können, werden im Bereich der GC-Analytik so genannte PTV (Programmed Temperature Vaporizer) Einlasssysteme empfohlen, weil dadurch das Injektionsvolumen des Probenextraktes (1g/ml) mindestens verdreifacht werden kann (Injektionsvolumen $\geq 3\mu\text{l}$ – statt $1\mu\text{l}$).

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die Multimethode nach QuEChERS – im Vergleich zu der Multimethode DFG S 19 – mit deutlich weniger Aufwand betrieben werden kann. Allerdings ist auch die QuEChERS Methode ein analytischer Kompromiss. So erfordern beispielsweise alkali-sensitive sowie säure-labile Pestizide eine gesonderte Extraktreinigung, da die Stabilität der Pestizide andernfalls gefährdet ist, was das Risiko falsch-negativer Analyseergebnisse deutlich erhöht. Die Verwendung von GCB kann zur Entfernung planarer Pestizide führen.

3.3.3 Die Multimethode L 00.00–113 (BfR-Methode)

Aufgrund der geringen Probeneinwaage von 10g (Risiko von Inhomogenitäten) wird auch hier die Zugabe von Trockeneis zur tiefgekühlten Probe bei der Homogenisierung empfohlen. Die anschließende Extraktion erfolgt nach Standardisierung der Extraktionsbedingungen (Wasserzugabe) mit Methanol. Die Extraktreinigung wird durch Solid Supported Liquid Extraktion (SLE) vorgenommen. Der Analyt verteilt sich hierbei zwischen der wasserhaltigen Probe und einem (mit Wasser nicht mischbaren) organischen Lösungsmittel (in Analogie zur Flüssig/flüssig-Extraktion). Der wässrige Probenextrakt wird auf trockene Diatomeenerde (Kieselgur) gegeben. Diatomeenerde wird aus Ablagerungen abgestorbener Kieselalgen (Diatomeen) gewonnen, calciniert (gebrannt), gesiebt und in Fertig-Kartuschen (ChemElut) zur Verfügung gestellt. Die Wasserphase verteilt sich auf dem inerten Trägermaterial und stellt die flüssige stationäre Phase dar. Die Elution erfolgt mit dem organischen (mit Wasser nicht mischbaren) Lösungsmittel Dichlormethan. Die lipophilen Analyten gehen in die organische Phase über, und die Wasserphase bleibt auf der Diatomeenerde, so dass der Extrakt frei von Wasserspuren bleibt. Der Extrakt wird schonend eingeeengt, mit Stickstoff bis zur Trockene abgeblasen und in geeigneten Lösungsmitteln (z.B. Methanol) im Ultraschallbad gelöst. Ziel ist es, eine Konzentration des Probenextraktes von etwa 1,0g/ml zu erhalten. Dieser wird schließlich instrumentell analytisch (z.B. GC und LC Trennung / MS-Detektion) vermessen:

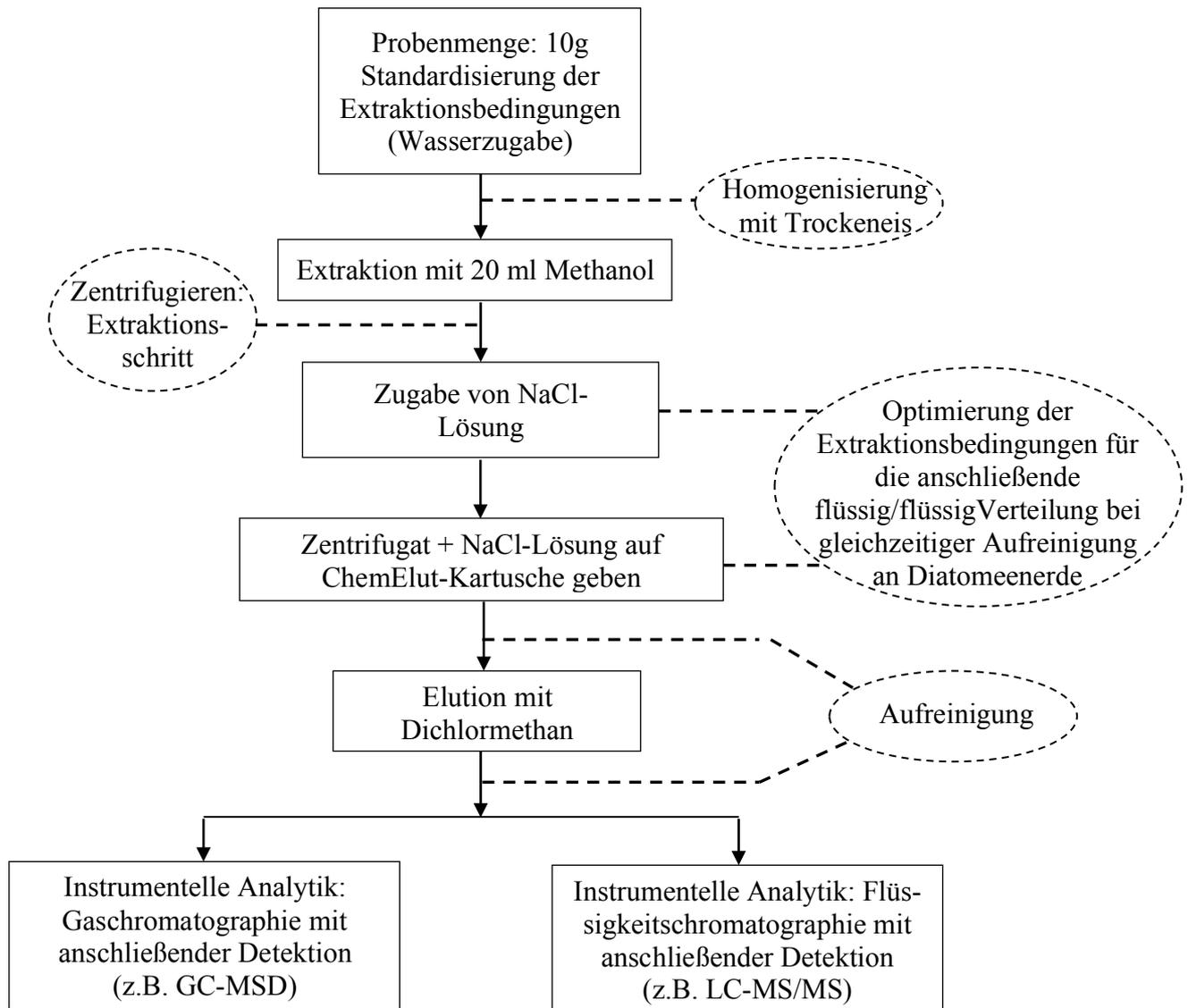


Abb. 19: Ablaufschema der Multimethode L 00.00–113 (BfR-Methode [9])

Die BfR-Methode stellt eine vereinfachte, weniger zeitaufwendige Alternative für Multimethoden dar. Auch wenn toxikologisch unerwünschte chlorierte Lösungsmittel zum Einsatz kommen, hat sich die BfR-Methode insbesondere in Deutschland etabliert. Diese Multimethode hat ebenfalls zum Ziel, in einem Arbeitsgang möglichst viele Wirkstoffe nachweisen zu können, was sie zu einem analytischen Kompromiss macht. So führt die Methanol-extraktion von fetthaltigen Lebensmitteln (z.B. Nüsse) bei unpolaren Pestiziden zu schlechten Ausbeuten [20]. Weiterhin kann die Stabilität saurer Verbindungen (z.B. Fluazifop) nur durch eine modifizierte Extraktreinigung erfolgen, bei der die Diatomeenerde gepuffert wird (auf etwa pH 4,5) [20].

3.3.4 Multimethoden im Vergleich: DFG S 19, QuEChERS und BfR-Methode

Der Trend zu immer schnelleren und kostengünstigeren Multimethoden hat dazu geführt, dass die analytische Qualität und die Vergleichbarkeit etablierter Multimethoden für Pflanzenschutzmittelrückstandsanalytik immer öfter in der Kritik stehen [20]. Der Verzicht auf umfangreiche Extraktreinigungen führt überdies zu der Frage, inwieweit die Extraktaufreinigung Einfluss auf das Analysenergebnis hat – oder ob der Matrixeinfluss eventuell überschätzt wird. Die Hemmerling-Trilogie [21, 22, 23] hat sich intensiv mit diesen Fragen beschäftigt und die in dieser Arbeit beschriebenen Multimethoden einem Vergleich unterzogen. Als Beurteilungskriterium für die Validität der Methoden wurde die Wiederfindung herangezogen. Wirkstoffe, die entsprechend der Anforderungen des „Document No. SANCO/10684/2009“ [15] Raten von 70-120% zeigten, wurden als zufriedenstellend bewertet. Gehalte, die mit Wiederfindungsraten von < 70% bzw. > 120% berichtet wurden, wurden als unbefriedigend beurteilt. Da die Ergebnisse der Studie durch die individuellen Analysebedingungen des Labores (GC-MS-TOF Pegasus II, LC-MS/MS Quattro LC Alliance 2695, Temperaturprogramm, Gradient, Säule, Injektionsbedingungen etc.) im Einzelfall beeinflusst wurden, werden die allgemein abgeleiteten Erkenntnisse zusammengefasst:

1. Es gibt keine Idealmethode (Multimethode = analytischer Kompromiss).
2. Alle Methoden liefern neben sehr guten auch einige falsche Ergebnisse, die auf Matrixeffekte zurückgeführt werden.
3. Auch Messungen mit hochselektiven Massenspektrometern garantieren nicht ein richtiges quantitatives Ergebnis, da das zu integrierende Signal bereits durch Matrixeffekte verfälscht sein kann (nur man sieht es nicht!).
4. Eine Kalibrierung auf einem Matrixextrakt ist die Mindestanforderung. Sie ist aber nicht immer ausreichend.
5. Die Analytik homogener Proben mit gewachsenen Rückständen führt zu Abweichungen der berichteten Ergebnisse bis zu einem Faktor von 10.

Die gewonnenen Erkenntnisse führen zu der Frage nach einer sinnvollen Laborkompetenz-Bewertung. Wie kann ein Labor seine tatsächliche Laborkompetenz transparent-kommunizierbar darstellen? Inwieweit werden die analytischen Herausforderungen der Multimethoden bei der Kompetenzbewertung berücksichtigt, um nachhaltiges Vertrauen und Glaubwürdigkeit in die Analytik zu schaffen? Welche Zwänge nehmen darüber hinaus durch die Tagesroutine Einfluss auf die analytische Laborleistung?

3. 4 Etablierte Systeme zur Bewertung der Laborkompetenz

Die Akkreditierung eines Labores nach der Norm ISO/IEC 17025:2005 [11] ist als maßgebliche Voraussetzung für kompetente Analytik anerkannt. Akkreditierungen werden in Deutschland von der Deutschen Akkreditierungsstelle GmbH (DAkkS) durchgeführt, die eine „Akkreditierung“ wie folgt versteht [107]: „*Entsprechend der Definition in der DIN EN ISO/IEC 17000 ist Akkreditierung die Bestätigung durch eine dritte Seite, die formal darlegt, dass eine Konformitätsbewertungsstelle die Kompetenz besitzt, bestimmte Konformitätsbewertungsaufgaben durchzuführen.*“

Ein zentrales Element der Akkreditierungsanforderungen ist auch die Teilnahme der Labore an so genannten Eignungsprüfungen / Ringversuchen. Das Bestehen eines Labores bei derartigen Prüfungen hat auch im privatwirtschaftlichen Sektor deutlich an Bedeutung gewonnen [5]. Da sich Eignungstests / Ringversuche in ihrem Design und ihrer Zielsetzung („fit for purpose“) deutlich voneinander unterscheiden, wird auf diese Anforderung detailliert eingegangen.

3.4.1 Akkreditierungsanforderungen für Multimethoden

Neben formalen Aspekten wie z.B. Definitionen und Begriffsbestimmungen sowie Literaturhinweisen werden auch konkrete Anforderungen formuliert, die das Labor umsetzen muss, um die Akkreditierung für die jeweilige Multimethode zu erhalten:

Validierungen

Ziel einer Validierung ist es, den nachvollziehbaren Nachweis zu erbringen, dass die „Prüfungsaufgabe“ erfüllt werden kann [13]. Übertragen auf den Bereich der Pestizidanalytik von Lebensmitteln durch die Anwendung von Multimethoden, bedeutet eine Validierung, dass das Labor durch transparente Nachweise zeigen kann, dass es eine Vielzahl (i. d. R. mehrere Hundert) von Pestiziden mit unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften in den vom Labor analysierten Lebensmitteln / -gruppen sicher und zuverlässig bestimmen kann. Es muss belegen können, dass die Methoden unter Einhaltung der *Validierungskriterien* intern beherrscht werden.

Validierungskriterium: „Selektivität“

Die Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren [108, 109]. Eine Analysenmethode ist *selektiv*, wenn ein ermitteltes Analyseergebnis

unabhängig ist von der Anwesenheit von möglicherweise erwarteten Begleitstoffen (Pestizide, Matrix etc.).

Validierungskriterium: „Spezifität“

Unter Spezifität versteht man die Fähigkeit, eine Substanz (oder Substanzklasse) ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren [108, 109].

Validierungskriterium: „Präzision“

Die Präzision beschreibt die zufällige Abweichung von Werten um einen Mittelwert. Man unterscheidet zwischen

- Wiederholpräzision mit festgelegten Wiederholbedingungen: gleiche Probe, gleiches Gerät, gleiche Standardlösungen, kurze Zeitfenster für die Durchführung der jeweiligen Analysen etc. Auf Englisch: Repeatability bzw. within-laboratory precision.
- Laborpräzision: Wiederholungen der Bestimmung in einem Labor an derselben Probe unter wechselnden Bedingungen (unterschiedliche Geräte, unterschiedliche Standardlösungen / Reagenzien, längere Zeitfenster für die Durchführung der jeweiligen Analysen etc.). Auf Englisch: Intermediate precision.
- Vergleichpräzision: Die Bestimmungen werden unter wechselnden Bedingungen durchgeführt („Vergleichsbedingungen“: z.B. Messung von Ringversuchsproben in unterschiedlichen Laboratorien). Auf Englisch: Reproducibility bzw. total between-laboratory precision.

Die Abweichung der Werte kann als Standardabweichung oder prozentuale relative Standardabweichung RSD% (Relative Standard Deviation; auch Variationskoeffizient genannt) angegeben werden. Sie ist ein zentrales Messinstrument für die Beurteilung von Messergebnissen.

Zum besseren Verständnis statistischer Größen

Für das Verstehen statistischer Größen (wie z.B. der Standardabweichung), die für die Beurteilung der Laborkompetenz herangezogen werden, ist zwischen einer Grundgesamtheit und einer Stichprobe zu unterscheiden. Die Grundgesamtheit ist die gesamte Menge aller Elemente eines untersuchten Systems (z.B. Befragung aller Raucher der Bundesrepublik zu ihrem Zigaretten-Konsum pro Tag) – wohingegen eine Stichprobe nur eine Auswahl der Grundgesamtheit darstellt (z.B. nur 100 Raucher aller Raucher der Bundesrepublik). Die Grundgesamtheit ist üblicherweise unendlich groß, da die Grundgesamtheit die Menge aller möglichen Messungen umfasst (eine Probe kann 1 Mal, ... 10 Mal, ... 100 Mal, 101 Mal,... vermessen werden). Die Normalverteilung ist in diesem Zusammenhang in der analytischen

Chemie von großer Bedeutung, da sie sich aus praktischen Erfahrungswerten herleitet, und weil die Verteilung mehrerer / vieler Messungen (z.B. 10-malige Messung von Orangenhomogenat mit einem dotierten Gehalt von 20 ppb Chlorpyrifos-ethyl) i. d. R. der Normalverteilung (die als Verteilung der Grundgesamtheit verstanden werden kann) folgt – entsprechend des zentralen Grenzwertsatzes: *[...] eine Summe von vielen unabhängigen, beliebig verteilten Zufallsvariablen gleicher Größenordnung [ist] annähernd normalverteilt, und zwar umso besser angenähert, je größer ihre Anzahl ist. [...]* Die Zufallsvariable kann z.B. ein Messwert der oben beispielhaft aufgeführten 10-maligen Messungen des Chlorpyrifos-ethyl im Orangenhomogenat sein.

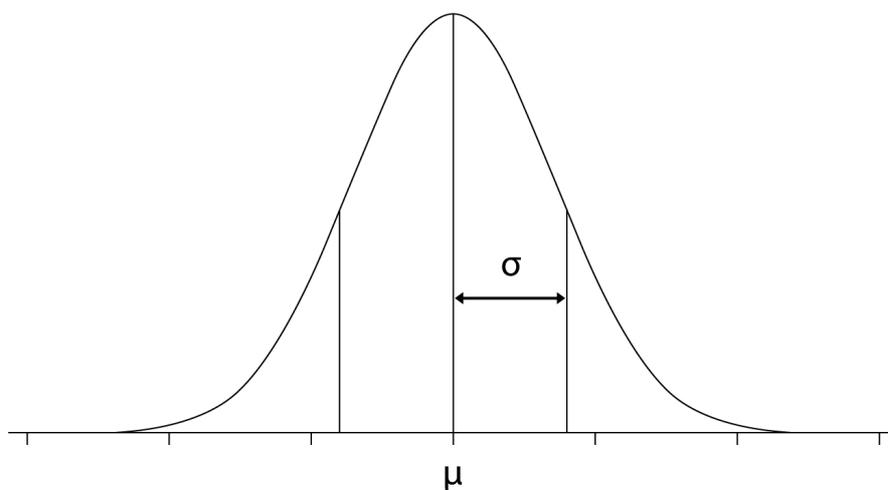


Abb. 20: Normalverteilung: Mittelwert μ sowie Standardabweichung σ

Aus der Normalverteilung kann abgeleitet werden, dass sich alle Werte symmetrisch um den Wert μ verteilen. Darüber hinaus ist die Häufigkeit der Werte am Punkt μ am größten und nimmt in beide Richtungen gleichmäßig ab. Der Abstand zwischen dem Wert der größten Häufigkeit (= Mittelwert der Grundgesamtheit = μ) und dem Wendepunkt (die 2. Ableitung der Normalfunktion = 0; bzw. der Punkt, an dem sich die Kurve von der konvexen zur konkaven Form ändert – und umgekehrt) ist die Standardabweichung der Grundgesamtheit σ . Die Standardabweichung „s“ einer Stichprobe nähert sich mit zunehmender Größe der Stichprobe der Standardabweichung der Grundgesamtheit „ μ “ an.

Die Standardabweichung (s) einer Stichprobe wird wie folgt errechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}} \quad (6)$$

n = Anzahl der Messwerte

x = ein Messwert von insgesamt n Messwerten

\bar{x} = Mittelwert der Stichprobe

Sofern eine Grundgesamtheit Basis der Statistik ist, errechnet sich die Standardabweichung als:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x-\mu)^2}{n}} \quad (7)$$

Die Fläche unter der Normalverteilungskurve kann als Wahrscheinlichkeit verstanden werden. Die Gesamtfläche unter der Kurve ist auf „1“ (= 100%) normiert. Wenn X eine beliebige, zufällige Messgröße ist, so entspricht die Wahrscheinlichkeit (P), dass X zwischen den Werten $\mu - \sigma$ und $\mu + \sigma$ (also $\mu \pm \sigma$) liegt, der Fläche unter der Kurve zwischen $\mu - \sigma$ und $\mu + \sigma$:

$$P(a \leq X \leq b) = \int_{\mu-\sigma}^{\mu+\sigma} f(x) dx \quad (8)$$

Wobei $f(x)$ gleich der Funktion entspricht, die die Normalverteilung beschreibt. In dem konkreten Fall erhält man den Wert 0,6872 (~68%). Somit ergeben sich weitere Eigenschaften aus der Normalverteilung:

In $\mu \pm 1\sigma$ liegen 68,27%
 in $\mu \pm 2\sigma$ liegen 95,45%, und
 in $\mu \pm 3\sigma$ liegen 99,9% aller Messwerte

bzw. anders berechnet:

In $\mu \pm 1,96\sigma$ liegen 95 %,
 in $\mu \pm 2,58\sigma$ liegen 99 %, und
 in $\mu \pm 3,29\sigma$ liegen 99,9 % aller Messwerte.

Der aus einer Stichprobe ermittelte Mittelwert (\bar{x}) sowie die nach wiederholten Messungen bestimmte Standardabweichung s (z.B. Mehrfach-Bestimmung im Rahmen von Validierungsmessungen) sind lediglich Schätzwerte für die wahren Werte μ und σ . Eine Angabe in der Form $\bar{x} \pm s$ ist bei Messwerten deshalb irreführend. Aus diesem Grund wurde ein anderer Parameter für die Eigenschaft einer Messung eingeführt, die den zusätzlichen Fehler berücksichtigt, der daraus resultiert, dass nur (kleine) Stichproben vorliegen. Dieser Parameter ist der so genannte Vertrauensbereich, der das Intervall definiert, in dem sich der wahre Wert mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit befindet. In dem „Document No. SANCO/10684/2009“ [15] ist dieser Vertrauensbereich als „erweiterte Messunsicherheit“ definiert worden.

Validierungskriterium: Messunsicherheit

Die Messunsicherheit ist ein dem Messergebnis zugeordneter Parameter, der die Streuung der Werte kennzeichnet, die vernünftigerweise der Messgröße zugeordnet werden könnte [111]. Messungen sind Unzulänglichkeiten unterworfen, die nicht eindeutig quantifiziert werden können. Ursachen hierfür können zufällig sein, wie beispielsweise kurzzeitigen Schwankungen der Temperatur, der Feuchtigkeit und des Luftdruckes der Umgebung. Die Leistungsfähigkeit des Analytikers hat einen starken Einfluss auf die Messunsicherheit – ebenso wie systematische Effekte, die darüber hinaus nicht immer exakt korrigiert werden können oder sogar nicht bekannt sind.

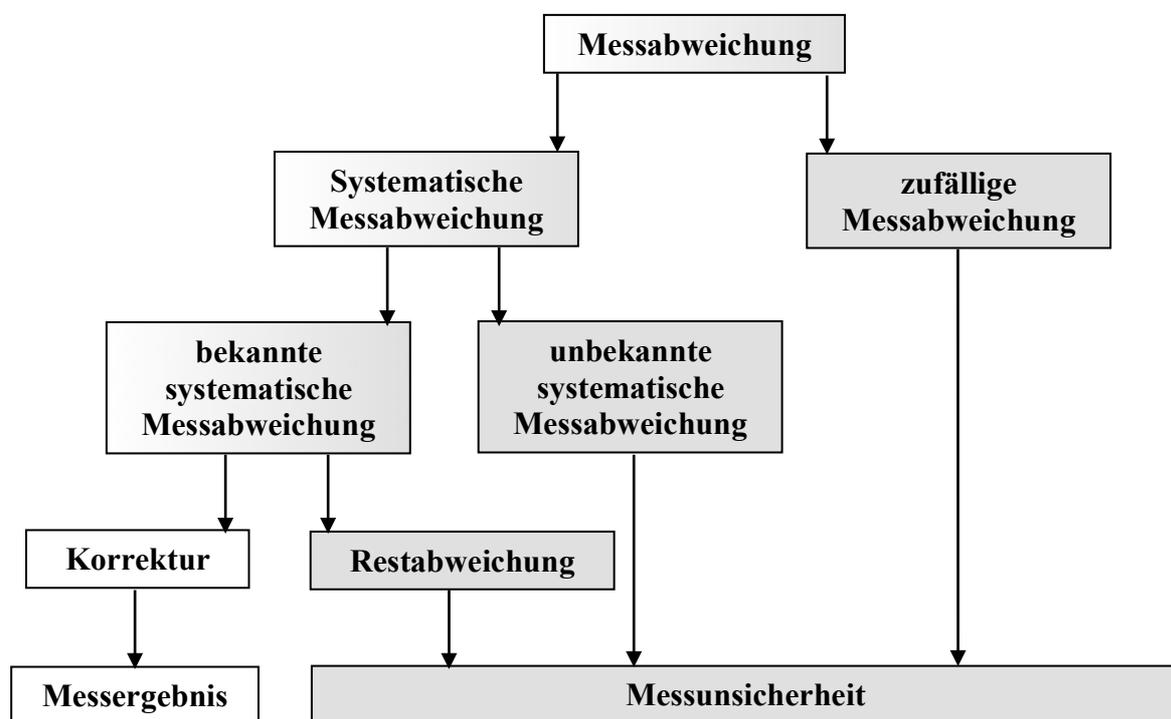


Abb. 21: Einflüsse auf die Abweichungen bei der Ermittlung von Messergebnissen [112]

Die Messunsicherheit resultiert aus experimentell bestimmten Unsicherheiten und / oder geschätzten Unsicherheiten. Sie muß das gesamte Prüfverfahren umfassen. Bezieht sich ein Ergebnis auf eine homogenisierte Probe, umfasst die Messunsicherheit nur den analytischen Teil (und nicht mehr den präanalytischen Teil wie z.B. Probenahme, Transport, Lagerung und Zerkleinerung / Homogenisierung). Die Messunsicherheit kann experimentell ermittelt werden, indem z. B. potentielle Unsicherheitsquellen identifiziert und gewichtet werden, der Beitrag der Präzision zur Messunsicherheit und Richtigkeit abgeschätzt wird und die so ermittelten Daten statistisch nach ISO [113] sowie EURACHEM [114] ausgewertet werden:

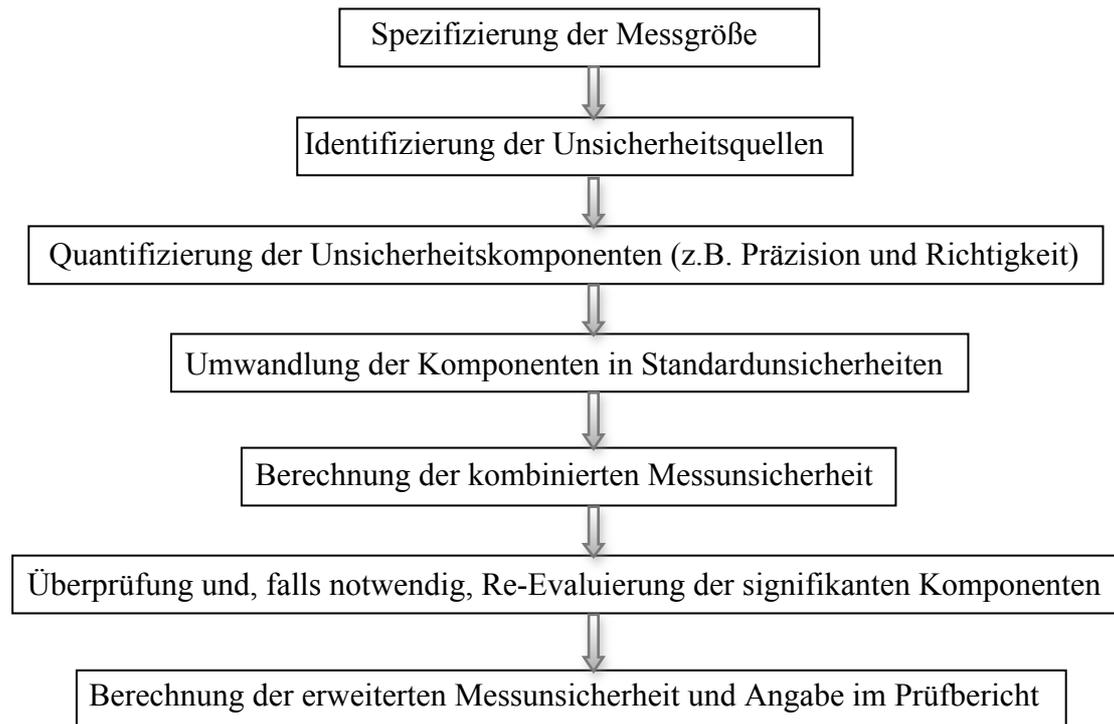


Abb. 22: Bestimmung der Messunsicherheit [113, 114]

Bei der Berechnung der kombinierten Messunsicherheit werden die bestimmten und abgeschätzten Unsicherheiten in Standardeinheiten in der Form einer Standardabweichung umgerechnet und unter Berücksichtigung der Fehlerfortpflanzung miteinander kombiniert. Für die Angabe der Standardabweichung gibt es keine einheitliche Abkürzung, weshalb in der Literatur oftmals unterschiedliche Bezeichnungen hierfür verwendet werden.

Diese Messunsicherheit (im Entwurf zur ISO 17025 [11] als „Ergebnisunsicherheit“ bezeichnet) kennzeichnet den Bereich, innerhalb dessen der wahre Wert einer Messgröße einer untersuchten Probe schätzungsweise – im Allgemeinen mit einer gegebenen Wahrscheinlichkeit – liegt. Sie soll nach dem Document No. SANCO/ 10684/2009 [15] $< 20\%$ sein. Die Messunsicherheit berücksichtigt jedoch nur diejenigen Streuungen, die innerhalb des betreffenden Labores („within-laboratory-precision“) beim Arbeiten unter Wiederholbedingungen auftreten. Der beschriebene „Bottom-up“-Ansatz (= Ansatz aus der Perspektive der Ursachen) verliert an Validität, sofern die Unsicherheiten nicht vollständig erfasst werden können bzw. bei mehrstufigen Analysenverfahren die funktionalen Zusammenhänge nicht formuliert werden können. Auch die Unkenntnis systematischer Abweichungen, die mit dem Verfahren nicht ermittelt oder abgeschätzt werden können, können durch den Bottom-up-Ansatz nicht erfasst werden. So sind z.B. die Einflüsse

- der Probenaufarbeitung und -aufreinigung auf die Stabilität der Analyten (z.B. Verhinderung des Abbaus alkali-labiler Pestizide wie Captan und Folpet durch Zugabe des Zitrat-Puffers – pH5-5,5 – bei der QuEChERS-Aufarbeitung),
- des Extraktionsmittels auf die Extraktions-Ausbeute (z.B. wird Methamidophos durch Aceton nur unzureichend extrahiert [115]),
- der Probenmatrix auf die Extraktions-Ausbeute (z.B. ist 2,4-D (=Säure) aus sauren Matrices mit gängigen Lösungsmitteln nicht extrahierbar; erst nach alkalischer Hydrolyse zeigen sich gute Extrakt-Ausbeuten von 2,4-D [116]),
- des Verlustes von polaren Analyten durch die Adsorption an Glassoberflächen (z.B. Glyphosat und Chlormequat [115]),
- des Abbaus von Analyten im GC-Liner (z.B. DDT, Captan und Dicofol [115]),
- des Abbaus von Analyten in der Trennsäule (z.B. Iprodion in GC-Säulen [115]), sowie
- Verstärkungen / Subpressionen von Signalstärken auf den Probenpeak bedingt durch Matrixeffekte [115]

extrem vielfältig und nicht von vornherein bestimmbar. Ihr Einfluss ist darüber hinaus u.a. abhängig von der Reinheit der verwendeten Reagenzien, der Sauberkeit und Art der Glassgeräte, der verwendeten Analysenmethode und der Kompetenz des Analytikers [115]. In der Praxis ist ihr Einfluss folglich nicht in Form einer standardisierbaren Messunsicherheit ermittelbar. Die auf Basis des Bottom-up-Ansatzes ermittelte Messunsicherheit ist somit lediglich als Kompromiss bzw. in Form einer Annäherung bestimmbar [15].

Ein alternativer Ansatz wurde von Horwitz eingeführt [117]. Horwitz hat bei seinen Auswertungen die Ergebnis-Streuung unter Vergleichsbedingungen ermittelt, d. h. er hat jene Streuungen gemessen die auftreten wenn identisches Probenmaterial im Rahmen von Laborvergleichsuntersuchungen von unterschiedlichen Laboratorien analysiert wird. Horwitz wollte so auch den Einfluss der Unterschiede zwischen den Laboratorien auf die Messunsicherheit ermitteln. Bei diesem so genannten „Top-down“-Ansatz (= Ansatz aus Perspektive der Ergebnisse) wird die Messunsicherheit durch einen Labor-Vergleich mit zertifizierten Referenzmaterialien ermittelt. Systematische Messabweichungen konnten somit durch zertifizierte Referenzmaterialien aus den Ringversuchen messtechnisch ermittelt werden. Horwitz hat bei der Auswertung von insgesamt 150 Labor-Vergleichstests der Association of Official Analytical Chemists (AOAC) unabhängig von den Analyten (Pestizide, Schwermetalle, Mykotoxine, Nährwerte etc.) festgestellt, dass die Messunsicherheit eine erkennbare Beziehung zum Konzentrationsniveau aufweist. Diesen Zusammenhang hat Horwitz durch

die Gegenüberstellung des Variationskoeffizienten (in %) zur Analyt-Konzentration in der so genannten „Horwitz Trumpet“ wie folgt dargestellt:

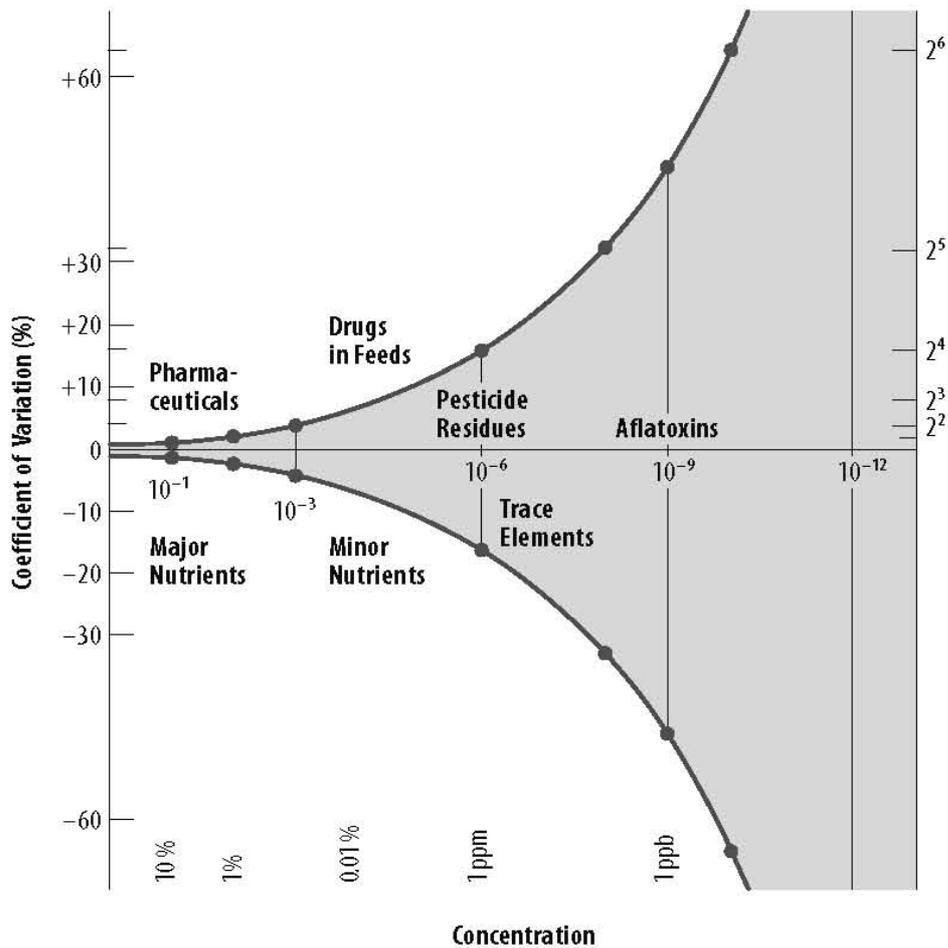


Abb. 23: Verhältnis Variationskoeffizient zu Analyt-Konzentration (Horwitz-Trompete)

Der Variationskoeffizient ist in diesem Fall der Quotient der ermittelten Standardabweichung der jeweiligen Stichproben (berichtete Ergebnisse der Ringversuchsteilnehmer aus 150 Laborvergleichstests) in Prozent. Er halbiert sich, wenn die Konzentration des Analyten um den Faktor 100 steigt. Der Variationskoeffizient beträgt etwa 20-25% der Analytkonzentration (innerhalb eines Analyt-Konzentrationsbereiches von $1\mu\text{g}/\text{kg}$ bis $10\text{mg}/\text{kg}$) in der Pestizidanalytik von Lebensmitteln [117].

Entsprechend der Bestimmungen zur Messunsicherheit [113, 114] ist die „erweiterte Messunsicherheit“ im Prüfbericht anzugeben [11]. Sie hat zum Ziel, ein Wertintervall anzugeben, das den Wert der gemessenen Größe mit hoher Wahrscheinlichkeit überdeckt. Sie entspricht dem „Vertrauensbereich“ (s. Abb. 24). Die erweiterte Messunsicherheit ergibt sich aus der Standardmessunsicherheit durch Multiplikation mit einem Erweiterungsfaktor. Je größer dieser Faktor ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit der Überdeckung bzw. desto größer ist das Vertrauen, dass der Wert der Messgröße in dem angegebenen Wertintervall liegt.

Mathematisch ausgedrückt ist der Vertrauensbereich (= Vertrauenswahrscheinlichkeit) die Fläche der Verteilungskurve zwischen den Werten $x_{links} \leq x \leq x_{rechts}$. Als Vertrauenswahrscheinlichkeit werden üblicherweise 0,95 (95%) oder 0,99 (99%) verwendet, was bedeutet, dass das Intervall (zwischen x_{links} und x_{rechts}) den wahren Wert im ersten Fall mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%, und im anderen Fall mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% überdeckt. Bei einer Überdeckungswahrscheinlichkeit von 95% ist ein Erweiterungsfaktor von 2 (in der nachfolgenden Abbildung dargestellt als „ $\pm 2\sigma_x$ “ dargestellt) zu verwenden [118, 119]. In $\mu \pm 2\sigma$ liegen insgesamt 95,45% aller Messwerte, sofern als Grundgesamtheit die Normalverteilung zugrunde gelegt wird. Dadurch erklärt sich der Erweiterungsfaktor von 2:

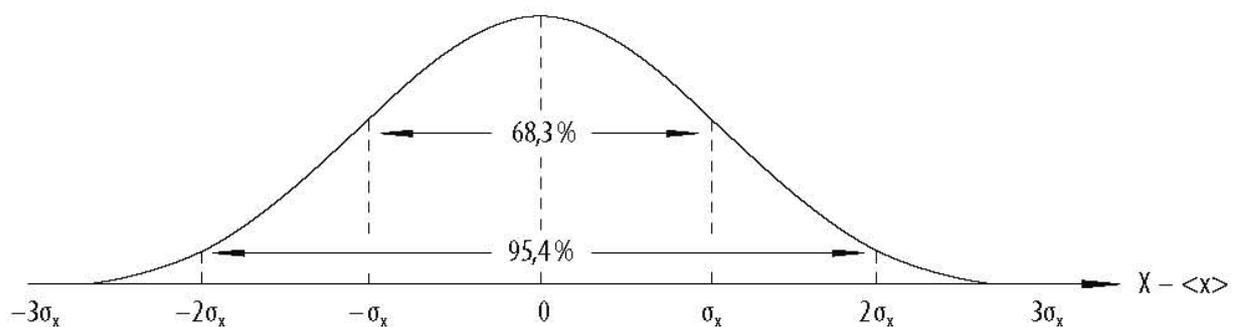


Abb. 24: Vertrauensbereich bei vorausgesetzter normalverteilter Grundgesamtheit

Der (zweiseitige) Vertrauensbereich errechnet sich nach folgender Formel (sofern die Standardabweichung der Grundgesamtheit σ nicht bekannt ist):

$$\bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

\bar{x} = Mittelwert der Stichprobe

t = t-Werte aus der Student-t-Verteilungstabelle, die dort in Abhängigkeit von Freiheitsgraden sowie für 3 Wahrscheinlichkeiten (90%, 95%, 99%) tabelliert sind. Der Freiheitsgrad ist die um eins verminderte Anzahl der Messwerte. Bei 6 Messwerten liegen so 5 Freiheitsgrade vor.

n = Anzahl der Messwerte

s = Standardabweichung der Stichprobe

In Anlehnung an das „Document No. SANCO/10684/2009“ [15], auf welches die Akkreditierungsstelle DAkkS Bezug nimmt, wird für die Analytik von Pestiziden in Lebens- und Futtermitteln eine erweiterte Messunsicherheit von 50% angenommen. Diese 50% wurden anhand von Ergebnis-Auswertungen von Laborvergleichsuntersuchungen europäischer Überwachungslabore empirisch ermittelt [15]. Dies erscheint insofern plausibel, als die

Vergleichsstandardabweichung $\hat{\sigma}_H$ (relative Standardabweichung der Vergleichspräzision) in einem Bereich von etwa 20-25% liegt, und somit in etwa der Hälfte der erweiterten Messunsicherheit entspricht.

Da sich die Vergleichsstandardabweichung auf Analysen unter wechselnden Bedingungen bezieht („between-laboratory-reproducibility“ z.B. Messung von Ringversuchsproben in unterschiedlichen Laboratorien) kann der Fall auftreten, dass ein Labor einen Messwert bestimmt, der um maximal 50% von dem Messwert eines anderen Laboratoriums (was die gleiche Ringversuchsprobe untersucht hat) abweicht; beide Labore haben aber dennoch unter Berücksichtigung des Einflusses von Unsicherheiten unter Vergleichsbedingungen im Rahmen der erweiterten Messunsicherheit noch vergleichbare Befunde berichtet. Dies ist unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit bei einem Vergleich der Werte wie folgt herzuleiten:

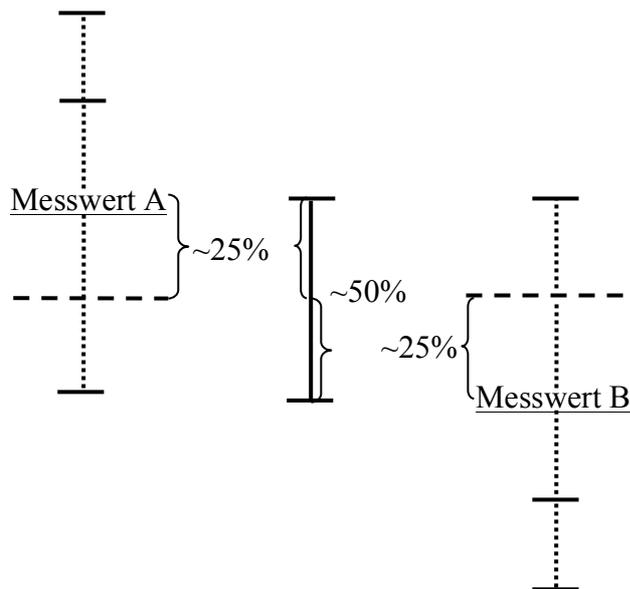


Abb. 25: Verhältnis der Vergleichsstandardabweichung $\hat{\sigma}_H$ zur erweiterten Messunsicherheit

Multiplikation der Vergleichsstandardabweichung $\hat{\sigma}_H$ (20-25%) mit dem Faktor 2 ergibt in etwa die erweiterte Mess-/ Ergebnisunsicherheit von 50%. Dies entspricht dem „worst case“, bei dem unter vergleichbaren Bedingungen (z.B. Ringversuchsprobe) bei einem Labor der Messwert um ~25% nach unten (Abb. 24, Messwert A) – und beim Vergleichslabor (Abb. 24, Messwert B) um ~25% nach oben abweicht, so dass es unter Berücksichtigung der erweiterten Mess-/Ergebnisunsicherheit (50%) noch eine gemeinsame Schnittmenge gibt und die Labormesswerte unter diesen Umständen somit vergleichbar sind.

Validierungskriterium: „Richtigkeit“

Die Richtigkeit ist die systematische Abweichung eines bestimmten Wertes von einem als richtig angesehenen Wert. Die *Richtigkeit* eines Messergebnisses bedeutet die Übereinstimmung mit dem wahren Wert (z.B. dotiertes Referenzmaterial). Die Richtigkeit kann als Prozentwert (Wiederfindung) angegeben werden. Die Differenz zwischen wahren Wert und Analysenergebnis wird auch als Bias (lack of trueness) bezeichnet. Ein Verfahren liefert nur dann richtige Werte, wenn es gelingt, systematische Fehler zu vermeiden. Das Document No. SANCO/10684/2009 [15] fordert Wiederfindungen im Bereich von 70-120%. Sofern dieser Zielbereich nicht erreicht wird, muss das Labor zeigen, dass es die Wiederfindung wiederholbar bestimmen kann (z.B. in der Regel bei 40%). Die Wiederfindung ist dann im Prüfbericht – mit der Angabe, ob der Analysenwert korrigiert wurde oder nicht – anzugeben.

Validierungskriterium: „Robustheit“

Die Fähigkeit einer Methode, gleichbleibende Resultate unter variierenden Bedingungen (unterschiedliche Analytiker, unterschiedliche Geräte- und Umgebungsbedingungen, unterschiedliche Zeitpunkte) zu liefern. Auf Englisch: Robustness.

Validierungskriterium: Bestimmungsgrenze (BG) = Limit of Quantification (LoQ)

Kleinster Gehalt eines Analyten, der quantitativ mit einer vorgegebenen Präzision und Richtigkeit quantitativ bestimmt werden kann. Erst oberhalb der Bestimmungsgrenze werden quantitative Analysenergebnisse angegeben. Per Definition ist die Bestimmungsgrenze der mittlere Blindwert plus sechsmal die Standardabweichung des Blindwertes [120]:

$$BG = \bar{x}_B + 6 \times s_B \quad (10)$$

\bar{x}_B = Mittlerer Blindwert

s_B = Standardabweichung des Blindwertes

Validierungskriterium: Umfang der Validierungen

Die Akkreditierungsanforderungen unterscheiden zwischen Validierungen und Verifizierungen. Verifizierungen sind dann vorzunehmen, wenn bereits externe Validierungsdaten vorliegen. Dies ist z.B. bei den veröffentlichten amtlichen Methoden [9, 10] der Fall. In solchen Fällen reicht eine Überprüfung der externen Validierungsdaten aus. Es wird von der DAkkS gefordert, dass mindestens 75% der Wirkstoffe verifiziert werden, zu denen die amtliche Methode externe Validierungsdaten zur Verfügung stellt. Im Rahmen der Verifizierung muss gezeigt werden, dass die Bestimmungsgrenze (i. d. R. 0,01mg/kg), eine Präzision unterhalb von 20% und eine Wiederfindung im Bereich von 70-120% erreicht werden [110].

Die umfassende Validierung von Matrix-/Wirkstoffkombinationen ist erforderlich, sofern keine externen Validierungsdaten vorliegen (z.B. bei etablierten Hausverfahren). **Alle** im Untersuchungsspektrum befindlichen Substanzen müssen Matrix-validiert bzw. –verifiziert sein, wobei diese Validierungen / Verifizierungen an repräsentativen Matrices für ausgewählte Lebensmittelgruppen vorgenommen werden können:

Tabelle 6: Anforderungen an die Validierung / Verifizierung (Auszug) [110]

	Lebensmittelgruppe	Kennzeichen	Beispiele	Anforderung an Bestimmungsgrenzen (BG)
<u>1</u>	<i>Obst und Gemüse</i>			
1a	Obst und Gemüse	hoher Wassergehalt	Kirschen, Erdbeeren, Gurke, Salat	Mindestanforderungen: 0,01 mg/kg bzw. 10% der Höchstmengen gemäß RHmV* bzw. VO(EG) 396/2005
1b	Saures Obst	hoher Säuregehalt	Zitrone, Orange, Apfel	Mindestanforderungen: 0,01 mg/kg bzw. 10% der Höchstmengen gemäß RHmV* bzw. VO(EG) 396/2005
1c	Trockenobst	hoher Zuckergehalt	Rosinen, getr. Feigen	Mindestanforderungen: 0,01 mg/kg bzw. 10% der Höchstmengen gemäß RHmV* bzw. VO(EG) 396/2005

*RHmV = Rückstandshöchstmengen-Verordnung

Ringversuche / Eignungsprüfungen

Vor dem Akkreditierungsaudit gemäß ISO/IEC 17025:2005 [11] muss das Labor mindestens an einem Pestizidringversuch in Lebensmitteln erfolgreich teilgenommen haben. Jährlich soll das Labor erneut mindestens an einem Pestizidringversuch im Bereich seiner Akkreditierung erfolgreich teilgenommen haben. Ein Ringversuch gilt nur dann als erfolgreich bestanden, wenn alle Wirkstoffe qualitativ richtig nachgewiesen (falsch positiv ermittelte Wirkstoffe gelten auch als nicht bestanden) und mindestens 75% der Wirkstoffe quantitativ mit einem z-Score von $|z| \leq 2$ bestimmt wurden.

Wenn das Laboratorium für mehrere Lebensmittelgruppen akkreditiert ist, reicht entsprechend den Anforderungen der DAkkS eine Teilnahme pro Jahr aus, unabhängig von der Anzahl der akkreditierten Lebensmittelgruppen. Bei zwei nicht erfolgreich abgeschlossenen Ringversuchen in Folge wird die Akkreditierung für diesen Bereich bis zum erneuten Kompetenznachweis ausgesetzt.

Qualitätssicherung im Laboralltag / Untersuchungsspektren

Die Akkreditierungsanforderungen sehen vor, dass ein Labor durch tägliche Mitführung interner Standards die Einhaltung definierter Bestimmungsgrenzen gewährleistet. Weiterhin muss das Labor ein System etabliert haben, welches die Absicherung von Rückstandsbefunden vorsieht. Dies ist im Bereich von Richt- oder Grenzwerten zwingend. Als Absicherungsmaßnahmen werden eine zweite Aufarbeitung, Standardaddition oder die Mitführung von Matrix-Standards aufgeführt.

Das Untersuchungsspektrum sollte den zu untersuchenden Lebensmittelgruppen angepasst sein und mindestens zwei Mal pro Jahr der aktuellen Rückstandslage angepasst werden. Somit ist auch die Validierung / Verifizierung kein einmaliger und danach abgeschlossener Vorgang.

Zusammenfassend wird festgehalten, dass im Bereich der Laborkompetenz-Prüfung bereits umfangreiche Kriterien ausgearbeitet und auch empirisch ermittelt wurden – wie z.B. die Vergleichsstandardabweichung $\hat{\sigma}_H$ nach Horwitz [117]. Es wird auch konkret Bezug genommen auf Anforderungen, die im Routinebetrieb einzuhalten sind (z.B. Absicherungen). Da Ringversuche ein zentrales Element der Laboreignungsprüfung darstellen, werden diese im nachfolgenden Kapitel auf ihre Aussage bezüglich der Laborkompetenz-Prüfung beurteilt.

3.5 Laboreignungstests / Laborvergleichsuntersuchungen

„The important question to be answered in the evaluation of methods of analysis is how much allowance must be made for between-laboratory variability in interpreting the values produced by different laboratories. If the variability is excessive – that is, it does not permit effective regulation as required by the statute – the method must be judged unacceptable for the intended purpose.”

William Horwitz, 1982 [121]

Diese Aussage hat William Horwitz als zu erreichendes Ziel formuliert, welches er sich bei der Auswertung von 150 Methodenringversuchen setzte. Nach Horwitz ist somit *„the intended purpose”* – d.h. das Ziel, welches durch einen Ringversuch erreicht werden soll – die Sicherstellung der Vergleichbarkeit von Laborergebnissen. Ist die Vergleichbarkeit von Laborergebnissen nach Auswertung eines Ringversuches nicht sichergestellt, dann ist die Methode für das vorgegebene Ziel nicht akzeptabel.

Um die Vergleichbarkeit von Laborergebnissen messbar zu machen und damit auch entsprechende Anforderungen an die Vergleichbarkeit stellen zu können, hat Horwitz einen Zusammenhang zwischen der Analytkonzentration einer Ringversuchsprobe und der zu erwartenden *„variability”* im Rahmen von 150 Labor-Vergleichstests ermittelt. Die Variabilität entspricht bei den Experimenten von Horwitz der Vergleichspräzision, d.h. der Reproduzierbarkeit von Analyseergebnissen unter Vergleichsbedingungen wie z.B. bei der Messung von Ringversuchsproben in unterschiedlichen Laboratorien (nach Horwitz: *„Reproducibility”* bzw. *„total between laboratory precision”* [121]). Diese Vergleichspräzision hat Horwitz als Vergleichsstandardabweichung ($\hat{\sigma}_H$) definiert, die in Massefraktionen (1 ppm = 10^{-6}) angegeben wird. Horwitz stellte fest, dass sich die Vergleichsstandardabweichung halbiert, wenn die Konzentration des Analyten um den Faktor 100 steigt (siehe auch Abb. 23 auf Seite 62). Dieser Zusammenhang wird in der empirischen Horwitz-Gleichung wie folgt zusammengefasst:

$$\hat{\sigma}_H = 0,02 c^{0,8495} \quad (11)$$

c = Angabe des Gehaltes als Massefraktion (1 ppm = 10^{-6})

$\hat{\sigma}_H$ = Vergleichsstandardabweichung in Massefraktionen (1 ppm = 10^{-6})

Bei einer gegebenen Konzentration „ c “ ist somit eine Vergleichsstandardabweichung $\hat{\sigma}_H$ (= relative Standardabweichung der Vergleichspräzision = RSDR = Relative Standard Deviation of Reproducibility = „between-laboratory-reproducibility“) entsprechend der o.g. Formel zu erwarten. Sie beträgt etwa 20-25% der Analytkonzentration (innerhalb eines Analyt-Konzentrationsbereiches von 0,001 mg/kg bis 10 mg/kg) in der Pestizidanalytik von Lebensmitteln [15, 115]. Die Horwitz-Gleichung wurde nach ihrer Publikation in wissenschaftlichen Veröffentlichungen hinterfragt und auf ihre Aussagekraft und Validität überprüft [115, 122]. Von großer Bedeutung waren hierbei die Feststellungen, dass

- die Horwitz-Gleichung sowohl im unteren Konzentrationsbereich ($< 10\text{ppb}$, d.h. $< 0,01\text{mg/kg} = 10^{-8}$),
- als auch im oberen Konzentrationsbereich ($> 13,8\% \text{ m/m}$)

zu pessimistisch ist und eine größere Vergleichsstandardabweichung erlaubt, als sie anhand empirischer Experimente festgestellt werden konnte [122]. Deshalb wurde für diese Konzentrationsbereiche die Horwitz-Gleichung entsprechend modifiziert:

$$\hat{\sigma}_H = \begin{cases} 0,22 c & \text{sofern } c < 1,2 \times 10^{-7} (c < 120 \text{ ppb}) \\ 0,02 c^{0,8495} & \text{sofern } 1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138 (0,12 \text{ mg/kg} \leq c \leq 0,138 \text{ kg/kg}) \\ 0,01 c^{0,5} & \text{sofern } c > 0,138 (c > 0,138 \text{ kg/kg}) \end{cases} \quad (12)$$

c = Angabe des Gehalts als Massefraktion (1 ppm = 1 mg/kg = 10^{-6})

$\hat{\sigma}_H$ = Vergleichsstandardabweichung in Massefraktionen (1 ppm = 1 mg/kg = 10^{-6})

Auf konkrete Messwerte bezogen, ergibt die Modifizierung der Horwitz-Gleichung [122]:

Tabelle 7: Vergleich zwischen der Horwitz-Gleichung und dem modifizierten Modell [122]

Analytkonzentration	Berechnung nach Horwitz	Berechnung modifiziert
0,01 mg/kg (10 ppb)	3,2 ppb (=32%)	2,2 ppb (=22%)
0,12 mg/kg (120 ppb)	26,41 ppb (22%)	26,41 ppb (=22%)
1,0 mg/kg (1.000 ppb)	159,97 ppb (16%)	159,97 ppb (16%)
138.000 mg/kg (13,8% bzw. 138.000.000 ppb)	3718410,04 ppb (= 2,7%)	3714835,12 ppb (2,7%)
500.000 mg/kg (50% bzw. 500.000.000 ppb)	11.099.540,86 ppb (=2,2%)	7.071.067,81 ppb (1,4%)

Ein weiterer Ansatz, der im Rahmen der Abschätzung der Vergleichsstandardabweichung vorgenommen wurde [115], basiert auf der Auswertung von 61 „*Proficiency Tests*“, bei denen 24 verschiedene Matrices auf Pestizide untersucht wurden. Die Auswertung ergab, dass innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 1 µg bis zu 10 mg/kg bei nicht-fetthaltigen Lebensmitteln (wie z.B. Obst und Gemüse) die Vergleichsstandardabweichung 25% beträgt.

3.5.1 Anforderungen, Zielsetzungen und die Aussagekraft von Laboreignungstests

Allgemeine Qualitätskriterien für Eignungsprüfungen wurden bisher in folgenden Normen/Richtlinien formuliert: ISO/IEC Guide 43-1 [123], ISO/IEC 17025 [11], ISO/IEC 17020 [124] sowie ILAC Guide 13 [125]. Mit der Norm ISO/IEC 17043 „Konformitätsbewertung – Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen“ wurde ein neuer Standard erarbeitet, welcher die unterschiedlichen Anforderungen an Eignungsprüfungen harmonisiert und erweitert [126]. Weiterhin fordert die Norm ISO/IEC 17043 in Kapitel 5.5.2, dass zentrale Aufgaben vom Laboreignungstest-Anbietern nicht an Unterauftragnehmer vergeben werden dürfen. Hierzu zählen die Planung des Tests (nach Kapitel 4.4.1.2), die Beurteilung der Laborleistung (nach Kapitel 4.7.2.1) sowie die finale Berichtsfreigabe (nach Kapitel 4.8.1). Der Begriff „Laboreignungstest“ (englisch: „*Proficiency Testing*“) wird in dieser Norm wie folgt definiert: „*Proficiency Testing (PT) is defined as the evaluation of participant performance against pre-established criteria by means of inter-laboratory comparison*“. Laboreignungstests entsprechen hierbei ganz grundsätzlich folgender Vorgehensweise: Es werden Proben homogener Zusammensetzung an unterschiedliche Laboratorien verschickt und von diesen untersucht. Die Ergebnisse werden anschließend an den jeweiligen Ausrichter berichtet, der die Teilnehmer-Ergebnisse statistisch auswertet. Statistische Modelle für Auswertungen von Ringversuchen sind in der Norm ISO 13528 niedergelegt [127]. Die statistische Auswertung und Bewertung eines Laboreignungstests ist dabei von dessen Zielstellung (*fitness for purpose* [18, 127]) abhängig. Für die statistische Auswertung werden unterschiedliche Verfahren herangezogen. Weit verbreitet ist hierbei das z-score-Modell [18], bei dem die Abweichung des jeweiligen Teilnehmers von einem bestmöglichen abgeschätzten *wahren Wert* („assigned value“) ermittelt wird:

$$z = (x - x_a) / \hat{\sigma} \quad (13)$$

x = berichteter Analysenwert des Teilnehmers

x_a = assigned value

$\hat{\sigma}$ = Ziel-Standardabweichung („*fitness-for-purpose standard deviation*“)

Nachfolgend werden die einzelnen Variablen der z-score-Formel vorgestellt und ihre Aussagekraft in Bezug auf die Laborkompetenz dargestellt:

x - Berichteter Analysenwert des Teilnehmers

In Laboreignungstests, die im Rahmen der Pestizid-Analytik ausgerichtet werden, berichten die Teilnehmer ihre Analysenwerte in $\mu\text{g}/\text{kg}$. Welchen Analysenwert das teilnehmende Labor berichtet und wie dieser ermittelt wurde, liegt in der Verantwortung des teilnehmenden Labors.

x_a - assigned value

Dieser wird von den jeweiligen Laboreignungstest-Anbietern unterschiedlich ermittelt. Folgende Möglichkeiten für die Bestimmung des „wahren Wertes“ x_a werden aufgeführt [18, 127]:

- 1) Übereinstimmungswert ermittelt aus den Werten der Teilnehmer
- 2) Messwerte eines anerkannten Referenzlabores
- 3) Zertifiziertes Referenzmaterial
- 4) Die dotierten Gehalte entsprechen dem Referenzwert („Formulation“ = Referenz)
- 5) Übereinstimmungswert ausgewählter Experten-Laboratorien

Im Bereich der Pestizid-Analytik sind insbesondere die Verfahren zur Ermittlung des wahren Wertes nach 1) und 4) etabliert.

Übereinstimmungswert ermittelt aus den Werten der Teilnehmer

Allen Verfahren zur Bestimmung des Übereinstimmungswertes liegt das Prinzip zu Grunde, die best-mögliche Tendenz der berichteten Werte herauszuarbeiten. Der Bereich der bestmöglichen Gemeinsamkeit wird hierbei als Optimum angesehen. Je weiter ein teilnehmendes Laboratorium von diesem Optimum entfernt ist, umso „schlechter“ wird das Ergebnis beurteilt.

Robustes Schätzverfahren / Robuste Statistik zur Ermittlung des Übereinstimmungswertes

Dieses Verfahren setzt voraus, dass die Verteilung der Werte uni-modal (eingipflig) ist und, abgesehen von Ausreißern, die Verteilung der Werte symmetrisch ist. Robuste Schätzverfahren sind unsensibel für Ausreißer, d.h. der Einfluss von Ausreißern wird im Rahmen der Berechnung des statistischen Mittelwertes minimiert. So wird bei der Anwendung des Huber-Algorithmus [127, 128, 129] zur Bestimmung des robusten Mittelwertes der Effekt zufälliger Ausreißer auf das Ergebnis minimiert. Dies erfolgt durch die Anwendung des Winsorisation-Verfahrens [128]. Hierbei wird im ersten Schritt (Zyklus) ein Mittelwert sowie eine Standardabweichung aus den berichteten Analyseergebnissen ermittelt. Daraufhin werden in einem weiteren Berech-

nungszyklus all die Messwerte, die zuzüglich bzw. abzüglich dem 1,5-fachen der robusten Standardabweichung vom robusten Mittelwert abweichen, auf einen Maximalwert von „robustem Mittelwert + (bzw. -) $1,5 \times$ der robusten Standardabweichung“ reduziert und gehen so in die Berechnung ein. Diese Zyklen werden so oft wiederholt, bis sich der robuste Mittelwert nicht mehr verändert (ca. 8 – 11 Zyklen).

Anwendung des Medians zur Ermittlung des Übereinstimmungswertes

Der Median ist der mittlere Wert der nach der Größe geordneten berichteten Messwerte. Einzelne abweichende Ergebnisse (z.B. Ausreißer) haben wenig Einfluss auf den Median. Laboreignungstest-Anbieter wie beispielsweise die LVU [130] ermitteln den Median in zwei Schritten: Zunächst werden alle berichteten Ergebnisse für die Berechnung des Medians herangezogen. In einer Zweitberechnung werden die Daten von Laboratorien, deren Ergebnisse

- um mehr als fünf Zielstandardabweichungen vom Median abweichen oder
- um mehr als 50% vom Median abweichen und gleichzeitig der Betrag des z-score > 3 ist,

nicht für die Bestimmung des Medians herangezogen. Der Median ist insofern direkt abhängig von den Ergebnissen der Laborteilnehmer.

Kerndichteschätzung / Bootstrapping [131]

Die Ergebnisse der Teilnehmer können z.B. aufgrund der Anwendung unterschiedlicher Analyse-Methoden nicht normalverteilt sein, sondern sich um mehrere Gipfel verteilen (bi- bzw. multi-modal verteilt). Es ist herauszufinden, wo die Gipfel liegen und wie die wahrscheinlichste Verteilung der Werte um die jeweiligen Gipfel ist. Um diese Fragen beantworten zu können, sind Kerndichteschätzungen (der Wahrscheinlichkeitsverteilung) vorzunehmen. Hierbei wird jeder Wert (berichtetes Laborergebnis) ersetzt durch einen Kern, um den eine Normalverteilung mit der Standardabweichung „h“ (auch Bandbreite genannt) gelegt wird. Werden diese Verteilungen addiert, resultiert daraus eine übergeordnete Verteilung (s. Abb. 26).

Diese resultierende Verteilung kann durch das so genannte Bootstrap-Verfahren überprüft werden. Hierbei wird die Verteilung direkt aus einer einzigen Gesamt-Stichprobe (= alle berücksichtigten Laborwerte) rekonstruiert, indem viele (Bootstrap-Einzel-)Proben aus der gesamten Stichprobe (alle berücksichtigten Laborwerte) mit „Zurücklegen“ gezogen werden, um aus denen sich daraus ergebenden Verteilungen auf eine übergeordnete Grundverteilung schließen zu können.

Sofern die Verteilung der Ergebnisse bi- oder sogar multi-modal ist, wird das Ziel verfolgt, den „richtigen“ Gipfel (Mode) und die entsprechenden Verteilungen / Abweichungen der Werte um diesen Gipfel zu identifizieren. Als „richtig“ können z.B. Werte um einen Gipfel identifiziert werden, die mit einer Methode ermittelt wurden, die als besonders geeignet für den Test angesehen wird.

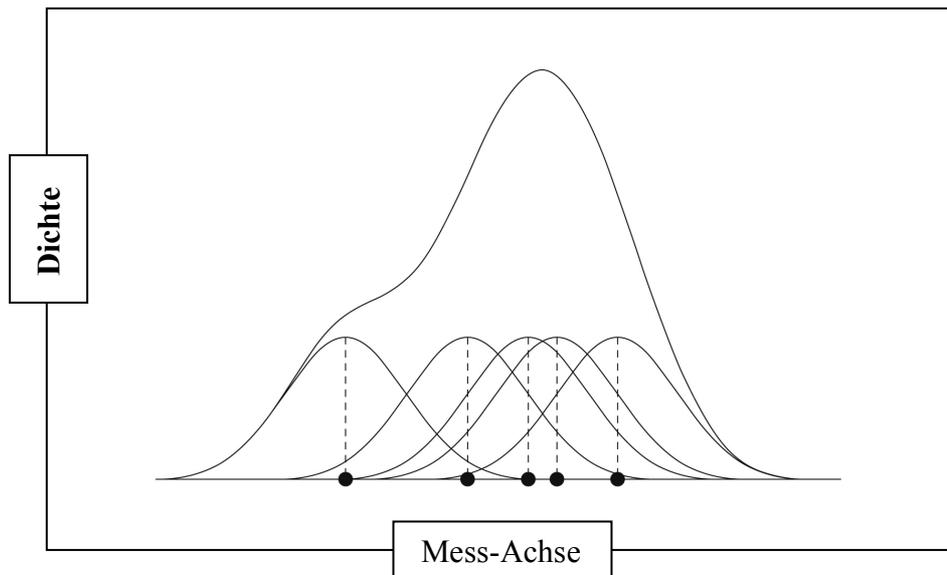


Abb. 26: Die Datenpunkte (hier Punkte auf der X-Achse) werden als Kerne der um sie gelegten Normalverteilungen dargestellt

Die dotierten Gehalte entsprechen dem Referenzwert („Formulation“ = Referenz)

Der als 'assigned value' x_a festgelegte Wert entspricht nicht einem statistisch ermittelten Wert, sondern der assigned value entspricht dem Gehalt, der dem Testmaterial zugesetzt wurde (= Dotierungslevel). Somit orientiert sich der assigned value nicht an den berichteten Ergebnissen der Teilnehmer, sondern ist völlig unabhängig von diesen definiert. Hierbei ist von dem Laboreignungstest-Anbieter sicherzustellen, dass die Analyten im Testmaterial nicht abbauen. Dies wird z.B. durch Stabilitätstests sichergestellt, die nach der Durchführung des Tests an dem Testmaterial vorgenommen werden [18].

$\hat{\sigma}$ - Ziel-Standardabweichung („fitness-for-purpose standard deviation“)

In der Literatur werden für die Zielstandardabweichung sowohl unterschiedliche Bezeichnungen verwendet (target standard deviation, standard deviation for proficiency testing (SDPA), performance criteria, tolerance interval etc.), als auch unterschiedliche Verfahren herangezogen, um diese zu ermitteln. Grundsätzlich wird die tatsächliche Standardabweichung, die aus den

berichteten Ergebnisse der Teilnehmer ermittelt wird, nicht als Zielstandardabweichung herangezogen, da sie zu stark von den Schwankungen der berichteten Ergebnisse beeinflusst wird [18, 130]. Eine unabhängige Referenz zur Messung der Laborleistung wird bevorzugt. Folgende Verfahren kommen in der Praxis zur Anwendung:

Zielstandardabweichung nach Horwitz (modifiziert)

Die von Horwitz beobachtete konzentrationsabhängige Vergleichsstandardabweichung ($\hat{\sigma}_H$) wird als Ziel-Standardabweichung herangezogen. Etablierte Laboreignungstest-Anbieter wie z.B. das Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) wendet die modifizierte Horwitz-Gleichung [121] für die Bestimmung der Zielstandardabweichung an. Sie beträgt im unteren Spurenbereich, in dem Pestizide insbesondere in Routineproben enthalten sind, 22%. Da nach Horwitz die Vergleichsstandardabweichung von der Analytkonzentration abhängt, ist vorab vom Proficiency-Testing-Anbieter zu definieren, was als Analytkonzentration für die Berechnung der Zielstandardabweichung nach Horwitz herangezogen wird. In der Regel wird der assigned value x_a für die Berechnung der Zielstandardabweichung herangezogen, d.h. auch die Zielstandardabweichung ist vom statistischen Durchschnitt der Teilnehmer abhängig.

Vorab festgelegte Zielstandardabweichung (i. d. R. in %)

Hierbei handelt es sich um eine Zielstandardabweichung, die – unabhängig von den berichteten Ergebnissen der Teilnehmer – vorab bekannt gegeben wird. Laboreignungstest-Anbieter verwenden hierbei unterschiedliche Zielstandardabweichungen:

- a) Laboreignungstests, die für jene Laboratorien ausgerichtet werden, die im öffentlichen Auftrag an Überwachungs- / Monitoringprogrammen teilnehmen (so genannte „Community Reference Laboratory“ {CRL} - European Commission Proficiency Testings) verwenden eine **Fit-for-Purpose Relative Standard Deviation (FFP RSD)** von 25% für Pestizid Proficiency Testings im Konzentrationsbereich von 1µg bis zu 10mg/kg in nicht-fetthaltigen Lebensmitteln (wie z.B. Obst und Gemüse) [115]. Als Referenzwert für die Berechnung der Zielstandardabweichung wird der assigned value herangezogen, der im Fall der CRL European Commission Proficiency Testings über den Median ermittelt wird [132].
- b) Weiterhin werden „strengere“, vorab festgelegte Zielstandardabweichungen von unterschiedlichen Laboreignungstest-Anbietern bei der Auswertung verwendet: Die LVU legt die Zielstandardabweichung auf maximal 22% fest [130] – sofern die Berechnung nach

Horwitz keine kleinere Abweichungen aufzeigt, die dann herangezogen werden. Als Referenz für die Berechnung der Zielstandardabweichung wird der Median verwendet.

- c) Der britische Anbieter „LGC Proficiency Testing Group“ verwendet für die Auswertung von Pestizid-Proficiency Testings in fettarmen Lebensmitteln eine festgelegte Zielstandardabweichung von 20%. Als Referenz für die Berechnung der Zielstandardabweichung wird der dotierte Gehalte („Formulation“ = Referenz) herangezogen [133].

Was bedeute also $z = (x - x_a) / \hat{\sigma}$? Und wie ist das Ergebnis zu verstehen?

Folgendes Bewertungsschema basierend auf dem z-score-Modell ist weit verbreitet:

<i>z-score</i>	<i>Interpretation</i>
$ z \leq 2$	Zufriedenstellend
$2 < z < 3$	Fragwürdiges Ergebnis
$ z \geq 3$	Nicht zufriedenstellendes Ergebnis

Ein zufriedenstellendes Ergebnis ($|z| \leq 2$) ist dann erreicht, wenn das berichtete Teilnehmerergebnis um weniger als das doppelte der Zielstandardabweichung von dem assigned value x_a abweicht:

assigned value $x_a = 100 \mu\text{g/kg}$

Zielstandardabweichung $\hat{\sigma} = 25 \mu\text{g/kg}$

Ergebnisse = 75 $\mu\text{g/kg}$ (Lab. A) / 150 $\mu\text{g/kg}$ (Lab. B) / 50 $\mu\text{g/kg}$ (Lab. C) /
40 $\mu\text{g/kg}$ (Lab. D) / 180 $\mu\text{g/kg}$ (Lab. E)

Labor A: z-score = $(75 \mu\text{g/kg} - 100 \mu\text{g/kg}) / 25 \mu\text{g/kg} = -1,0$. Betrag $|-1,0| =$ **1,0**

Labor B: z-score = $(150 \mu\text{g/kg} - 100 \mu\text{g/kg}) / 25 \mu\text{g/kg} = 2,0$. Betrag $|2,0| =$ **2,0**

Labor C: z-score = $(50 \mu\text{g/kg} - 100 \mu\text{g/kg}) / 25 \mu\text{g/kg} = -2,0$. Betrag $|-2,0| =$ **2,0**

Labor D: z-score = $(40 \mu\text{g/kg} - 100 \mu\text{g/kg}) / 25 \mu\text{g/kg} = -2,4$. Betrag $|-2,4| =$ **2,4**

Labor E: z-score = $(180 \mu\text{g/kg} - 100 \mu\text{g/kg}) / 25 \mu\text{g/kg} = 3,2$. Betrag $|3,2| =$ **3,2**

Das Prinzip des z-score-Modells kann im Zusammenhang mit der erweiterten Messunsicherheit erklärt werden: Die nach Horwitz ermittelte Vergleichsstandardabweichung, die nach Thompson [122] modifiziert wurde, liegt für Pestizide in fettarmen Lebensmitteln im Konzentrationsbereich von $1 \mu\text{g/kg}$ bis 10mg/kg etwa bei 20-25% [18, 115]. Das bedeutet, dass unter Vergleichsbedingungen die berichteten Analyseergebnisse der Teilnehmer um etwa 20-25% schwanken. Durch Multiplikation der Vergleichsstandardabweichung mit dem Faktor 2 ergibt

sich die erweiterte Messunsicherheit von 50%. Dies entspricht dem „worst case“, bei dem unter vergleichbaren Bedingungen (Laboreignungstest) bei einem Labor der Messwert um ~25% nach unten (Abb. 21, Messwert A) und beim Vergleichslabor (Abb. 21, Messwert B) um ~25% nach oben abweicht, so dass es unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit (50%) noch eine gemeinsame Schnittmenge gibt und die Labormesswerte unter diesen Umständen somit vergleichbar sind. Bei einem z-score-Ergebnis von $|2|$ ist genau dieser 'worst case' gegeben, bei dem das Ergebnis eines Teilnehmers um die doppelte Standardabweichung von dem assigned value abweicht. Das Ergebnis ist somit gerade noch vergleichbar mit dem assigned value, weil es bei einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% durch das Wertintervall überdeckt wird (siehe auch Seite 64, Abb. 25) [118,119]:

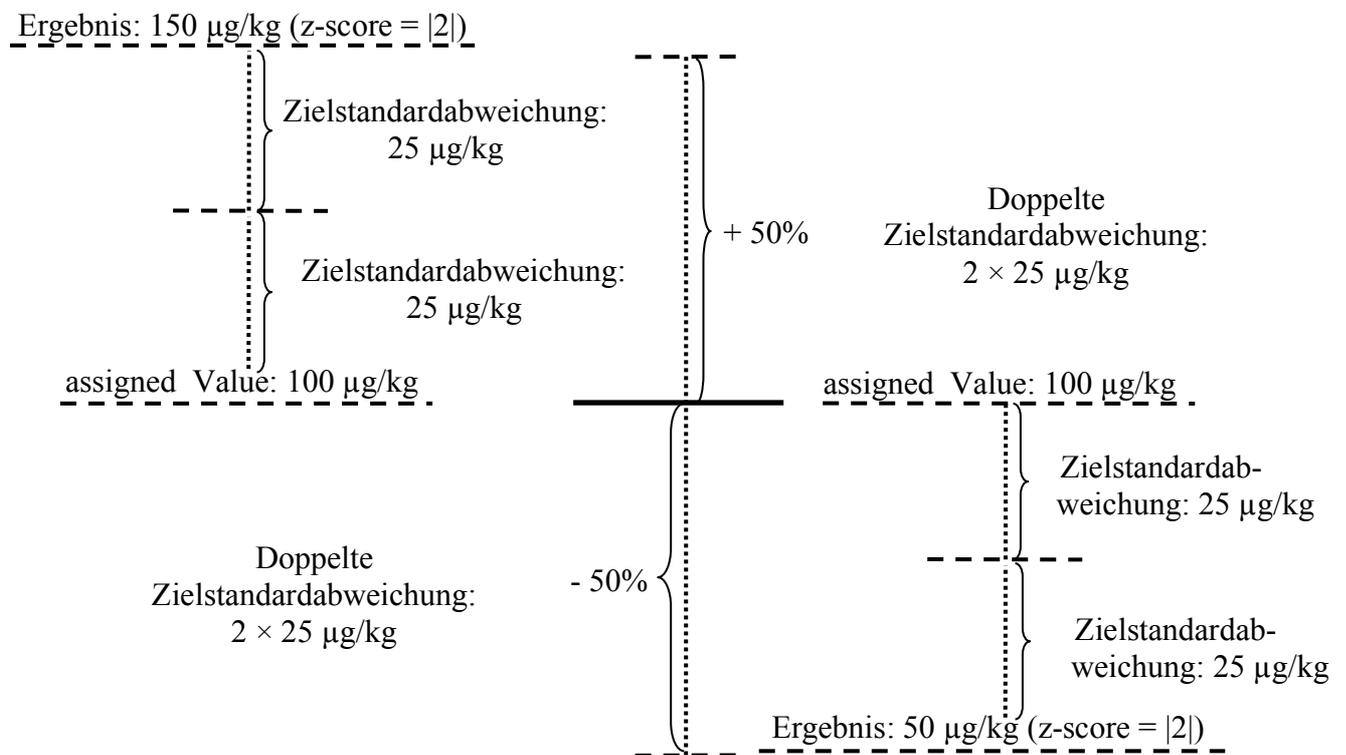


Abb. 27: Verhältnis der Vergleichsstandardabweichung $\hat{\sigma}_H$ zur erweiterten Messunsicherheit: Ein Labor, welches $50 \mu\text{g/kg}$ berichtet, ist mit dem Referenzwert von $100 \mu\text{g/kg}$ (assigned value) noch genauso vergleichbar wie ein Labor, welches $150 \mu\text{g/kg}$ misst. Beide Labore berichten unter Anwendung der erweiterten Messunsicherheit von 50% bezogen auf den assigned value ($100 \mu\text{g/kg}$) gerade noch vergleichbare Ergebnisse.

3.5.2 Angebote von Laboreignungstests (Proficiency Testings)

Tabelle 8: Designs von Laboreignungstests für fettarme Lebensmittel (Obst / Gemüse)

Anbieter	Design	Referenzwert	Zielstandardabweichung	Beurteilungskriterium
FAPAS (UK)	<ul style="list-style-type: none"> • Probenversand wird mittelfristig angekündigt (Wochen zuvor) • 2 bis 8 unterschiedliche Wirkstoffe im Testmaterial • Auswahl aus 146 möglichen Pestiziden • Analysezeit: 4-6 Wochen • Blank Material bei Bedarf verfügbar 	Statistischer Mittelwert – i. d. R. nach Auswertung robuster Statistik (Winsorisation)	Nach Horwitz – modifiziert durch Thompson	$z\text{-score} \leq 2 $
EU-PT (EU)	<ul style="list-style-type: none"> • Probenversand wird mittelfristig angekündigt (Wochen zuvor) • etwa 19 unterschiedliche Wirkstoffe im Testmaterial • Auswahl aus 58 möglichen Pestiziden • Analysezeit: 4 Wochen • Blank Material bei Bedarf verfügbar 	Median	$\pm 25\%$ des Medians	$z\text{-score} \leq 2 $
Bipea (F) [134]	<ul style="list-style-type: none"> • Probenversand wird mittelfristig angekündigt (Wochen zuvor) • etwa 11-19 unterschiedliche Wirkstoffe im Testmaterial • Auswahl aus 20-25 möglichen Pestiziden • Analysezeit: > 4 Wochen • Blank Material bei Bedarf verfügbar 	Statistischer Mittelwert – i. d. R. nach Auswertung robuster Statistik (Winsorisation)	Robuste Standardabweichung (aus den Laborergebnissen der Teilnehmer)	$\pm 40\%$ des assigned values Zusätzlich: $z\text{-score} \leq 2 $
LGC (UK)	<ul style="list-style-type: none"> • Probenversand wird mittelfristig angekündigt (Wochen zuvor) • etwa 10 unterschiedliche Wirkstoffe im Testmaterial • Auswahl aus 151 möglichen Pestiziden • Analysezeit: 3 – 4 Wochen • Blank Material bei Bedarf verfügbar 	Dotierter Gehalt (= spiked level)	$\pm 20\%$ des dotierten Gehaltes	$z\text{-score} \leq 2 $
LVU (D)	<ul style="list-style-type: none"> • Probenversand wird mittelfristig angekündigt (Wochen zuvor) • etwa 8 unterschiedliche Wirkstoffe im Testmaterial • Auswahl aus 175 möglichen Pestiziden • Analysezeit: ca. 7 Wochen 	Median	Nach Horwitz – aber maximal 22% des Medians	$z\text{-score} \leq 2 $

Tabelle 8 ist zu entnehmen, dass

- die Teilnehmer Wochen zuvor über das Eintreffen der Testprobe informiert werden;
- neben dem Testmaterial auch Blank Material (Matrix ohne Rückstände) zur Verfügung gestellt wird, um die Geräte besser kalibrieren zu können;
- der Umfang möglicher in der Probe enthaltener Pestizide vorab bekannt gegeben wird;
- die den Teilnehmern zur Verfügung stehende Analysezeit mehrere Wochen beträgt;

- ein Austausch der Ergebnisse der Labore untereinander bei den Randbedingungen nicht ausgeschlossen werden kann;
- die Auswertung der Laborleistung sich bei der Mehrheit der Anbieter (bis auf BIPEA und LGC) an dem Labordurchschnitt orientiert.

Das Design der in Tabelle 8 dargestellten Laboreignungstests entspricht nicht Labor-Routinebedingungen, bei denen

- die Proben in der Regel unangekündigt eintreffen;
- kurze Analysezeiten von den Kunden gefordert werden (48 Stunden bzw. weniger)
- die Art der in der Probe enthaltenen Pestizide unbekannt ist und insofern auch kein Umfang möglicher Pestizide, die in der Probe enthalten sein könnten, bekannt ist;
- Blank Material nicht von den Kunden bereitgestellt wird;
- eine Rückversicherung mit anderen Laboren nicht möglich ist;
- das Analysenergebnis isoliert vom Kunden betrachtet wird und nicht im Vergleich zu einem Labordurchschnitt.

Zusammenfassend konnte im Kapitel 3.5.1 festgestellt werden, dass etablierte Verfahren zur Bestimmung der Laboreignung die Vergleichbarkeit der einzelnen Laborleistung mit anderen Teilnehmern heranziehen. Hierzu wird mit unterschiedlichen Verfahren ermittelt, welche Bezugswerte für die Vergleichbarkeit heranzuziehen sind (z.B. der assigned value, ermittelt durch robuste Statistik, oder der Median) und wie stark die Laborleistung des einzelnen Teilnehmers von diesen Bezugswerten abweichen dürfen (etwa um das Zweifache der Standardabweichung). Das nach Horwitz definierte „fit-for-purpose“-Kriterium ist folglich die Vergleichbarkeit, denn ein Überwachungslabor (z.B. aus der Lebensmittelüberwachung) verfolgt das Ziel, dass seine Laborergebnisse von anderen Laboren bestätigt werden. Die Analytik sollte somit zu vergleichbaren Ergebnissen führen, so dass Laborteilnehmer, deren Ergebnisse im Bereich der erweiterten Messunsicherheit von $\pm 50\%$ des Bezugswertes (z.B. assigned value) liegen, zufriedenstellende Ergebnisse bei Laboreignungstests erzielen. Eine Aussage über die Richtigkeit der Ergebnisse des Teilnehmers ist durch ein zufriedenstellendes Abschneiden bei einem Laboreignungstest jedoch nicht ableitbar. Ein Labor, welches „vergleichbare Ergebnisse“ berichtet, kann z. B. auch nur vergleichbar schlechte Ergebnisse wie der Labordurchschnitt (assigned value) haben.

Ein labiles Pestizid, welches z.B. im Rahmen der Aufarbeitungen bei ungünstigen pH-Wert-Bedingungen stark abbaut (wie z.B. Pymetrozin) wird vom Teilnehmer-Durchschnitt nur sehr

schlecht bestimmt – d. h. es werden im Vergleich zum tatsächlich dotierten Gehalt deutlich geringere Gehalte vom Teilnehmer-Durchschnitt ermittelt. Ein Labor, welches diesen Sachverhalt berücksichtigt (z. B. durch sorgfältige Überwachung des pH-Wertes während der Aufarbeitung) und dadurch Gehalte berichtet, die dicht bei der dotierten Konzentration liegen, ist mit dem Durchschnitt nicht mehr vergleichbar und liegt außerhalb des z-scores von $|z| \leq 2$:

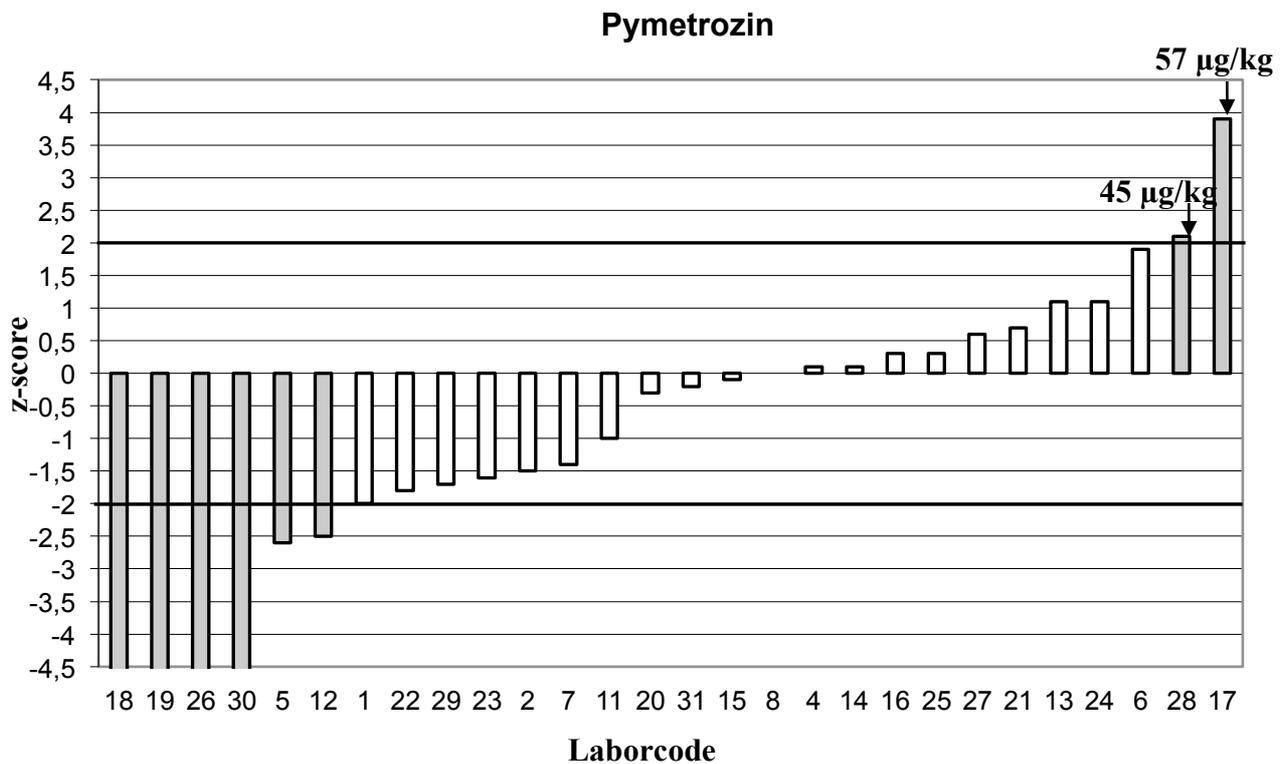


Abb. 28: Laboreignungstest der LVU Frühjahr 2009: Pymetrozin in Tomaten. Bei einem Dotierungsniveau von $50\mu\text{g}/\text{kg}$ Pymetrozin zum Testmaterial konnten Labore (hier: Labor 28 und 17), die Gehalte nahe des Dotierungsniveaus berichten, nicht zufriedenstellende z-scores erzielen, da sie zu stark vom Labordurchschnitt (Median: $0,031\mu\text{g}/\text{kg}$) abwichen.

Die vorliegende Arbeit verfolgt den Ansatz als fit-for-purpose Kriterium die Richtigkeit – und nicht die Vergleichbarkeit – von Laboreergebnissen in den Mittelpunkt von Laboreignungstests zu stellen. Die analytische Kompetenz eines Labores sollte zu richtigen Ergebnissen führen – unabhängig davon, ob sie vergleichbar sind oder nicht.

4 Material und Methoden

Nachfolgende Geräte und Hilfsmittel wurden für die Laboranalysen sowie für die Herstellung von Testmaterialien verwendet:

4.1 Geräte und Hilfsmittel

Probenherstellung und -homogenisierung

Stephan Universalmaschine Typ UMC 12, 1500 / 2780 U/min, Stephan Machinery GmbH, Hameln, Deutschland

Probenaufreinigung

Homogenisierstab: Art-Micra D-8 Stativmixer, ART moderne Labortechnik, Mühlheim, Deutschland

Kolbenhubpipetten mit Pipettenspitzen: 10-100 µl, 20-200 µL sowie 100 bis 1.000 µl, Rotilabo, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Mikroliterspritze: 1-10µL sowie 1-50µL, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz

Präzisionswaage: Scaltec SBC 51, Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Deutschland

Präzisionswaage: Sartorius Basic, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Zentrifuge: Sigma 4-15, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Zentrifuge: Sigma 1-14, Sigma Laborzentrifugen, Osterode im Harz, Deutschland

Schüttler: Vortex Genius 3, IKA GmbH, Staufen Deutschland

Schüttler: GenoGrinder, 2010, SPEX Sample Prep, Stanmore, UK

Lösungsmittelverdampfer: TurboVap[®] LVCaliper Life Sciences, Hopkinton, Massachusetts, USA

Zentrifugenröhrchen: 50ml Einmal-Röhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Zentrifugenröhrchen: 15-ml Einmal-Röhrchen aus Polypropylen mit Schraubverschluss, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Rotationsverdampfer: Laborota 4000 efficient mit Heizbad HB digit, Heidolph Instruments, Deutschland

Ultraschallbad: Bandelin Sonorex RK 52, Bandelin electronic GmbH, Berlin, Deutschland

Papier-Faltenfilter: MN 615 ¼ 125mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

Scheidetrichter 250-ml, Isolab, Deutschland

Zentrifugengläschen

GPC-Anlage

GPC Vario System, LCTech GmbH, Dorfen, Deutschland mit GPC 1122 Solvent Delivery System

Säule: 33 x 3 cm mit Bio Beads SX3 200-400 mesh, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Laufmittel: Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 mit einem Fluss von 5ml/min

Weitere Geräte

Muffelofen Carbolite ELF 11/143, Carbolite, Hope, England

Reinstwasseranlage Millipore Elix 5 mit Synergy UV, Molsheim, Deutschland

Instrumentelle Analytik / Messtechnik

Die Angaben zu den verwendeten GC-MS- sowie LC-MS/MS-Systemen werden an den entsprechenden Stellen bei den jeweils zur Anwendung kommenden Methoden aufgeführt.

4.2 Verwendete Materialien (Chemikalien, Lösungsmittel und Standardsubstanzen)

Die verwendeten Materialien werden entsprechend der jeweiligen Zielsetzung ausgewählt:

- Herstellung von homogenem Testmaterial mit definiertem Design,
- Überprüfung des Testmaterials auf Homogenität sowie Analyse des Testmaterials mit unterschiedlichen Methoden und Quantifizierungsverfahren zur Identifizierung analytischer Abweichungen unter Berücksichtigung von Verfahrenskenngrößen (Wiederhol- und Laborpräzision, Wiederfindungen) innerhalb desselben Labores.

Chemikalien

Natriumsulfat, > 99% p.a.(Carl Roth GmbH & Co. KG)

Natriumchlorid, >99,5% (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Magnesiumsulfat, getrocknet, reinst, DAC (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Tri-Natriumzitat dihydrat (Sigma Aldrich)

Natriumzitat dibasisch sesquihydrat, >99,0% p.a. (Sigma Aldrich)

Bondesil-PSA, 40µm, Agilent Technologies, USA

Festphase: Chem Elut CE 1005 5 ml, ungepuffert, Varian, USA

Lösungsmittel und Säuren

Aceton, Rotisolv >99,8% , Pestilyse (Carl Roth GmbH & Co. KG),

Ethylacetat, Rotisolv Pestilyse (Carl Roth GmbH & Co. KG),

Cyclohexan, Rotisolv Pestilyse (Carl Roth GmbH & Co. KG),

Methanol, Rotisolv >99,9% Pestilyse (Carl Roth GmbH & Co. KG),

Acetonitril, Rotisolv HPLC Grade (Carl Roth GmbH & Co. KG),

Ameisensäure Rotipuram >98% p.a. (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Dichlormethan Rotisolv Pestilyse (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Standardsubstanzen

Standards für Herstellung der Dotierlösung des Testmaterials (Herstellung des Testmaterials)

Die Dotierlösungen wurden so angesetzt, dass das Design des Testmaterials (s. Tabelle 9) bestmöglich umgesetzt werden konnte. Als Testmaterial wurden 10 kg Bio-Tafeltrauben (rot) der Sorte Crimson Seedless im Lebensmitteleinzelhandel gekauft. Die Reinsubstanzen wurden in jeweils einer Stammlösung angesetzt, aus denen entsprechende Aliquote entnommen wurden, um sie zu einer Dotierlösung (100ml) zu kombinieren. Die Dotierlösung wurde dem Testmaterial (8kg Bio-Trauben-Homogenat) zugegeben:

Tabelle 9: Design des Testmaterials (Trauben-Homogenat-Proben)

Substanz	Dotierter Ziel-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Rückstandshöchstgehalt [mg/kg] in Trauben [44]	Anbieter der Reinsubstanzen
Acetamiprid	45	0,01	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Bifenthrin	35	0,2	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Boscalid	115	5	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Cyhalothrin-lambda	77	0,2	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Cyprodinil	165	5	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Deltamethrin	51	0,2	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Fenhexamid	355	5	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Fludioxinil	65	2	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Iprodion	950	10	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Pyrimethanil	1400	5	Dr. Ehrenstorfer GmbH

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der zu analysierenden Analyten sind im Anhang aufgeführt (Tabelle A1).

Standards für die Laboranalysen der Testproben (Homogenitätstest / Analyse des Testmaterials)

Tabelle 10: Stammlösungen für die Erstellung des Mischstandards

Substanz	Konzentration	Lösungsmittel
Acetamiprid	1 g/l	Methanol
Bifenthrin	1 g/l	Aceton
Boscalid	1 g/l	Aceton
Cyhalothrin-lambda	1 g/l	Aceton
Cyprodinil	0.5 g/l	Aceton/Cyclohexan (1:1)
Deltamethrin	1 g/l	Aceton/Cyclohexan (1:1)
Fenhexamid	1 g/l	Aceton
Fludioxonil	1 g/l	Aceton
Iprodion	1 g/l	Aceton
Pyrimethanil	1 g/l	Aceton

Aus den Stammlösungen wurde ein Mischstandard in Aceton hergestellt, der als Grundlage für die Herstellung der Dotierungen, der gespikten Probenextrakte sowie für die Herstellung der externen Standards verwendet wurde:

Tabelle 11: Mischstandard für die Dotierungen

Substanz	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
Acetamiprid	4.5
Bifenthrin	3.5
Boscalid	11.5
Cyhalothrin-lambda	7.7
Cyprodinil	16.5
Deltamethrin	5.1
Fenhexamid	35.5
Fludioxonil	6.5
Iprodion	95
Pyrimethanil	140

4.3 Verwendete Methoden

Die Methoden wurden entsprechend der jeweiligen Zielsetzung verwendet.

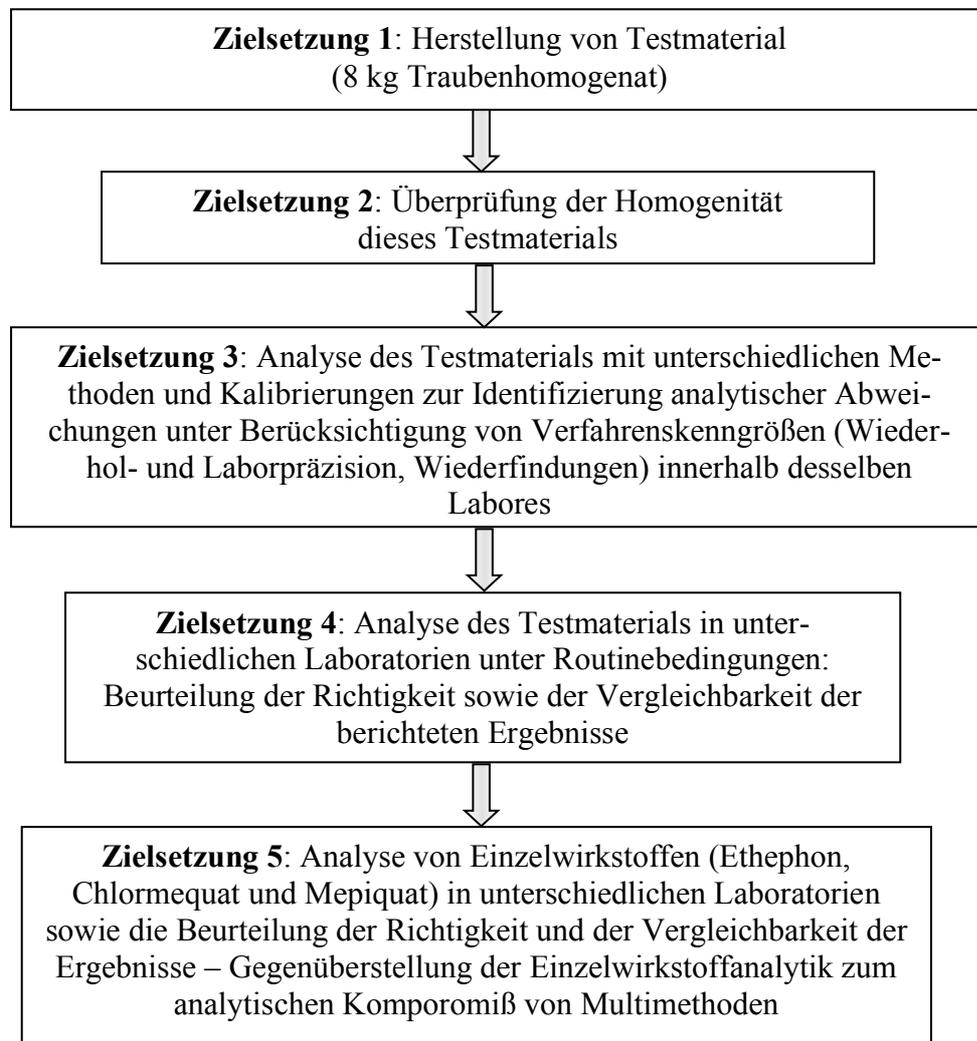


Abb. 29: Verwendete Methoden je nach Zielsetzung

Grundsätzlich orientieren sich die Ziele an der Entwicklung eines Systems zur optimierten Laborkompetenz-Bewertung. Vor diesem Hintergrund stellt sich schließlich die Frage nach der tolerierbaren Schwankung von Laborergebnissen (unter Routinebedingungen) bei der Analyse von Proben desselben Designs.

4.3.1 Zielsetzung 1: Herstellung von Testmaterial (8 kg Traubenhomogenat)

Nach einigen Vorversuchen zur Homogenisierbarkeit der Trauben wurden 8,0 kg Bio-Tafeltrauben (rot) der Sorte Crimson Seedless in einer Stephan-Universalmaschine (mit Kühl-

und Vakuumeinrichtung) unter Zugabe von Trockeneis homogenisiert. Insgesamt wurde mit steigender Drehzahl für 45 Minuten zerkleinert. In Vorversuchen war sichergestellt worden, dass hierbei sämtliche Fruchtbestandteile fein zerkleinert werden. Die Temperatur wurde während der Zerkleinerung kontrolliert und lag durchgehend unter 25°C. Durch Wägen des leeren wie des gefüllten Rührgefäßes vor und nach der Zerkleinerung wurde sichergestellt, dass sich die Einwaage während des Zerkleinerungsvorganges nicht wesentlich änderte. Zur anschließenden Überprüfung der Partikelgröße des Homogenates wurde dieses über Millimeterpapier ausgestrichen:

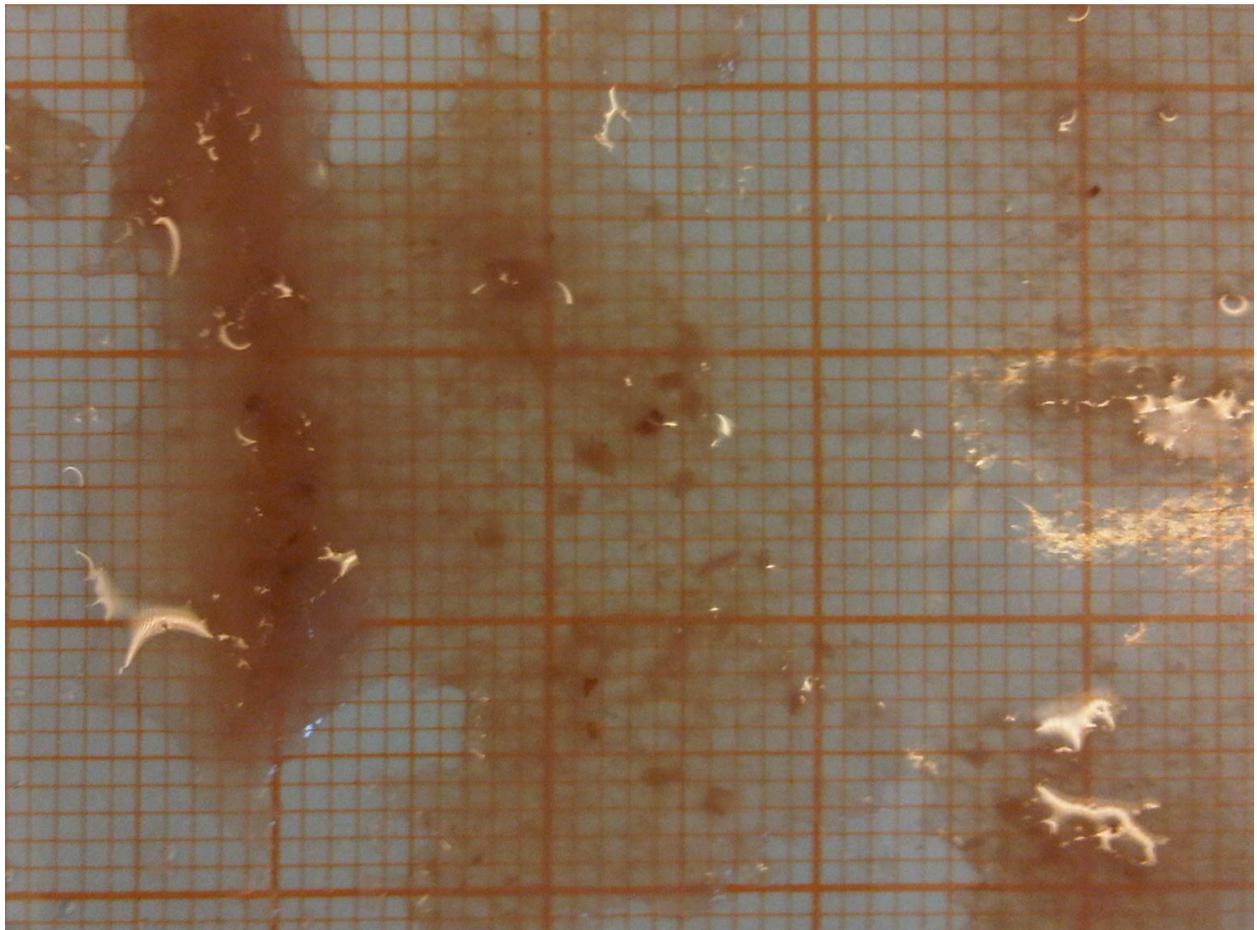


Abb. 30: Ausgestrichenes Traubenhomogenat auf Millimeterpapier (Prüfung der Partikelgröße)

Die Überprüfung zeigte, dass das Testmaterial fein vermahlen war. Eine Partikelgröße von 2mm wurde nicht überschritten.

Die 10 ausgewählten Reinsubstanzen des Probendesigns (s. Tabelle 9) wurden genau eingewogen und jeweils in 10ml organischem Lösungsmittel (s. Tabelle 10) angesetzt. Die Einwaage berücksichtigte die Reinheit und richtete sich nach dem vorgesehenen Testmaterial-Design.

Tabelle 12: Wirkstoffe und daraus hergestellte Stammlösungen

Wirkstoff	Reinheit [%]	Einwaage [mg]	Endvolumen [ml]	Konzentration Stammlösung [mg/l] bzw. [µg/ml]
Acetamiprid	99.0	10.10	10	1000
Bifenthrin	97.7	10.23	10	999
Boscalid	98.4	10.38	10	1021
Cyhalothrin-lambda	98.5	10.26	10	1011
Cyprodinil	99.5	10.12	10	1007
Deltamethrin	98.0	10.22	10	1002
Fenhexamid	98.5	10.33	10	1018
Fludioxonil	99.0	10.09	10	999
Iprodion	97.5	10.47	10	1021
Pyrimethanil*	98.3	10.16	10	999
Pyrimethanil*	98.3	10.28	10	1011

*Beide Stammlösungen werden für die Dotierlösung verwendet, um die Sollgehalte erreichen zu können

Aliquote der insgesamt 10 Stammlösungen (bzw. 11 Stammlösungen, da für Pyrimethanil zwei Stammlösungen angesetzt wurden) wurden entsprechend ihrer Absolut-Konzentrationen zu einer Dotierungslösung kombiniert, die auf insgesamt 100ml mit Aceton aufgefüllt wurde. Diese Dotierungslösung wurde dem Homogenat (8,0kg Testmaterial) schließlich zugegeben:

Tabelle 13: Herstellung der Dotierungslösung und daraus resultierende Sollgehalte (bezogen auf 8,0kg Testmaterial)

Wirkstoff	Dotierungslevel Soll [µg/kg]	Masse Wirkstoff [µg], bezogen auf die Gesamtprobe (8,0kg)	Zugabe (Stammlösung) [µl] auf 100ml Endvolumen	Konzentration (Stammlösung) [mg/l] bzw. [µg/ml]
Acetamiprid	45	360	360	1000
Bifenthrin	35	280	280	999
Boscalid	115	920	901	1021
Cyhalothrin-lambda	77	616	609	1011
Cyprodinil	165	1320	1311	1007
Deltamethrin	51	408	407	1002
Fenhexamid	355	2840	2790	1018
Fludioxonil	65	520	521	999
Iprodion	950	7600	7444	1021
Pyrimethanil*	1000	8000	8008	999
Pyrimethanil*	400	3200	3165	1011

*Beide Stammlösungen werden für die Dotierlösung verwendet, um die Sollgehalte erreichen zu können

Die gesamte Dotierungslösung (s. Tabelle 13) wurde aus einem 100ml Messkolben unter laufendem Rühren in kleinsten Teilportionen zugegeben. Es wurde darauf geachtet, die Probe nicht über 25°C zu erwärmen.

Unmittelbar im Anschluss an die Dotierung wurden 20 Proben plus 5 Rückstellproben von mindestens 150g in vorbereitete Hart-Polyethylen-Weithals-Flaschen mit Schraubverschluss abgefüllt. Darüber hinaus wurden für die Untersuchung der Homogenität weitere Gefäße abgefüllt. Diese Proben wurden sofort nach der Abfüllung bei minus 20°C tiefgefroren:



Abb.31: Testmaterialien aus dotiertem Bio-Traubenhomogenat, aufgemacht als Gegenprobe

4.3.2 Zielsetzung 2: Überprüfung der Homogenität des Testmaterials

Die Homogenität der Wirkstoffverteilungen im Testmaterial wurde durch die Analysen von insgesamt 10 zufällig ausgewählten Testmaterial-Proben überprüft. Diese Proben wurden im Anschluss an die Dotierung entnommen und die Wirkstoffgehalte jeweils doppelt bestimmt, d.h. aus jedem Homogenat wurden zwei Aufarbeitungen vorgenommen und die so erhaltenen zwei Analysenextrakte entsprechend vermessen. Die Quantifizierung wurde mittels Matrix-Kalibrierung (1-Punkt) ermittelt, d.h. der Pestizid-Kalibrier-Standard wurde zum aufgearbeiteten Analysenextrakt (aus Bio-Tafeltrauben (rot) der Sorte Crimson) gegeben.

Angewendetes Analyseverfahren

QuEChERS (Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB 00.00-115) [10]. Die Aufreinigung des Probenextraktes mit PSA wurde hierbei jedoch nicht vorgenommen.

Probenhomogenisierung

Nicht erforderlich, da das Testmaterial bereits als Homogenat vorlag.

Extraktion

5g werden mit 5ml Acetonitril extrahiert (1. Extraktionsschritt)

Zugabe von MgSO₄, NaCl sowie Zitratpuffer (2. Extraktionsschritt)

Aufreinigung

Der Aufreinigungsschritt mit dispersiver SPE durch Zugabe von PSA sowie MgSO₄ wurde nicht vorgenommen.

Analysenextrakt

Der für die LC-MS/MS-Messung vorgesehene Analysenextrakt wird in Methanol/Wasser (1:1) aufgenommen. Für die GC-MS-Analytik wird der Probenextrakt direkt verwendet (Lösungsmittel: Acetonitril).

Messung (GC-MS)

Die GC-MS-Analytik wurde mit dem GC-System 6890N Agilent Technologies, gekoppelt mit dem Massenspektrometer 5975B Agilent Technologies, vorgenommen. Das System wird mit der Agilent Chemstation Software DE0100237 betrieben. Die Ionisierung erfolgt über Elektronenstoßionisation (EI positiv) bei 70 eV. Als Detektionsmodus wurde der Full Scan Mode gewählt. Weitere Betriebsbedingungen:

Tabelle 14: GC-MS-Betriebsbedingungen

Injektion

Autosampler	COMBI PAL CTC ANALYTICS
Inlet (Probenaufgabe)	PTV-Injektion
Injektionsvolumen	5µl
Injektorblock-Temperatur	280°C
Mobile Phase	Helium

GC-Trennung

Säule	VF5 (Äquivalent zu 5% Phenyl und 95 % Dimethylpolysiloxan als Säulenmaterial)
Länge	30m
Durchmesser	0,25mm
Filmdicke	0,25µm

Temperaturprogramm

Modus	Gradient
Ausgangstemperatur	50°C
Endtemperatur	350°C

Detektion

Quadrupol-Temperatur	150°C
Quellen-Temperatur	230°C
Target-Ionenspuren:	
Fludioxinil	m/z: 248
Bifenthrin	m/z: 181
Cyhalothrin-lambda	m/z: 81
Deltamethrin	m/z: 253
Boscalid	m/z: 342
Cyprodinil	m/z: 224

Messung (LC-MS/MS)

Die LC-MS/MS-Analytik wurde mit dem LC-System 1200 Series Agilent Technologies, gekoppelt mit dem Massenspektrometer 320 MS Varian, vorgenommen. Das System wird mit der Software der Varian Work Station 6.9.1 MS betrieben. Die Ionisierung erfolgte über Electrospray-Ionisation (ESI) im positiven Modus. Als Detektionsmodus wurde der Multiple Reaction Mode (MRM) gewählt. Weitere Betriebsbedingungen:

Tabelle 15: LC-MS/MS-BetriebsbedingungenInjektion

Autosampler	LC PAL CTC ANALYTICS
Injektionsvolumen	10µl

LC-Trennung

Säule	Phenomenex Aqua 3u C18 125A (RP-18)
Mobile Phase	A: H ₂ O mit 0,1% HCOOH B: Me-OH mit 0,1% HCOOH
Flow	200µl/min
Eluentenmodus	Stufengradient
Temperatur	30°C

Detektion

ESI Quelle	Stickstoffgas, 34psi
Target-Ionenspuren:	
Acetamiprid	m/z 223 → m/z 126
Pyrimethanil	m/z 200 → m/z 107
Fenhexamid	m/z 302 → m/z 97
Iprodion	m/z 330 → m/z 245

Identifizierung / Quantitative Auswertung

Da die im Testmaterial enthaltenen Wirkstoffe bereits vor der Durchführung des Homogenitätstests bekannt waren wurden nur Target-Ionenspuren (Masse / Ladung, m/z) herangezogen. Weitere Ionenspuren, die üblicherweise zur qualitativen Absicherung herangezogen werden, (Qualifier-Ionen) wurden nicht berücksichtigt. Die Identifizierung erfolgte über die Retentionszeit (Probe / Matrix-Kalibrierlösung). Die Pestizidkonzentrationswerte der Probenlösung wurden mittels Integration der Pestizid-Peaks über die Software aus der gemessenen Kalibrierfunktion (in Matrix) berechnet. Der Messwert der Probe musste innerhalb des kalibrierten Konzentrationsbereiches liegen, andernfalls wurde die Probe entsprechend verdünnt.

Statistische Auswertung der Homogenitätsdaten

Das Testmaterial muss ausreichend homogen sein, um die anschließende Interpretation der Teilnehmer-Ergebnisse nicht durch inhomogenes Testmaterial zu gefährden.

Präzision des Analyseverfahrens und Varianz zwischen Testmaterial-Einheiten (s_{an} vs s_{sam})

Sofern die Präzision des angewendeten Analyseverfahrens zur Bestimmung der Homogenität gering ist (und somit eine starke Schwankung der Analysenergebnisse, bedingt durch methodische Schwankungen, auftritt), können Inhomogenitäten des Testmaterials nicht sicher

festgestellt werden, da Inhomogenitäten durch methodenbedingte Schwankungen ggf. aufgehoben werden.

Auf der anderen Seite kann die Anwendung analytischer Verfahren mit sehr hoher Präzision Schwankungen zwischen den Testmaterial-Einheiten aufzeigen, die jedoch für die abschließende Teilnehmerbewertung eines Laboreignungstests nicht von Relevanz sind. Dies ist z.B. dann der Fall, wenn durch Schwankungen der Homogenität zwischen den Testmaterial-Einheiten ein ermittelter z-score erst in der dritten Nachkommastelle beeinflusst wird. Da die ermittelte Standardabweichung (bzw. die Varianz = Quadrat der Standardabweichung) zwischen Testmaterial-Einheiten stark von der Präzision des Analyseverfahrens abhängt, wird die Präzision bei der Überprüfung auf ausreichende Homogenität berücksichtigt.

Durchführung des Homogenitätstests

1. 10 Testmaterial-Einheiten ($m = 10$) wurden für die Homogenitätstests rein zufällig ausgewählt. Von jedem der 10 Homogenate wurden zwei Teil-Proben entnommen, die in zufälliger Reihenfolge unter Wiederholbedingungen mit einer *angemessenen* Wiederholpräzision analysiert wurden. Eine dem Zweck der Homogenitätsprüfung *angemessene* Wiederholpräzision (σ_{an}) liegt vor, wenn sie kleiner ist als das 0,5-fache der für die Analyse vorgesehen Standard-Messunsicherheit. Im Bereich der Analytik von Pflanzenschutzmitteln mit Multi-Methoden sollte sie somit etwa die Hälfte von 20% betragen [15]. bzw. anders ausgedrückt: $\sigma_{an} < 0,5 \hat{\sigma}$; beziehungsweise $\sigma_{an} < 0,5 \hat{\sigma}_H$ wenn die Vergleichsstandardabweichung nach Horwitz für die Berechnung der Zielstandardabweichung zur Anwendung kommt:

$\hat{\sigma}$ = Zielstandardabweichung nach Horwitz [121] für Laboreignungstests bzw.

$\hat{\sigma}_H$ = Vergleichsstandardabweichung (relative Standardabweichung der Vergleichspräzision), die in einem Bereich von etwa 20-25% liegt. [121]

2. Die Messergebnisse wurden visuell (z.B. durch das Auftragen der Ergebnisse gegen die Probennummern) auf nicht zufällige Auffälligkeiten überprüft.

3. Anschließend wurden mit Hilfe des Cochran-Tests [136, 137] Analysenpaare, die aus einer Testmaterial-Einheit ermittelt wurden, und die zu stark voneinander abweichen, identifiziert und eliminiert. Sofern durch den Cochran-Test mehr als ein Analysenpaar identifiziert wird, welches zu große Differenzen aufweist, ist die komplette Analytik der Proben zu wiederholen.

4. Es erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA = ANalysis Of VAriance). Diese Varianzanalyse nutzt die Tatsache, dass anhand der Stichprobendaten (Ergebnisse der Homogenitätsmessung = Population) zwei unabhängige Schätzungen der Populationsvarianz möglich sind:

- a. „within-Varianz“ = Varianz innerhalb definierter Gruppen (hier: Gruppe = Doppelbestimmung): Wie sehr schwanken die Differenzen zwischen den jeweils zwei Ergebnissen einer Doppelbestimmung? Diese Varianz ergibt sich aus der Summe der Differenzen der Analysenpaare einer Doppelbestimmung und der Anzahl aller durchgeführten Analysen ($2m = 20$), hier: $s_{an}^2 = \sum D_i^2 / 2m$. Bevor diese Berechnung durchgeführt wurde, wurden mit Hilfe des Cochran-Tests [136, 137] „Ausreißer-Paare“ identifiziert, um diese für die anschließende Varianz-Berechnung ausschließen zu können. Solche Ausreißer-Paare einer Doppelbestimmung zeigen im Vergleich zu den anderen Analyse-Paaren eine stark abweichende Differenz untereinander.

Man unterscheidet zwischen Ausreißern mit starken Differenzen bei der Doppelbestimmung und Ausreißern, bei denen das jeweilige Paar zwar ähnliche Differenzen wie die andere Paare zeigt, aber deutlich außerhalb der Messwerte anderer Paare liegt:

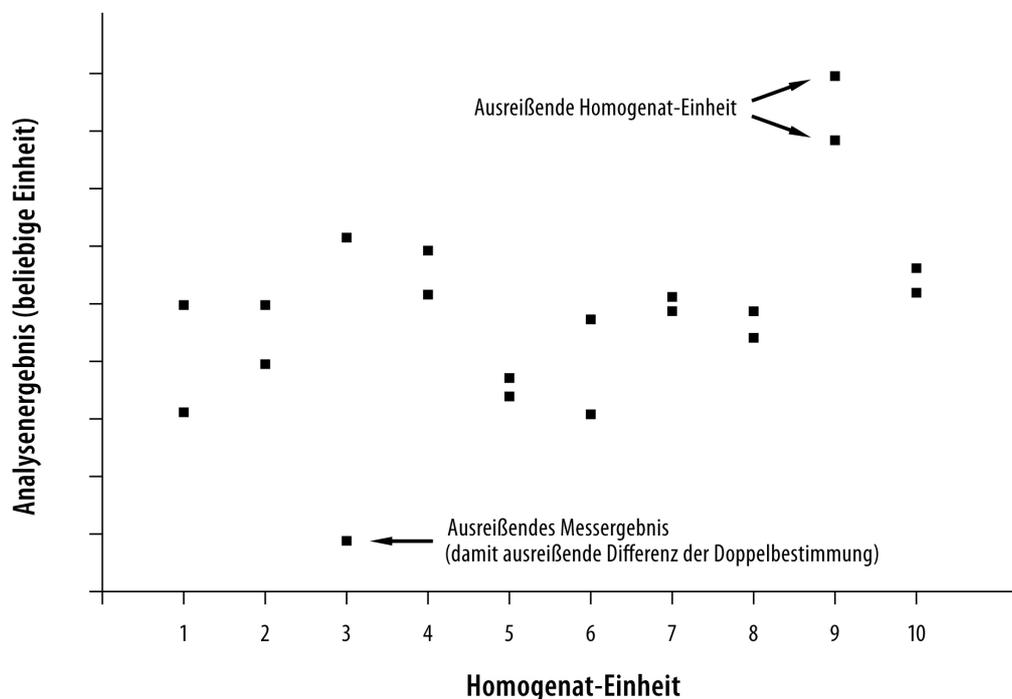


Abb. 32: Klassifizierung von Ausreißern bei der Homogenitätsprüfung [136, 137]

Ein Ausreißer-Paar, dessen Einzelmesswerte eine signifikante Differenz aufweisen, wird von der Varianzanalyse ausgeschlossen (siehe Homogenat-Einheit 3 in Abb. 32). Sofern der Cochran-Test [136, 137] mehr als ein Ausreißer-Paar identifiziert, sind die Homogenitätsanalysen zu wiederholen. Paare mit vergleichbarer Differenz (unabhängig davon, wie vergleichbar die Einzelmesswerte mit denen anderer Paare sind; siehe Homogenat-Einheit 9 in Abb. 32) werden von der Varianzanalyse nicht ausgeschlossen.

Die Varianz der Doppelbestimmungen (s_{an}^2) wird auf das verwendete Analyseverfahren („ an “ steht für „analytical“) zurückgeführt, d. h. auf die durch die Präzision des Analyseverfahrens verursachte Schwankung. Nach Bestimmung der analytischen Varianz und der Populationsvarianz (siehe unten) kann die so genannte *sampling*-(sam)-Varianz (Varianz zwischen Testmaterial-Einheiten = s_{sam}^2) berechnet werden, die als Maß für die Inhomogenität der Proben (nach Bereinigung durch Abzug der analytischen Varianz s_{an}^2) herangezogen wird und die bestimmte Anforderungen einzuhalten hat.

- b. Populationsvarianz = Varianz aller Stichproben aus der gleichen Population (hier: 20 Analyseergebnisse des Homogenitätstests): Wie groß ist die Varianz aller Messergebnisse untereinander? Die Berechnung der Populationsvarianz (V_S) erfolgt unter Berücksichtigung aller ermittelten Einzelmesswerte ($\sum S_i$):

$$V_S = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m - 1)$$

$$\text{mit } \bar{S} = (\sum S_i) / m \text{ (= Mittelwert von } S_i)$$

- c. Nach Berechnung der Populationsvarianz (V_S) kann durch Abzug der analytischen Varianz (s_{an}^2) schließlich die Varianz zwischen Testmaterial-Einheiten (s_{sam}^2) ermittelt werden: $s_{sam}^2 = (V_S/2 - s_{an}^2) / 2$
- d. Die zulässige erlaubte (*allowable*) Sampling Varianz (σ_{all}^2) zwischen Testmaterial-Einheiten hat folgende Anforderungen einzuhalten: $\sigma_{all}^2 = (0,3 \hat{\sigma})^2$, mit $\hat{\sigma}$ = Zielstandardabweichung nach Horwitz [121] für Laboreignungstests. Sie wird herangezogen, um die statistischen Anforderungen an die Homogenität zu formulieren.
- e. Die statistischen Anforderungen an eine ausreichende Homogenität des Testmaterials beziehen sich auf die erlaubte Sampling-Varianz (σ_{all}^2) und die analytische Varianz (s_{an}^2) eines Verfahrens. Der Zusammenhang wird unter Berücksichtigung der Fischer-Verteilungs-Faktoren „F-Faktoren“ [123] für die erlaubte Sampling-Varianz σ_{all}^2 sowie

die analytische Varianz wie folgt dargestellt: $c = F_1 \sigma_{\text{all}}^2 + F_2 s_{\text{an}}^2$. Hierbei ist c der critical value, d. h. die Summe der analytischen und der erlaubten Sampling-Varianz. Sofern die tatsächlich ermittelte Sampling-Varianz $s_{\text{sam}}^2 < c$ ist, ist mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit (Vertrauensbereich) das Testmaterial homogen. Andernfalls wurden die Anforderungen an die Homogenität nicht erfüllt.

Die Anforderungen an die Homogenität berücksichtigen somit sowohl den Einfluss der analytischen Varianz als auch den Einfluss der Varianz zwischen Testmaterial-Einheiten (Sampling Varianz).

Stabilitätstest

Nach der Durchführung des Labortests mit den verdeckten Proben (siehe 5.4) wurde das Testmaterial unter den beschriebenen Analysebedingungen auf Stabilität der Analyten überprüft. Hierzu wurden zwei Testmaterial-Proben aufgearbeitet und der Probenextrakt doppelt vermessen.

4.3.3 Zielsetzung 3: Analyse des Testmaterials mit unterschiedlichen Methoden und Kalibrierungen

Proben des nach 4.3.1 hergestellten und nach 4.3.2 auf Homogenität überprüften Testmaterials (dotiertes Traubenpüree) gleichen Designs (gleiche Pestizide zu gleichen Gehalten in der gleichen Matrix) wurden mit unterschiedlichen Methoden sowie verschiedenen Kalibrierungen (Matrix-Kalibrierung, Standardaddition, Messungen gegen externe Standardlösungen) innerhalb desselben Laboratoriums unter standardisierten Arbeitsbedingungen analysiert. Bei der Durchführung der Laboranalysen der Proben-Homogenate kamen die nachfolgenden drei verschiedenen Methoden zur Anwendung:

- Multimethode L-00.00-115 „QuEChERS“ [10]
- Multimethode L-00.00-113, „BfR-Methode“[9], sowie die
- Sammelmethode DFG S 19 [55, 56].

Es sollte herausgearbeitet werden, inwieweit die Anwendung unterschiedlicher Analysemethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Weiterhin wurde hierbei auch die Einhaltung der Verfahrenskenngrößen (Wiederfindungen, Wiederholpräzision, Laborpräzision etc.) überprüft.

Angewendetes Analyseverfahren

QuEChERS (Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB 00.00-115 [10])

Probenhomogenisierung

Nicht erforderlich, da das Testmaterial bereits als Homogenat vorliegt.

Extraktion

10g werden mit 10ml Acetonitril extrahiert (1. Extraktionsschritt).

Zugabe von MgSO₄, NaCl sowie Zitratpuffer (2. Extraktionsschritt).

Aufreinigung

Mittels dispersiver SPE durch Zugabe von PSA sowie MgSO₄. Anschließend zügige Ansäuerung des Extraktes mit Ameisensäure in Acetonitril.

Analysenextrakt

Der für die LC-MS/MS-Messung vorgesehene Analysenextrakt wird aufkonzentriert (2,5g Einwaage (EW) auf 1ml) und in Methanol/Wasser (1:1) aufgenommen; der für die GC-MS-Analytik vorgesehene Extrakt verbleibt in angesäuertem Acetonitril.

Messung (GC-MS/MS)

Die GC-MS-Analytik wurde mit dem GC-System 7890A Agilent Technologies gekoppelt mit dem Triple Quadrupol Massenspektrometer 7000A Agilent Technologies vorgenommen. Das System wird mit der Agilent MassHunter Software B.05.00. betrieben. Die Ionisierung erfolgte über Elektronenstoßionisation (EI positiv) bei 70 eV. Als Detektionsmodus wurde der MS/MS Mode gewählt (Multiple Reaction Mode, MRM). Weitere Betriebsbedingungen:

Tabelle 16: GC-BetriebsbedingungenInjektion

Autosampler	GC PAL CTC ANALYTICS
Inlet (Probenaufgabe)	PTV-Injektion
Injektionsvolumen	2µl
Injektorblock-Temperatur	50°C / 0,1min / 700°C/min / 280°C
Mobile Phase	Helium

GC-Trennung

Säule	HP-5MS UI (Agilent Part Number 19091S-433UI)
Länge	30m
Durchmesser	0,25mm
Filmdicke	0,25µm

Temperaturprogramm

50°C/1min
35°C/min → 100°C/0min
8°C/min → 320°C/1min
Backflush pressure: 100psi / 4,1min

Detektion

Quadrupol-Temperatur	150°C
Quellen-Temperatur	280°C
Target-Ionenspuren:	
Acetamiprid	-----
Bifenthrin	181 → 165
Boscalid	342 → 142

Cyhalothrin-lambda	181 → 152
Cyprodinil	225 → 224
Deltamethrin	253 → 172
Fenhexamid	177 → 133
Fludioxinil	248 → 127
Iprodion	314 → 245
Pyrimethanil	198 → 118

Messung (LC-MS/MS)

Die LC-MS/MS-Analytik wurde mit dem LC-System 1100 Series Agilent Technologies, gekoppelt mit dem Massenspektrometer 1500 MS Varian, vorgenommen. Das System wird mit der Software 1200 Version 2.1.045 betrieben. Die Ionisierung erfolgte über Electrospray-Ionisation (ESI) im positiven Modus. Als Detektionsmodus wurde der MS/MS Mode gewählt (Multiple Reaction Mode, MRM). Weitere Betriebsbedingungen:

Tabelle 17: LC-Betriebsbedingungen

Injektion

Autosampler	LC PAL CTC ANALYTICS
Injektionsvolumen	10µL

LC-Trennung

Säule	Agilent Technologies Eclipse Plus C18 RRHD, 2.1 X 50 mm, 1,8 µm particle size
Mobile Phase	A: H ₂ O (0,1% Ameisensäure) B: ACN (0,1% Ameisensäure)
Flow	250 µl/min
Gradient	0% B bei 0 min für 1 min. halten Von 0% B auf 100% B von 1 min. bis 5 min. 100% B für 5 min. halten Post time: 5min

Detektion

ESI Quelle	Nebulizing gas N ₂ : 37psi Drying gas N ₂ : 26psi/350°C
------------	--

Target-Ionenspuren:	
Acetamiprid	223 → 126
Bifenthrin	----
Boscalid	343 → 307
Cyhalothrin-lambda	----
Cyprodinil	226 → 93
Deltamethrin	----
Fenhexamid	302 → 97
Fludioxinil	----
Iprodion	330 → 245
Pyrimethanil	200 → 107

Angewendetes Analyseverfahren

Multimethode L-00.00-113, „BfR-Methode“ [9].

Probenhomogenisierung

Nicht erforderlich, da das Testmaterial bereits als Homogenat vorliegt.

Extraktion

10g werden mit 20ml MeOH mit dem Stativmixer homogenisiert (Extraktion).

2,5ml 20%-ige NaCl-Lösung ad 10ml mit Extrakt auffüllen.

Aufreinigung

5ml des NaCl-Extrakt-Gemisches auf ChemElut-Säule geben und mit Dichlormethan eluieren.

Analysenextrakt

Der für die LC-MS/MS-Messung vorgesehene Analysenextrakt wird aufkonzentriert (2,5g EW auf 1ml) und in Methanol/Wasser (1:1) aufgenommen; der für die GC-MS-Analytik vorgesehene Extrakt wird in Methanol aufgenommen.

Messung (GC-MS/MS) / LC-MS/MS

siehe unter QuEChERS

Angewendetes Analyseverfahren

Sammelmethode DFG S 19, Amtliche Analysenverfahren L 00.00-34 [57].

Probenhomogenisierung

Nicht erforderlich, da das Testmaterial bereits als Homogenat vorliegt.

Extraktion

10g werden mit 20ml Aceton extrahiert (Extraktion).

Zugabe von 10ml Ethylacetat/Cyclohexan 1:1 (Phasenverteilung).

Verwerfung der polaren Phase, Aufkonzentrierung der lipiden Phase.

Aufreinigung

Aufkonzentrierte Phase wird über den GPC gegeben.

Analysenextrakt

Der für die LC-MS/MS-Messung vorgesehene Analysenextrakt wird aufkonzentriert (2,5g EW auf 1ml) und in Methanol/Wasser (1:1) aufgenommen; der für die GC-MS-Analytik vorgesehene Extrakt wird in Methanol aufgenommen.

Messung (GC-MS) / LC-MS/MS

siehe unter QuEChERS

Identifizierung / Quantitative Auswertung

Da die im Testmaterial enthaltenen Wirkstoffe bereits bekannt waren, wurden Target-Ionenspur-
en (Masse / Ladung, m/z) für die Identifizierung herangezogen. Jeweils eine weitere weitere
Ionenspur (Qualifier-Ionen) pro Pestizid wurde auch bei der Quantifizierung berücksichtigt. Die
Identifizierung erfolgt über die Retentionszeit (Probe / Matrix-Kalibrierlösung). Die Pestizid-
konzentrationswerte der Probenlösung wurden mittels Integration der Pestizid-Peaks über die
Software aus der gemessenen Kalibrierfunktion (in Matrix) berechnet.

4.3.4 Zielsetzung 4: Analyse des Testmaterials in unterschiedlichen Laboratorien unter Routinebedingungen

Hierzu wurde jeweils eine Testmaterial-Einheit als Gegenprobe aufgemacht (siehe Abb. 31), damit die Teilnehmer des verdeckten Ringversuches die Probe nicht als Test-Probe erkennen konnten. Die Proben wurden mit einem Begleitschreiben (siehe Anhang Dokument B1) an die Labore verschickt. Der offizielle Auftraggeber (eine Fruchtagentur bei München / eine Agrar-marketingeinrichtung aus Österreich) bat um eine Eilanalytik, wobei das Zeitfenster hierfür nicht näher definiert wurde. Die Proben sowie das Begleitschreiben wurden in Styroporboxen unter Zugabe von Kühl-Akkus per Kurier verschickt und trafen innerhalb von 24 bis 48 Stunden bei den Laboren ein (Überprüfung durch die Frachtbriefnummer).

Um die Ergebnisse der Teilnahme vergleichen zu können, mussten u.a. folgende Bedingungen an das Test-Design sowie die Durchführung gestellt und eingehalten werden:

- Gleiche Randbedingungen für die teilnehmenden Labore: Zeitrahmen (innerhalb dessen die Stabilität des Testmaterial-Designs sichergestellt war), Probenmaterial, Aufgabenstellung.
- Einhaltung von Routine-Bedingungen wie bei einem üblichen Kunden-Auftrag.
- Die Probe durfte nicht als „Spezial“- oder „Test“-Probe erkannt werden.

Um den Verdacht einer Test-Probe nicht aufkommen zu lassen, wurden konkrete Methodendetails nicht abgefragt. Die Analysenergebnisse sollten entsprechend der Kundenanforderungen (teilweise Ausschöpfungen des Rückstandshöchstgehaltes sowie des ARfD-Wertes) beurteilt werden und es sollte auf eventuelle Auffälligkeiten / Abweichungen hingewiesen werden.

Die Richtigkeit der berichteten Werte wurde anhand der Bestimmung der Wiederfindung des dotierten Gehaltes ermittelt:

$$\text{Wiederfindung (\%)} = \frac{\text{Berichteter Gehalt}}{\text{Dotierter Gehalt}} \times 100 \quad (14)$$

Die Vergleichbarkeit der berichteten Werte wurde durch Anwendung des z-score-Modells (siehe Gleichung 13, Seite 70) nach Ermittlung des Übereinstimmungswertes durch robuste Statistik (Winsorisation [128]) aus den Werten aller Teilnehmer ermittelt.

Insgesamt haben 19 Laboratorien aus 7 Ländern (Deutschland, Italien, Niederlande, Belgien, Spanien, Österreich und Türkei) an dem Test mit verdeckten Proben „unwissend“ teilgenommen.

4.3.5 Zielsetzung 5: Gegenüberstellung der analytischen Kompetenz bei der Analytik von Einzelwirkstoffen und der Analytik von Multimethoden

Folgende Einzelwirkstoffe wurden im Rahmen von Methodenringversuchen analysiert:

- a) Ethephon in Tomatenpüree
- b) Chlormequat und Mepiquat in Pilz und Pilzsubstrat (jeweils als Püree).

Die Erstellung des Testmaterials sowie die Durchführung der Homogenitätstests wurden bei externen Instituten in Auftrag gegeben.

Die Methodenringversuche wurden offiziell angekündigt, und interessierte Laboratorien konnten sich innerhalb einer vorgegebenen Frist für den Versuch anmelden. Insofern wurden die Labore nicht „verdeckt“ geprüft. Für den Methodenringversuch „Ethephon in Tomatenpüree“ meldeten sich 15 Labore an, an dem Methodenringversuch „Chlormequat in Pilz und Pilzsubstrat“ nahmen insgesamt 14 Labore teil.

Zusammen mit den zu analysierenden Testproben und Blank-Proben erhielten die Teilnehmer detaillierte Anweisung zur Ergebnisermittlung sowie zur Verfügung stehenden Analysezeit und den Umgang mit den Proben (siehe Anhang Dokument B2 bis B4 für den Methodenringversuch „Ethephon“ – sowie Anhang Dokument B5 bis B7 für den Methodenringversuch „Chlormequat / Mepiquat“).

Nach Abgabe der Analysenergebnisse aller Teilnehmer wurde eine statistische Auswertung vorgenommen. Hierbei wurde die Richtigkeit der berichteten Werte anhand der Bestimmung der Wiederfindung des dotierten Gehaltes ermittelt (siehe Gleichung 14, Seite 100)

Die Vergleichbarkeit der berichteten Werte wurde durch Anwendung des z-score-Modells (siehe Gleichung 13, Seite 70) nach Ermittlung des Übereinstimmungswertes durch robuste Statistik (Winsorisation [128]) aus den Werten aller Teilnehmer ermittelt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse werden entsprechend der Reihenfolge der in Abb. 29 dargestellten Zielsetzungen vorgestellt. Ergänzende Informationen / Berechnungen werden ggf. im Anhang aufgeführt. Hierauf wird an den entsprechenden Stellen in der Ergebnisdarstellung hingewiesen.

5.1 Zielsetzung 1: Herstellung von Testmaterial (8 kg Traubenhomogenat)

Das erstellte Traubenhomogenat zeigte hinsichtlich des Homogenisierungsgrades zufriedenstellende Ergebnisse. Die Partikel des Homogenates wiesen eine Größe von $< 2\text{mm}$ auf (siehe Abb. 29). Da für die Testmaterial-Erstellung kernlose Trauben (Crimson seedless) verwendet wurden, konnten Inhomogenitäten durch das Kernmaterial ausgeschlossen werden. Bei Trauben mit Kernen besteht grundsätzlich das Risiko, dass in dem Kernmaterial andere Pestizidkonzentrationen vorliegen als in dem Fruchtfleisch selbst. Sofern das Kernmaterial bei der Homogenisierung nicht ausreichend zerkleinert werden würde und sich die Kernstückchen ungleichmäßig in dem Traubenbrei verteilen würden, wäre eine grundlegende Voraussetzung für die gleichmäßige Verteilung der Pestizide im Traubenhomogenat nicht mehr gegeben.

Durch die Zugabe von 100ml Dotierlösung zum Testmaterial (8 kg) konnte einem Verdünnungseffekt – und damit einer Beeinflussung der Absolutgehalte der Pestizide im Testmaterial – entgegengewirkt werden.

Durch die Berücksichtigung der Reinheiten der jeweiligen Pestizid-Standard-Substanzen sollte ebenfalls das vorgegebene Dotierungsniveau bestmöglich getroffen werden.

Die langsame Zugabe der Dotierlösung mit Hilfe eines Glasstrichters zum gekühlten Homogenat (Trockeneis) war entscheidend, um eine Verspritzung der Dotierlösung (aufgrund des Temperaturunterschiedes) zu verhindern. Das Trauben-Homogenat wurde nach der Fertigstellung auf Millimeter-Papier ausgestrichen, um die maximale Teilchengröße zu ermitteln. Ziel hierbei war es, einen Verkleinerungsgrad von maximal 2mm nicht zu überschreiten.

Fazit

Die Ergebnisse des statistischen Homogenitätstests (5.2) bestätigten die Homogenität des Testmaterials. Weiterhin ergab das auf Millimeterpapier ausgestrichene Testmaterial eine zufriedenstellende Partikelgröße, die 2mm nicht überschritt (s. Abb. 30).

5.2 Zielsetzung 2: Überprüfung der Homogenität des Testmaterials

Das Testmaterial wurde entsprechend der unter 4.3.2 aufgeführten methodischen Verfahren auf Homogenität überprüft. Die daraus ermittelten Messergebnisse (siehe Tabelle A2 im Anhang) wurden statistisch ausgewertet. Zusammenfassend stellt sich die Auswertung der Ergebnisse wie folgt dar:

Tabelle 18: Ergebnisse des Homogenitätstest

Wirkstoff	Mittelwert [µg/kg]	Standardabweichung [µg/kg]	Variationskoeffizient [rel %]	Variationskoeffizient (Horwitz) [122] in [µg/kg]	Variationskoeffizient (Horwitz) [122] in [%]	Dotierung [µg/kg]	Wiederfindung [%] der Dotierung
Acetamidiprid	41,55	1,2	2,9	9,14	22	45	92
Bifenthrin	34,9	2,8	8	7,68	22	35	100
Boscalid	112,4	8,4	7,5	24,6	21,9	115	98
Cyhalothrin, lambda	83,85	4,4	5,2	18,45	22	77	109
Cyprodinil	159,35	8	5	33,61	21,1	465	97
Delta-methrin	53,9	2,5	4,7	11,86	22	51	106
Fenhexamid	352,65	10,9	3,1	65,99	18,7	355	99
Fludioxinil	66,45	2,7	4	14,62	22	65	102
Iprodion	840,15	30,9	3,7	137,97	16,4	950	88
Pyrimethanil	1279,4	27,5	2,2	197,21	15,4	1400	91

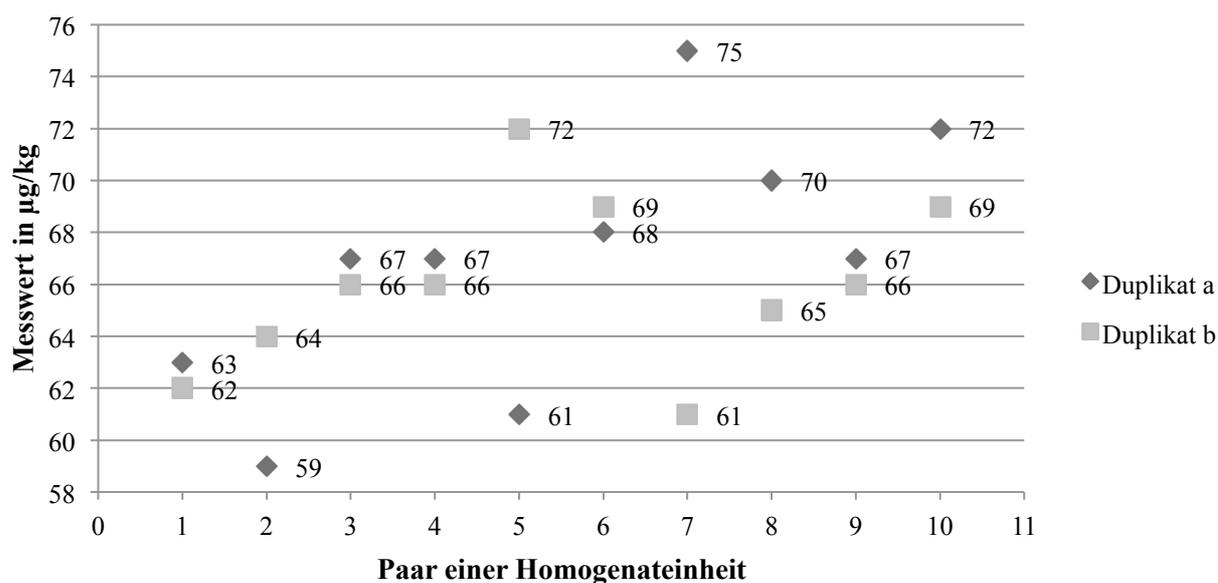
Das hergestellte Testmaterial erfüllte sämtliche statistischen Anforderungen an die Homogenität für jeden der 10 Wirkstoffe hinsichtlich der analytischen Varianz sowie bezüglich der Varianz zwischen den Testmaterial-Einheiten (s_{sam}^2).

Die Anwendung des Cochran-Tests [136, 137] ließ keine Identifizierung eines Ausreißer-Paares zu, bei dem die Einzelmesswerte eine statistisch nicht akzeptierbare Differenz aufweisen. Weiterhin wurde durch die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA keine statistische Kenngröße überschritten:

Tabelle 19: Ergebnisse des Cochran-Tests sowie der einfaktoriellen Varianzanalyse

Wirkstoff	Kritische Werte für den Cochran-Statistik-Test [136, 137]			Test auf ausreichende Homogenität [18]	
	Ermittelt	95%	99%	Ermittelte Varianz s_{sam}^2 zwischen den Testmaterial-Einheiten	Kritischer Wert
Acetamidiprid	0,391	0,602	0,718	0,878	15,3
Bifenthrin	0,381	0,602	0,718	6,429	18,46
Boscalid	0,464	0,602	0,718	67,6	155
Cyhalothrin-lambda	0,49	0,602	0,718	14,81	138,35
Cyprodinil	0,316	0,602	0,718	58,5	345,11
Deltamethrin	0,355	0,602	0,718	4,61	38,04
Fenhexamid	0,485	0,602	0,718	113,7	843,42
Fludioxinil	0,514	0,602	0,718	4,95	55,41
Iprodion	0,402	0,602	0,718	945,7	3.600,55
Pyrimethanil	0,267	0,602	0,718	749,33	6.883,59

Die größte Differenz zwischen Einzelmesswerten wurde bei dem Wirkstoff Fludioxinil festgestellt. Das Analysenpaar der Homogenitätseinheit Nr. 7 zeigt zwar eine auffällige Differenz (Cochran-Statistik-Test: $D^2/\text{Summe } D^2 = 0,514$), aber die kritischen Werte für den Cochran-Statistik-Test für Doppelbestimmungen mit $m = 10$ Analysenpaaren – 0,602 (95%) bzw. 0,718 (99%) – werden nicht überschritten. Der Wert von 0,514 liegt unterhalb des 5%-kritischen Wertes bzw. des 1%-kritischen Wertes, so dass kein Verdacht eines analytischen Ausreißers gegeben ist:

**Abb. 33:** Differenzen zwischen Analysenpaar-Messwerten bei Fludioxinil

Die Ergebnisse des Homogenitätstests zeigen darüber hinaus, dass der Variationskoeffizient nach Horwitz [122], der die Vergleichsstandardabweichung $\hat{\sigma}_H$ (relative Standardabweichung der Vergleichspräzision) wiedergibt, deutlich größer ist als der Variationskoeffizient der Laborpräzision, die im Rahmen der Bestimmung der Homogenität ermittelt wurde, und hier dem relativen Variationskoeffizienten [%] entspricht. Die Laborpräzision ist bei Bifenthrin mit 8% am höchsten (gegenüber der Vergleichspräzision nach Horwitz [122] mit 22%), und beim Pyrimethanil mit 2,2% am geringsten (gegenüber der Vergleichspräzision nach Horwitz [122] mit 15,4%). Die Ursache hierfür kann darauf zurückzuführen sein, dass Pyrethroide die Eigenschaft haben, an Glaswänden zu „kleben“ oder sich in alkalischer Umgebung abzubauen. Eine alkalische Umgebung kann z.B. durch Seifenreste an Glasmaterialien verursacht werden, die auf das Reinigen der Glasmaterialien zurückzuführen sind. Wird das Glasmaterial nach dem Reinigen nicht bei ausreichend hohen Temperaturen ($> 150^\circ\text{C}$) über einen längeren Zeitraum getrocknet, können Seifenreste nicht vollständig zerstört werden. Die ermittelte Laborpräzision bei den Pyrethroiden Cyhalothrin-lambda und Deltamethrin zeigen ebenfalls höhere Variationskoeffizienten im Vergleich zu den anderen Wirkstoffen.

Fazit

Das Testmaterial verfügte über die notwendige Homogenität und konnte somit für weitere Experimente als homogenes Probenmaterial herangezogen werden.

Ergebnisse des Stabilitätstests

Die Ergebnisse des Stabilitätstests, der im Anschluss an die Ergebnisabgabe der Teilnehmer des verdeckten Tests vorgenommen wurde, bestätigte die Stabilität der jeweiligen Wirkstoffe während der Testphase (s. auch zum Vergleich Tabelle 9):

Tabelle 20: Ergebnisse des Stabilitätstests

Wirkstoff	Dotierungslevel Soll [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Mittelwert des Homogenitätstests [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Mittelwert des Stabilitätstests [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Wiederfindung Stabilität zu Dotierung [%]
Acetamiprid	45	42	44	97,7
Bifenthrin	35	35	35	100,0
Boscalid	115	112	106	92,0
Cyhalothrin- lambda	77	84	94	122,0
Cyprodinil	165	159	162	98,2
Deltamethrin	51	54	52	102,0

Wirkstoff	Dotierungslevel Soll [µg/kg]	Mittelwert des Homogenitätstests [µg/kg]	Mittelwert des Stabilitätstests [µg/kg]	Wiederfindung Stabilität zu Dotierung [%]
Fenhexamid	355	353	358	100,8
Fludioxonil	65	66	64	98,5
Iprodion	950	840	950	100,0
Pyrimethanil	1.400	1.279	1.336	95,4

Fazit

Die Wiederfindungen der Sollwerte liegen zwischen 92% und 122%. Eine erhöhte Wiederfindung des Wirkstoffes Cyhalothrin-lambda zeigte sich bereits bei der Durchführung des Homogenitätstests (109%), so dass bei der Analytik des Wirkstoffes mit der hier angewendeten Methode von einem systematischen Fehler ausgegangen wird.

5.3 Zielsetzung 3: Analyse des Testmaterials mit unterschiedlichen Methoden und Kalibrierungen

Das Testmaterial (Traubenhomogenat) wurde mit unterschiedlichen Multimethoden untersucht (siehe 4.3.3), und die Messergebnisse wurden anschließend miteinander verglichen, um methodisch bedingte Unterschiede herauszuarbeiten.

Weiterhin wurden die Analysenergebnisse auf die Einhaltung von Verfahrenskenngrößen (Wiederholpräzision, Laborpräzision, Messunsicherheit, erweiterte Messunsicherheit, Richtigkeit, Robustheit sowie Bestimmungsgrenze) überprüft.

5.3.1 Multimethode L-00.00-115 „QuEChERS“ [10]

Die Traubenhomogenate wurden nach folgendem Schema analysiert: Das hergestellte Testmaterial (=Probe) wurde sechsmal hintereinander aufgearbeitet, aufgereinigt, analysiert und ausgewertet. Die Messung fand sowohl unter Wiederholbedingungen statt (gleiche Probe, gleiches Gerät, gleiche Standardlösungen, kurze Zeitfenster für die Durchführung der jeweiligen Analysen) als auch unter Laborbedingungen (gleiche Probe, unterschiedliche Geräte, unterschiedliche Standardlösungen/Reagenzien, längere Zeitfenster für die Durchführung der jeweiligen Analysen usw.). Die Analysen erfolgten darüber hinaus nach folgenden Vorgehensweisen:

- A) Messung der aufgearbeiteten Probenextrakte gegen einen externen Standard: Hierbei befanden sich die Pestizidstandards, die für die Kalibrierung und somit für die Quantifizierung herangezogen wurden, in Lösungsmittel und nicht in Matrix-Extrakten.
- B) Messung des Probenextraktes gegen Matrix-Standards: Auf Rückstandsfreiheit überprüfte Bio-Trauben (aus dem Handel) wurden noch vor der Aufarbeitung mit denjenigen Pestiziden dotiert, wie sie auch im Trauben-Testmaterial enthalten waren (gleiche Art und Konzentration). Diese dotierten Trauben wurden in gleicher Weise wie die zu vermessenden Proben aufgearbeitet. Die Quantifizierung erfolgte über den proportionalen Vergleich der Peakflächen der so „nachgestellten“ Probe mit den Flächen der Testmaterial-Proben (1-Punkt-Kalibrierung).
- C) Standardadditionsverfahren: Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurde Probenmaterial bereits vor der Probenaufarbeitung und -aufreinigung mit Pestizidstandards versetzt. Hierbei wurde die einfache, die zweifache sowie die dreifache Menge der tatsächlich im Probenmaterial enthaltenen Pestizide zugesetzt. Mit Hilfe des Standard-

additionsverfahrens wurden die Pestizide im Probenmaterial quantifiziert. Darüber hinaus wurden in Analogie hierzu die aufgearbeiteten und aufgereinigten Probenextrakte mit den Pestizidstandards (einfache, zweifache sowie dreifache Menge) versehen und die Quantifizierung ebenfalls über das Standardadditionsverfahren vorgenommen. Es wurde folglich der Einfluss der Aufarbeitung und der Aufreinigung auf das Analyseergebnis bei dieser Vorgehensweise nicht berücksichtigt.

Grundsätzlich wurden alle Wirkstoffe mittels GC-MS/MS sowie LC-MS/MS vermessen. Neben der Target-Ionenspur, die zur Identifizierung als auch zur Quantifizierung des jeweiligen Wirkstoffes herangezogen wurde, hat auch eine weitere Auswertung über eine weitere Qualifier-Ionenspur stattgefunden. Die Auswertung über die Qualifier-Ionenspur ist nur als ergänzende Information zu verstehen. Für die Auswertung sind die Ergebnisse der Target-Ionenspuren von erster Priorität.

5.3.1.1 Verfahrenskenngrößen (Gaschromatographie)

Die Testmaterial-Proben wurden sechsmal unter Wiederholbedingungen sowohl gegen einen Matrix-Standard als auch gegen einen Lösungsmittelstandard vermessen. Die relative Standardabweichung (RSD) ausgedrückt in % (RSD%) wurde ermittelt, ebenso wie die Wiederfindung. Da die Art der Wirkstoffe bekannt war und sich die Konzentrationen der Pestizide in den Testmaterial-Proben nicht im Bereich der Bestimmungsgrenze befanden, wurde diese nicht explizit ermittelt. Der praktische Arbeitsbereich für die Pestizidanalytik in Obst und Gemüseerzeugnissen liegt im unteren Konzentrationsbereich bei 0,01 mg/kg. Die instrumentelle Ausstattung (GC-MS/MS, LC-MS/MS) war sogar für die Detektion geringerer Gehalte geeignet. Die ermittelten Verfahrenskenngrößen (Messung gegen Matrix-Standard) stellen sich wie folgt dar:

Tabelle 21: Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul)

Wirkstoff	Konzentration (Mittelwert)	RSD Konzentrationen	Variations- koeffizient (RSD%)	Wiederfindung
	[µg/kg]	[µg/kg]	[%]	[%]
Bifenthrin_1	32	2	6	91
Bifenthrin_2	32	2	6	91
Boscalid_1	111	5	5	97
Boscalid_2	114	6	6	99
Cyprodinil_1	123	4	3	74

Wirkstoff	Konzentration (Mittelwert)	RSD Konzentrationen	Variationskoeffizient (RSD%)	Wiederfindung
Cyprodinil_2	122	4	3	74
Deltamethrin_1	38	3	8	74
Deltamethrin_2	35	3	9	68
Fenhexamid_1	214	13	6	60
Fenhexamid_2	203	10	5	57
Fludioxonil_1	61	4	6	95
Fludioxonil_2	63	4	7	97
Iprodion_1	856	38	4	90
Iprodion_2	738	69	9	78
Pyrimethanil_1	1.190	13	1	85
Pyrimethanil_2	1.193	12	1	85
Cyhalothrin-lambda_1	79	4	6	102

Die jeweilige Angabe der Zahl (_1 bzw. _2) hinter dem Wirkstoff kennzeichnet die Art der Ionenspur (_1: Target; _2: Qualifier)

Bis auf Acetamiprid konnten alle Wirkstoffe des Testmaterials gaschromatographisch bestimmt werden. Der Variationskoeffizient RSD% liegt bei allen mittels GC bestimmbarer Wirkstoffen unterhalb von 10%. Die Wiederfindungen liegen in der Regel zwischen 70% und 120% entsprechend den Anforderungen des Document No. SANCO/10684/2009 [15]. Lediglich der Wirkstoff Fenhexamid zeigt bei der Target-Ionenspur Wiederfindungen < 70%.

Die Messungen gegen den Lösungsmittelstandard führten zwar zu wiederholbaren Ergebnissen (die RSD% betrug 6% bis 20%), jedoch zeigten die Befunde deutlich zu hohe Werte (Wiederfindungen bis zu 300%). Als Ursache hierfür wurde schließlich der Einsatz neuer Liner identifiziert. Die GC-Messserien begannen jeweils mit der Einspritzung der Lösungsmittelstandards. Da zu Beginn einer Messserie immer ein neuer Liner verwendet wurde, equilibrierte sich dieser bei den ersten Durchläufen mit dem injizierten Probenmaterial (Lösungsmittelstandards), so dass die Signalintensität geringer ausfiel als bei den nachfolgend injizierten Testmaterialproben. Dadurch wurden höhere Konzentrationen des Testmaterials vorgetäuscht.

Entsprechend der Vorschrift zur QuEChERS-Methode [10] wurde ein interner Standard (PCB-31) verwendet, der zu einem frühen Zeitpunkt (vor der Aufarbeitung und Aufreinigung) den Proben / Matrixstandards zugesetzt wurde. Die Analysenergebnisse wurden mit diesem internen Standard korrigiert:

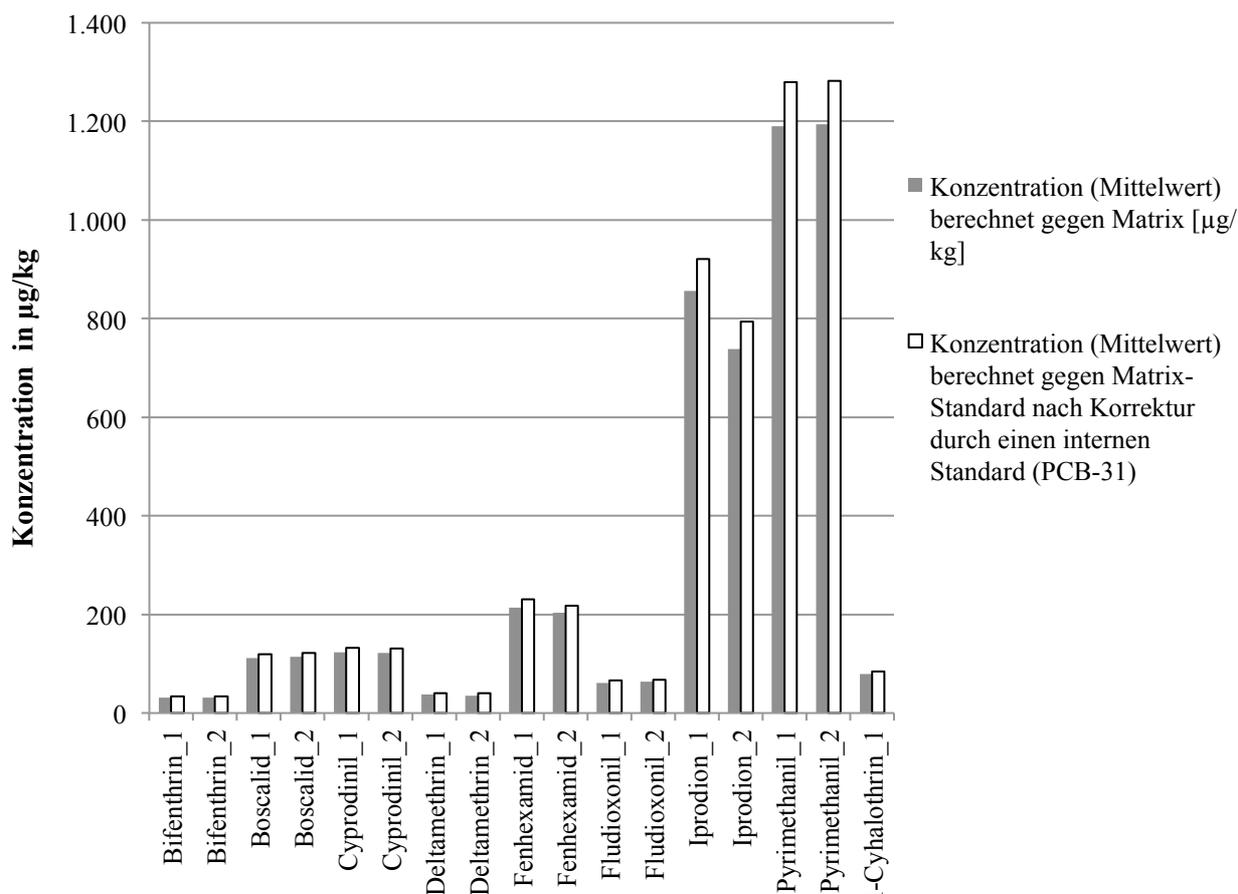


Abb. 34: Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul) nach Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31)

Die Korrektur mit dem internen Standard zeigt wenig Abweichung im Vergleich zu den Ergebnissen, die ohne Berücksichtigung des internen Standards ermittelt wurden. Dies galt im Übrigen auch für den Variationskoeffizienten.

Der kaum spürbare Einfluss der Korrektur mit einem internen Standard zeigte sich auch bei den Quantifizierungen nach dem Verfahren der Standardaddition. Hierbei wurde dem Probenmaterial die einfache, die zweifache sowie die dreifache Menge der tatsächlich im Probenmaterial enthaltenen Pestizide zugesetzt. Weiterhin wurden die aufgearbeiteten und aufgereinigten Probenextrakte mit den Pestizidstandards (einfache, zweifache sowie dreifache Menge) gespiked und die Quantifizierung über das Standardadditionsverfahren vorgenommen. Durch die Anwendung linearer Regression wurde der Wirkstoffgehalt ermittelt. Der Korrelationskoeffizient „r“ wird als Kriterium für die Linearität der Kalibriergeraden herangezogen [138]. Korrelationsunterschiede können durch das Bestimmtheitsmaß R^2 , welches durch eine Quadrierung

von r ermittelt wird, erkannt werden. Die Werte für R^2 zeigten gute Ergebnisse – wie am Beispiel von Deltamethrin_1 nachfolgend dargestellt wird:

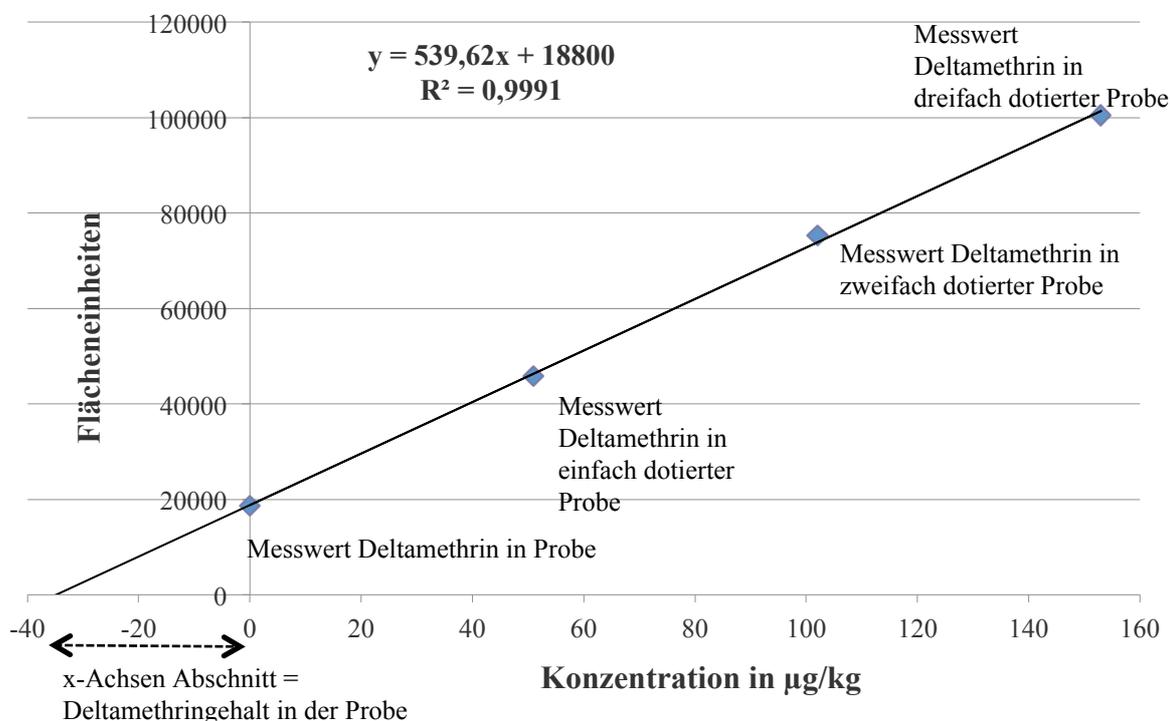


Abb. 35: Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul) - Standardaddition von Deltamethrin mit gespikten Probenextrakten

Die Quantifizierung aller mittels GC bestimmbaren Wirkstoffe über die Standardaddition wurde an dotiertem Probenmaterial sowie an gespikten Probenextrakten vorgenommen und führte zu folgenden Ergebnissen:

Tabelle 22: Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul) - Standardaddition an gespikten Extrakten und dotierten Proben im Vergleich

Wirkstoff	Standardaddition Probe			Standardaddition Extrakt		
	Ergebnis [µg/kg]	Soll [µg/kg]	Wiederfindung (%)	Ergebnis [µg/kg]	Soll [µg/kg]	Wiederfindung (%)
Bifenthrin_1	19	35	53	19	35	53
Bifenthrin_2	19	35	54	18	35	50
Boscalid_1	57	115	49	49	115	43
Boscalid_2	58	115	50	53	115	47
Cyprodinil_1	90	165	54	82	165	50
Cyprodinil_2	88	165	54	84	165	51

Wirkstoff	Standardaddition Probe			Standardaddition Extrakt		
Deltamethrin_1	37	51	73	35	51	68
Deltamethrin_2	37	51	72	30	51	58
Fenhexamid_1	91	355	26	38	355	11
Fenhexamid_2	84	355	24	35	355	10
Fludioxinil_1	38	65	58	35	65	54
Fludioxinil_2	38	65	59	33	65	51
Iprodion_1	518	950	55	465	950	49
Iprodion_2	507	950	53	412	950	43
Pyrimethanil_1	1.220	1.400	87	1.166	1.400	83
Pyrimethanil_2	1.211	1.400	87	1.156	1.400	83
Cyhalothrin-lambda_1	61	77	80	55	77	71

Die jeweilige Angabe der Zahl (_1 bzw. _2) hinter dem Wirkstoff kennzeichnet die Art der Ionenspur (_1: Target; _2: Qualifier)

Die Anwendung des Standardadditionsverfahrens unter Berücksichtigung der Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31) führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Die Unterschiede zwischen den ermittelten Gehalten durch die Standardaddition in dotierten Proben und in gespikten Extrakten waren nicht groß. Tendenziell wird im Extrakt etwas weniger gefunden. Die eher geringeren Wiederfindungen (< 70%) können darauf zurückgeführt werden, dass die Gerade der Standardaddition nach hinten hin (höherer Konzentrationsbereich) steiler verläuft, wodurch sich der x-Achsenabschnitt verkleinert. Ursächlich hierfür ist die Aufstockung über einen großen Konzentrationsbereich (im Fall von Pyrimethanil: 1.400 µg/kg bis zu 5.600 µg/kg), wodurch der lineare Messbereich der Geräte verlassen wird.

Ein Vergleich der Laborpräzision und der Wiederholpräzision wurde ebenfalls vorgenommen. Bei der Laborpräzision fand die Analyse im gleichen Labor, aber unter variierenden Randbedingungen statt:

- mit unterschiedlichen Reagenzien (die bereits seit längerer Zeit angebrochen oder frisch hergestellt wurden),
- mit unterschiedlichen Geräten, die im Rahmen der Aufarbeitung und Aufreinigung verwendet wurden,
- mit Standardlösungen, die bereits seit längerer Zeit angebrochen oder frisch angesetzt wurden sowie
- mit zeitlich weit auseinanderliegenden Zeitfenstern für die Durchführungen der jeweiligen Analysen.

Demzufolge war zu erwarten, dass die Verfahrenskenngrößen unter den Laborbedingungen stärkere Schwankungen aufweisen als die Ergebnisse der Wiederholbedingungen (gleiche Probe,

gleiches Gerät, gleiche Standardlösungen, kürzere Zeitfenster für die Durchführung der jeweiligen Analysen):

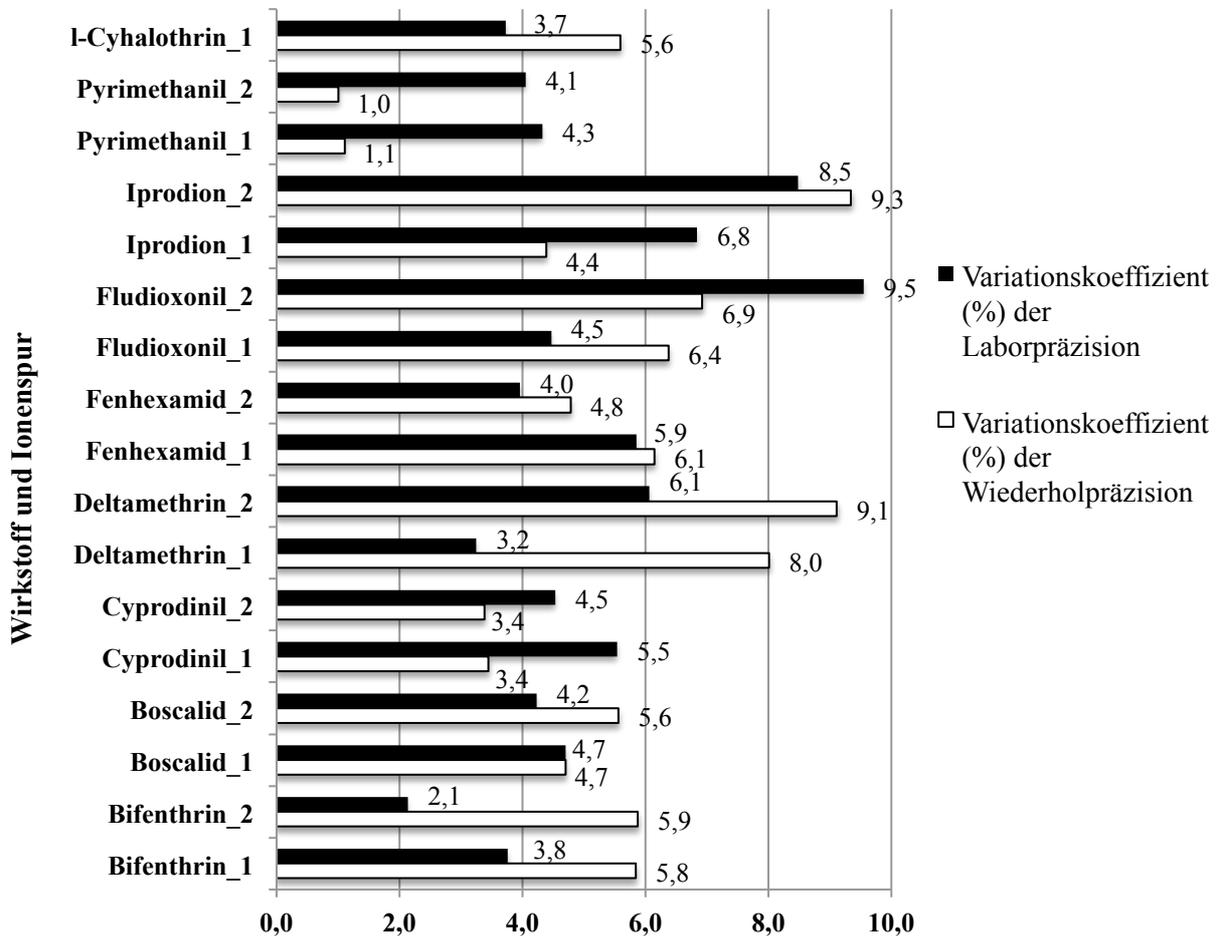


Abb. 36: Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Wiederhol- und Laborpräzision (nicht korrigiert mit internem Standard)

Die Variationskoeffizienten variieren nur geringfügig; die größte Abweichung ist bei dem Target-Ionenübergang des Deltamethrins gegeben (4,8% Differenz zwischen dem Variationskoeffizienten unter Wiederholbedingungen und Laborbedingungen). Zum Teil sind die Variationskoeffizienten unter Laborbedingungen sogar geringer als unter Wiederholbedingungen (bei Cyhalothrin-lambda_1, Pyrimethanil_1, Fludioxinil_1, Fenhexamid_1, Delatamethrin_1 und Bifenthrin_1). Bei den (absolut betrachtet) geringen Abweichungen erscheint dieser Effekt allerdings irrelevant.

Auch unter Berücksichtigung einer Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31) zeigt sich ein vergleichbares Bild: Die Differenz zwischen den Variationskoeffizienten der Wiederhol- und Laborpräzision beträgt maximal 3,6% bei den Target-Ionenspuren von Iprodion und

Fenhexamid, wenn man die Koeffizienten mit und ohne Korrektur durch einen internen Standard miteinander vergleicht. Die Wiederfindungen differieren um maximal 9% bei den Wirkstoffen, wenn die Ergebnisse mit einem internen Standard korrigiert werden.

Auch die Wiederfindungsraten verhalten sich unter Labor- und Wiederholbedingungen ähnlich und unterscheiden sich nur wenig voneinander:

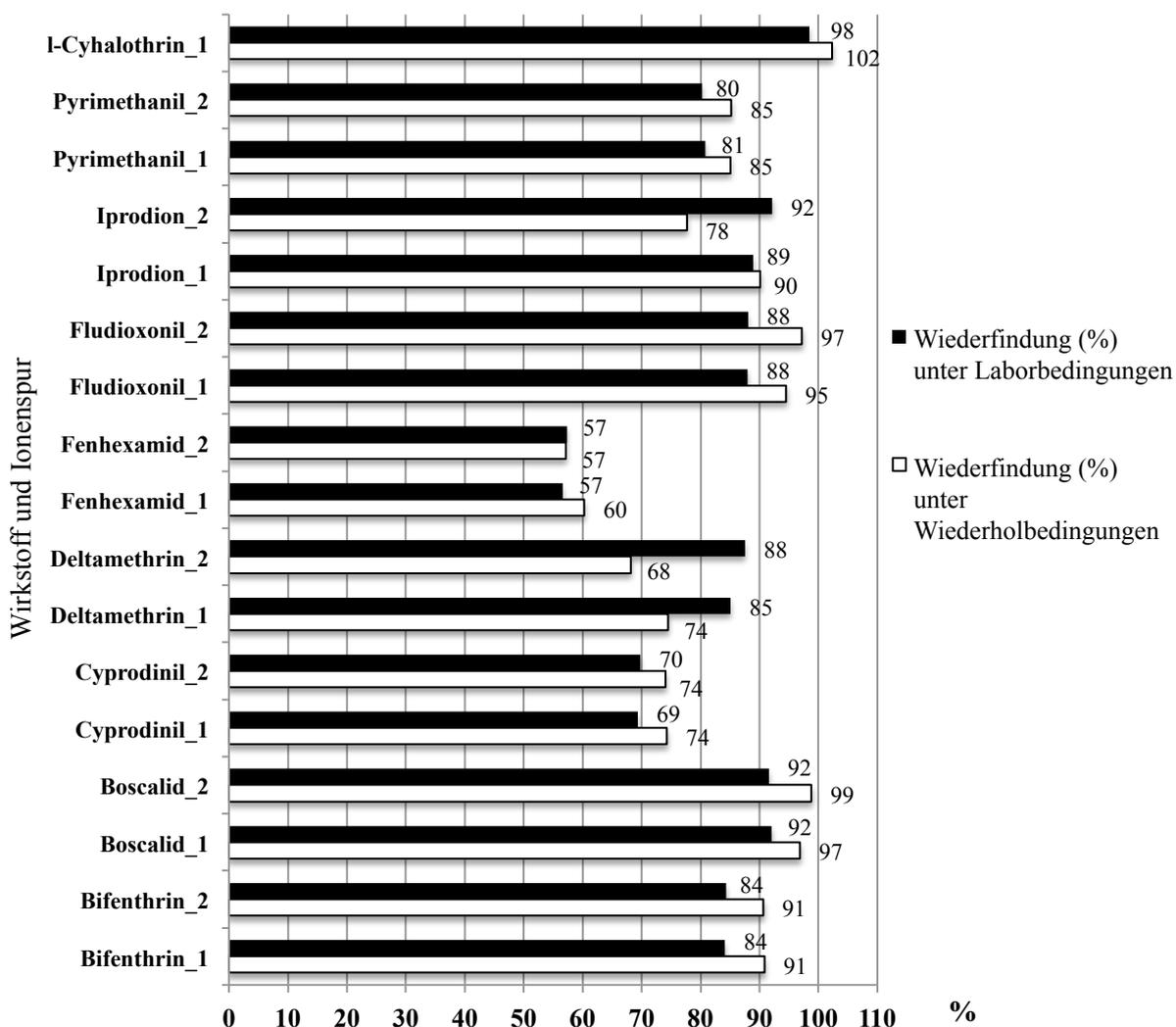


Abb. 37: Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Wiederfindungen (%) unter Labor- und Wiederholbedingungen (nicht korrigiert mit internem Standard)

Der Wirkstoff Fenhexamid wird somit wiederholbar „schlecht“ bestimmt – sowohl unter Labor- als auch unter Wiederholbedingungen. Eine Korrektur der Ergebnisse mit einem internen Standard (PCB-31) hatte wenig Einfluss und veränderte die Werte kaum.

Fazit:

Die ermittelten Verfahrenskenngrößen zeigen gute Werte für die mittels GC-MS/MS bestimm- baren Wirkstoffe. Fenhexamid lässt sich nur zu etwa 60% wiederfinden. Bifenthrin, Boscalid, Cyprodinil, Deltamethrin, Fludioxinil, Iprodion, Pyrimethanil und Cyhalothrin-lambda sind sicher über QuEChERS bestimmbar gegen Matrixstandards, die die Wirkstoffe zu gleichen Konzentrationen enthalten wie das Testmaterial. Die Korrektur der Gehalte durch die Anwen- dung eines internen Standards hat keinen signifikanten Einfluss auf die Messergebnisse. Die Anwendung der Standardaddition führt in der Regel zu geringeren Befunden. Signifikante Unterschiede zwischen der Analyse unter Wiederholbedingungen und Laborbedingungen konnten nicht festgestellt werden. Ein Wirkstoff, wie z.B. das Fenhexamid, wird somit zwar wiederholbar gemessen, allerdings auch wiederholbar mit einer schlechten Wiederfindung.

5.3.1.2 Verfahrenskenngrößen (Flüssigkeitschromatographie, LC)

Auch hier wurden die Testmaterial-Proben sechsmal unter Wiederholbedingungen sowohl gegen einen Matrix-Standard als auch gegen einen Lösungsmittelstandard vermessen. Die Wirkstoffe Bifenthrin, Deltamethrin, Fludioxinil und Cyhalothrin-lambda sind aufgrund ihrer chemisch- physikalischen Eigenschaften (unpolar, Größe) ungeeignet für die LC-Analytik und wurden nicht erfasst. Die Quantifizierung wurde sowohl über einen Matrix-Standard als auch über einen Lösungsmittelstandard vorgenommen:

Tabelle 23: Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul)

Matrix-matched				
Wirkstoff	Konzentration (Mittelwert)	RSD Konzentrationen	Variationskoeffizient (RSD%)	Wiederfindung
	[µg/kg]	[µg/kg]	[%]	[%]
Acetamiprid_1	38	4	10	85
Acetamiprid_2	34	5	16	75
Boscalid_1	102	10	9	89
Boscalid_2	115	20	18	100
Cyprodinil_1	110	13	11	67
Cyprodinil_2	109	7	7	66
Fenhexamid_1	223	16	7	63
Fenhexamid_2	195	42	22	55

Matrix-matched				
Wirkstoff	Konzentration (Mittelwert)	RSD Konzentrationen	Variationskoeffizient (RSD%)	Wiederfindung
	[µg/kg]	[µg/kg]	[%]	[%]
Iprodion_1	772	87	11	81
Iprodion_2	709	78	11	75
Pyrimethanil_1	1.086	65	6	78
Pyrimethanil_2	1.091	51	5	78

Die jeweilige Angabe der Zahl (_1 bzw. _2) hinter dem Wirkstoff kennzeichnet die Art der Ionenspur (_1: Target; _2: Qualifier)

Die Quantifizierung über den Matrix-Standard zeigt Variationskoeffizienten (RSD%), die maximal bei 11% liegen (Target-Ionenspur). Cyprodinil und Fenhexamid zeigen Wiederfindungen, die unterhalb von 70% des tatsächlichen Wirkstoffgehaltes liegen.

Die Messungen gegen einen Lösungsmittelstandard führten zu folgenden Ergebnissen:

Tabelle 24: Messung gegen Lösungsmittelstandard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul)

Externer Lösungsmittelstandard				
Wirkstoff	Konzentration (Mittelwert)	RSD Konzentrationen	Variationskoeffizient (RSD%)	Wiederfindung
	[µg/kg]	[µg/kg]	[%]	[%]
Acetamidiprid_1	23	2	10	50
Acetamidiprid_2	28	4	16	62
Boscalid_1	84	8	9	73
Boscalid_2	95	17	18	82
Cyprodinil_1	82	9	11	50
Cyprodinil_2	75	5	7	46
Fenhexamid_1	136	10	7	38
Fenhexamid_2	165	36	22	47
Iprodion_1	626	71	11	66
Iprodion_2	659	72	11	69
Pyrimethanil_1	887	53	6	63
Pyrimethanil_2	861	40	5	61

Die jeweilige Angabe der Zahl (_1 bzw. _2) hinter dem Wirkstoff kennzeichnet die Art der Ionenspur (_1: Target; _2: Qualifier)

Obwohl die Ergebnisse wiederholbar sind (RSD% maximal 11% bei Target-Ionenspuren), liegen sie in der Regel unterhalb der tatsächlich zugesetzten Gehalte (Wiederfindungen < 70%; lediglich Boscalid zeigt zufriedenstellende Wiederfindungen). Ursächlich hierfür ist die geringere Ionisierungsausbeute, die durch die Matrixbestandteile im Probenextrakt verursacht

wird. Da bei dem externen Lösungsmittelstandard keine Matrixbestandteile im Messextrakt enthalten sind wird dieser Effekt nicht berücksichtigt. Die Signalintensität ist deshalb relativ betrachtet stärker im Vergleich zu den Intensitäten der Signale der Probenextrakte. Somit werden in den Proben geringere Gehalte ermittelt (als tatsächlich zugesetzt).

Weiterhin wurden Quantifizierungen nach dem Verfahren der Standardaddition vorgenommen (in Analogie zur Vorgehensweise wie unter 5.3.1.1 beschrieben).

Die Werte für das Bestimmtheitsmaß R^2 zeigten gute Ergebnisse – wie am Beispiel von Boscalid_1 nachfolgend dargestellt wird:

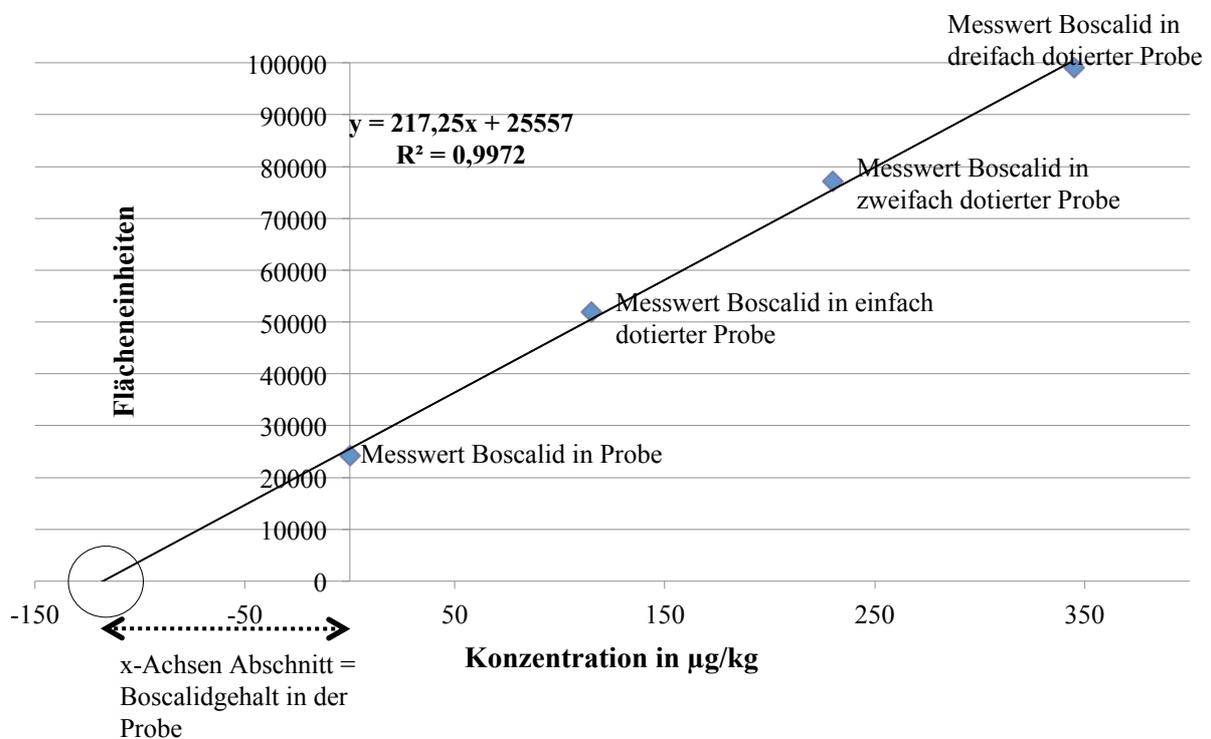


Abb. 38: Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul) - Standardaddition von Boscalid mit dotiertem Probenmaterial

Die Quantifizierung aller mittels LC bestimmbarer Wirkstoffe über die Standardaddition wurde an dotiertem Probenmaterial sowie an gespikten Probenextrakten vorgenommen und führte zu folgenden Ergebnissen:

Tabelle 25: Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Standardaddition von dotiertem Probenmaterial und gespikten Probenextrakten

Wirkstoff	Standardaddition dotierte Probe			Standardaddition gespikter Extrakt		
	Ergebnis [µg/kg]	Soll [µg/kg]	Wiederfindung (%)	Ergebnis [µg/kg]	Soll [µg/kg]	Wiederfindung (%)
Acetamid_1	37	45	83	36	45	80
Acetamid_2	39	45	86	33	45	74
Boscalid_1	118	115	102	117	115	102
Boscalid_2	180	115	156	159	115	139
Cyprodinil_1	104	165	63	109	165	66
Cyprodinil_2	123	165	75	109	165	66
Fenhexamid_1	325	355	92	208	355	59
Fenhexamid_2	347	355	98	191	355	54
Iprodion_1	1.346	950	142	1.019	950	107
Iprodion_2	1.497	950	158	1.075	950	113
Pyrimethanil_1	1.967	1.400	141	1.973	1.400	141
Pyrimethanil_2	2.084	1.400	149	1.887	1.400	135

Die jeweilige Angabe der Zahl (_1 bzw. _2) hinter dem Wirkstoff kennzeichnet die Art der Ionenspur (_1: Target; _2: Qualifier)

Die Unterschiede zwischen Standardaddition in dotierter Probe und in gespiktem Probenextrakt sind nicht signifikant. Tendenziell wird im Extrakt etwas weniger gefunden (zum Beispiel bei Fenhexamid_1: 92% gegenüber 59 % Wiederfindung). Im Vergleich zur Quantifizierung gegen einen Matrix-Standard (siehe Tabelle 23) liegen die Wiederfindungsraten jedoch oftmals außerhalb eines Bereiches von 70%-120% (Document No. SANCO/10684/2009 [15]). Ursächlich hierfür ist die Aufstockung über einen großen Konzentrationsbereich (im Fall von Pyrimethanil: 1.400 µg/kg bis zu 5.600 µg/kg), wodurch der lineare Messbereich verlassen wird. Die Geraden flachen nach hinten hin ab, wodurch der x-Achsen-Abschnitt größer wird (→ höhere Wiederfindungsraten). Dieser Effekt verläuft somit genau gegenläufig zur Standardaddition bei der GC-MS/MS, bei der die Gerade nach hinten hin steiler verläuft.

Ein Vergleich der Laborpräzision und der Wiederholpräzision wurde ebenfalls vorgenommen. Bei der Laborpräzision fand die Analyse im gleichen Labor, aber unter variierenden Randbedingungen statt (s. Seite 108):

Auch hier war zu erwarten, dass die Verfahrenskenngrößen unter Laborbedingungen stärkere Schwankungen aufweisen als die Ergebnisse unter Wiederholbedingungen. Die Auswertung der Ergebnisse bestätigt diese Vermutung:

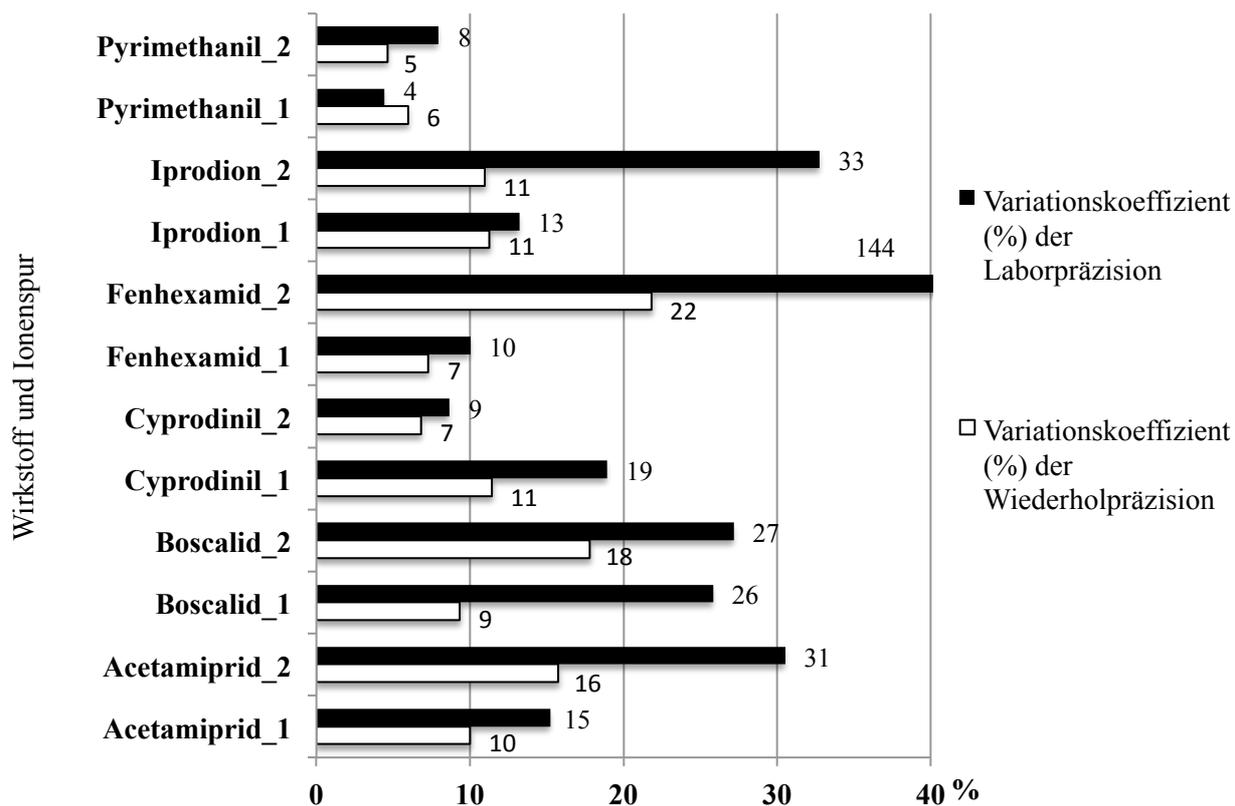


Abb. 39 Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Variationskoeffizienten unter Wiederhol- und Laborbedingungen gegen Matrix

Lediglich die Ergebnisse der Qualifier-Ionenspur für Iprodion und Fenhexamid zeigten signifikante Differenzen. Die Auswertungen der Target-Ionenspur zeigten maximal eine Differenz von 15% zwischen der Wiederhol- und der Laborpräzision bei Boscalid. Somit konnten keine gravierenden Differenzen des Variationskoeffizienten zwischen Labor- und Wiederholbedingungen festgestellt werden.

Die Wiederfindungen (Richtigkeit) der Ergebnisse unter Wiederhol- und Laborbedingungen zeigen ein ähnliches Bild:

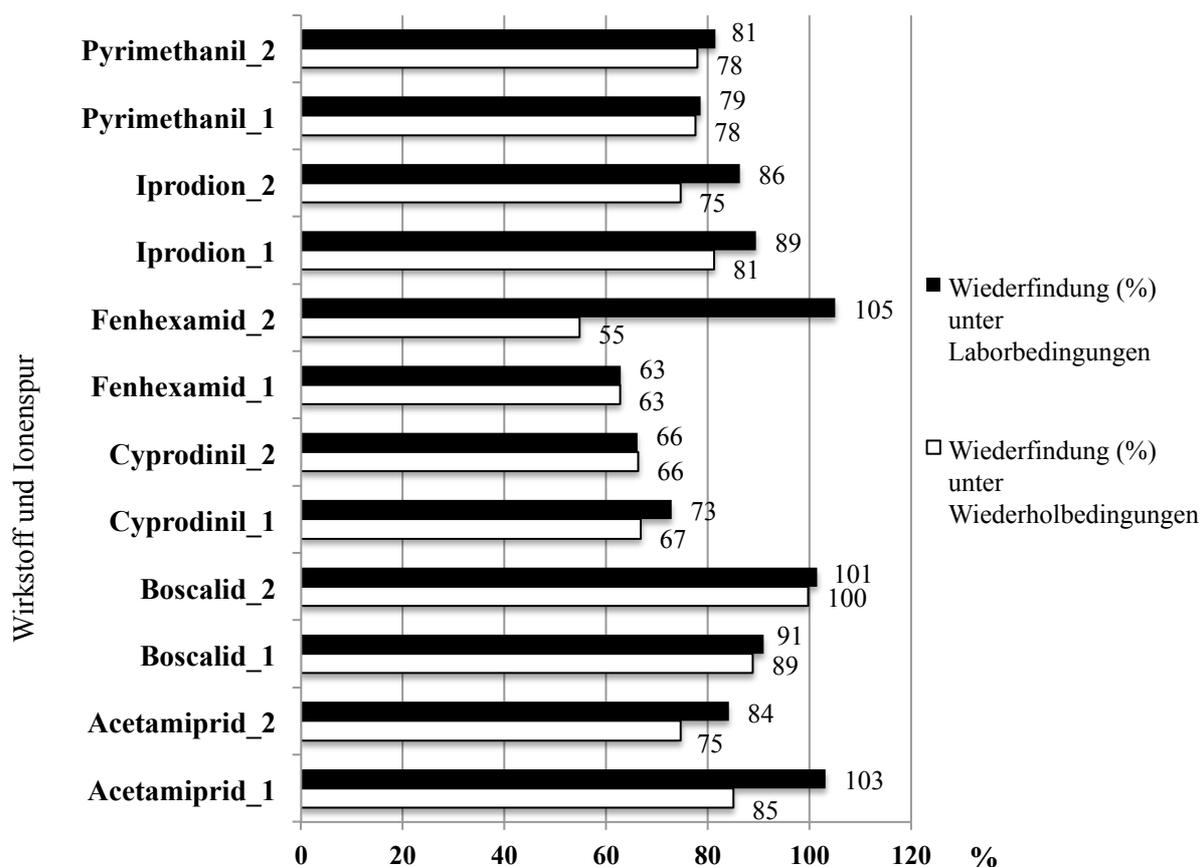


Abb. 40: Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Wiederfindungen unter Wiederhol- und Laborbedingungen gegen Matrix

Hier zeigt nur die Qualifier-Ionenspur von Fenhexamid eine signifikante Differenz (50%). Ansonsten liegen die Differenzen der Target-Ionenspuren maximal bei 18% (Acetamiprid_1) oder weniger (0% bei Fenhexamid_1 sowie 8% bei Iprodion_1). Somit konnten keine gravierenden Differenzen der Wiederfindungen zwischen Labor- und Wiederholbedingungen festgestellt werden.

Fazit

Die Quantifizierung der Probenwirkstoffe mit Matrix-Standards zeigt die besten Verfahrenskenngrößen der über die LC-Analytik bestimmbaren Wirkstoffe. Lediglich Cyprodinil und Fenhexamid zeigen Wiederfindungen < 70%. Acetamiprid, Boscalid, Iprodion, Pyrimethanil lassen sich mit guten Wiederfindungen und wiederholbar quantifizieren. Die Quantifizierung über einen externen Standard in Lösungsmittel führt nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen (in der Regel zu geringe Gehalte), da sie den Matrixeffekt nicht ausreichend berücksichtigen. Die

Standardaddition führt bei der Analyse mittels LC-MS/MS zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Teilweise konnte jedoch eine Tendenz zu höheren Gehalten festgestellt werden. Dies ist insbesondere bei den Wirkstoffen zu beobachten, die zu höheren Gehalten ($> 100 \mu\text{g/kg}$) im Testmaterial enthalten waren (Boscalid, Iprodion, Pyrimethanil). Die Wirkstoffe Fenhexamid sowie Cyprodinil zeigten bereits bei der Messung gegen einen Matrixstandard geringere Wiederfindungen. Dieser Effekt wird bei der Standardaddition zum Vorteil der Wiederfindungsraten (63%-98%) kompensiert. Signifikante Unterschiede zwischen der Analyse unter Wiederholbedingungen und Laborbedingungen konnten nicht festgestellt werden. Ein Wirkstoff wie z.B. das Fenhexamid wird somit zwar wiederholbar gemessen, allerdings auch wiederholbar mit einer schlechten Wiederfindung.

5.3.2 Multimethode L-00.00-113, „BfR-Methode“[9]

Die Vorgehensweise erfolgte wie unter 5.1.1 (QuEChERS) beschrieben, wobei die nachfolgenden Messungen ausschließlich unter Wiederholbedingungen stattgefunden haben. Standardadditionen (wie unter 5.1.1. C beschrieben) wurden nicht vorgenommen. Grundsätzlich wurden alle Wirkstoffe mittels GC-MS/MS sowie LC-MS/MS vermessen.

5.3.2.1 Verfahrenskenngrößen (Gaschromatographie, GC)

Die relative Standardabweichung (RSD%) sowie die Wiederfindungsraten zeigten folgende Ergebnisse:

Tabelle 26: Messung gegen Matrix-Standard (BfR-Methode GC-MS/MS-Modul)

Wirkstoff	Konzentration (Mittelwert)	RSD Konzentrationen	Variations- koeffizient (RSD%)	Wiederfindung
	[µg/kg]	[µg/kg]	[%]	[%]
Bifenthrin_1	25	4	16	71
Bifenthrin_2	25	4	15	71
Boscalid_1	86	13	15	75
Boscalid_2	88	13	15	77
Cyprodinil_1	112	12	11	68
Cyprodinil_2	112	13	12	68
Deltamethrin_1	31	7	23	62
Deltamethrin_2	34	8	23	67
Fenhexamid_1	159	32	20	45
Fenhexamid_2	159	33	21	45
Fludioxonil_1	54	6	12	82
Fludioxonil_2	53	6	12	82
Iprodion_1	760	106	14	80
Iprodion_2	794	159	20	84
Pyrimethanil_1	1.052	109	10	75
Pyrimethanil_2	1.063	109	10	76
Cyhalothrin-lambda_1	61	10	16	79

Die jeweilige Angabe der Zahl (_1 bzw. _2) hinter dem Wirkstoff kennzeichnet die Art der Ionenspur (_1: Target; _2: Qualifier)

Eine Tendenz zu geringeren Wiederfindungen ist bei den Wirkstoffen Cyprodinil, Deltamethrin und Fenhexamid erkennbar. Das Fenhexamid zeigt auch hier wie bei der Methode nach QuEChERS die schlechtesten Ergebnisse bei der Wiederfindung. Gleichwohl kann Fenhexamid (wie bei QuEChERS) zufriedenstellend wiederholbar bestimmt werden (RSD%: 20% bei der Target-Ionenspur).

Die Messungen gegen den Lösungsmittelstandard führten zwar zu wiederholbaren Ergebnissen, jedoch zeigten die Befunde deutlich zu hohe Werte. Als Ursache hierfür wurde der Einsatz neuer Liner identifiziert (siehe auch unter 5.3.1.1).

Die Berücksichtigung der Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31) zeigte vergleichbare Wiederfindungen. Die Ergebnisse schwankten jedoch weniger, was durch die kleineren Variationskoeffizienten zum Ausdruck gebracht wird:

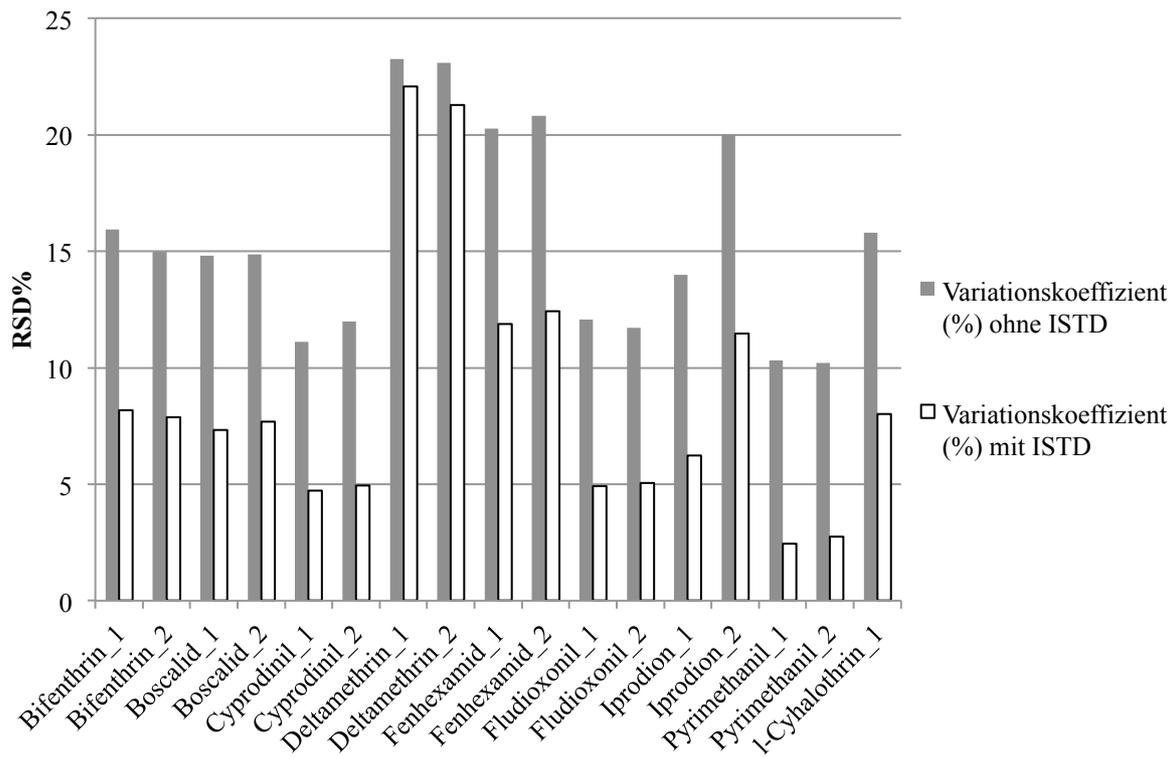


Abb. 41: Messung gegen Matrix-Standard (BfR-Methode GC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Variationskoeffizienten mit und ohne Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31)

Fazit

Wie bei der QuEChERS-Methode zeigt auch die BfR-Methode nicht zufriedenstellende Wiederfindungen bei dem Wirkstoff Fenhexamid. Die Matrix-Wirkstoff-Kombination „Traube-Fenhexamid“ ist insofern kein methodenspezifisches Problem. Sie scheint offensichtlich eine grundsätzliche Herausforderung an die Analytik darzustellen.

Die Richtigkeit der Analyseergebnisse (ausgedrückt als Verfahrenskenngröße der „Wiederfindung“) wird durch die Korrektur mit einem internen Standard wenig beeinflusst. Die Wiederholbarkeit (RSD%) der Analyseergebnisse wird jedoch durch den internen Standard verbessert.

5.3.2.2 Verfahrenskenngrößen (Flüssigkeitschromatographie, LC)

Die Quantifizierung wurde sowohl über einen Matrix-Standard als auch über einen Lösungsmittelstandard vorgenommen:

Tabelle 27: Messung gegen Matrix-Standard (BfR-Methode LC-MS/MS-Modul)

Wirkstoff	Matrix-matched			
	Konzentration (Mittelwert)	RSD Konzentrationen	Variationskoeffizient (RSD%)	Wiederfindung
	[µg/kg]	[µg/kg]	[%]	[%]
Acetamidiprid_1	38	3	7	85
Acetamidiprid_2	47	6	12	104
Boscalid_1	115	16	14	100
Boscalid_2	140	21	15	122
Cyprodinil_1	115	14	12	70
Cyprodinil_2	120	14	12	73
Fenhexamid_1	214	20	10	60
Fenhexamid_2	225	29	13	63
Iprodion_1	791	67	8	83
Iprodion_2	740	112	15	78
Pyrimethanil_1	1.171	105	9	84
Pyrimethanil_2	1.192	93	8	85

Die jeweilige Angabe der Zahl (_1 bzw. _2) hinter dem Wirkstoff kennzeichnet die Art der Ionenspur (_1: Target; _2: Qualifier)

Die Wiederholbarkeit der Analysen zeigt zufriedenstellende Variationskoeffizienten (7-14% bei den Target-Ionenspuren). Die Richtigkeit (Wiederfindung) des Wirkstoffes Fenhexamid entspricht auch hier erneut nicht den Anforderungen nach dem Document No. SANCO/10684/2009" [15].

Die Messungen gegen einen Lösungsmittelstandard führten zu folgenden Ergebnissen:

Tabelle 28: Messung gegen Lösungsmittelstandard (BfR-Methode LC-MS/MS-Modul)

Wirkstoff	Externer Lösungsmittelstandard			
	Konzentration (Mittelwert)	RSD Konzentrationen	Variationskoeffizient (RSD%)	Wiederfindung
	[µg/kg]	[µg/kg]	[%]	[%]
Acetamidrid_1	20	1	7	43
Acetamidrid_2	26	3	12	57
Boscalid_1	96	13	14	84
Boscalid_2	95	15	15	83
Cyprodinil_1	92	11	12	56
Cyprodinil_2	83	10	12	51
Fenhexamid_1	257	25	10	72
Fenhexamid_2	314	40	13	89
Iprodion_1	496	42	8	52
Iprodion_2	500	76	15	53
Pyrimethanil_1	935	84	9	67
Pyrimethanil_2	908	70	8	65

Die jeweilige Angabe der Zahl (_1 bzw. _2) hinter dem Wirkstoff kennzeichnet die Art der Ionenspur (_1: Target; _2: Qualifier)

Obwohl die Ergebnisse wiederholbar sind (RSD% im Bereich von 7-14% bei den Target-Ionenspuren), liegen sie in der Regel unterhalb der tatsächlich zugesetzten Gehalte (Wiederfindungen < 70%). Ursächlich hierfür ist ebenfalls die geringere Ionisierungsausbeute, die durch die Matrixbestandteile im Probenextrakt verursacht wird (siehe 5.3.1.2).

Erstaunlicherweise kann der Wirkstoff Fenhexamid mit der erforderlichen Richtigkeit hier gegen einen Lösungsmittelstandard bestimmt werden.

Die Analyse verdünnter Extrakte (1:10) hat zu keinen bemerkenswerten Verbesserungen der Ergebnisse geführt.

Fazit

Auch hier ist die Richtigkeit (Wiederfindungen) der Ergebnisse bei Messungen gegen Matrixstandards deutlich besser. Unabhängig von der Richtigkeit der Ergebnisse sind diese in der Regel gut wiederholbar (Variationskoeffizient).

5.3.3 Multimethode L 00.00-34, Sammelmethode DFG S 19 [57]

Die Vorgehensweise erfolgte wie unter 5.1.1 (QuEChERS) beschrieben. Es wurden lediglich keine Standardadditionen wie unter 5.1.1. vorgenommen. Grundsätzlich wurden alle Wirkstoffe mittels GC-MS/MS sowie LC-MS/MS vermessen.

5.3.2.1 Verfahrenskenngrößen (Gaschromatographie, GC)

Die Methode nach DFG S 19 ist die „älteste“ und die umfassendste Multimethode, die im Rahmen dieser Arbeit für die Messungen des Testmaterials herangezogen wurde. Ein zentraler Aspekt, der im Rahmen der Entwicklung dieser Methode im Mittelpunkt stand, war insbesondere die Analyse fetthaltiger sowie komplexer Matrices. Die Aufreinigung des Probenextraktes (Aceton) durch eine flüssig/flüssig-Verteilung mit Ethylacetat/Cyclohexan (1:1) sowie der Ausschluss sterisch-komplexer Störsubstanzen mit großer Oberfläche (wie z.B. Fette) durch die Gel-permeationschromatographie (GPC) lassen sich auf die ursprüngliche Ausrichtung der Methode zurückführen. Im Gegensatz zur QuEChERS- und BfR-Methode ist das Ziel der Anwendung der S 19-Methode nicht explizit die Pestizidanalytik in fettarmen Lebensmitteln. Während im Rahmen der durchgeführten Analytik die Aufreinigung mittels GPC vorgenommen wurde, entfiel die Aufreinigung mittels Kieselgel (s. Abb. 6), da die Messungen an einem GC-MS/MS-System vorgenommen wurden (und nicht mit einer GC-ECD-Kombination).

Tabelle 29: Messung gegen Matrix-Standard (DFG S 19 Methode GC-MS/MS-Modul)

Wirkstoff	Konzentration (Mittelwert)	RSD Konzentrationen	Variations- koeffizient (RSD%)	Wiederfindung
	[µg/kg]	[µg/kg]	[%]	[%]
Bifenthrin_1	23	5	22	64
Bifenthrin_2	23	5	21	65
Boscalid_1	72	15	21	63
Boscalid_2	72	16	22	63
Cyprodinil_1	97	15	16	59
Cyprodinil_2	96	17	17	58
Deltamethrin_1	27	6	21	53
Deltamethrin_2	29	5	17	57
Fenhexamid_1	127	32	25	36
Fenhexamid_2	124	32	26	35
Fludioxonil_1	43	9	22	66
Fludioxonil_2	44	10	24	67
Iprodion_1	584	131	22	61
Iprodion_2	551	133	24	58
Pyrimethanil_1	907	148	16	65
Pyrimethanil_2	915	147	16	65
Cyhalothrin-lambda_1	60	11	19	77

Die jeweilige Angabe der Zahl (_1 bzw. _2) hinter dem Wirkstoff kennzeichnet die Art der Ionenspur (_1: Target; _2: Qualifier)

Geringere Wiederfindungen (< 70%) waren hierbei die Regel. Lediglich das Cyhalothrin-lambda konnte mit zufriedenstellender Wiederfindung bestimmt werden. Im Vergleich zu den anderen Multimethoden zeigen sich höhere Variationskoeffizienten (16-26%). Die Messungen gegen den Lösungsmittelstandard führten zwar zu wiederholbaren Ergebnissen jedoch zeigten die Befunde deutlich zu hohe Werte. Als Ursache hierfür wurde der Einsatz neuer Liner identifiziert (siehe auch unter 5.3.1.1).

Die Berücksichtigung der Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31) erschien angemessen und zeigte deutliche Verbesserungen hinsichtlich der Wiederholbarkeit sowie der Richtigkeit:

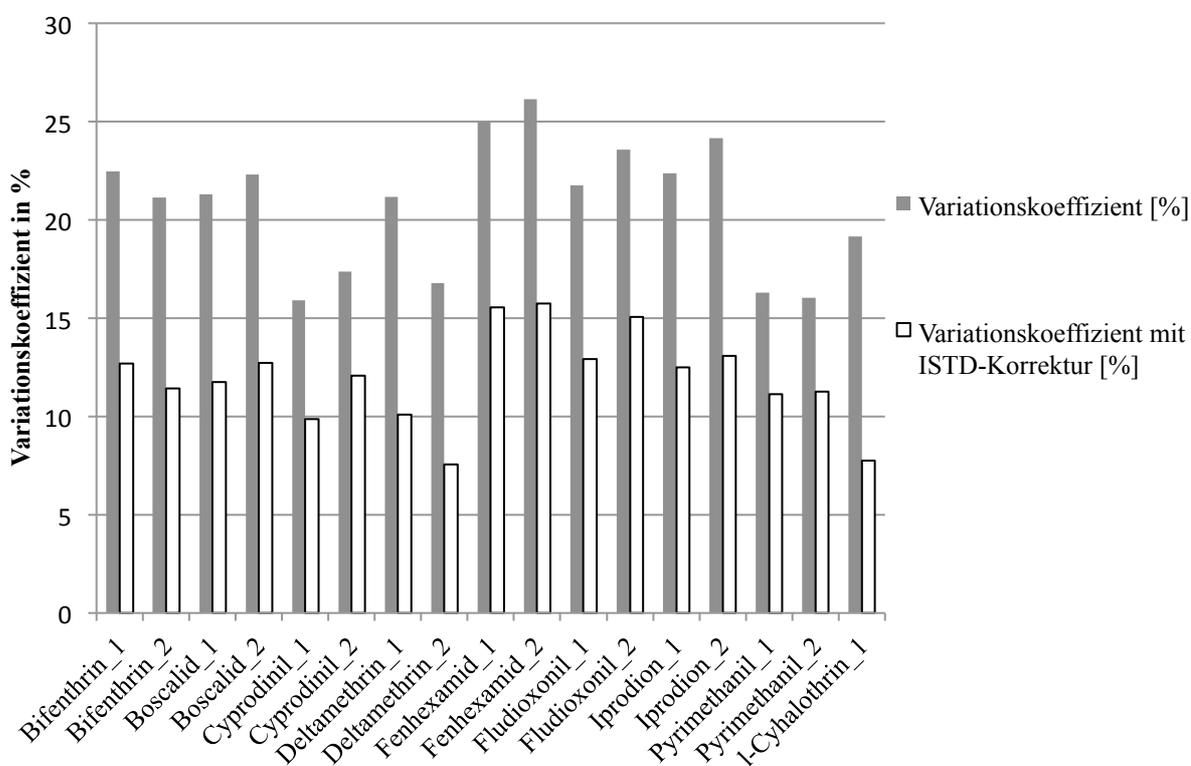


Abb. 42: Messung gegen Matrix-Standard (DFG S 19 Methode GC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Variationskoeffizienten mit und ohne Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31)

Die Verbesserung der Richtigkeit der Ergebnisse durch die Korrektur mit einem internen Standard wird durch die Gegenüberstellung der Wiederfindungsraten deutlich:

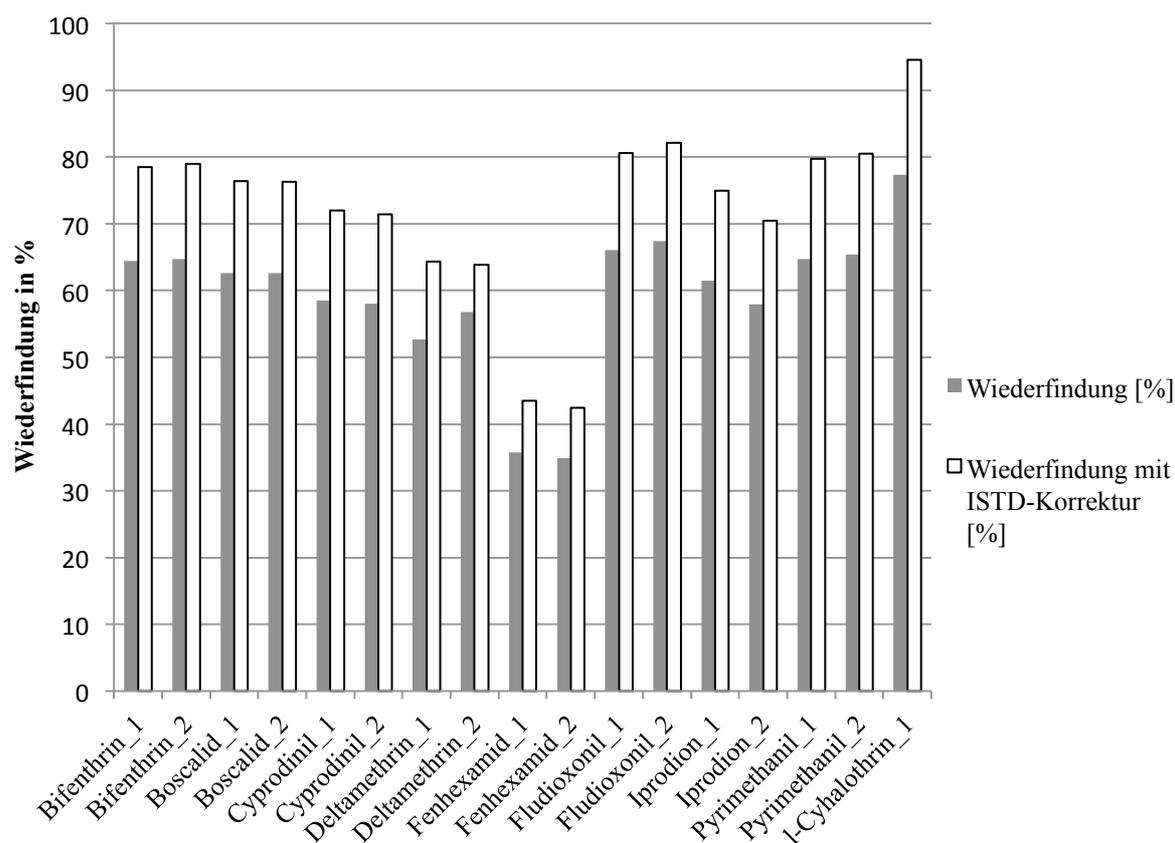


Abb. 43: Messung gegen Matrix-Standard (DFG S 19 Methode GC-MS/MS Modul) – Vergleich der Variationskoeffizienten mit und ohne Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31)

Methodisch bedingte Schwankungen der Ergebnisse konnten durch den internen Standard zu großen Teilen kompensiert werden. Die Wiederfindungsraten haben sich verbessert (Beispiel: beim Pyrimethanil_1: Wiederfindung von 65% auf 80%), und auch die Wiederholbarkeit konnte optimiert werden ($\leq 16\%$).

Fazit

Die Methode S 19 zeigte bei den Verfahrenskenngrößen im Vergleich zur QuEChERS- und BfR-Methode die schlechtesten Ergebnisse. Ursache hierfür ist u.a. die universelle Ausrichtung der S 19 auf komplexe Matrices. Die Korrektur der Ergebnisse mit dem internen Standard hat zu einer deutlichen Verbesserung der Verfahrenskenngrößen und somit zur Verbesserung hinsichtlich der Richtigkeit und Wiederholbarkeit der Methode beigetragen.

5.3.3.2 Verfahrenskenngrößen (Flüssigkeitschromatographie, LC)

Die Quantifizierung wurde sowohl über einen Matrix-Standard als auch über einen Lösungsmittel-Standard vorgenommen. Da die Werte gegen den Lösungsmittelstandard jedoch nicht zufriedenstellend waren (die beste Wiederfindung betrug 48% bei dem Wirkstoff Boscalid; alle anderen Wirkstoffe zeigten geringere Raten), wird auf diese nicht weiter eingegangen.

Tabelle 30: Messung gegen Matrix-Standard (DFG S 19 Methode LC-MS/MS-Modul)

Wirkstoff	Matrix-matched			Wiederfindung
	Konzentration (Mittelwert)	RSD Konzentrationen	Variationskoeffizient (RSD%)	
	[µg/kg]	[µg/kg]	[%]	[%]
Acetamidrid_1	49	10	20	108
Acetamidrid_2	36	13	35	80
Boscalid_1	99	8	8	86
Boscalid_2	85	16	19	74
Cyprodinil_1	114	14	13	69
Cyprodinil_2	109	19	18	66
Fenhexamid_1	195	21	11	55
Fenhexamid_2	225	51	23	63
Iprodion_1	720	80	11	76
Iprodion_2	704	104	15	74
Pyrimethanil_1	1.106	126	11	79
Pyrimethanil_2	1.192	93	8	85

Fenhexamid zeigte – wie zu erwarten – geringere Wiederfindungen (wie bei den Methoden nach QuEChERS und BfR). Der Wirkstoff Cyprodinil wurde zwar wiederholbar, aber nicht richtig bestimmt, vergleichbar der Bestimmung bei der Methode nach BfR. Die Vermessung von 1:10 verdünnten Messreihen hat zu keiner signifikanten Verbesserung der Messergebnisse beigetragen.

Fazit

Im Vergleich zur GC zeigen die Ergebnisse der LC-Analytik stabilere Werte (ohne Berücksichtigung eines internen Standards). Die Komplexität der Multimethode S 19 erfordert eine ausgewählte Anpassung der jeweiligen Methoden-Module an die analytische Fragestellung. Die Aufreinigung mittels GPC – zur Entfernung von u.a. fetthaltigen Störsubstanzen – scheint bei fettarmen Matrices wie z.B. Trauben nicht optimal zu sein. Weiterhin stellt sich die Frage, ob eine Aufreinigung des Probenextraktes (in Aceton) mittels flüssig/flüssig-Verteilung (mit Ethylacetat/Cyclohexan, 1:1) bei fettarmen und wasserhaltigen Proben angemessen ist.

5.3.4 QuEChERS, BfR und S 19 im direkten Vergleich

Die Mittelwerte der nach 6-facher Bestimmung unter Wiederholbedingungen ermittelten Gehalte der Wirkstoffe im Trauben-Testmaterial werden entsprechend der angewendeten Methode (QuEChERS, BfR, S 19) zusammengefasst und gegenübergestellt. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, werden jene Ergebnisse herangezogen, die durch eine Quantifizierung gegen Matrix-Standard erzielt wurden (nicht durch Standardaddition) und bei denen keine Korrektur durch einen internen Standard (GC) vorgenommen wurde:

Tabelle 31: Methodenvergleich QuEChERS-, BfR-, DFG S 19-Methode (Befunde)

Wirkstoff	QuEChERS		BfR		S 19		Soll
	Konzentration in [µg/kg] (GC)	Konzentration in [µg/kg] (LC)	Konzentration in [µg/kg] (GC)	Konzentration in [µg/kg] (LC)	Konzentration in [µg/kg] (GC)	Konzentration in [µg/kg] (LC)	Sollkonzentration [µg/kg]
Acetamidiprid_1		<u>38</u>		38		<u>49</u>	45
Acetamidiprid_2		34		47		36	
Bifenthrin_1	<u>32</u>		25		<u>23</u>		35
Bifenthrin_2	32		25		23		
Boscalid_1	<u>111</u>	102	86	115	<u>72</u>	99	115
Boscalid_2	114	115	88	140	72	85	
Cyprodinil_1	<u>123</u>	110	112	115	<u>97</u>	114	165
Cyprodinil_2	122	109	112	120	96	109	
Deltamethrin_1	<u>38</u>		31		<u>27</u>		51
Deltamethrin_2	35		34		29		
Fenhexamid_1	214	<u>223</u>	<u>159</u>	214	127	195	355
Fenhexamid_2	203	195	159	225	124	225	
Fludioxonil_1	<u>61</u>		54		<u>43</u>		65
Fludioxonil_2	63		53		44		
Iprodion_1	<u>856</u>	772	760	791	<u>584</u>	720	950
Iprodion_2	738	709	794	740	551	704	
Pyrimethanil_1	<u>1.190</u>	1.086	1.052	1.171	<u>907</u>	1.106	1.400
Pyrimethanil_2	1.193	1.091	1.063	1.192	915	1.113	
l-Cyhalothrin_1	<u>79</u>		61		<u>60</u>		77

Es wurden die Werte der Target-Ionenspuren markiert, die am stärksten voneinander abweichen (größte Differenz). Mit Hilfe der nachfolgenden Gegenüberstellung der entsprechenden Wiederfindungsraten je nach verwendeter Methode sollen anschließend weitere Erkenntnisse abgeleitet werden:

Tabelle 32: Methodenvergleich QuEChERS-, BfR-, DFG S 19-Methode (Wiederfindungen)

Wirkstoff	QuEChERS		BfR		S 19	
	Wiederfindung in [%] (GC)	Wiederfindung in [%] (LC)	Wiederfindung in [%] (GC)	Wiederfindung in [%] (LC)	Wiederfindung in [%] (GC)	Wiederfindung in [%] (LC)
Acetamiprid_1		85		108		85
Acetamiprid_2		75		80		104
Bifenthrin_1	91		71		64	
Bifenthrin_2	91		71		65	
Boscalid_1	97	89	75	86	63	100
Boscalid_2	99	100	77	74	63	122
Cyprodinil_1	74	67	68	69	59	70
Cyprodinil_2	74	66	68	66	58	73
Deltamethrin_1	74		62		53	
Deltamethrin_2	68		67		57	
Fenhexamid_1	60	63	45	55	36	60
Fenhexamid_2	57	55	45	63	35	63
Fludioxonil_1	95		82		66	
Fludioxonil_2	97		82		67	
Iprodion_1	90	81	80	76	61	83
Iprodion_2	78	75	84	74	58	78
Pyrimethanil_1	85	78	75	79	65	84
Pyrimethanil_2	85	78	76	79	65	85
l-Cyhalothrin_1	102		79		77	

Wiederfindungen unterhalb von 70% wurden für die jeweiligen Target-Ionenspuren grau unterlegt.

Folgende Erkenntnisse können aus den Tabellen 31 und 32 abgeleitet werden:

- Lediglich bei den beiden Wirkstoffen Cyhalothrin-lambda und Acetamiprid befinden sich die Messergebnisse oberhalb der dotierten Wirkstoffkonzentration. Bei allen anderen Wirkstoffen liegen sämtliche Ergebnisse unterhalb des tatsächlich dotierten Wirkstoffgehalts.
- Die größten beobachteten Differenzen zwischen den Messwerten treten vorwiegend zwischen der QuEChERS-Methode und der DFG S 19-Methode auf.

- Bei der BfR-Methode ist keine durchgehende Annäherung an die Ergebnisse der beiden anderen Methoden (QuEChERS / S 19) erkennbar. Während die Ergebnisse nach der BfR-Methode beim Acetamid das Ergebnis der QuEChERS-Methode bestätigen (38µg/kg), wird der Wert der Methode S 19 bei Cyhalothrin-lambda durch die BfR-Methode bestätigt.
- Nur bei dem Wirkstoff Fenhexamid ist die größte Differenz zwischen den Messwerten mit unterschiedlichen Trennmodulen (QuEChERS: LC/BfR: GC) bestimmt worden. Bei allen anderen Wirkstoffen konnte die größte Differenz zwischen den Messwerten auch dann festgestellt werden, wenn das gleiche Trennmodul (nur GC oder nur LC) verwendet wurde.
- Ein Wiederfindungs-„Gradient“ ist von der QuEChERS- über die BfR- zur S 19-Methode zu erkennen: Die Wiederfindungsraten sind bei QuEChERS am höchsten und bei der Methode S 19 am geringsten.
- Fenhexamid zeigt unabhängig von der angewendeten Methode Wiederfindungsraten < 70%. Cyprodinil und Deltamethrin zeigten durch Unterbefunde ebenfalls Auffälligkeiten bei der Richtigkeit der Ergebnisse.

5.3.4.1 Zusammenfassung der Diskussion

Aus dem Methodenvergleich sowie aus den Ergebnissen der jeweiligen Methodenreihen selbst (siehe 5.3.1, 5.3.2 und 5.3.3) können folgende Erkenntnisse zusammengefasst werden:

- 1) Die Richtigkeit der Messergebnisse (ausgedrückt durch die Verfahrenskenngröße der „Wiederfindung“) variiert je nach angewendeter Methode.
- 2) Es gibt Wirkstoffe (hier: Fenhexamid), die methodenunabhängige analytische Herausforderungen darstellen, die auf ihre individuellen chemisch-physikalischen Eigenschaften zurückzuführen sind. Im Rahmen einer Multimethode kann auf diese wirkstoffspezifischen Eigenschaften nicht mit der notwendigen Sorgfalt eingegangen werden, da Multimethoden immer einen analytischen Kompromiss darstellen. Werden die Analysebedingungen für einen Wirkstoff optimiert (z.B. polarere Extraktionsbedingungen geschaffen), können sich diese Optimierungen nachteilig auf andere Wirkstoffe (z.B. auf

unpolare Wirkstoffe) auswirken, so dass diese nicht mit der erforderlichen Richtigkeit bestimmt werden können.

- 3) Die analytische Qualität wird nicht allein durch das Trenn- und Detektionsmodul (GC-MS/MS bzw. LC-MS/MS) beeinflusst. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass auch bei Verwendung gleicher Trenn- und Detektionsmodule unterschiedliche Ergebnisse auftreten, wenn unterschiedliche Methoden (QuEChERS, BfR, S 19) zur Anwendung kommen. Multimethoden sind deshalb in ihrer Gesamtheit (Homogenisierung, Extraktion, Aufreinigung, instrumentelle Trennung und Messung) zu bewerten. Ein Wirkstoff mit einer geringen Extraktionsausbeute wird auch nach einer optimalen Trennung und Detektion nicht mit der notwendigen Wiederfindung bestimmt werden können, da er im Rahmen der Aufarbeitung bereits verloren geht.
- 4) Die jeweiligen Methoden zeigen Ergebnisse mit zufriedenstellender Wiederholbarkeit (Variationskoeffizient $< 20\%$). Selbst „falsche“ Ergebnisse, bei denen die Wiederfindungsrate unterhalb von 70% liegt, werden mit einer guten Wiederholbarkeit ermittelt. Insofern kann die Sicherheit darüber, dass ein Analysenergebnis im Labor wiederholbare Befunde zeigt (die das erste Ergebnis bestätigen), noch lange nicht die Richtigkeit eines Analysenergebnisses garantieren. Die Richtigkeit der Ergebnisse muss deshalb im Labor bekannt sein und überprüft werden.
- 5) Signifikante Unterschiede der Verfahrenskenngrößen unter Wiederhol- und Laborbedingungen können nicht festgestellt werden. Bei gleichbleibenden Randbedingungen im Labor (Geräte, Chemikalien und Reagenzien, Analytiker) ist davon auszugehen, dass im Labor für die gleichen Matrix-/Wirkstoffkombinationen vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.
- 6) Sofern eine Quantifizierung über die Standardaddition herangezogen wird, ist darauf zu achten, dass sich der Konzentrationsbereich der Messungen innerhalb des linearen Messbereiches der Messinstrumente befindet.

5.4 Zielsetzung 4: Analyse des Testmaterials in unterschiedlichen Laboratorien unter Routinebedingungen

Jeweils eine Testmaterial-Einheit des Traubenhomogenats von ca. 150g (aufgemacht als Gegenprobe) wurde an insgesamt 19 international verteilte Labore durch den jeweiligen offiziellen Auftraggeber (eine Fruchtagentur bei München bzw. eine Agrarmarketingeinrichtung aus Österreich) verschickt und zur Analyse in Auftrag gegeben (siehe S. 102). Es wurden „Eilanalysen“ in Auftrag gegeben, wobei die Auslegung von „eilig“ dem jeweiligen Laboratorium überlassen wurde.

Da Trauben im Anbau empfindlich gegen Schädlinge und Krankheiten sind, kommt im konventionellen Anbau üblicherweise eine große Zahl an Insektiziden und Fungiziden zum Einsatz. Somit war beim Design des Testmaterials eine große Vielfalt und Vielzahl an Wirkstoffen möglich, und den unwissend teilnehmenden Laboren fiel somit auch nicht auf, dass eine Testprobe zur Analyse gegeben wurde.

Für die anonymisierte Auswertung der Teilnehmer wurde jedes Labor mit einem Laborcode versehen (von Code 1 bis 19).

5.4.1 Analysenzeiten der getesteten Labore

Die Labore wurden beauftragt, die Proben als „Eilprobe“ zu analysieren. Dies führte zu unterschiedlichen Auslegungen:

- 15 Labore berichteten innerhalb von 2 Arbeitstagen die Analysenergebnisse
- 1 Labor berichtete innerhalb von 4 Arbeitstagen die Analysenergebnisse
- 1 Labor berichtete innerhalb von 5 Arbeitstagen die Analysenergebnisse
- 1 Labor berichtete innerhalb von 6 Arbeitstagen die Analysenergebnisse
- 1 Labor berichtete innerhalb von 11 Arbeitstagen (unter Berücksichtigung nationaler Feiertage) die Analysenergebnisse.

Fazit

Über 70% der Labore berichteten die Ergebnisse innerhalb von 48 Stunden. Dies scheint eine gängige Analysezeit für Eilproben unter Routinebedingungen zu sein. Die Analysezeit eines Teilnehmers von 11 Arbeitstagen erscheint für eine Eilanalytik deutlich zu lang.

5.4.2 Prüfkriterien für die Beurteilung der Laborkompetenzen

Die Ergebnisse werden anhand von vier Kriterien beurteilt:

- 1) Wurde ein Wirkstoff berichtet, der nicht in der Testprobe enthalten war? (Falsch-positiver Befund)
- 2) Wurde ein Wirkstoff, der in der Testprobe enthalten war, nicht berichtet? (Falsch-negativer Befund)
- 3) Bewertung des Gehaltes der jeweiligen Wirkstoffe bezogen auf die tatsächlich zugesetzte Wirkstoffmenge (Richtigkeit des Befundes).
- 4) Bewertung des Gehaltes der jeweiligen Wirkstoffe bezogen auf den statistischen Mittelwert aller Teilnehmer für den jeweiligen Wirkstoff (Vergleichbarkeit des Befundes mit dem Labordurchschnitt der Test-Teilnehmer).

Die Beurteilungskriterien berücksichtigen insbesondere die Perspektive der Laborkunden, die ihre Proben auf Verkehrsfähigkeit (Konformität mit lebensmittelrechtlichen Anforderungen) hinsichtlich der Pflanzenschutzmittelrückstände durch die Laboranalyse überprüfen. Während die unter Punkt 1 und 2 aufgeführten Kriterien unmittelbar zu falschen Konsequenzen für den Auftraggeber führen können (was die Beurteilung der Verkehrsfähigkeit der Ware betrifft), sind die unter Punkt 3 und 4 genannten Kriterien von Relevanz, wenn Befunde dicht an Spezifikationsgrenzen (z.B. Höchstgehalte nach der Verordnung (EG) Nr. 396/2005 [44]) liegen. Sofern ein solcher Befund z.B. durch eine Gegenprobe abgesichert werden soll, stellt sich für den Auftraggeber des Labores die Frage, welches Laborergebnis die erforderliche Zuverlässigkeit für die Entscheidung über die Einhaltung/Nicht-Einhaltung von Spezifikationsgrenzen liefert.

5.4.2.1 Falsch-positive Befunde

Kein getestetes Labor hat einen falsch-positiven Befund berichtet.

Fazit

Da die Probe als Gegenprobe gekennzeichnet war und das Labor deshalb davon ausgehen musste, dass bereits ein Analysenbefund existiert (den es durch die Gegenanalyse zu überprüfen gilt), ist nicht auszuschließen, dass die Probe mit besonderer Aufmerksamkeit analysiert und abgesichert wurde. Insbesondere falsch-positive Befunde stellen für Labore ein großes Risiko

dar. Sofern sich herausstellt, dass ein Labor einen falsch-positiven Befund berichtet hat und dieser schlimmstenfalls einen (unnötigen) Rückruf der Ware aus dem Verkehr zur Folge hat, kann dieser Befund ein großes finanzielles Risiko (Vermögensschadenhaftpflicht) als auch ein großes Reputationsrisiko für das Labor darstellen.

5.4.2.2 Falsch-negative Befunde

Tabelle 33: Falsch-negative Befunde im Rahmen des Labortests mit verdeckten Proben

Laborcode	Wirkstoff	Ergebnis (mg/kg)	LoQ (mg/kg)
3	Deltamethrin	Nicht berichtet	0,01
10	Deltamethrin	Nicht berichtet	Nicht berichtet
12	Deltamethrin	Nicht berichtet	0,005
18	Deltamethrin	Nicht berichtet	Nicht berichtet

Fazit

Der Wirkstoff Deltamethrin wurde zu dem Testmaterial mit einer Konzentration von 51 µg/kg dotiert (siehe Tabelle 9) und stellte hinsichtlich der Identifizierung die größte Herausforderung für die Teilnehmer dar. Mögliche Ursache für die analytische Herausforderung bezüglich Deltamethrin können die chemisch-physikalischen Eigenschaften dieses Wirkstoffes sein, denn Deltamethrin hat – wie andere Pyrethroide auch – die Eigenschaft, an Glaswänden anzuhaften und kann deshalb im Rahmen der Probenaufarbeitung verlorengehen. Schließlich kann auch die Einstellung des richtigen „dwell time“-Fensters zur Messung des entsprechenden Massenübergangs eine Ursache für die Schwierigkeit bei der Deltamethrin-Bestimmung sein. Geringe Verschiebungen des Fensters führen dazu, dass der Wirkstoff nicht „gesehen“ wird (→ falsch-negativ).

Alle anderen Wirkstoffe wurden von den Laboren korrekt identifiziert.

5.4.2.3 Richtigkeit der Befunde

Hierzu wird überprüft, ob die Labore mindestens 70% bis maximal 120% der tatsächlich zugeetzten Menge gefunden haben („Document No. SANCO/10684/2009“ [15]). Durch die Durchführung der Stabilitätstests, die nach Abgabe des letzten Teilnehmerergebnisses durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Wirkstoffe keinem Abbau unterlegen waren (siehe

Tabelle 20, siehe S. 105). Die tatsächlich zugesetzten Wirkstoffmengen wurden durch den Stabilitätstest bestätigt. Die Richtigkeit, mit der die Teilnehmer die jeweiligen Wirkstoffe quantifiziert haben, stellt sich wie folgt dar:

Tabelle 34: Labortest mit verdeckten Proben: Richtigkeit der berichteten Laborergebnisse

Wirkstoff	Tatsächlich zugesetzte Menge (µg/kg)	Anzahl Ergebnisse, die im Bereich 70-120% der tatsächlich zugesetzten Menge liegen	Anzahl der Labore, die ein Ergebnis für den Wirkstoff berichtet haben	Zufriedenstellende Ergebnisse (%)
Acetamidiprid	45	10	19	53
Bifenthrin	35	12	19	63
Boscalid	115	13	19	68
Cyhalothrin-lambda	77	14	19	74
Cyprodinil	165	10	19	53
Deltamethrin	51	10	15	53
Fenhexamid	355	12	19	63
Fludioxonil	65	13	19	68
Iprodion	950	15	19	79
Pyrimethanil	1400	14	19	74

Die Wirkstoffe Acetamidiprid, Cyprodinil sowie Deltamethrin zeigten mit einer Quote von 53% zufriedenstellender Resultate die schlechtesten Ergebnisse. Während bei den Wirkstoffen Acetamidiprid und Cyprodinil offensichtlich fast die Hälfte der Teilnehmer Schwierigkeiten bei der Quantifizierung zeigten, hat die Mehrheit der Labore, die den Wirkstoff Deltamethrin berichtet haben, diesen auch korrekt quantifiziert (immerhin zwei Drittel der Teilnehmer).

Die Einzelbefunde, die für diese drei Wirkstoffe berichtet wurden, werden nachfolgend detailliert aufgeführt und entsprechend ihrer Richtigkeit bewertet. Der „akzeptierte Bereich“ entspricht hierbei 70-120% der Wiederfindung des Wirkstoff-Gehaltes, der dem Trauben-Testmaterial tatsächlich zugesetzt wurde:

Tabelle 35: Labortest mit verdeckten Proben: Wiederfindungen von Acetamidrid, Cyprodinil und Deltamethrin

Labor Code	Acetamidrid: Soll: 45 µg/kg		Cyprodinil Soll: 165 µg/kg		Deltamethrin Soll: 51 µg/kg	
	Ergebnis (µg/kg)	Akzeptierter Bereich (µg/kg): 31.5-54	Ergebnis (µg/kg)	Akzeptierter Bereich (µg/kg): 115.5-198	Ergebnis (µg/kg)	Akzeptierter Bereich (µg/kg): 35.7-61.2
1	32	Ja	94	Nein	35	Nein
2	30	Nein	120	Ja	10	Nein
3	40	Ja	140	Ja	Nicht berichtet	Nicht berichtet
4	47	Ja	144	Ja	61	Ja
5	50	Ja	163	Ja	39	Ja
6	22	Nein	84	Nein	27	Nein
7	12	Nein	54	Nein	33	Nein
8	42	Ja	135	Ja	48	Ja
9	30	Nein	120	Ja	50	Ja
10	39	Ja	100	Nein	Nicht berichtet	Nicht berichtet
11	50	Ja	140	Ja	52	Ja
12	43	Ja	80	Nein	Nicht berichtet	Nicht berichtet
13	30	Nein	220	Nein	70	Nein
14	180	Nein	120	Ja	54	Ja
15	48	Ja	60	Nein	40	Ja
16	27	Nein	90	Nein	45	Ja
17	38	Ja	98	Nein	41	Ja
18	30	Nein	130	Ja	Nicht berichtet	Nicht berichtet
19	65	Nein	140	Ja	56	Ja

Bei dem Wirkstoff Acetamidrid lagen die Labore mit nicht zufriedenstellendem Ergebnis in der Regel (bis auf Labor Nr. 14) unterhalb der Wiederfindung von 70%. Vergleichbar stellte sich die Situation beim Wirkstoff Cyprodinil dar: Auch hier waren bei 8 von 9 Laboren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend, weil sie unterhalb des akzeptierten Bereiches lagen. Schließlich zeigten auch beim Deltamethrin n-1 der nicht zufriedenstellenden Laboregebnisse zu geringe Gehalte. Zusammenfassend erbibt sich somit das folgende Gesamtbild hinsichtlich der Richtigkeit der Analyseergebnisse:

Tabelle 36: Labortests mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Richtigkeit in der Übersicht

Kriterium	Anzahl der Labore, die das Kriterium erfüllen	Anzahl aller Laborteilnehmer	Zufriedenstellende Ergebnisse (%)
Korrekte Identifizierung aller 10 Wirkstoffe	15	19	79
Korrekte Identifizierung UND Quantifizierung hinsichtlich der Richtigkeit der Ergebnisse (70-120%) aller 10 Wirkstoffe	2	19	11

Fazit

Tendenziell ist bei den Laboren mit nicht zufriedenstellendem Ergebnis zu erkennen, dass die tatsächlich dotierten Wirkstoffe zu Gehalten $< 70\%$ berichtet werden. Überbefunde treten seltener auf. Das Gesamtergebnis hinsichtlich der Identifizierung und Quantifizierung (Richtigkeit) der Ergebnisse ist nicht gut ausgefallen. Lediglich 11% (=2 Labore) aller 19 Teilnehmer konnten die im Testmaterial enthaltenen 10 Wirkstoffe korrekt identifizieren und *richtig* quantifizieren.

5.4.2.4 Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Ergebnissen der anderen Teilnehmer

Um zu prüfen, ob ein Labor im Vergleich zum Labordurchschnitt abweicht oder nicht, wurde eine z-score-Berechnung vorgenommen. Hierbei kann die Vorgehensweise wie folgt zusammengefasst werden:

- Der statistische Mittelwert aller berichteten Laborergebnisse eines Wirkstoffes wird ermittelt und als Bezugswert („assigned value“ = best-möglicher abgeschätzter *wahrer Wert*), an dem alle Labore gemessen werden müssen, angesehen.
- Entsprechend der Vergleichsstandardabweichung nach Horwitz [117] – die später von Thompson modifiziert wurde [122] – wird abgeleitet, welche Streuungen der Laborergebnisse bei Laborvergleichsuntersuchungen in Abhängigkeit von der Analytkonzentration zu erwarten sind (hier bezeichnet als „Zielstandardabweichung“).

- Sofern ein Teilnehmer um das Zweifache der Zielstandardabweichung vom statistischen Mittelwert abweicht, ist das Labor nicht mehr vergleichbar mit dem Labordurchschnitt ($z\text{-score} > 2$).

Die so ermittelte Vergleichbarkeit informiert darüber, wie vergleichbar ein Labor mit dem Labordurchschnitt ist. Ist jedoch der gesamte Labordurchschnitt unbefriedigend – wenn z.B. ein Pestizid labil ist und deshalb eine besondere Probenaufarbeitung erfordert, die vom Durchschnitt der Labore nicht vorgenommen wurde – dann wird ein Labor, welches die besonderen Anforderungen berücksichtigt und deshalb höhere Gehalte findet, benachteiligt. Das Labor ist in diesem Fall nicht mehr vergleichbar, da es zu stark vom Labordurchschnitt abweicht. Die z -score-Auswertung führte zu folgenden Ergebnissen:

Tabelle 37: Labortest mit verdeckten Proben: Übersicht statistischer Kenngrößen hinsichtlich der Vergleichbarkeit

Assigned Values und Zielstandardabweichungen							
Wirkstoff	Soll	Wahrer Wert (Assigned value)				Zielstandardabweichung	
	$\mu\text{g}/\text{kg}$	Datenpunkte, n	wahrer Wert, X , $\mu\text{g}/\text{kg}$	Unsicherheit, u	Robuste Standardabweichung, σ	Abgeleitet von	$\hat{\sigma}$, $\mu\text{g}/\text{kg}$
Acetamiprid	45	19	38	2,52	11	Horwitz	8,5
Bifenthrin	35	18	29	1,68	7	Horwitz	6,3
Boscalid	115	19	95	5,97	26	Horwitz	20,9
Cyhalothrin-lambda	77	19	66	3,80	17	Horwitz	14,4
Cyprodinil	165	19	116	7,35	32	Horwitz	25,6
Deltamethrin	51	15	45	3,21	12	Horwitz	9,9
Fenhexamid	355	19	309	22,17	97	Horwitz	58,9
Fludioxonil	65	19	62	3,41	14,9	Horwitz	13,6
Iprodion	950	19	803	38,58	168,2	Horwitz	132,7
Pyrimethanil	1400	19	1168	53,71	234,1	Horwitz	182,6

Bei allen Wirkstoffen zeigt sich, dass die mittels robuster Statistik ermittelte tatsächliche Standardabweichung („robuste Standardabweichung“) größer ist, als die nach Horwitz [117]/Thompson [122] zu erwartende Zielstandardabweichung. Das bedeutet, dass die Laborergebnisse stärker schwanken als nach statistischen Experimenten abgeleitet wurde (Horwitz [117]/Thompson [122]). Am stärksten schwanken die Ergebnisse beim dem Wirkstoff Fenhexamid:

Tabelle 38: Labortest mit verdeckten Proben: Robuste Standardabweichung und Zielstandardabweichung im Vergleich

Wirkstoff	wahrer Wert, X, µg/kg	Robuste Standardabweichung σ , µg/kg	$\hat{\sigma}$, µg/kg	Zielstandardabweichung $\hat{\sigma}$ in %-Anteil vom wahren Wert X	Robuste Standardabweichung σ in %-Anteil vom wahren Wert
Acetamid	38	11	8,5	22,4	28,9
Bifenthrin	29	7	6,3	21,7	24,1
Boscalid	95	26	20,9	22,0	27,4
Cyhalothrin-lambda	66	17	14,4	21,8	25,8
Cyprodinil	116	32	25,6	22,1	27,6
Deltamethrin	45	12	9,9	22,0	26,7
Fenhexamid	309	97	58,9	19,1	31,4
Fludioxonil	62	14,9	13,6	21,9	24,0
Iprodion	803	168,2	132,7	16,5	20,9
Pyrimethanil	1168	234,1	182,6	15,6	20,0

Die Schwankungen bei dem Wirkstoff Fenhexamid sind insofern nicht verwunderlich, als der Wirkstoff bei dem Methodenvergleich (siehe 5.3.1 bis 5.3.4) bereits analytische Probleme zeigte. Die Wirkstoffe Acetamid, Boscalid, Cyprodinil und Deltamethrin weisen ebenfalls höhere Standardabweichungen (σ) auf ($> 26\%$), als es nach den experimentell ermittelten Zielstandardabweichungen $\hat{\sigma}$ zu erwarten gewesen wäre (maximal 22%). Die detaillierten Übersichten werden unter 5.4.1 aufgeführt (siehe dort).

Die Anwendung des z-score-Modells [18] führte zu folgendem Gesamtergebnis hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Laborergebnisse:

Tabelle 39: Labortest mit verdeckten Proben: Gesamtergebnis hinsichtlich der Vergleichbarkeit

Wirkstoff	Anzahl Labore mit zufriedenstellender Vergleichbarkeit (z-score ≤ 2)	Anzahl der Labore, die ein Ergebnis für den Wirkstoff berichtet haben	Zufriedenstellende Ergebnisse (%)
Acetamid	16	19	84
Bifenthrin	16	19	84
Boscalid	17	19	89
Cyhalothrin-lambda	16	19	84
Cyprodinil	16	19	84
Deltamethrin	13	15	68
Fenhexamid	15	19	79
Fludioxonil	16	19	84
Iprodion	16	19	84
Pyrimethanil	14	19	74

Hinsichtlich der Vergleichbarkeit fielen die Ergebnisse etwas besser aus als bei der Bewertung der Richtigkeit (siehe Tabelle 34). Obwohl die tatsächlichen Ergebnisse stärker schwanken als es statistisch zu erwarten gewesen wäre, liegt die Anzahl zufriedenstellender Ergebnisse im Bereich von 79-89%. Der Wirkstoff Deltamethrin zeigt aufgrund der vier falsch-negativen Befunde die schlechtesten Ergebnisse. Das Ergebnis bei Pyrimethanil (74% zufriedenstellende Ergebnisse) kann darauf zurückzuführen sein, dass der Wirkstoff mit 1.400 µg/kg zugesetzt war und deshalb den linearen Messbereich der Geräte bei der hohen Konzentration überschreitet. Zusammenfassend ergibt sich somit das folgende Gesamtbild hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse:

Tabelle 40: Labortests mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Vergleichbarkeit in der Übersicht

Kriterium	Anzahl der Labore, die das Kriterium erfüllen	Anzahl aller Laborteilnehmer	Zufriedenstellende Ergebnisse (%)
Korrekte Identifizierung aller 10 Wirkstoffe	15	19	79
Korrekte Identifizierung UND Quantifizierung hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse ($z\text{-score} \leq 2$) aller 10 Wirkstoffe	5	19	26

Fazit

Nur 26% (5 Labore) aller Teilnehmer zeigen durchgehend vergleichbare Ergebnisse. Das Resultat fällt somit deutlich besser aus als bei der Auswertung der Richtigkeit (11% bzw. zwei Labore). Es stellt sich dennoch die Frage, weshalb der Anteil zufriedenstellender Ergebnisse maximal bei etwa einem Viertel liegt. Eine Ursache hierfür liegt sicherlich in dem analytischen Kompromiss der angewendeten Multimethoden.

5.4.3 Gegenüberstellung der Richtigkeit und der Vergleichbarkeit

Die Richtigkeit und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aller Laborteilnehmer werden nachfolgend zusammenfassend in Form von Übersichtstabellen sowie z-score- und Wiederfindungsdiagrammen (70-120%) dargestellt:

Tabelle 41: Acetamidrid - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)

	Acetamidrid, Soll: 45 µg/kg		Wahrer Wert: 38 µg/kg
Labor Code	Ergebnis (µg/kg)	<i>Richtigkeit</i> Akzeptierter Bereich (µg/kg): 31.5-54	<i>Vergleichbarkeit</i> z-score
1	32	Ja	-0,8
2	30	Nein	-1,0
3	40	Ja	0,2
4	47	Ja	1,0
5	50	Ja	1,4
6	22	Nein	-1,9
7	12	Nein	-3,1
8	42	Ja	0,4
9	30	Nein	-1,0
10	39	Ja	0,1
11	50	Ja	1,4
12	43	Ja	0,5
13	30	Nein	-1,0
14	180	Nein	16,8
15	48	Ja	1,1
16	27	Nein	-1,3
17	38	Ja	0,0
18	30	Nein	-1,0
19	65	Nein	3,1

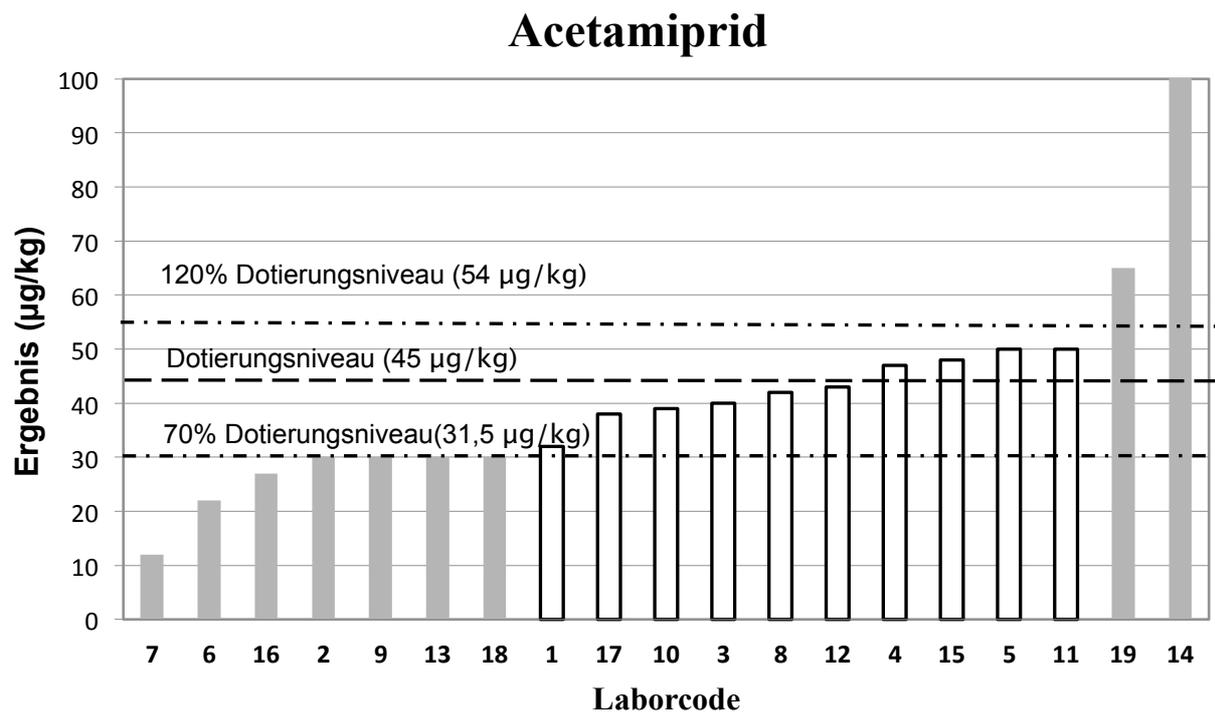


Abb. 44: Acetamidrid – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)

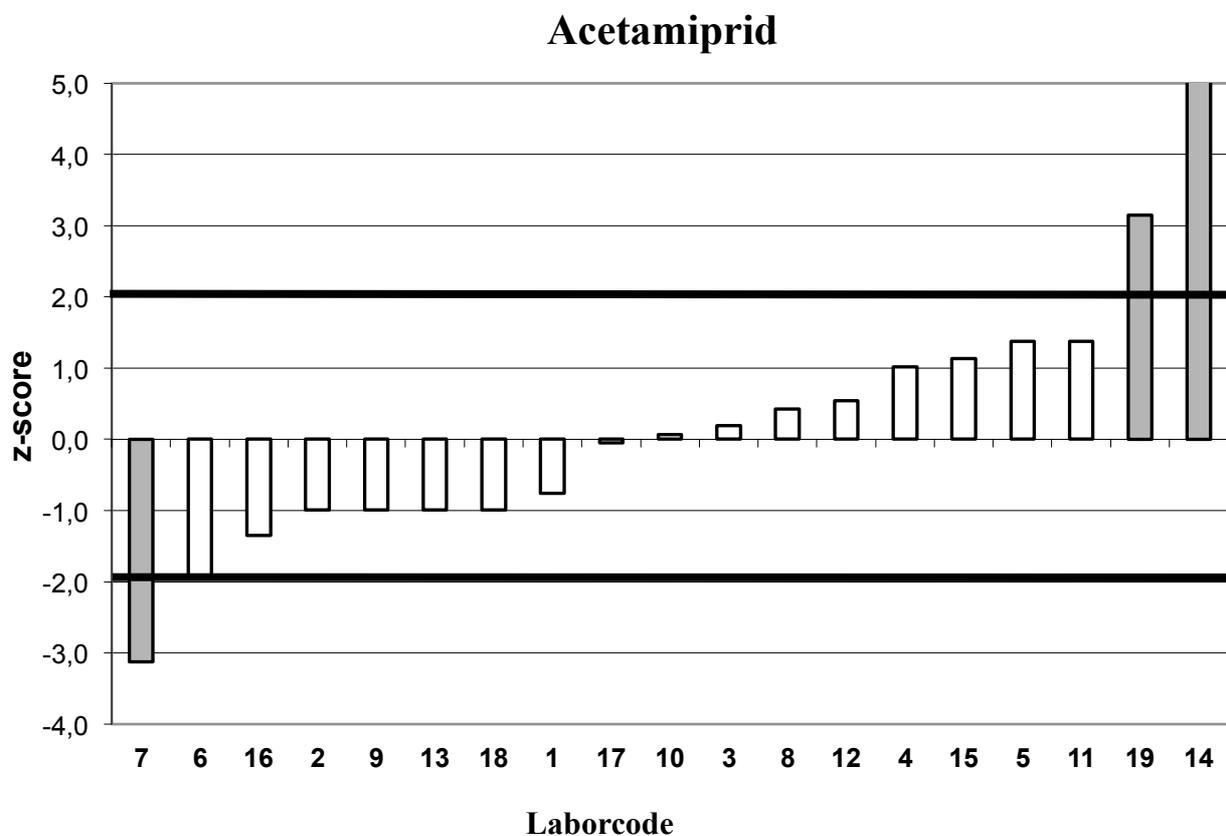


Abb. 45: Acetamidrid – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)

Tabelle 42: Bifenthrin - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)

Labor Code	Bifenthrin, Soll: 35 µg/kg		<i>Wahrer Wert: 29 µg/kg</i>
	Ergebnis (µg/kg)	Richtigkeit Akzeptierter Bereich (µg/kg): 24.5-42	Vergleichbarkeit z-score
1	29	Ja	0,1
2	30	Ja	0,2
3	30	Ja	0,2
4	35	Ja	1,0
5	42	Ja	2,1
6	21	Nein	-1,2
7	28	Ja	-0,1
8	30	Ja	0,2
9	30	Ja	0,2
10	<10	Nein	---
11	33	Ja	0,7
12	21	Nein	-1,2
13	50	Nein	3,4
14	28	Ja	-0,1
15	20	Nein	-1,4
16	21	Nein	-1,2
17	25	Ja	-0,6
18	20	Nein	-1,4
19	41	Ja	2,0

Bifenthrin

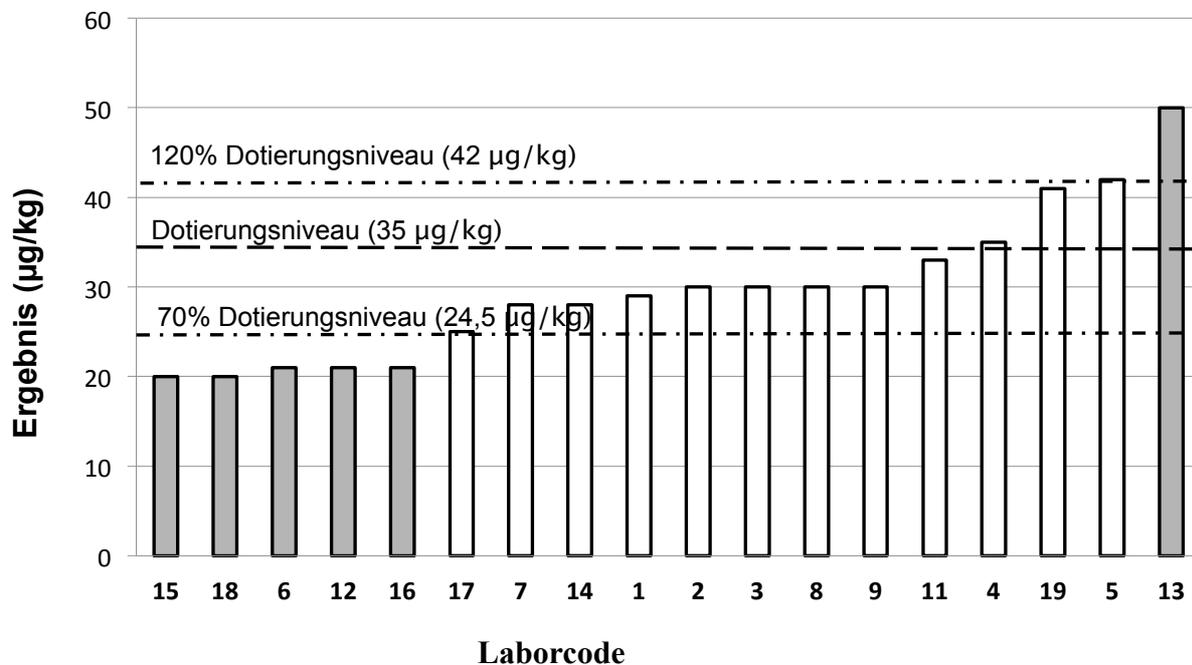


Abb. 46: Bifenthrin – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)

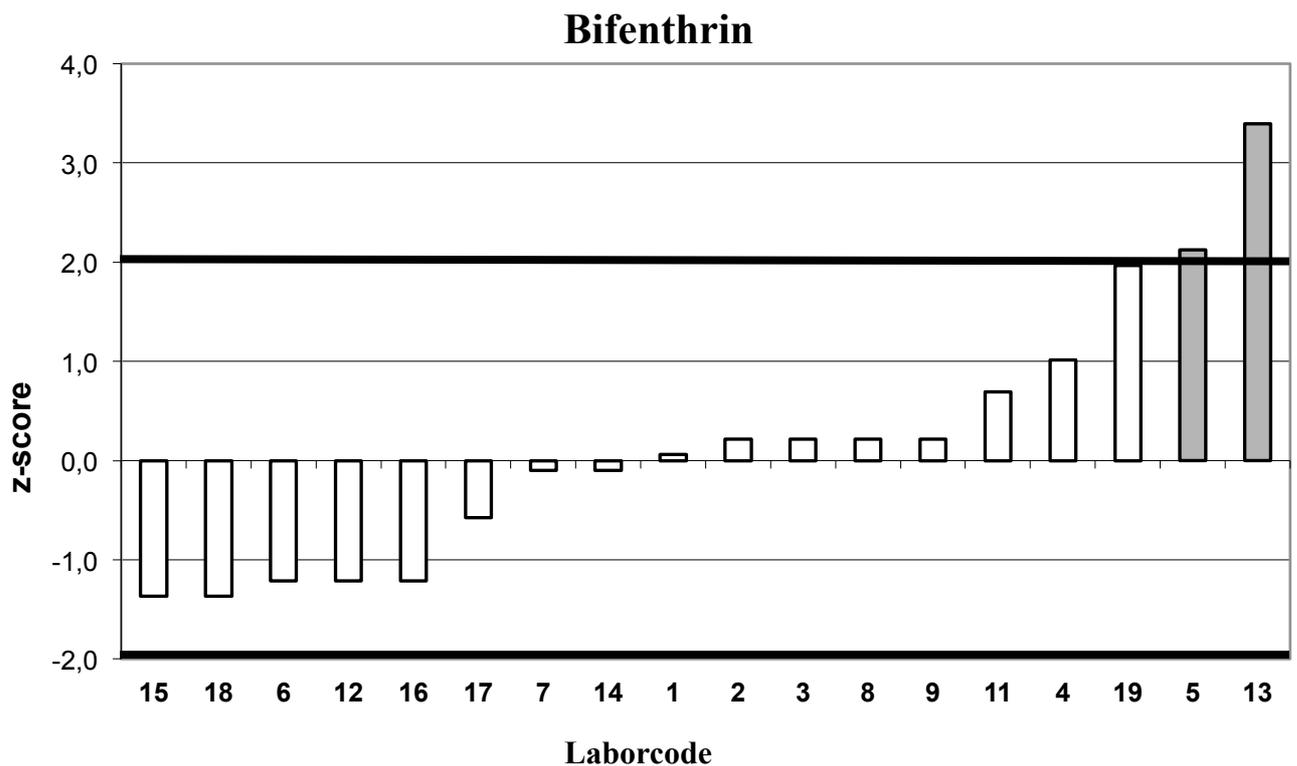
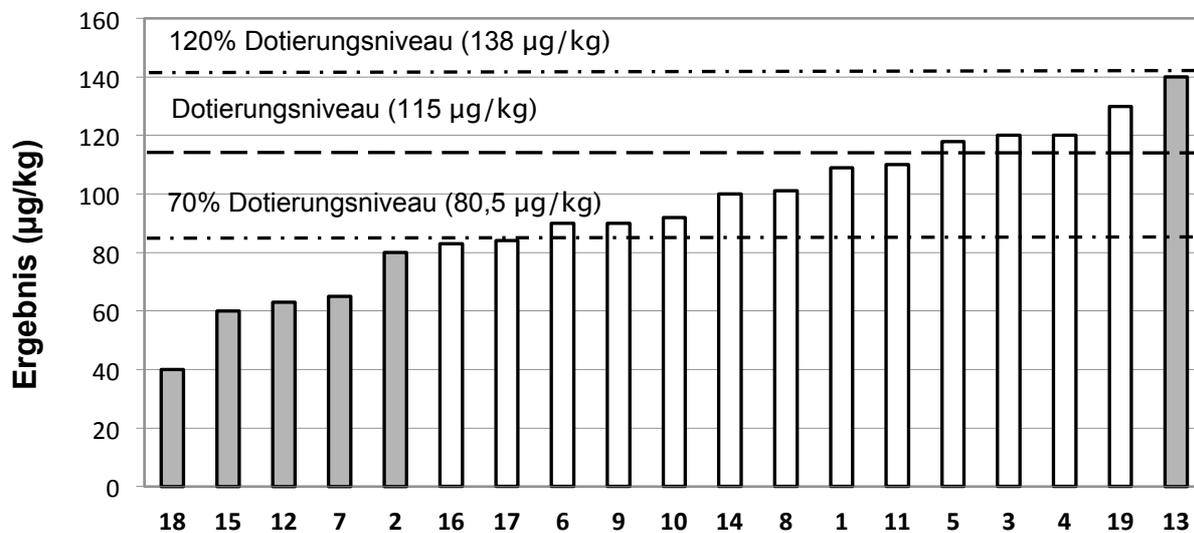


Abb. 47: Bifenthrin – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)

Tabelle 43: Boscalid - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)

Labor Code	Boscalid, Soll: 115 µg/kg		<i>Wahrer Wert: 95 µg/kg</i>
	Ergebnis (µg/kg)	Richtigkeit Akzeptierter Bereich (µg/kg): 80.5-138	Vergleichbarkeit z-score
1	109	Ja	0,7
2	80	Nein	-0,7
3	120	Ja	1,2
4	120	Ja	1,2
5	118	Ja	1,1
6	90	Ja	-0,2
7	65	Nein	-1,4
8	101	Ja	0,3
9	90	Ja	-0,2
10	92	Ja	-0,1
11	110	Ja	0,7
12	63	Nein	-1,5
13	140	Nein	2,2
14	100	Ja	0,2
15	60	Nein	-1,7
16	83	Ja	-0,6
17	84	Ja	-0,5
18	40	Nein	-2,6
19	130	Ja	1,7

Boscalid



Laborcode

Abb. 48: Boscalid – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)

Boscalid

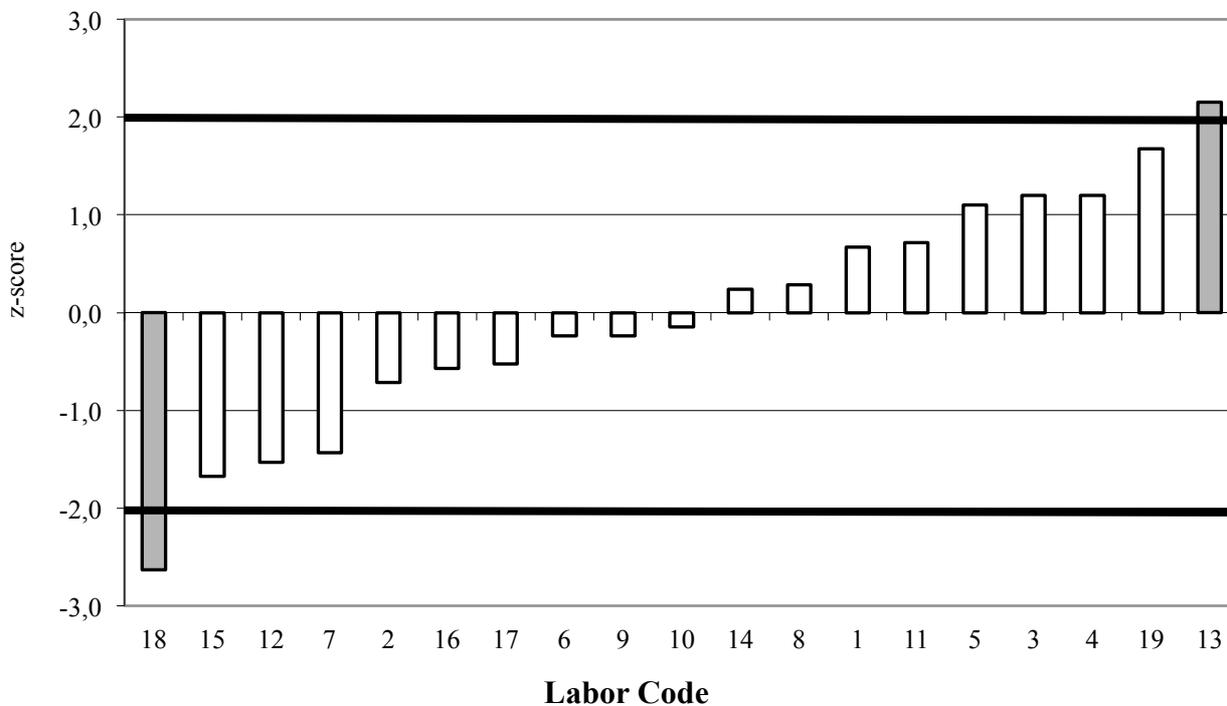


Abb. 49: Boscalid – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)

Tabelle 44: Cyhalothrin-lambda – Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)

Labor Code	Cyhalothrin-lambda, Soll: 77 µg/kg		<i>Wahrer Wert: 66 µg/kg</i>
	Ergebnis (µg/kg)	Richtigkeit Akzeptierter Bereich (µg/kg): 53,9-92,4	Vergleichbarkeit z-score
1	75	Ja	0,7
2	40	Nein	-1,8
3	60	Ja	-0,4
4	57	Ja	-0,6
5	85	Ja	1,3
6	46	Nein	-1,4
7	56	Ja	-0,7
8	72	Ja	0,4
9	70	Ja	0,3
10	67	Ja	0,1
11	74	Ja	0,6
12	74	Ja	0,6
13	130	Nein	4,5
14	84	Ja	1,3
15	30	Nein	-2,5
16	62	Ja	-0,2
17	63	Ja	-0,2
18	30	Nein	-2,5
19	83	Ja	1,2

Cyhalothrin-lambda

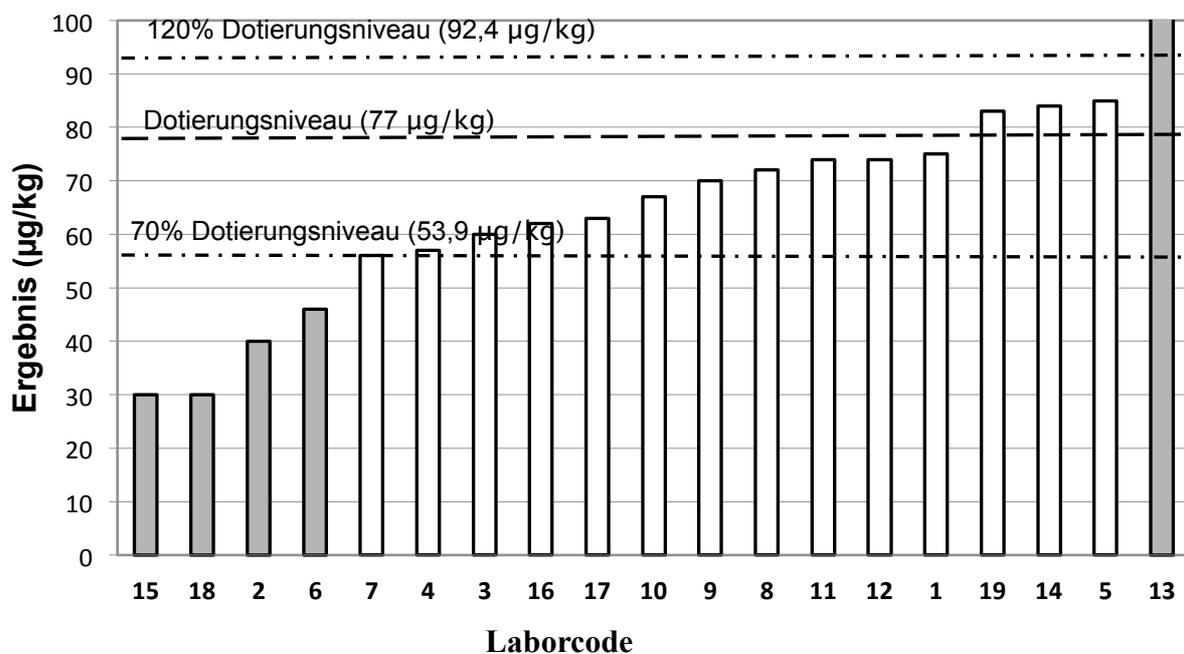


Abb. 50: Cyhalothrin-lambda – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)

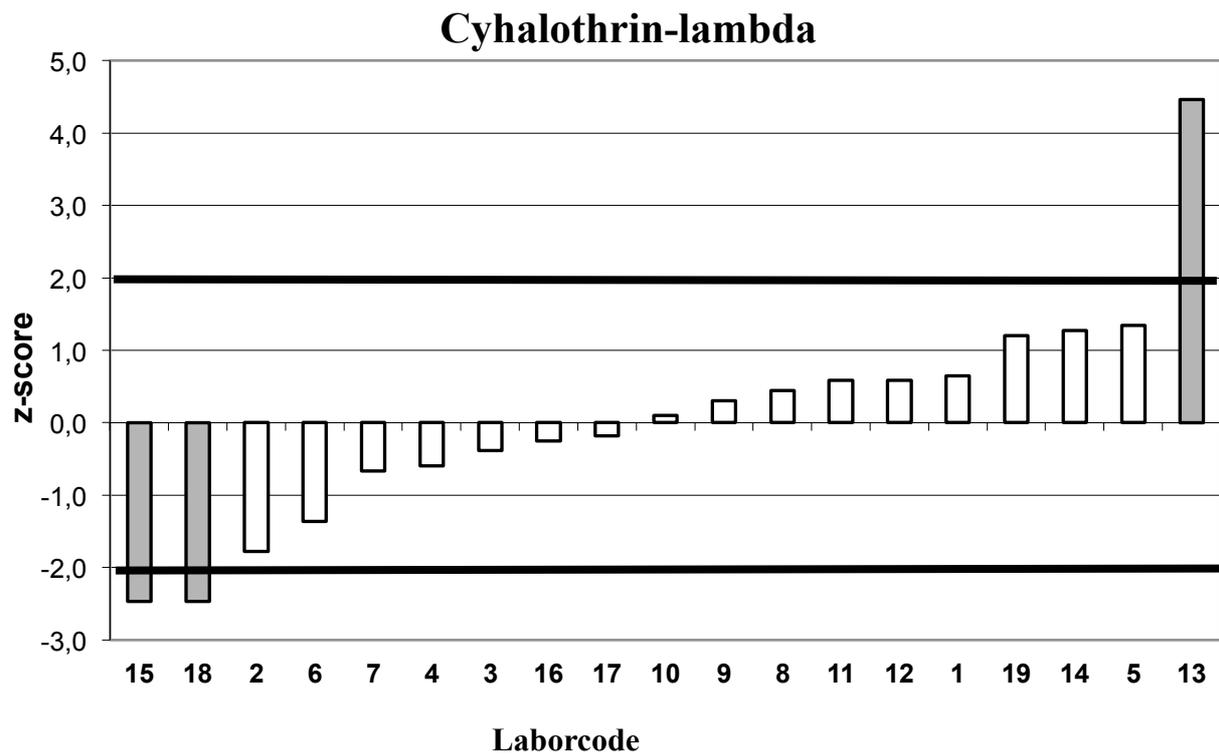


Abb. 51: Cyhalothrin-lambda – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)

Tabelle 45: Cyprodinil – Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)

Labor Code	Cyprodinil, Soll: 165 µg/kg		<i>Wahrer Wert: 116 µg/kg</i>
	Ergebnis (µg/kg)	Richtigkeit Akzeptierter Bereich (µg/kg): 115.5-198	Vergleichbarkeit z-score
1	94	Nein	-0,8
2	120	Ja	0,2
3	140	Ja	1,0
4	144	Ja	1,1
5	163	Ja	1,8
6	84	Nein	-1,2
7	54	Nein	-2,4
8	135	Ja	0,8
9	120	Ja	0,2
10	100	Nein	-0,6
11	140	Ja	1,0
12	80	Nein	-1,4
13	220	Nein	4,1
14	120	Ja	0,2
15	60	Nein	-2,2
16	90	Nein	-1,0
17	98	Nein	-0,7
18	130	Ja	0,6
19	140	Ja	1,0

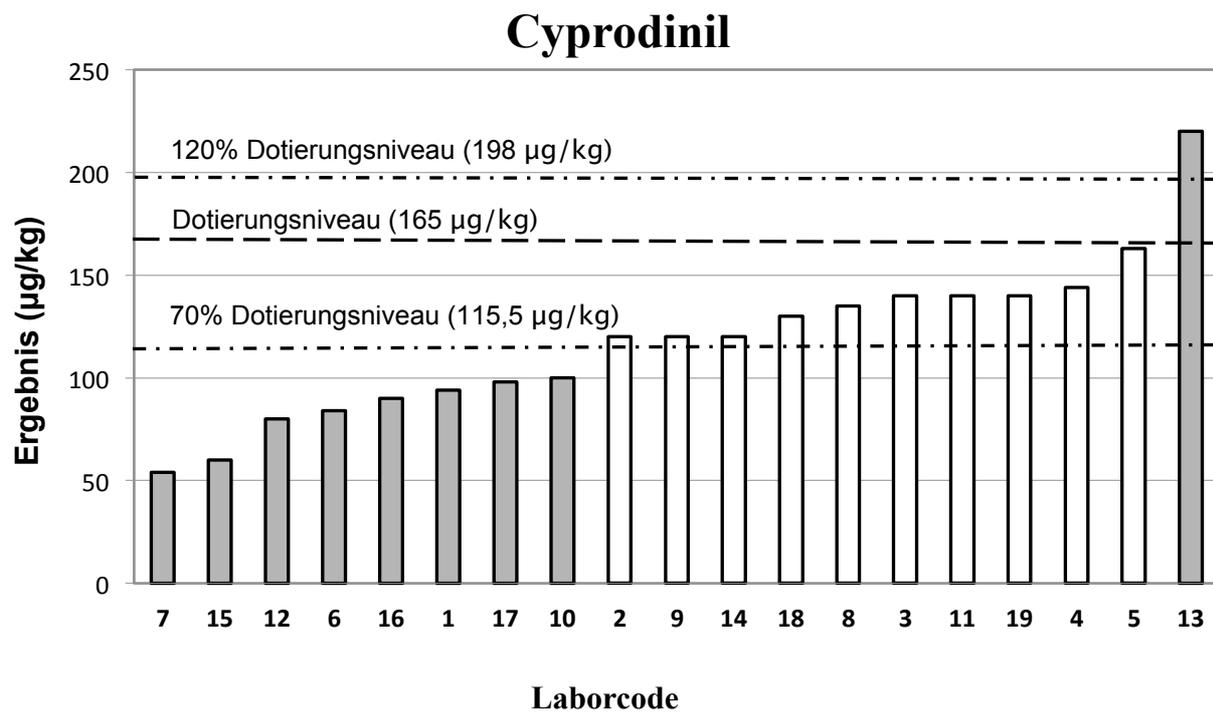


Abb. 52: Cyprodinil – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)

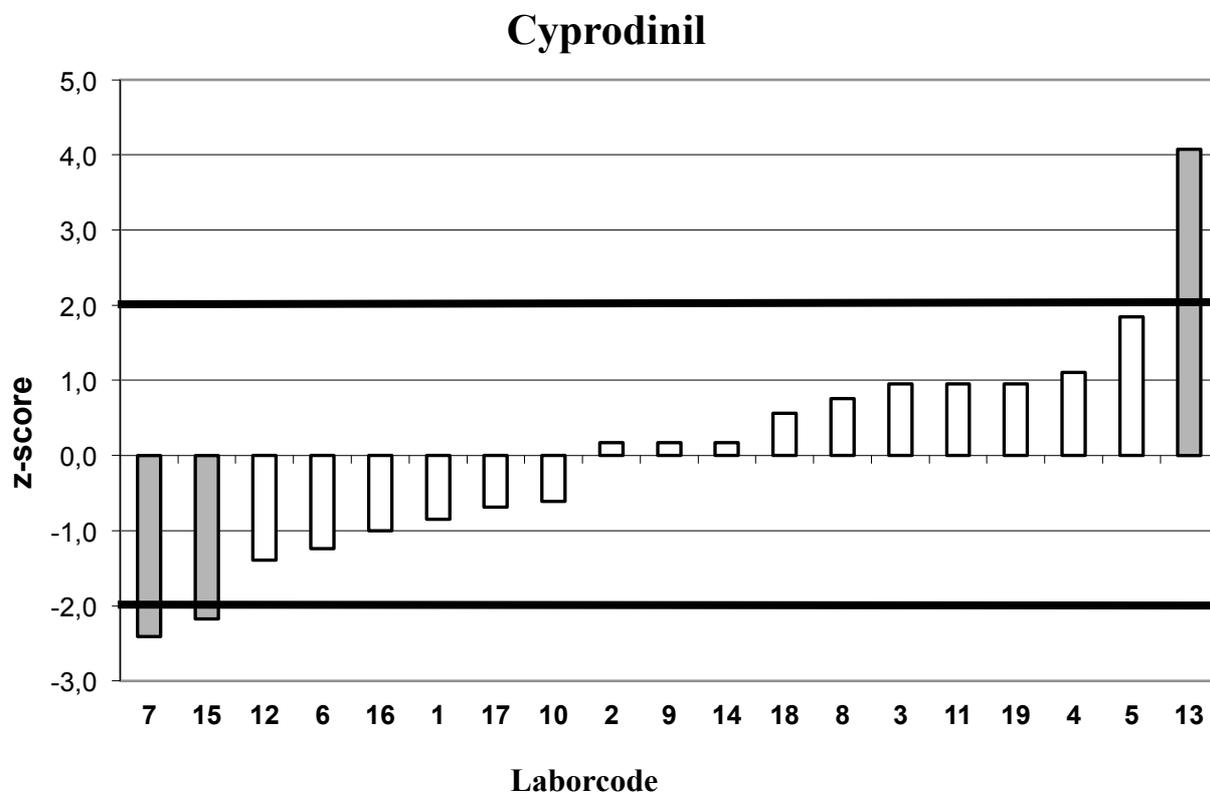
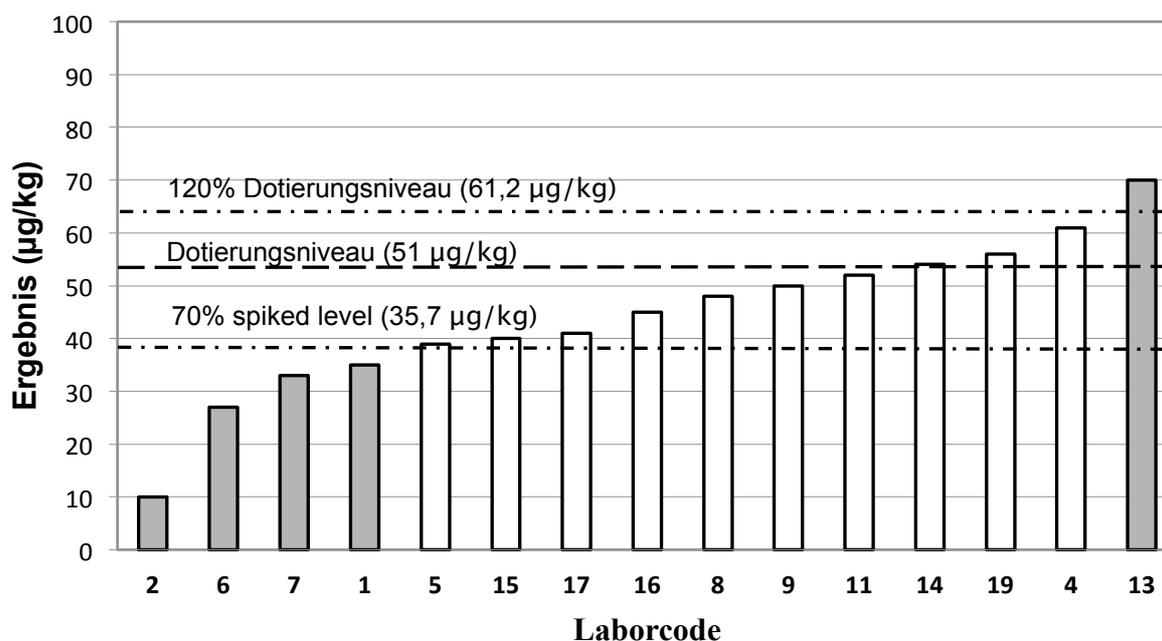


Abb. 53: Cyprodinil – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)

Tabelle 46: Deltamethrin – Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)

Labor Code	Deltamethrin, Soll: 51 µg/kg		Wahrer Wert: 45 µg/kg
	Ergebnis (µg/kg)	Richtigkeit Akzeptierter Bereich (µg/kg): 35.7-61.2	Vergleichbarkeit z-score
1	35	Nein	-1,0
2	10	Nein	-3,5
3	n.r.	Nicht berichtet	Nicht berichtet
4	61	Ja	1,6
5	39	Ja	-0,6
6	27	Nein	-1,8
7	33	Nein	-1,2
8	48	Ja	0,3
9	50	Ja	0,5
10	n.r.	Nicht berichtet	Nicht berichtet
11	52	Ja	0,7
12		Nicht berichtet	Nicht berichtet
13	70	Nein	2,6
14	54	Ja	0,9
15	40	Ja	-0,5
16	45	Ja	0,0
17	41	Ja	-0,4
18	n.r.	Nicht berichtet	Nicht berichtet
19	56	Ja	1,1

Deltamethrin

**Abb. 54:** Deltamethrin – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)

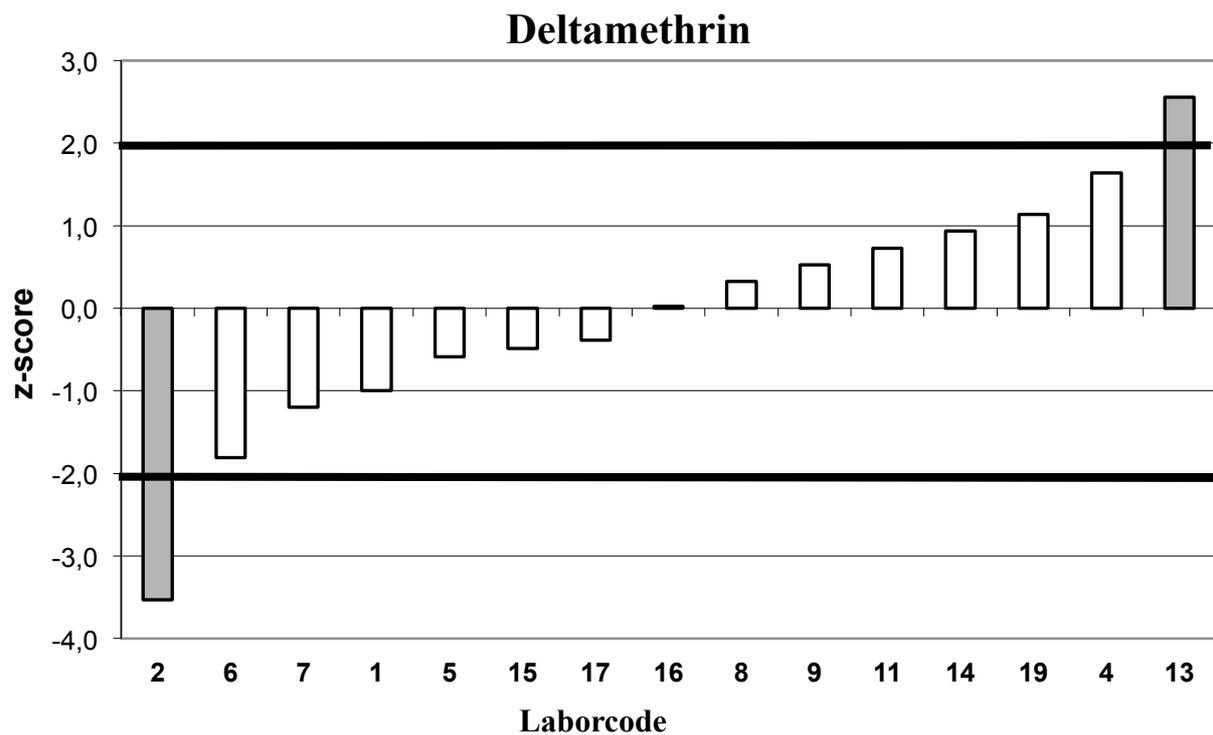


Abb. 55: Deltamethrin – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)

Tabelle 47: Fenhexamid – Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)

Labor Code	Fenhexamid, Soll: 355 µg/kg		Wahrer Wert: 309 µg/kg
	Ergebnis (µg/kg)	Richtigkeit Akzeptierter Bereich (µg/kg): 248.5-426	Vergleichbarkeit z-score
1	246	Nein	-1,1
2	170	Nein	-2,4
3	420	Ja	1,9
4	522	Nein	3,6
5	283	Ja	-0,4
6	380	Ja	1,2
7	350	Ja	0,7
8	328	Ja	0,3
9	210	Nein	-1,7
10	260	Ja	-0,8
11	300	Ja	-0,1
12	282	Ja	-0,5
13	420	Ja	1,9
14	1140	Nein	14,1
15	360	Ja	0,9
16	270	Ja	-0,7
17	202	Nein	-1,8
18	20	Nein	-4,9
19	320	Ja	0,2

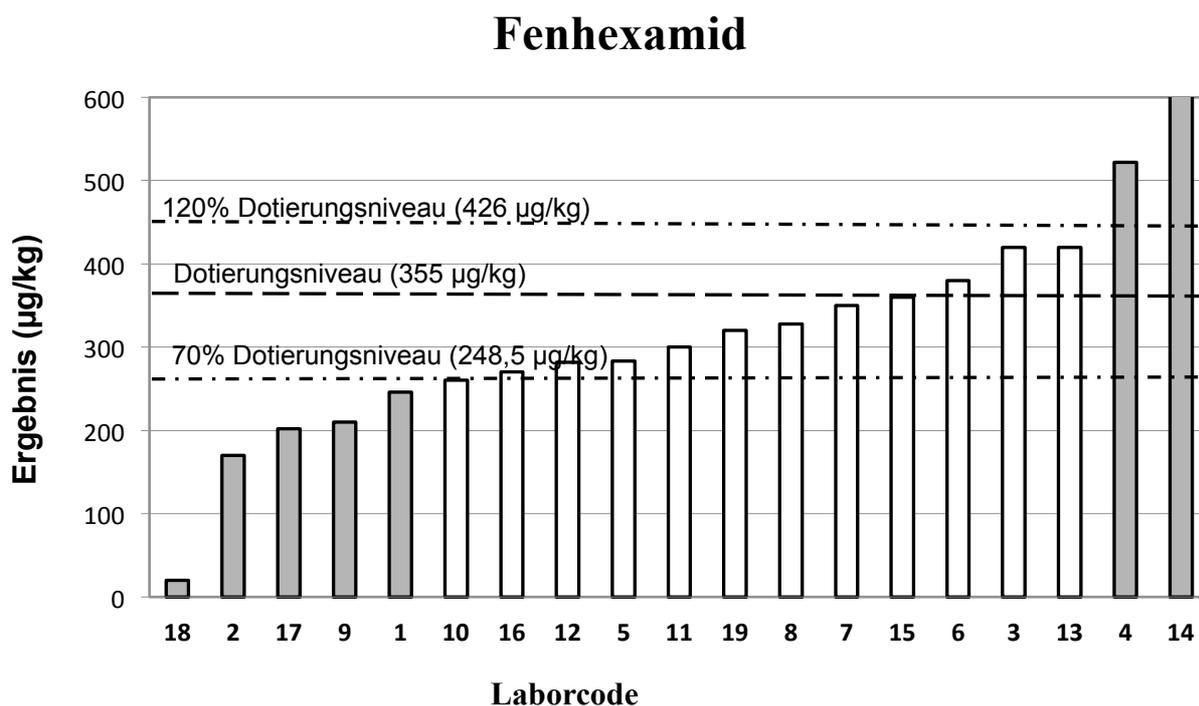


Abb. 56: Fenhexamid – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)

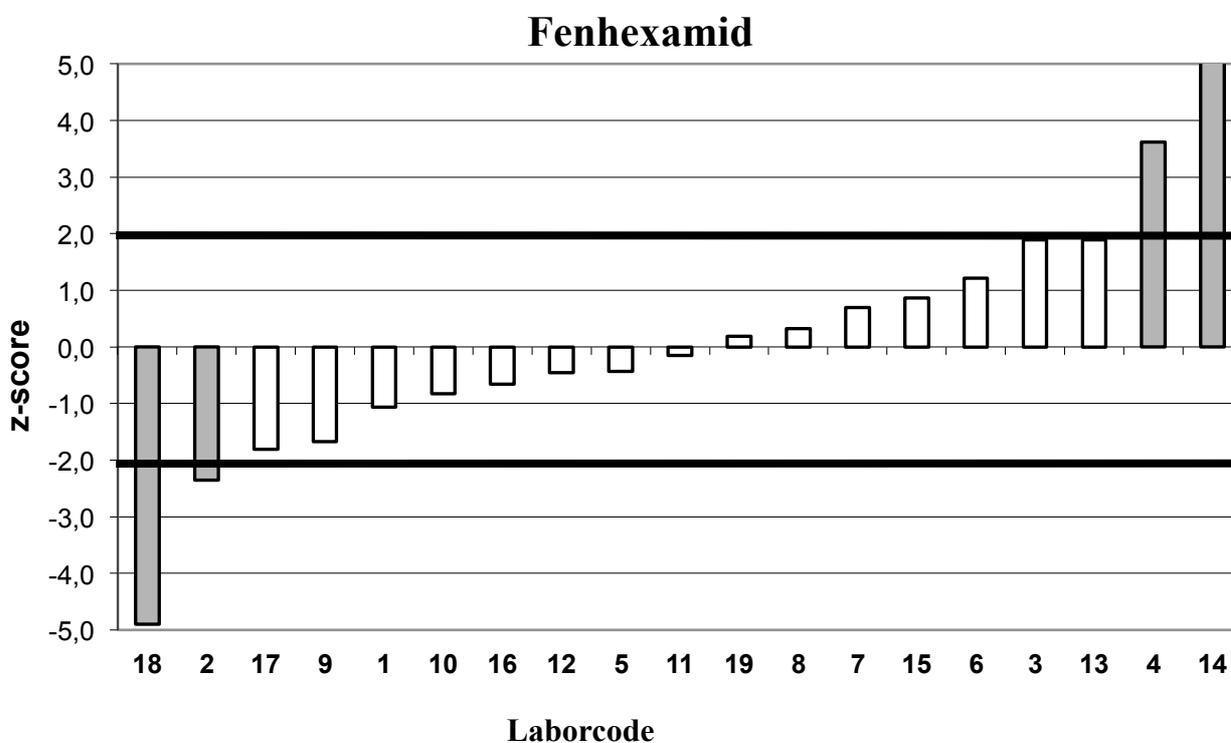


Abb. 57: Fenhexamid – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)

Tabelle 48: Fludioxonil – Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)

Labor Code	Fludioxonil, Soll: 65 µg/kg		Wahrer Wert: 62 µg/kg
	Ergebnis (µg/kg)	Richtigkeit Akzeptierter Bereich (µg/kg): 45.5-78	
1	63	Ja	0,1
2	30	Nein	-2,3
3	80	Nein	1,3
4	63	Ja	0,1
5	113	Nein	3,8
6	72	Ja	0,7
7	40	Nein	-1,6
8	59	Ja	-0,2
9	60	Ja	-0,1
10	61	Ja	-0,1
11	62	Ja	0,0
12	47	Ja	-1,1
13	100	Nein	2,8
14	72	Ja	0,7
15	40	Nein	-1,6
16	60	Ja	-0,1
17	60	Ja	-0,1
18	50	Ja	-0,9
19	77	Ja	1,1

Fludioxonil

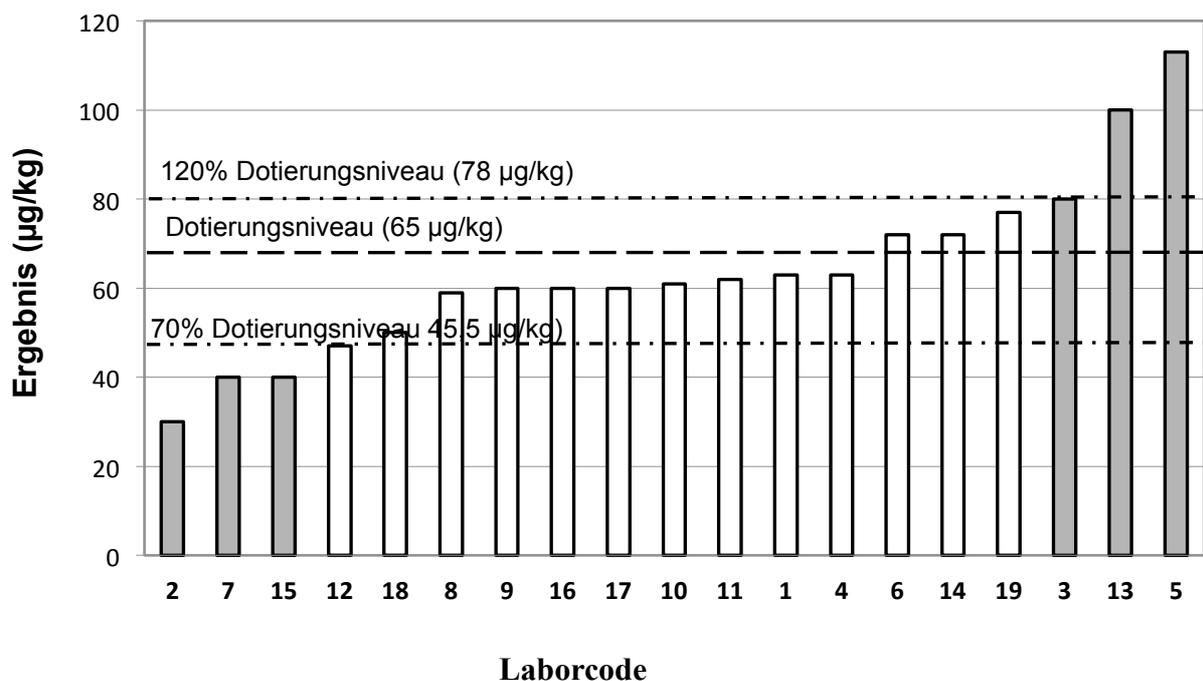


Abb. 58: Fludioxonil – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)

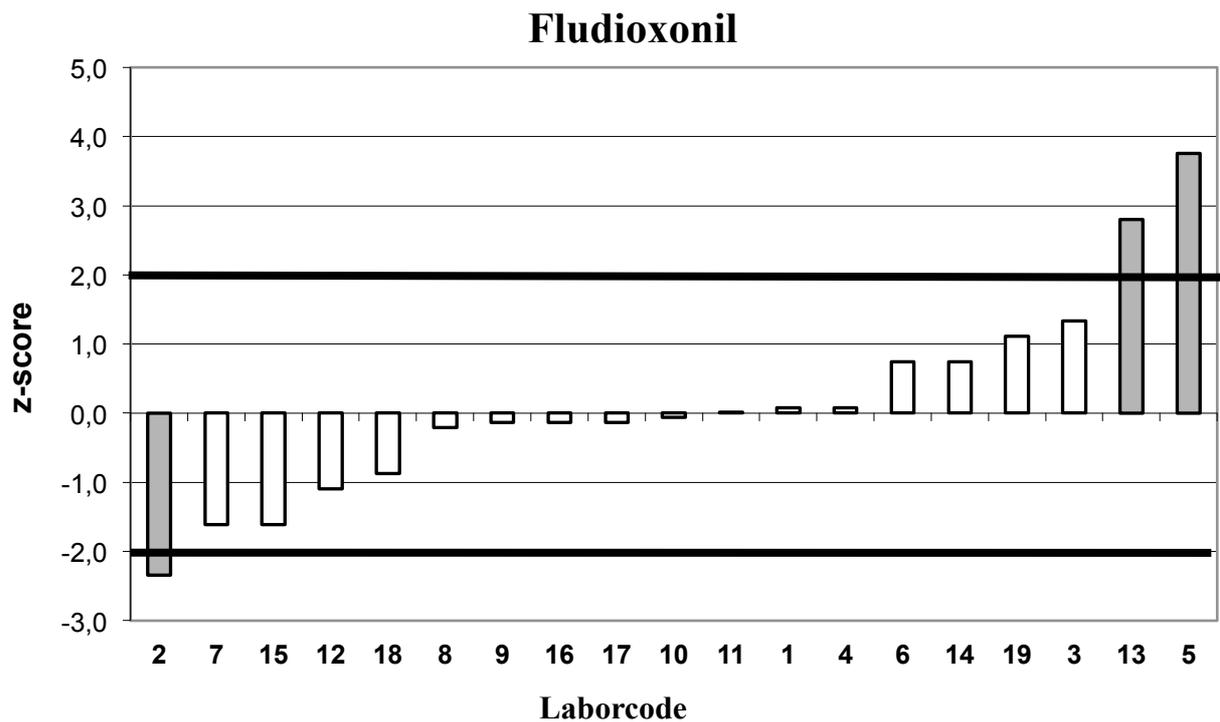


Abb. 59: Fludioxonil – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)

Tabelle 49: Iprodion – Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)

Labor Code	Iprodion, Soll: 950 µg/kg		<i>Wahrer Wert: 803 µg/kg</i>
	Ergebnis (µg/kg)	Richtigkeit accepted range (µg/kg): 665-1140	Vergleichbarkeit z-score
1	853	Ja	0,4
2	750	Ja	-0,4
3	810	Ja	0,1
4	980	Ja	1,3
5	728	Ja	-0,6
6	630	Nein	-1,3
7	800	Ja	0,0
8	840	Ja	0,3
9	710	Ja	-0,7
10	1100	Ja	2,2
11	730	Ja	-0,5
12	1044	Ja	1,8
13	960	Ja	1,2
14	1000	Ja	1,5
15	820	Ja	0,1
16	500	Nein	-2,3
17	591	Nein	-1,6
18	90	Nein	-5,4
19	840	Ja	0,3

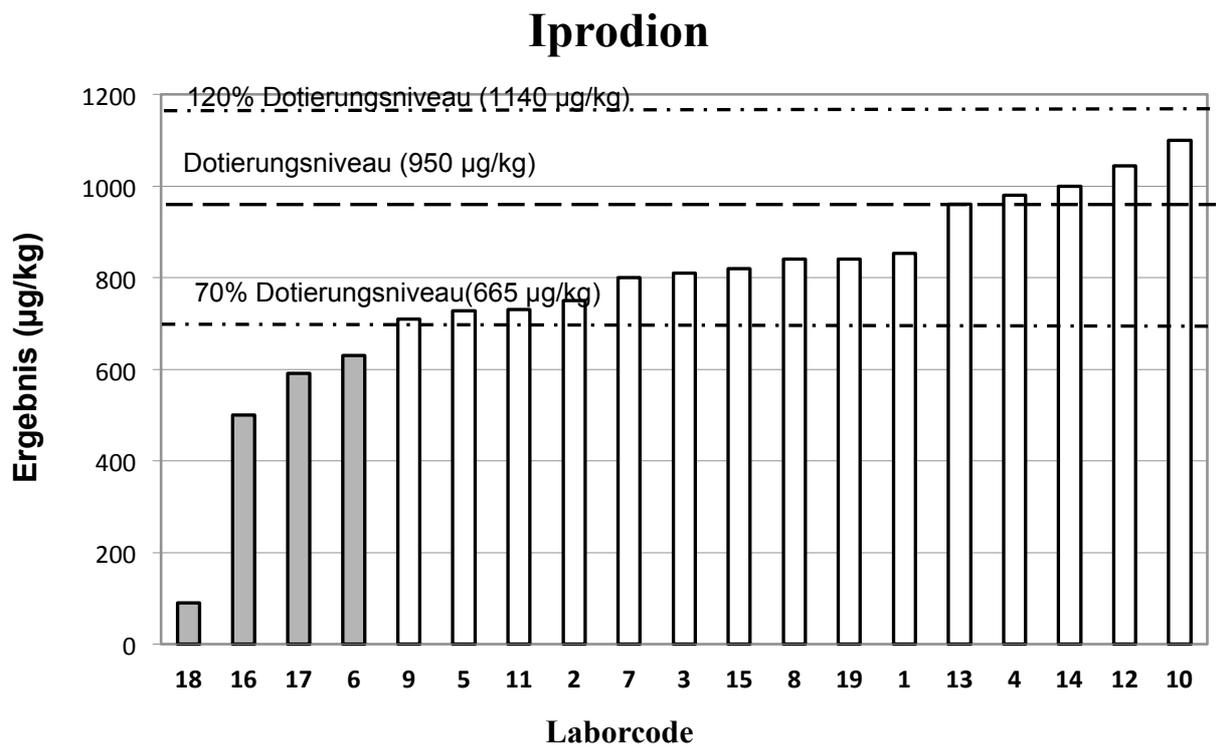


Abb. 60: Iprodion – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)

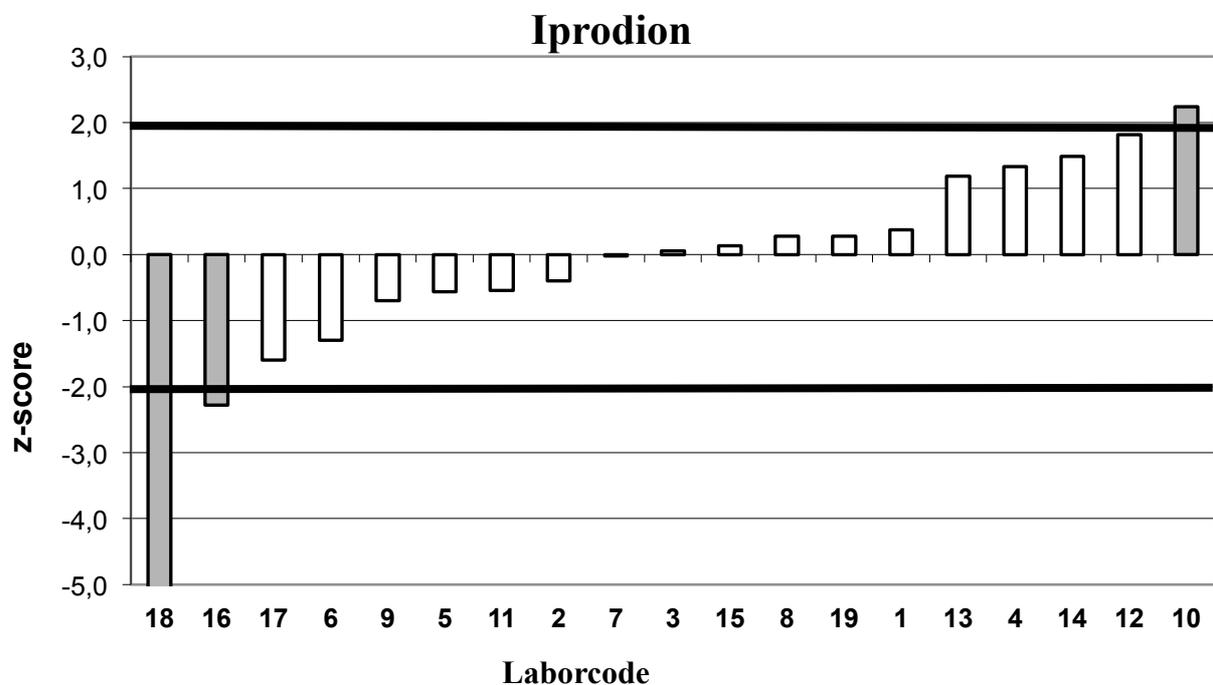


Abb. 61: Iprodion – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)

Tabelle 50: Pyrimethanil – Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)

Labor Code	Pyrimethanil, Soll: 1400 µg/kg		Wahrer Wert: 1168 µg/kg
	Ergebnis (µg/kg)	Richtigkeit Akzeptierter Bereich (µg/kg): 980-1680	Vergleichbarkeit z-score
1	717	Nein	-2,5
2	1050	Ja	-0,6
3	1200	Ja	0,2
4	1297	Ja	0,7
5	1623	Ja	2,5
6	1200	Ja	0,2
7	710	Nein	-2,5
8	1142	Ja	-0,1
9	930	Nein	-1,3
10	1400	Ja	1,3
11	1300	Ja	0,7
12	1454	Ja	1,6
13	2800	Nein	8,9
14	1110	Ja	-0,3
15	710	Nein	-2,5
16	1100	Ja	-0,4
17	1089	Ja	-0,4
18	1100	Ja	-0,4
19	1300	Ja	0,7

Pyrimethanil

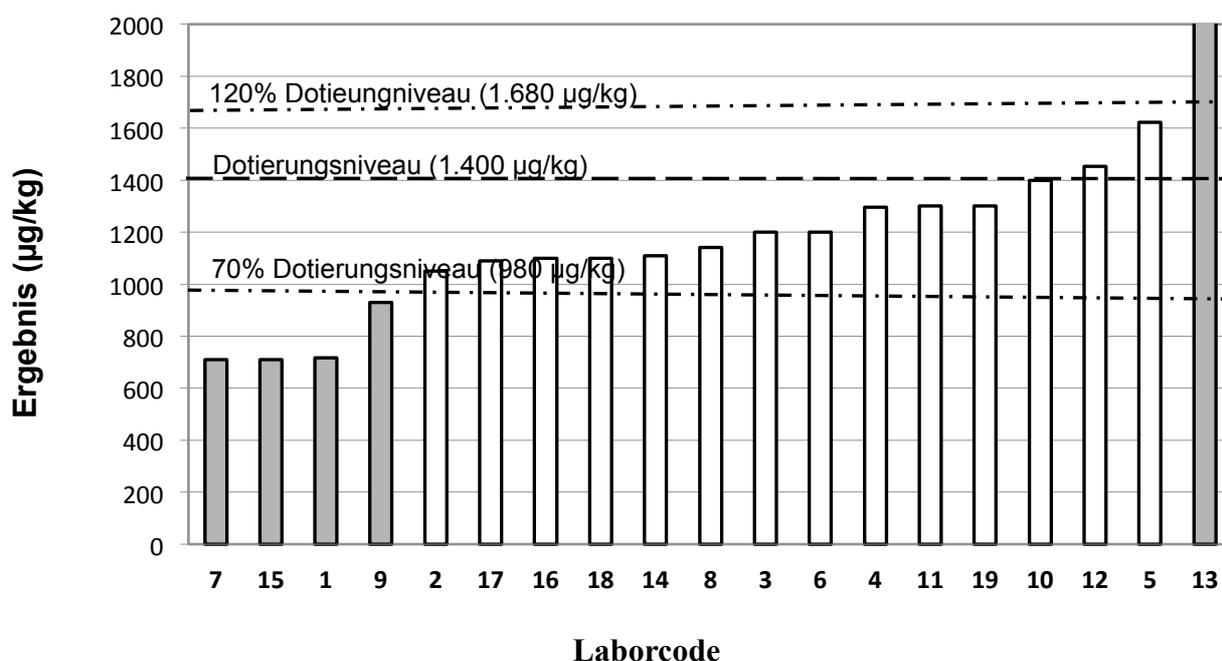


Abb. 62: Pyrimethanil – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)

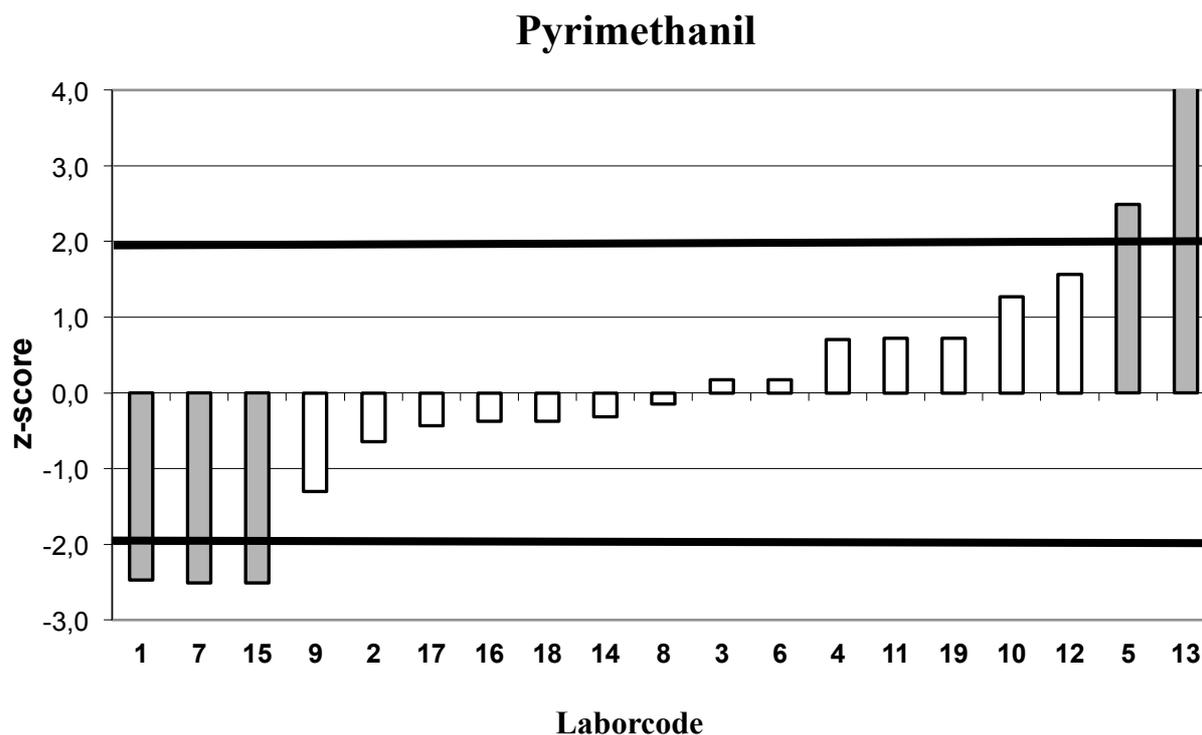


Abb. 63: Pyrimethanil – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)

Der Vergleich der Richtigkeit und der Vergleichbarkeit der Ergebnisse führt zu folgenden Feststellungen: Die statistisch ermittelten Labordurchschnittswerte (*wahre Werte*) liegen allesamt unterhalb der jeweiligen dotierten Gehalte der Wirkstoffe, die tatsächlich dem Testmaterial zugesetzt wurden. Somit kann grundsätzlich festgestellt werden, dass der Labordurchschnitt niedrigere Gehalte bestimmt.

Tabelle 51: Soll-Gehalte im Vergleich zum Labordurchschnitt sowie zur Richtigkeit (Labortest)

Wirkstoff	Dotierter Gehalt (Soll) in µg/kg	Labordurchschnitt (<i>wahrer Wert</i>) in µg/kg	Ausschöpfung (<i>wahrer Wert / dotierter Gehalt * 100</i>) in %
Acetamiprid	45	38	84,4
Bifenthrin	35	29	82,9
Boscalid	115	95	82,6
Cyhalothrin-lambda	77	66	85,7
Cyprodinil	165	116	70,3
Deltamethrin	51	45	88,2
Fenhexamid	355	309	87,0
Fludioxonil	65	62	95,4
Iprodion	950	803	84,5
Pyrimethanil	1400	1168	83,4

Die Ergebnisse und Erkenntnisse aus dem Kompetenztest werden nachfolgend bezogen auf die jeweiligen Einzel-Wirkstoffe diskutiert:

Acetamiprid – Cyprodinil – Bifenthrin

Nur 53% aller Teilnehmer konnten Acetamiprid hinsichtlich der Richtigkeit zufriedenstellend quantifizieren. Von den 9 Laboren, die diesen Wirkstoff nicht zufriedenstellend bestimmt haben, berichteten 7 Teilnehmer Gehalte, die deutlich unterhalb der zugesetzten Menge lagen (bis zu 12 µg/kg, bei einer tatsächlich zugesetzten Menge von 45 µg/kg). Bei diesem Wirkstoff wird deutlich, dass Labore zwar in der Lage sind, vergleichbare Werte zu produzieren (84% zufriedenstellende Ergebnisse bei der z-score-Auswertung), aber damit nicht zwangsläufig richtige Ergebnisse (nur 53%). Labor Nr. 7 hat sogar die Überschreitung des Höchstgehaltes von 0,01 mg/kg nicht festgestellt, so dass die Probe als verkehrsfähig beurteilt wurde, da der Rückstandshöchstgehalt unter Berücksichtigung der erweiterten Messunsicherheit nicht sicher überschritten war.

Cyprodinil haben ebenfalls nur 10 von 19 Teilnehmern richtig bestimmt (53%). Von den 9 Laboren, die Cyprodinil nicht zufriedenstellend quantifiziert haben (hinsichtlich der Richtigkeit), haben 8 Labore Unterbefunde berichtet (z.B. 54 µg/kg, bei einer tatsächlich zugesetzten Menge von 165 µg/kg). Bereits beim Methodenvergleich (5.3) konnte beobachtet werden, dass Cyprodinil durch Unterbefunde methodenübergreifend (QuEChERS und BfR) auffiel. Die Differenz zwischen dem dotierten Gehalt (165 µg/kg) und dem statistisch ermittelten „wahren Wert“ (116 µg/kg) ist beim Cyprodinil im Vergleich zu den anderen Wirkstoffen am höchsten. Der „wahre Wert“ schöpft den tatsächlich dotierten Gehalt nur zu 70,3% aus.

Zieht man jedoch die Vergleichbarkeit für die Beurteilung der Ergebnisse heran, dann stellt sich ein deutlich besseres Ergebnis dar: 84% aller Labore haben zufriedenstellende Ergebnisse berichtet, d.h. die Labore sind vergleichbar mit dem (schlechten) Labordurchschnitt.

Auch bei dem Wirkstoff Bifenthrin ist dieses Phänomen zu erkennen.

Iprodion

Dieser Wirkstoff wurde hinsichtlich der Richtigkeit von den Laboren relativ gut bestimmt. 79% der Teilnehmer (15 von 19 Laboren) haben das Iprodion zufriedenstellend bestimmt im Vergleich zum zugesetzten Gehalt. Beurteilt man die Ergebnisse anhand ihrer Vergleichbarkeit, so zeigen sogar 84% der Teilnehmer zufriedenstellende Ergebnisse.

Pyrimethanil

Die berichteten Ergebnisse zeigen starke Schwankungen (von 710 µg/kg bis zu 2.800 µg/kg, bei einer zugesetzten Menge von 1.400 µg/kg), weshalb die Vergleichbarkeit der Labor-Ergebnisse

für diesen Wirkstoff bei 74% liegt. Pyrimethanil zeigt damit die schlechteste Vergleichbarkeit aller Wirkstoffe.

Boscalid

Hier sind weniger starke Ergebnis-Schwankungen der Labore zu erkennen. Bei zugesetzten 115µg/kg schwanken die Ergebnisse zwischen 40 und 140µg/kg. Die Vergleichbarkeit ist mit 89% von allen 10 Wirkstoffen am höchsten. Allerdings konnten nur 68% der Teilnehmer das Boscalid richtig bestimmen. 5 von den 6 Laboren, die nicht zufriedenstellende Ergebnisse berichtet haben, liegen deutlich unterhalb der zugesetzten Menge (z.B. hat Labor 18 bei zugesetzten 115µg/kg nur ein Ergebnis von 40µg/kg berichtet).

Cyhalothrin-lambda

Die Richtigkeit zeigt das zweitbeste Ergebnis aller Wirkstoffe. 74% der Teilnehmer konnten den Wirkstoff richtig bestimmen. 4 der 5 Labore mit nicht zufriedenstellenden Ergebnissen zeigten Unterbefunde. Die Vergleichbarkeit der Analytik stellt sich mit 84% zufriedenstellenden Ergebnissen ebenfalls gut dar.

Deltamethrin

Die vier falsch-negativen Befunde beim Deltamethrin machen bereits auf die analytischen Herausforderungen dieses Wirkstoffes aufmerksam. Und nicht nur die Identifizierung, sondern auch die Quantifizierung ist beim Deltamethrin kritisch zu beurteilen. Von den insgesamt 15 Teilnehmern, die den Wirkstoff gefunden haben, waren nur 2/3 (=10 von 15 Laboren) in der Lage, Deltamethrin auch mit einer Richtigkeit von mindestens 70% Wiederfindung zu quantifizieren. Bereits beim Methodenvergleich (5.3) zeigte Deltamethrin methodenübergreifend (BfR und S 19) Unterbefunde. Bei der Vergleichbarkeit stellt sich ein anderes Bild dar: Hier haben 87% der Labore, die Deltamethrin identifiziert haben, den Wirkstoff auch vergleichbar quantifiziert (13 von 15 Teilnehmern).

Fenhexamid

Wie bereits beim Methodenvergleich (5.3) festgestellt werden konnte, ist die Bestimmung von Fenhexamid in der Matrix „Traube“ nicht unproblematisch. 7 der 19 Teilnehmer haben hinsichtlich der Richtigkeit keine zufriedenstellenden Ergebnisse berichtet. 5 von diesen 7 Laboren berichteten deutliche Unterbefunde von Fenhexamid, und zwei dieser sieben Labore lagen mit den berichteten Gehalten deutlich (522µg/kg) bzw. sehr deutlich (1140µg/kg) über dem tatsächlich dotierten Gehalt (355µg/kg). Würde man allein nur die Ergebnisse der Ver-

gleichbarkeit heranziehen (79% zufriedenstellende Ergebnisse), so würden die analytischen Schwierigkeiten mit dem Wirkstoff Fenhexamid nicht zum Ausdruck kommen. Erst die Beurteilung der Richtigkeit der Ergebnisse zeigt, dass Fenhexamid herausfordernd ist und der analytische Kompromiss der angewendeten Multimethoden hier offensichtlich zuungunsten des Fenhexamides gelegt wurde.

Fludioxonil

Bei diesem Wirkstoff liegen der tatsächlich dotierte Gehalt (65µg/kg) und der *wahre Wert* (62µg/kg) so dicht beieinander wie bei keinem anderen Wirkstoff. Die berichteten Gehalte verteilen sich somit auch statistisch betrachtet um den dotierten Gehalt. Dennoch konnten drei Labore nicht den Anforderungen an die Richtigkeit (> 70%) genügen, da sie Ergebnisse berichteten, die Wiederfindungen von 61% (2 Labore) oder 123% (1 Labor) zeigten. Da diese Ergebnisse jedoch den Anforderungen an die Vergleichbarkeit entsprachen, fiel das Ergebnis der z-score-Auswertung deutlich besser aus (84% zufriedenstellende Ergebnisse).

In tabellarischer Form lassen sich die Vergleichbarkeit und die Richtigkeit wie folgt zusammenfassen (sortiert nach Laborcode):

Tabelle 52: Zusammenfassung der Vergleichbarkeit und der Richtigkeit der berichteten Ergebnisse (Labortest)

Labor Code	Vergleichbarkeit: Anzahl Wirkstoffe mit z-score > 2	VERGLEICHBAR, aber NICHT RICHTIG: z -score zwar ≤ 2, aber außerhalb 70-120% des spiked levels	NICHT VERGLEICHBAR, aber RICHTIG: z -score zwar > 2, aber innerhalb 70-120% des dotierten Gehaltes
1	1	3	0
2	3	3	0
3	0	1	0
4	1	0	0
5	3	1	2
6	0	6	0
7	3	3	0
8	0	0	0
9	0	3	0
10	2	1	1
11	0	0	0
12	0	3	0
13	7	1	0
14	2	0	0
15	3	3	0
16	1	3	0
17	0	3	0
18	2	4	0
19	0	1	0

5.4.3.1 Vergleich mit anderen Auswertungssystemen

Auswertungen, wie sie von anderen Ringversuchsanbietern (LVU, EU-Proficiency Tests) durchgeführt werden, wurden vorgenommen, um überprüfen zu können, ob es zu signifikanten Änderungen bei der Beurteilung der Laborbewertung kommt.

Auswertung über den Median sowie über eine Zielstandardabweichung von maximal 22%

Die Ergebnisse des Labortests mit verdeckten Proben wurden nicht mit dem „wahren Wert“ nach robuster Statistik verglichen [128], sondern als Referenzwert wurde der Median der berichteten Ergebnisse herangezogen. Hierbei werden in einem ersten Schritt alle Ergebnisse ausgewertet. In einer zweiten Berechnung wurden die Daten von Laboren, deren Ergebnisse um mehr als 5 Zielstandardabweichungen vom Median abweichen oder um mehr als 50% vom Median abweichen, nicht berücksichtigt und der Median auf dieser Datenbasis neu berechnet. Die Zielstandardabweichung wurde nach Horwitz [121] ermittelt. Sofern sie größer als 22% war (siehe Tabelle 38), wurde sie auf maximal 22% vom Wert des Medians beschränkt. Die so erhaltenen Mediane und Zielstandardabweichungen wurden für die z-score-Ermittlung [18] herangezogen, und ein Ergebnis mit einem ($|z\text{-score}| \leq 2$) als zufriedenstellend beurteilt. Die jeweiligen Ergebnisübersichten befinden sich im Anhang (s. dort Tabelle A13 bis A15). Das Gesamtergebnis der Auswertung stellt sich wie folgt dar:

Tabelle 53: Labortest mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse unter Berücksichtigung des „korrigierten“ Medians und einer Zielstandardabweichung von 22%

Kriterium	Anzahl der Labore, die das Kriterium erfüllen	Anzahl aller Laborteilnehmer	Zufriedenstellende Ergebnisse (%)
Korrekte Identifizierung aller Wirkstoffe	15	19	79
Korrekte Identifizierung UND Quantifizierung ($z\text{-score} \leq 2$) aller 10 Wirkstoffe	5	19	26

Tabelle 54: Labortest mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse hinsichtlich der jeweiligen Wirkstoffe unter Berücksichtigung des Medians sowie einer Zielstandardabweichung von 22%

Wirkstoff	Anzahl Labore mit zufriedenstellendem Ergebnis (z-score ≤ 2)	Anzahl aller Laborteilnehmer	Zufriedenstellende Ergebnisse (%)
Acetamiprid	16	19	84
Bifenthrin	16	19	84
Boscalid	17	19	89
Cyhalothrin-lambda	16	19	84
Cyprodinil	16	19	84
Deltamethrin	13	15	68
Fenhexamid	13	19	68
Fludioxonil	16	19	84
Iprodion	16	19	84
Pyrimethanil	14	19	74

Das Gesamtergebnis ist absolut vergleichbar mit dem Ergebnis der Auswertung nach Anwendung der robusten Statistik und der Zielstandardabweichung nach Horwitz, bei der ebenfalls 26% aller Teilnehmer zufriedenstellende Ergebnisse zeigten (siehe Tabellen 39 und 40).

Die Auswertung der Einzelwirkstoffe zeigt, dass die prozentualen Anteile zufriedenstellender Ergebnisse mit denen aus Tabelle 39 übereinstimmen. Lediglich bei dem Wirkstoff Fenhexamid fällt das Ergebnis unter der Berücksichtigung des Medians schlechter aus. Da der Median 292 µg/kg beträgt und die Abweichung zum Median nicht größer sein darf als die zweifache Zielstandardabweichung, fallen die Labore Nr. 3 und 13 bei der z-score-Berechnung mit einem score von 2,2 aus der Bewertungsgrenze $-2 < \text{z-score} < +2$ heraus. Sie liegen zu weit weg vom (niedrigen) Median.

Bei der Anwendung der robusten Statistik wird der Referenzwert (*wahrer Wert*) mit 309 µg/kg berechnet und ist somit größer als der Median. Die Labore Nr. 3 und 13 fallen somit unter Berücksichtigung der zweifachen Zielstandardabweichung nicht aus der Bewertungsgrenze heraus, sondern liegen mit einem z-score von jeweils 1,9 zwar recht hoch, aber noch innerhalb der Bewertungsgrenze $-2 < \text{z-score} < +2$. Ihre Abweichungen zum (höheren) *wahren Wert* sind noch im akzeptierten Bereich:

Tabelle 55: Labortest mit verdeckten Proben – Vergleich der Auswertung des Wirkstoffes Fenhexamid mit unterschiedlichen Referenzwerten (Median / *wahrer Wert*)

Laborcode	Fenhexamid		
	Soll (Dotierungsniveau): 355 µg/kg		
	Ergebnis (µg/kg)	Auswertung über Median (=292 µg/kg)	Auswertung über robuste Statistik (wahrer Wert: 309 µg/kg)
1	246	-0,8	-1,1
2	170	-2,1	-2,4
3	420	2,2	1,9
4	522	*	3,6
5	283	-0,1	-0,4
6	380	1,5	1,2
7	350	1,0	0,7
8	328	0,6	0,3
9	210	-1,4	-1,7
10	260	-0,5	-0,8
11	300	0,1	-0,1
12	282	-0,2	-0,5
13	420	2,2	1,9
14	1140	*	14,1
15	360	1,2	0,9
16	270	-0,4	-0,7
17	202	-1,5	-1,8
18	20	*	-4,9
19	320	0,5	0,2

*Werte werden nicht berücksichtigt für die Zweitberechnung des Medians

Fazit

Die Anwendung des Medians sowie die Festlegung der Zielstandardabweichung auf maximal 22% zeigt nahezu identische Ergebnisse im Vergleich zur Anwendung der robusten Statistik (für die Ermittlung des *wahren Wertes*) und der Zielstandardabweichung nach Horwitz ohne Beschränkung auf maximal 22%. Nur beim Wirkstoff Fenhexamid wurden zwei Labore unter Berücksichtigung des Medians nicht zufriedenstellend beurteilt, weil sie vom (niedrigen) Median zu weit entfernt liegen.

Auswertung über den Median sowie die Fit-For-Purpose Relative Standard Deviation (FFP RSD) von ± 25%

Die Ergebnisse des Labortests mit verdeckten Proben wurden nicht mit dem „wahren Wert“ nach robuster Statistik ermittelt [128], sondern als Referenzwert wurde der Median aller berichteten Ergebnisse herangezogen. Eine Neuberechnung des Medians in einem zweiten

Berechnungsschritt findet nicht statt. Die Zielstandardabweichung wird grundsätzlich auf 25% des Medians festgelegt (FFP RSD). Die so erhaltenen Mediane und Zielstandardabweichungen wurden für die z-score-Ermittlung [18] herangezogen, und ein Ergebnis mit einem ($|z\text{-score}| \leq 2$) als zufriedenstellend beurteilt. Die jeweiligen Ergebnisübersichten befinden sich im Anhang (s. dort Tabelle A16 bis A18). Das Gesamtergebnis der Auswertung stellt sich wie folgt dar:

Tabelle 56: Labortest mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse unter Berücksichtigung des Medians sowie einer Zielstandardabweichung von 25%

Kriterium	Anzahl der Labore, die das Kriterium erfüllen	Anzahl aller Laborteilnehmer	Zufriedenstellende Ergebnisse (%)
Korrekte Identifizierung aller Wirkstoffe	15	19	79
Korrekte Identifizierung UND Quantifizierung ($z\text{-score} \leq 2$) aller 10 Wirkstoffe	7	19	37

Tabelle 57: Labortest mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse hinsichtlich der jeweiligen Wirkstoffe unter Berücksichtigung des Medians sowie einer Zielstandardabweichung von 25%

Wirkstoff	Anzahl Labore mit zufriedenstellendem Ergebnis ($ z\text{-score} \leq 2$)	Anzahl aller Laborteilnehmer	Zufriedenstellende Ergebnisse (%)
Acetamid	16	19	84
Bifenthrin	17	19	89
Boscalid	17	19	89
Cyhalothrin-lambda	16	19	84
Cyprodinil	17	19	89
Deltamethrin	13	19	68
Fenhexamid	16	19	84
Fludioxonil	17	19	89
Iprodion	18	19	95
Pyrimethanil	18	19	95

Fazit

Die Anwendung des (unkorrigierten) Medians sowie die grundsätzliche Festlegung der Zielstandardabweichung auf 25% zeigt das bisher „beste“ Ergebnis mit einem Anteil von 37% erfolgreicher Teilnehmer. Durch die großzügige Beurteilung sind auch bei dem Wirkstoff Fenhexamid keine gravierenden Auffälligkeiten zu erkennen, da 84% aller Teilnehmer zufriedenstellende Ergebnisse für diesen Wirkstoff zeigen.

5.4.4 Zusammenfassung der Diskussion

Aus den unter 5.4.1 bis 5.4.3 vorgestellten und diskutierten Ergebnissen können folgende Erkenntnisse abgeleitet werden:

- 1) Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Analysenkompetenz der getesteten Labore unter Routinebedingungen nicht zufriedenstellende Ergebnisse zeigt: 79% aller Teilnehmer waren in der Lage, alle Wirkstoffe zu identifizieren. Nur 26% aller Teilnehmer (5 Labore) haben vergleichbare Ergebnisse gezeigt, und nur zwei Labore überhaupt (11%) zeigten richtige Ergebnisse für alle 10 Wirkstoffe. Diese beiden Labore haben darüber hinaus auch für alle 10 Wirkstoffe vergleichbare Ergebnisse berichtet.
- 2) Während bei den durchgeführten Einzelbetrachtungen und Evaluierungen der Analyseergebnisse die analytische Laborleistung ausschließlich gemessen an der Vergleichbarkeit (z-score) zu zufriedenstellenden Ergebnissen führte, wurden die fragwürdigen Ergebnisse erst durch die Beurteilung der Richtigkeit (Wiederfindung) der berichteten Werte identifiziert (z.B. beim Acetamid, Cyprodinil, Deltamethrin und Fenhexamid). Das Prüfkriterium der Vergleichbarkeit ist als alleiniges Kriterium nicht aussagekräftig genug und „belohnt“ Teilnehmer, deren Ergebnisse dicht am Labordurchschnitt liegen, unabhängig davon, ob die Ergebnisse richtig sind oder nicht. Wirkstoffe, die durch den analytischen Kompromiss der Multimethoden nicht optimal in der Matrix bestimmt werden können (Beispiel: Fenhexamid), fallen deshalb bei der Beurteilung der Ergebnisse aller Teilnehmer nach ihrer Vergleichbarkeit nicht negativ auf, solange sie mit dem Labordurchschnitt vergleichbar sind. Deshalb ist die Richtigkeit der Ergebnisse unbedingt zu überprüfen, wenn die analytische Kompetenz der Teilnehmer zu beurteilen ist.
- 3) Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Wirkstoffe, die bereits bei dem Methodenvergleich (5.3) Schwierigkeiten zeigten (z.B. Fenhexamid und Cyprodinil), auch bei der Auswertung des Tests mit verdeckten Proben zu Auffälligkeiten (hier: Unterbefunde) neigten.
- 4) Obwohl die nach robuster Statistik ermittelte Standardabweichung (hier: Vergleichsstandardabweichung) die statistisch zu erwartende Zielstandardabweichung nach Horwitz

[121] überschritt, lag sie maximal bei $\pm 31\%$ gemessen am Labordurchschnittswert (*wahrer Wert*). Die nach Horwitz / Thompson [122] zu erwartende Zielstandardabweichung beträgt maximal $\pm 22\%$ des Labordurchschnittswertes, so dass die tatsächlich ermittelte und die statistisch zu erwartende Standardabweichungen nicht weit voneinander entfernt lagen. Dieses positive Ergebnis ist umso erstaunlicher, da es sich bei dem Test nicht um einen offiziell angekündigten Laborvergleich handelte, sondern um die Analyse verdeckter Proben unter Routinebedingungen.

- 5) Die Anwendung anderer Berechnungsmodelle, die von Ringversuchsanbietern herangezogen werden (hier beispielhaft: LVU, EU-Proficiency Tests) zeigten ähnliche Ergebnisse wie die Anwendung der robusten Statistik sowie der Zielstandardabweichung nach Horwitz/Thompson [121,122]. Nur geringfügige Änderungen des Gesamtergebnisses waren zu erkennen. Die durch die Beurteilung der Ergebnisse nach ihrer Richtigkeit herausgearbeiteten und im Methodenvergleich unter 5.3 identifizierten Defizite bei der Analyse des Trauben-Testmaterials wurden nicht aufgedeckt.

5.5 Zielsetzung 5: Analytik von Einzelwirkstoffen versus analytischer Kompromiss von Multimethoden

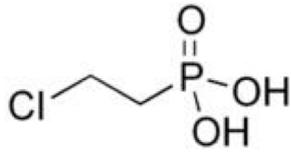
Im Gegensatz zur Analytik mit Multimethoden ist die Analytik von Einzelwirkstoffen (die aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften nicht im Rahmen einer Multimethode analysiert werden können) insofern von Vorteil, als sich der gesamte Analysenprozess auf die analytischen Anforderungen des Einzelwirkstoffes ausrichten kann. Auch wenn sich die zur Anwendung kommenden Methoden aufgrund ihrer Einzelmodule stark voneinander unterscheiden (Probenvorbereitung, Aufreinigung, Chromatographie und Detektionstechnik), so können sie sich individuell auf die analytische Einzelfragestellung ausrichten und anpassen, so dass sie zu richtigen und vergleichbaren Ergebnissen führen können.

Am Beispiel eines Methodenringversuches von Ethephon in Tomaten soll nachfolgend gezeigt werden, dass unterschiedliche Einzelmethoden zu vergleichbaren und richtigen Ergebnissen führen können.

5.5.1 Methodenringversuch zum Wirkstoff Ethephon – Hintergründe

Die Zuverlässigkeit der Analytik von Ethephon ist aufgrund seiner Anwendung als Wachstumsregulator in einer Vielzahl von pflanzlichen Lebensmitteln von großer Bedeutung. Ethephon wirkt systemisch. Sobald es von der Pflanze aufgenommen wurde, spaltet es Ethylen ab, welches als Pflanzenhormon die Reifung beschleunigt. Die Anwendung von Ethephon wird z.B. empfohlen, um die Reifung von Äpfeln, Beeren, Kirschen, Zitrusfrüchten, Zuckerrüben, Futterrüben, Kaffee, und Paprika vor deren Ernte zu beschleunigen [135]. Weiterhin dient Ethephon zur Verstärkung der Reifung nach der Ernte, z.B. bei Bananen, Mangos und Zitrusfrüchten. Darüber hinaus wird Ethephon eingesetzt, um bei Beeren und Äpfeln das Lösen der Frucht von der Pflanze bei der Ernte zu vereinfachen. Schließlich verstärkt Ethephon das Treiben der Knospen bei jungen Apfelbäumen und kommt deshalb auch in dieser Vegetationsphase der Pflanzen zum Einsatz [135].

Ethephon (2-Chlorethylphosphonsäure) hat ein geringes Molekulargewicht von 144.5 g/mol und zeigt eine gute Wasserlöslichkeit von 1 kg/l (23°C) [135]. Seine chemisch-physikalischen Eigenschaften lassen sich wie folgt zusammenfassen:



Schmelzpunkt: 74-75°C

Dampfdruck: $<1 \times 10^7$ hPa (20 °C)

K_{ow} logP <-2.20 (25 °C)

Ionenspuren (z.B.): 143>107 (Quantifier);143>79 (Qualifier)

Abb. 64: Chemisch-physikalische Eigenschaften von Ethephon [135]

Aufgrund des kleinen Moleküls sind z.B. bei einem MS-Detektor die Fragmente ebenfalls klein und dadurch weniger spezifisch. Das polare Verhalten des Wirkstoffes erfordert auch polare Extraktionsbedingungen, so dass die methodischen Randbedingungen speziell auf die chemisch-physikalischen Eigenschaften von Ethephon abzustimmen sind.

Unterschiedliche Analyseverfahren wurden etabliert, um den Wirkstoff bestmöglich bestimmen zu können. Hierzu zählen u.a. gaschromatographischen Verfahren wie

- GC-FPD (P-mode) oder GC/MS nach Extraktion und Derivatisierung sowie
- Headspace-GC nach Freisetzung von Ethylen unter alkalischen Bedingungen.

Entsprechend der analytischen Entwicklungen im Bereich der Rückstandsanalytik mit LC-Trenntechniken und MS/MS-Detektoren wurden auch auf dieser Basis neue Methodenansätze für die Bestimmung von Ethephon etabliert.

Aufgrund der unterschiedlichen Methoden, die bei der Analytik von Ethephon zur Anwendungen kommen, traten sowohl bei den Laboren als auch bei den Laborkunden Zweifel daran auf, ob die Analysenergebnisse wirklich richtig, robust und vergleichbar sind. Da die Anzahl positiver Ethephonbefunde darüber hinaus zunahm und auch Verbraucherschützer auf den Sachverhalt aufmerksam wurden [139], wurde ein Methodenringversuch durchgeführt, der zum Ziel hatte, die Frage nach der Richtigkeit, Robustheit und Vergleichbarkeit der Ethephonbefunde zu beantworten und Methodendetails zu den angewendeten Analyseverfahren der Labore den Teilnehmern zur Verfügung zu stellen.

5.5.2 Durchführung (Ethephon)

Homogenisiertes Bio-Tomatenpüree wurde mit einer Soll-Konzentration von 150 µg/kg Ethephon dotiert und auf Homogenität geprüft. Das Testmaterial wurde zu mindestens 100g in Probenflaschen abgefüllt und bei -20°C gelagert, bis es zusammen mit Blank Material den Ringversuchsteilnehmern zur Verfügung gestellt wurde (Kühltransport). Hierbei erhielt jeder

Teilnehmer zwei Probenflaschen mit Testmaterial (2×100g) sowie zwei Probenflaschen mit Blank Material (2 ×100g). Den Laboren wurden zusammen mit den Proben entsprechende Anweisungen zur Durchführung des Methodenringversuches sowie zur Ergebnisabgabe (siehe im Anhang Dokument B2 bis B4) zugeschickt. Insgesamt 15 Labore aus 6 Ländern (Frankreich, Belgien, Niederlande, Italien, Deutschland und Spanien) nahmen an dem Methodenringversuch teil.

Es wurden den Teilnehmern überlassen, darüber zu entscheiden, welche Methoden für die Analytik von Ethephon im Labor zur Anwendung kommen sollten. Die Teilnehmer wurden dazu ermuntert, in ihrem Labor auch unterschiedliche Methoden – z.B. mit den Modulen Headspace GC oder LC-MS/MS – für die Analyse des Testmaterials heranzuziehen.

5.5.3 Ergebnisse des Methodenringversuches (Ethephon)

Alle teilnehmenden Labore berichteten ihre Ergebnisse innerhalb von 14 Tagen nach Erhalt der Proben. Insgesamt wurden von den 15 Teilnehmern 19 Ergebnisse berichtet, da zum Teil mehrere Methoden (und damit mehrere Ergebnisse) in einem Teilnehmerlabor zur Anwendung kamen. Zusammenfassend berichteten die Teilnehmer

- 11 Ergebnisse, bei denen die LC/MSMS-Technik angewendet wurde (Labore 1b / 2 / 4 / 5 / 7 / 8 / 9b / 12b / 13 / 14 / 15b; weiße Balken in Abb. 65 und 66),
- 5 Ergebnisse, bei denen die Headspace-GC-Technik zur Anwendung kam (Labore 1a / 10 / 11 / 12a / 15a; graue Balken in Abb. 65 und 66), sowie
- 3 Ergebnisse, bei denen die GC/FPD- oder GC/MS-Technik nach Derivatisierung der Probenextrakte zur Anwendung kamen (Labore 3 / 6 / 9a, schwarze Balken in Abb. 65 und 66).

Die Analysenergebnisse wurden statistisch ausgewertet [120, 121], um sie auf das Kriterium der Vergleichbarkeit zu prüfen. Weiterhin wurden die berichteten Ergebnisse mit dem tatsächlich dotierten Gehalt an Ethephon (150 µg/kg) verglichen, um die Richtigkeit der Ergebnisse zu evaluieren:

Tabelle 58: Statistische Parameter für die Bewertung der Vergleichbarkeit (Ethephon) [121,122,128]

Analyt	Wahrer Wert (robuster Mittelwert)			Zielstandardabweichung
	Anzahl der Datenpunkte, n	Robuster Mittelwert, X , $\mu\text{g/kg}$	robuste Standardabweichung, σ	σ_p , $\mu\text{g/kg}$
Ethephon	19	150	16	32

Tabelle 59: Ethephon – Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Methodenvergleich)

Ethephon (wahrer Wert 150 $\mu\text{g/kg}$) Dotierungsniveau (Soll Gehalt): 150 $\mu\text{g/kg}$					
Labor-code	Ergebnis ($\mu\text{g/kg}$)	Wiederfindung (%) im Labor	Bestimmungsgrenze ($\mu\text{g/kg}$)	z-score	Ausschöpfung des Soll-Gehaltes von 150 $\mu\text{g/kg}$ (%)
1a	159	110	30	0,3	106
1b	142	103	30	-0,3	95
2	136	95-100	1	-0,4	91
3	154	91	10	0,1	103
4	175	109	40	0,8	117
5	137	90,2	50	-0,4	91
6*	134	54	10	-0,5	89
7	150	92-96	10	0	100
8	175	100	10	0,8	117
9a*	144	15	50	-0,2	96
9b	131	102	50	-0,6	87
10	195	93	100	1,4	130
11	180	95	50	0,9	120
12a	152	70-110	50	0,1	101
12b	145	70-110	10	-0,2	97
13	145	105	10	-0,2	97
14	140	96	10	-0,3	93
15a	165	100,6	25	0,5	110
15b	135	100,6	25	-0,5	90

a / b: Die Ergebnisse wurden von einem Teilnehmer berichtet und beziehen sich auf unterschiedliche Methoden

*6 = Das Ergebnis wurde auf eine Wiederfindung von 95% korrigiert

*9a = Das Ergebnis wurde auf eine Wiederfindung von 100% korrigiert

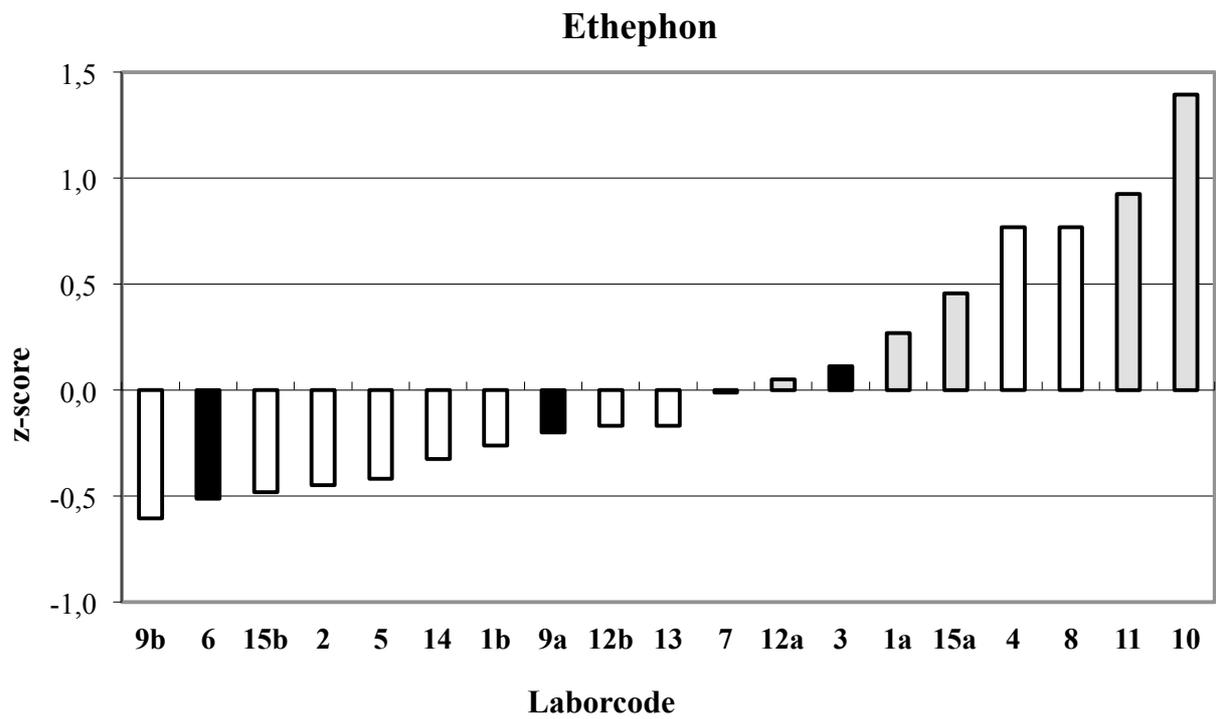


Abb. 65: Ethephon – z-scores der Laborteilnehmer (Methodenvergleich)

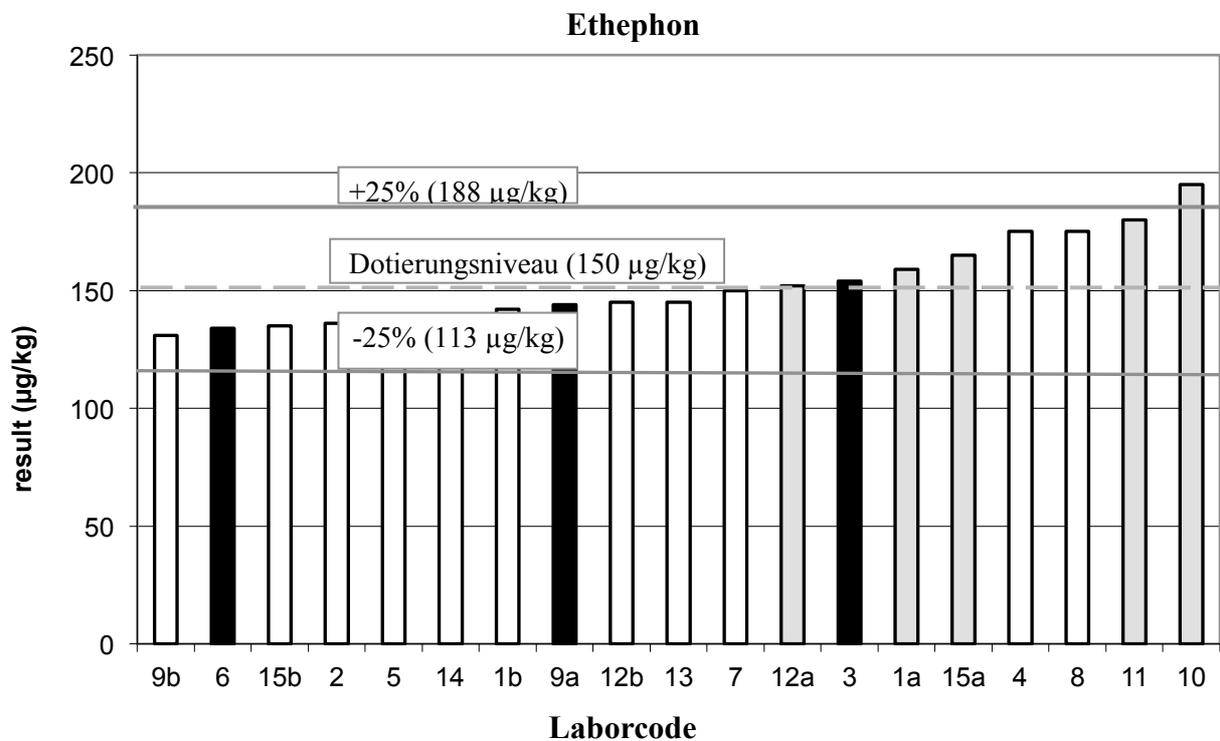


Abb. 66: Ethephon – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Methodenvergleich: (weiße Balken: LC/MSMS / schwarze Balken: GC nach Derivatisierung / graue Balken: Headspace-GC)

Alle 19 berichteten Ergebnisse liegen eng beieinander. Das niedrigste Ergebnis liegt bei 131 µg/kg, der höchste Gehalt wurde mit 195 µg/kg berichtet. Die Anwendung der robusten Statistik [129] ergab eine robuste Standardabweichung von 16 µg/kg. Sie beträgt nur die Hälfte der Zielstandardabweichung (31 µg/kg) nach Horwitz [121]. Abbildung 65 zeigt, dass 18 von 19 Ergebnissen einen $|z\text{-score}| < 1$ erzielen. Lediglich ein Ergebnis (Laborcode 10) liegt mit einem z-score von 1,3 darüber, was das sehr gute Gesamtergebnis bezüglich der Vergleichbarkeit nicht negativ beeinflusst und eine sehr gute Vergleichbarkeit zeigt.

Abbildung 65 bezieht sich auf die Darstellung der Richtigkeit der Ergebnisse. Die Ausschöpfung des dotierten Gehaltes (150µg/kg) wird in einem Bereich von $\pm 25\%$ betrachtet. Hierbei kann gezeigt werden, dass lediglich ein Teilnehmer (Laborcode 10) den Soll-Gehalt um 130% ausschöpft.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Methoden / Methodenmodule, die bei diesem Methodenringversuch zur Anwendung kamen, ist eine Tendenz aus den Ergebnissen abzuleiten: Die Ergebnisse, die durch Anwendung des Headspace-GC-Moduls ermittelt wurden, liegen typischerweise höher als die Ergebnisse, die unter Anwendung der GC- sowie der LC-MS/MS-Module erzielt wurden. Unter den insgesamt 8 höchsten Ergebnissen wurden 5 mit der Headspace-Methode berichtet. Alle Ergebnisse, die mit Anwendung des Headspace-Moduls berichtet wurden, liegen über dem Dotierungsniveau von 150µg/kg, obwohl sie sich nahe am Dotierungsniveau befinden. Offensichtlich existieren Einflüsse, die die Ergebnisse bei der indirekten Bestimmung des Ethephons über Ethylen mittels Headspace GC zu höheren Befunden tendieren lassen (z.B. natürliche Ethylengehalte).

5.5.4 Zusammenfassung der Diskussion (Ethephon)

Die Überprüfung der Vergleichbarkeit und der Richtigkeit der Ergebnisse machen deutlich, dass die Analytik von Ethephon valide Ergebnisse liefert, unabhängig von den angewendeten Analyseverfahren. Es konnten keine signifikanten Abweichungen zwischen den angewendeten Analyseverfahren festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen eine gute Vergleichbarkeit und Richtigkeit. Die Ergebnisse, die unter Anwendung der Headspace-GC berichtet wurden, zeigen eine leichte Tendenz zu höheren Gehalten, die sich jedoch noch immer im akzeptablen Bereich bewegen. Die Analytik von Einzelwirkstoffen unter Anwendung unterschiedlicher Methoden führt zu vergleichbaren und richtigen Ergebnissen. Die Problematik, den richtigen analytischen Kompromiss zu finden – wie bei der Anwendung von Multimethoden – ist hier nicht gegeben.

5.5.5 Methodenringversuch zur Analytik von Chlormequat und Mepiquat in Pilzen

In Analogie zum Ethephon-Methodenringversuch wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem die Wirkstoffe Chlormequat und Mepiquat in Pilzen getestet wurden. Insgesamt 14 Labore aus 5 Nationen (Frankreich, Niederlande, Italien, Spanien und Deutschland) nahmen an dem Methodenringversuch teil. Ziel hierbei war es, die laborinternen Methoden der Teilnehmer mit dem LC-MS/MS-Modul auf ihre Validität zu überprüfen. Da die Rückstandsproblematik von Chlormequat und Mepiquat insbesondere in Bio-Pilzen im unteren Konzentrationsbereich (10 µg/kg) bekannt ist, wurde das Design des Testmaterials entsprechend gestaltet. Die Einzelergebnisse sowie die Auswertung des Methodenringversuchs sind im Anhang aufgeführt (s. dort Tabelle A19 und A20) und lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Tabelle 60: Chlormequat / Mepiquat – Ergebnisse des Methodenringversuches

Wirkstoff	Wahrer Wert (robuster Mittelwert)			Zielstandardabweichung
	Datenpunkte, <i>n</i>	Robuster Mittelwert, X, µg/kg	Robuste Standardabweichung, σ	σ_p , µg/kg
Chlormequat	14	40	7,73	8,73
<i>Austernpilz</i> Dotierungsniveau: 33 µg/kg				
Mepiquat	14	14	4,7	3
<i>Austernpilz</i> Dotierungsniveau: 12 µg/kg				

Die z-score-Auswertung (Vergleichbarkeit) zeigt, dass beim Chlormequat 13 von 14 Laboratorien innerhalb des Bereiches $|z\text{-score}| \leq 2$ liegen und somit vergleichbare Ergebnisse berichtet haben:

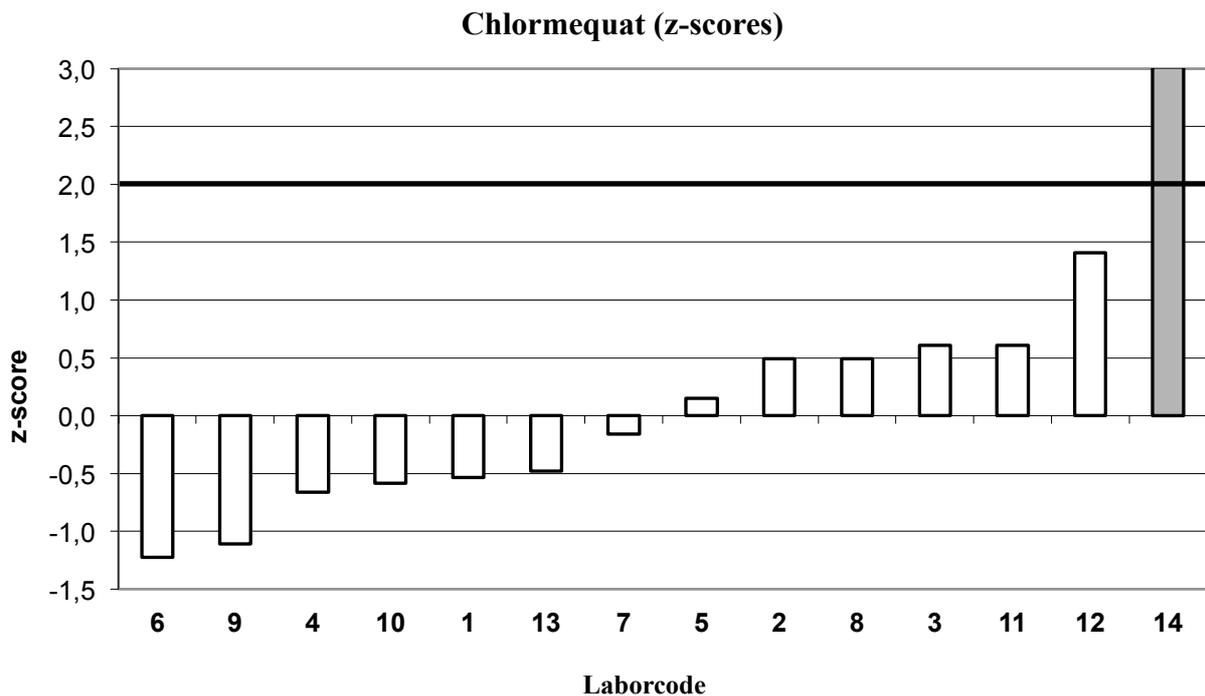


Abb. 67: Chlormequat – z-scores der Laborteilnehmer (Methodenringversuch)

Die Überprüfung des Kriteriums der Richtigkeit zeigt hier jedoch ein anderes Ergebnis. Sechs Labore berichten Gehalte, die das Dotierungsniveau zu über 125% ausschöpfen. Das Labor mit dem Code 14 schöpft das Dotierungsniveau sogar um 200% aus.

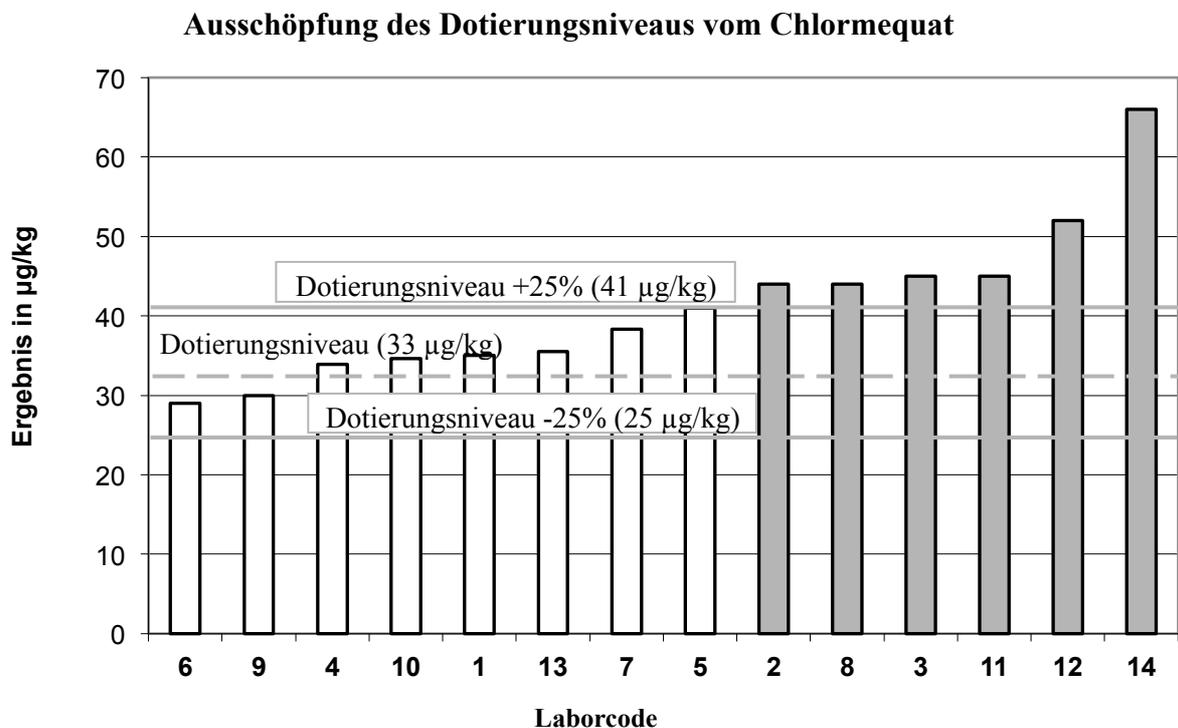


Abb. 68: Chlormequat – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Methodenringversuch)

Auch bei dem Wirkstoff Mepiquat zeigt sich zwar eine gute Vergleichbarkeit (nur 2 von 14 Laboren liegen ausserhalb eines $|z\text{-scores}| \leq 2$, siehe Abb. 69), wohingegen bei der Überprüfung auf die Richtigkeit insgesamt 50% der Labore das Dotierungsniveau um mehr als $\pm 25\%$ ausschöpfen (siehe Abb. 70). 5 Labore haben hierbei zu hohe Gehalte berichtet, und zwei Labore liegen deutlich unterhalb des Dotierungsniveaus:

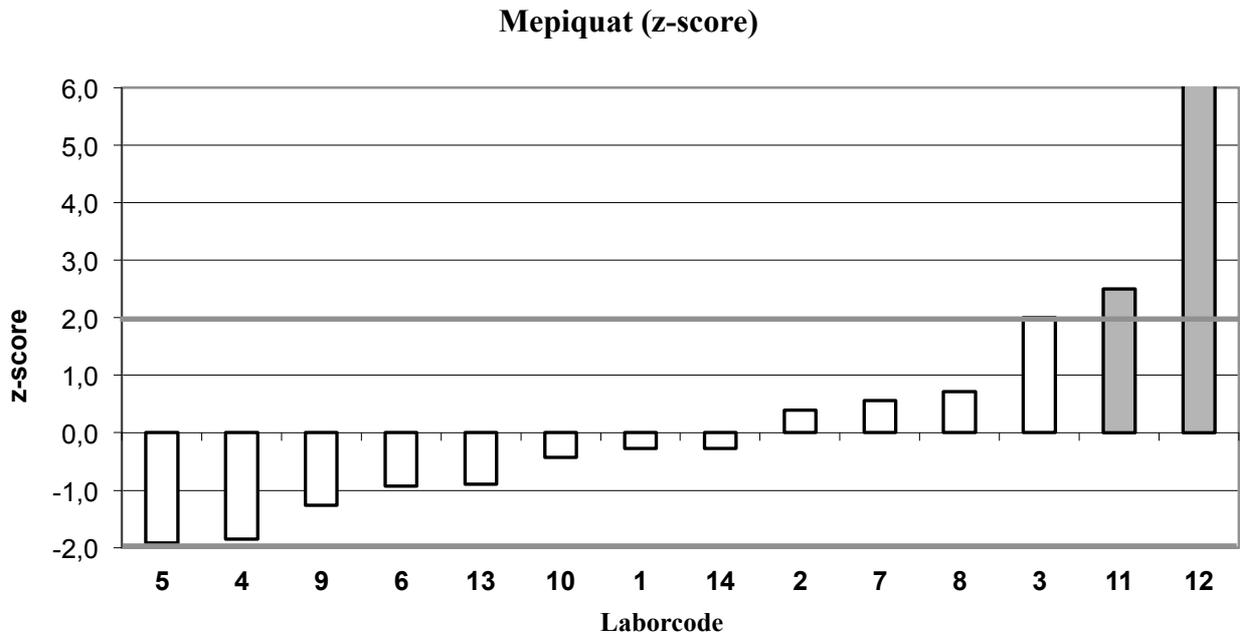


Abb. 69: Mepiquat – z-scores der Laborteilnehmer (Methodenringversuch)

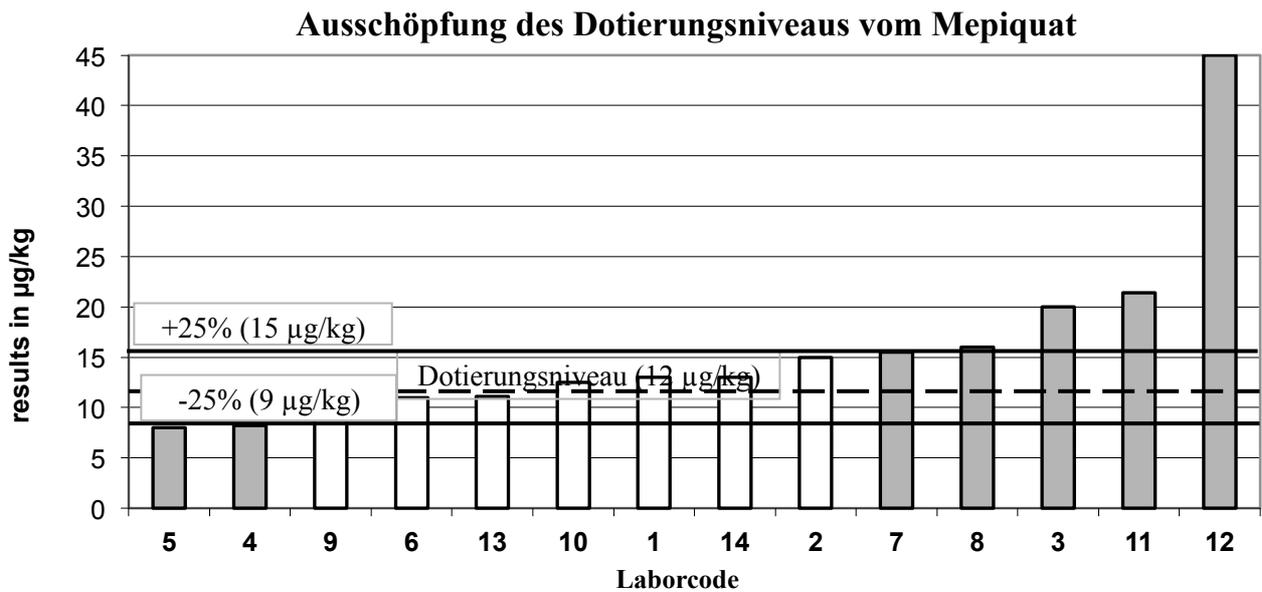


Abb. 70: Mepiquat – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Methodenringversuch)

Die statistische Auswertung zeigt, dass die Analytik von Chlormequat und Mepiquat hinsichtlich des Prüfkriteriums der Vergleichbarkeit zufriedenstellende Ergebnisse liefert. Maximal 2 von 14 Teilnehmern lagen ausserhalb eines $|z\text{-scores}| \leq 2$.

Das Labor 14 zeigt im Gegensatz zu den berichteten Ergebnissen beim Chlormequat deutlich bessere Ergebnisse für das Mepiquat. Die im Anschluss an den Methodenringversuch durchgeführte Ursachenrecherche ergab, dass der Referenzstandard für das Chlormequat offensichtlich einem Abbau unterlegen war, weil die Haltbarkeit der Standardsubstanz bei der Messung der Ringversuchsproben nicht mehr gegeben war.

Die Überprüfung der Ergebnisse auf Richtigkeit zeigte ein schlechteres Ergebnis: Während beim Chlormequat 6 Teilnehmer die Ausschöpfung des Dotierungsniveaus um $\pm 25\%$ überschritten, berichteten beim Mepiquat 50% der Teilnehmer (7 Labore) Werte ausserhalb dieser Grenzen. Hierbei lagen 2 Labore auch unterhalb der Grenze vom Dotierungsniveau minus 25%.

5.5.6 Zusammenfassung der Diskussion

Auch hier hat sich gezeigt, dass analytische Mängel erst durch das Prüfkriterium der Richtigkeit aufgedeckt werden, da die Ergebnisse der Vergleichbarkeit sowohl bei Chlormequat als auch beim Mepiquat zufriedenstellende Ergebnisse zeigten.

Obwohl bei allen angewendeten Methoden das LC-MS/MS-Modul zum Einsatz gekommen ist, zeigte sich insbesondere bei der Beurteilung der Richtigkeit der Ergebnisse, dass Optimierungsbedarf für den sicheren Umgang mit den Methoden existiert.

6 Schlußfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System zur optimierten Labokompetenz-Bewertung im Bereich der Pestizidanalytik in Obst- und Gemüseerzeugnissen entwickelt.

Etablierte Prüfsysteme zur Beurteilung der Laborkompetenzen wurden hierbei berücksichtigt, ebenso wie die analytischen Herausforderungen im Rahmen von Multimethoden, die aufgrund der individuellen chemisch-physikalischen Eigenschaften der Pestizide sowie der zahlreichen Wirkstoff-/ Substratkombinationen lediglich einen mehr oder weniger optimalen Kompromiss für die jeweilige analytische Fragestellung darstellen.

Ein Vergleich etablierter Multimethoden (QuEChERS-, BfR- und S 19-Methode) wurde an Testmaterial durchgeführt, welches extra hierfür designt, homogenisiert und auf Homogenität und Stabilität geprüft wurde. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Anforderungen an die Verfahrenskenngrößen der Präzision (Maß für die Wiederholbarkeit) sowie der Wiederfindungsraten (Maß für die Richtigkeit) je nach angewandeter Methode variieren. Der analytische Kompromiss erstreckt sich über alle Module einer Multimethode (Extraktion, Aufreinigung, Chromatographie, Detektion). Sowohl eine geringe Extraktionsausbeute zu Beginn der Analytik als auch eine geringe Ionisierungsausbeute im Detektor (bedingt durch Matrix-Störsubstanz) am Ende der Analyse führen zu nicht richtigen Ergebnissen. Je nach dem, welche Module im Rahmen der angewendeten Multimethode zum Einsatz kommen, werden unterschiedliche Ergebnisse bestimmt. Die Tatsache, dass alle drei Methoden als offizielle Analysenmethoden in Deutschland in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB für fettarme Lebensmittel aufgeführt sind, schützt somit nicht vor unterschiedlichen (ggf. falschen) Ergebnissen, zumal auch ein offizieller Charakter den analytischen Kompromiss nicht überwinden kann. Methodenringversuche zu Einzelwirkstoffbestimmungen (Ethephon, Chlormequat und Mepiquat) haben gezeigt, dass auch mit ganz unterschiedlichen Analyseverfahren richtige Ergebnisse erzielt werden können, da sich die Methoden auf eine analytische Fragestellung konzentrieren können und somit keine Kompromisse eingegangen werden müssen.

Es gibt Analyt-/Substrat-Kombinationen, die unabhängig von der angewendeten Multimethode nicht zu richtigen Ergebnissen führen. Die Kombination „Fenhexamid – Traube (rot)“ zeigte z.B. unabhängig von der angewendeten Multimethode nicht zufriedenstellende Analyseergeb-

nisse im Hinblick auf die Richtigkeit (schlechte Wiederfindungen), weil durch den analytischen Kompromiss nicht mit der notwendigen Sorgfalt auf die analytische Herausforderung der Kombination „Fenhexamid – Traube (rot)“ eingegangen werden kann. Dies wird jedoch erst unter Berücksichtigung der Verfahrenskenngröße der „Richtigkeit“ (bestimmt durch die Wiederfindung (%) des tatsächlich dotierten Wirkstoffgehaltes im Testmaterial) deutlich. Die durchgehend zufriedenstellenden Ergebnisse der Wiederholbarkeitsmessungen (Standardabweichung) machten deutlich, dass die Wirkstoffe wiederholbar nicht richtig bestimmt wurden. Sofern folglich ein Wirkstoff nicht richtig bestimmt wird, ist diese „schlechte“ Leistung immerhin wiederholbar und täuscht somit eine falsche Ergebnissicherheit vor.

Die Auswertung des Labortests mit „verdeckten“ Proben (Probe, die nicht als Testprobe sondern als Routineprobe aufgemacht ist) hat darüber hinaus bestätigt, dass analytische Defizite erst durch Berücksichtigung des Kompetenzkriteriums der „Richtigkeit“ aufgedeckt wurden. Bisher etablierte Kriterien zur Beurteilung der analytischen Kompetenz ziehen die „Vergleichbarkeit“ als Kompetenzkriterium heran, bei dem ein Labor zufriedenstellende Ergebnisse aufweist, wenn es vergleichbar mit dem Labordurchschnitt ist („assigned value“/Median). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Vergleichbarkeit wenig über die tatsächliche Laborkompetenz aussagt, weil die Leistung des Labordurchschnittes mit den darüber hinaus zulässigen Abweichungen ($+2 > z\text{-score} > -2$) eine „großzügige“ Beurteilung erlaubt, die nicht zwischen guter und schlechter analytischer Laborleistung unterscheiden kann. Wenn darüber hinaus berücksichtigt wird, dass bei herkömmlichen Laboreignungstests/Ringversuchen die Testproben vorab angekündigt werden und dem teilnehmenden Labor ein entspanntes Zeitfenster bis zur Abgabe der Analysenergebnisse zur Verfügung gestellt wird (i. d. R. mehrere Wochen), dann sagt die Beurteilung der analytischen Kompetenz aufgrund von Ringversuchsergebnissen wenig aus über die tatsächliche analytischen Kompetenz eines Labores in der Routineanalytik. Dies konnte durch den durchgeführten Labortest mit verdeckten Proben bestätigt werden. Nur 2 von insgesamt 19 Laboren waren in der Lage, richtige Ergebnisse unter Routinebedingungen zu erzielen. Positiv hervorzuheben ist allerdings die geringe Schwankung der berichteten Laborergebnisse. Die statistisch nach Horwitz zu erwartende sowie die tatsächlich ermittelte Vergleichsstandardabweichung lagen eng beieinander, obwohl der Labortest mit verdeckten Proben unter Routinebedingungen stattfand und somit deutlich größere

Schwankungen der Laborergebnisse zu erwarten gewesen wären, da Horwitz seine statistischen Kenngrößen aus Methodenringversuchen (unter „Nicht“- Routinebedingungen) abgeleitet hat.

Alle getesteten Labore sind nach der Norm ISO/IEC 17025 akkreditiert. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente haben jedoch gezeigt, dass die Akkreditierung der getesteten Labore kein Garant für richtige und valide Laborergebnisse ist.

Für bisher etablierte Systeme zur Beurteilung der analytischen Kompetenz von Laboren gelten die Norm ISO/IEC 17043 „Konformitätsbewertung – Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen“ sowie die statistischen Modelle für Auswertungen von Ringversuchen in der Norm ISO 13528. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente haben ebenfalls gezeigt, dass die Ergebnisse von Laboreignungstests kein Garant für richtige und valide Laborergebnisse sind.

Insofern besteht ein deutlicher Optimierungsbedarf:

- a) bei der Sicherstellung der analytischen Kompetenz sowie
- b) bei der Überprüfung der analytischen Kompetenz durch Laboreignungsprüfungen.

Bei der Sicherstellung der analytischen Kompetenz (a) kann der analytische Kompromiss der Multimethoden praktisch nicht mit 100%iger Sicherheit überwunden werden, aber die zur Anwendung kommenden Multimethoden können hinsichtlich der jeweiligen analytischen Fragestellungen (z.B. Analytik von Pestiziden in fettarmen Lebensmitteln) optimiert werden (bestmöglicher Kompromiss). Wenn die Schwächen der Methoden im jeweiligen Labor durch eine sorgfältige und umfassende Validierung identifiziert werden, sind in der Routineanalytik entsprechende Absicherungsverfahren möglich. Das setzt sowohl ein Kenntnis der vielfältigen Methodenschwächen sowie deren kontinuierliche Kommunikation im Labor voraus. Bei den Validierungen ist eine ganzheitliche Betrachtung aller Verfahrenskenngrößen von Relevanz (nicht nur die Wiederholbarkeit, sondern auch die Wiederfindung), da nur so sämtliche Schwächen erkannt werden können. Auch die Aufnahme von Wirkstoffen in den Analysenumfang darf nur nach vorheriger umfassender Validierung der relevanten Wirkstoff-/ Substrat-Kombinationen erfolgen. Kompetente Analytik mit Multimethoden setzt somit voraus, dass umfassende Erfahrungswerte gesammelt und diese in der Routine auch berücksichtigt werden. Entsprechend gilt natürlich auch für die Überprüfung der analytischen Kompetenz im Rahmen eines Akkreditierungsaudits: Das Audit muss von Personen durchgeführt werden, die

(mindestens) auf dem Gebiet der Multimethoden von Pestiziden entsprechend kompetent sind, um die analytische Kompetenz prüfen und bewerten zu können.

Bei der Überprüfung der analytischen Kompetenz durch Laboreignungsprüfungen (b) ist die Richtigkeit (Wiederfindung des dotierten Gehaltes des Testmaterials) der Ergebnisse deutlich stärker zu gewichten als bisher üblich. Ein vergleichbares – aber falsches – Ergebnis trägt wenig zur Aufdeckung analytischer Defizite bei und hat somit sowohl für das Labor selbst als auch für den Laborkunden keinen Wert. Die bisherige Orientierung der Laborleistung am Durchschnitt der Teilnehmer von Eignungstests sowie die weiten Grenzen für zufriedenstellende und somit nicht sanktionierte Ergebnisse der Teilnehmer geben auch wenig Anlass und Motivation, die analytische Kompetenz zu optimieren.

Der analytische Kompromiss von Multimethoden kann auf der einen Seite als Grund herangezogen werden, keine „Saktionierungsgrenzen“ bei Laboreignungstests zu setzen. Auf der anderen Seite ist davon auszugehen, dass die im Rahmen dieser Arbeit unter Berücksichtigung der Laborroutine aufgedeckten schlechten Ergebnisse des Labortests – der durch die Beurteilung mittels etablierter Auswertungssysteme nicht erkannt werden konnte, sondern der erst durch die Beurteilung der Richtigkeit der Ergebnisse offensichtlich wurde – keine Besserung erzielen werden, wenn eine schlechte analytische Leistung nicht sanktioniert wird. Insofern sind konkrete und greifbare Grenzen zu benennen, die zur Orientierung für die Bewertung analytischer Kompetenz heranzuziehen sind. Der aus dieser Arbeit entwickelte Ansatz berücksichtigt

- 1) als Referenz für die Beurteilung der analytischen Kompetenz die Richtigkeit der Ergebnisse und damit den tatsächlich dotierten Gehalt der Wirkstoffe im Testmaterial
- 2) die maximal erlaubte Streuung der Ergebnisse um diesen Referenzwert.

Im praktischen Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass am Beispiel von Pestizidrückstandsanalytik mit Multimethoden in fettarmen Lebensmitteln die modifizierte Vergleichsstandardabweichung $\hat{\sigma}$ nach Horwitz auch unter Routinebedingungen herangezogen werden kann. Ein angemessenes und leicht überprüfbares Beurteilungskriterium ist somit

Dotierter Gehalt im Testmaterial $\pm 25\%$

Literaturverzeichnis

- [1] Hill, A., Startin, J. R. und Fussell, R. (2004) Quality control for pesticide residues analysis. In Fernández-Alba, A. R. (Hrsg.) Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace determination of pesticide residues. 1. Auflage, S. 1-5, Almeria, Spain.
- [2] Stokowski, W. (2006) Die Nationale Berichterstattung Pflanzenschutzmittel- Rückstände - ein Indikator für die Einhaltung von Pflanzenschutzmittel-Rückstandshöchstgehalten in und auf Lebensmitteln. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, vol. 1, Nr. 2, 142-146.
- [3] Richtlinie 86/362/EWG des Rates vom 24. Juli 1986 über die Festsetzung von Höchstgehalten an Rückständen von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf und in Getreide (Amtsblatt L 221 vom 7.8.1986).
- [4] Richtlinie 90/642/ EWG des Rates vom 27. November 1990 über die Festsetzung von Höchstgehalten an Rückständen von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf und in bestimmten Erzeugnissen pflanzlichen Ursprungs, einschließlich Obst und Gemüse (Amtsblatt L 175 vom 04.07.1991).
- [5] Schulze-Althoff, G., Schulpin, C., Schmitz-Eiberger M. und Petersen B. (2007) Einführung von dynamischen Minimierungsansätzen für Rückstände in Frischeprodukten. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, vol. 2, Nr. 1, 20-33.
- [6] Hanf, J. H. und Wettstein, N. (2009) Bio-Handelsmarken als strategisches Instrument zur Positionierung und Imagebildung eines Lebensmittelhändlers – Chancen und Risiken. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Vol. 4, Nr. 1, 15-22.
- [7] Informationsdienst der Chemischen und Veterinäruntersuchungsämter (CVUA) Stuttgart, Karlsruhe, Freiburg und Sigmaringen sowie des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes (STUA) Aulendorf Diagnostikzentrum (2006) Rückstände des in der EU nicht zugelassenen Insektizides Isufenphos-methyl in Paprika, aus:
http://www.untersuchungsämter-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=5&ID=641&Pdf=No

- [8] Greenpeace e.V. Hamburg (2005) Pestizide aus dem Supermarkt, Einkaufsratgeber und Supermarktvergleich für Obst und Gemüse, aus: http://www.greenpeace.de/file-admin/gpd/user_upload/themen/umweltgifte/greenpeace_ratgeber_pestizide_supermarkt.pdf
- [9] Multimethode zur Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS nach Methanolextraktion und Aufreinigung an Diatomeenerde, L 00.00–113, Amtliche Analysenverfahren für Rückstände von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln in Lebensmitteln nach § 64 LFGB.
- [10] Multimethode zur Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln mittels GC-MS(/MS) oder LC-MS/MS nach Acetonitril-Extraktion/Verteilung und Aufreinigung mittels dispersiver SPE (QuEChERS), L 00.00–115, Amtliche Analysenverfahren für Rückstände von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln in Lebensmitteln nach § 64 LFGB.
- [11] SN EN ISO/IEC 17025 Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:1999).
- [12] Verordnung (EG) Nr. 765/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. Juli 2008 über die Vorschriften für die Akkreditierung und Marktüberwachung im Zusammenhang mit der Vermarktung von Produkten und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 339/93 des Rates (Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 218/30, 13.08.2008).
- [13] Albrecht, B., Luginbühl, W., Balsiger, C., Bögli, R., Buxtorf, U. P., Bühler, F., Emch, H., Roos, P., Jakob, A., Gremaud, G., Hübner, Ph., Schurter, M., Spack, L., Wenk, P. und Wolfensberger, M. (2004) Leitfaden zur Validierung chemischphysikalischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit. Mitt. Lebensm. Hyg. 95, 199-222.
- [14] DIN EN ISO 9000:2005 Qualitätsmanagementsysteme - Grundlagen und Begriffe.
- [15] Document No. SANCO / 10684 / 2009 Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, Supersedes Document No. SANCO / 3131 / 2007, Implemented by 01/01/2010.

- [16] FAPAS®, The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York, UK, YO41 1LZ Tel: (+44) 1904 462100 ~ Fax: (+44) 1904 462040, www.fapas.com
- [17] QS Fachgesellschaft Obst-Gemüse-Kartoffeln GmbH, Bonn, Rückstandsmonitoring – Obst, Gemüse und Kartoffeln (2010) Kriterien für die QS-Anerkennung (Laboreignungstests), aus: http://www.q-s.de/fileadmin/QS_Fileadmin/downloads_v2/produktbereich_obst_gemuese_und_kartoffeln/erzeugung/rueckstandsmonitoring_obst_gemuese_und_kartoffeln/leitfaden_rueckstandsmonitoring_obst_gemuese_und_kartoffeln/lf_rm_ogk_d_frei_100101.pdf
- [18] Thompson, M., Ellison, S.L.R. and Wood, R. (2006) The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. *Pure Appl. Chem.*, 78, No. 1, 145-196.
- [19] Thompson, M. (2000) Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, 125, 385-386.
- [20] Hemmerling, C., Augustyniak, B., Maye, A., Seidl, G. und Warschewske, G. (2009) Multirückstandsmethoden zur Pestizidanalytik in der Lebensmittelkontrolle – Möglichkeiten und Grenzen – Teil 1: Methodenvergleich. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, Heft 4., Apr. 2009, 245-252.
- [21] Hemmerling, C., Augustyniak, B., Maye, A., Seidl, G. und Warschewske, G. (2009) Multirückstandsmethoden zur Pestizidanalytik in der Lebensmittelkontrolle – Möglichkeiten und Grenzen – Teil 2: Methodenvergleich an Proben mit „gewachsenen Rückständen“. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, Heft 7., Jul. 2009, 435-443.
- [22] Hemmerling, C., Augustyniak, B., Maye, A., Seidl, G. und Warschewske, G. (2009) Multirückstandsmethoden zur Pestizidanalytik in der Lebensmittelkontrolle – Möglichkeiten und Grenzen – Teil 3: Variation der Methode des BfR zur universellen Anwendung für die Rückstandsbestimmung mit dem GC-MS-TOF und LC-MS-MS. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, Heft 10., Okt. 2009, 633-644.

- [23] Richtlinie 2003/13/EG der Kommission vom 10. Februar 2003 zur Änderung der Richtlinie 96/5/EG über Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder (Amtsblatt der Europäischen Union L 41 vom 14.2.2003).
- [24] Richtlinie 2003/14/EG der Kommission vom 10. Februar 2003 zur Änderung der Richtlinie 91/321/EWG über Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung (Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 41 vom 14.2.2003).
- [25] Koerber, K. von und Kretschmer, J. (2000) Zukunftsfähige Ernährung - Gesundheits-, Umwelt-, Wirtschafts- und Sozialverträglichkeit im Lebensmittelbereich. Zeitschrift für Ernährungsökologie, 1 (1), S. 39-46.
- [26] Schinner, F. und Sonnleitner, R. (1997) Bodenökologie - Mikrobiologie und Bodenenzymatik Bd. III: Pflanzenschutzmittel, Agrarhilfsstoffe und organische Umweltchemikalien. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [27] Akkan Z., Flaig H. und Ballschmiter K. (2003) Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmittel in der Umwelt. Emissionen, Immissionen und ihre human- und ökotoxikologische Bewertung. Erich Schmidt Verlag, Berlin.
- [28] Kempter, G. und Jumar, A. (1991) Chemie - organischer Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. 4. Aufl., Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.
- [29] Perry, A. S., Yamamoto, I., Ishaaya, I. und Perry, R. Y. (1998) Insecticides in Agriculture and Environment - Retrospects and Prospects. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [30] Nolte, R. F. und Joas, R. (1992) Handbuch Chlorchemie I – Gesamtstofffluss und Bilanz. Umweltbundesamt (Hrsg.) Texte, Berlin.
- [31] Stoltzenberg, D. (1998) Fritz Haber : Chemiker, Nobelpreisträger, Deutscher, Jude ; eine Biographie. Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto.

- [32] Hassall, W. und Kenneth, A. (1990) The biochemistry and uses of pesticides - structure, metabolism, mode of action and uses in crop Protection. 2. Aufl., VCH Verlag, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- [33] Börner, H. (1997) Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 7. Neubearb. Aufl., Ulmer-Verlag, Stuttgart.
- [34] Schmidt, G.H. (1986) Pestizide und Umweltschutz. Vieweg Verlagsgesellschaft, Braunschweig.
- [35] Kempter, G. und Jumar, A. (1991) Chemie - organischer Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. 4. Aufl., Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.
- [36] Hommen U., Schäfers Ch., Roß-Nickoll M. und Ratte T. (2004): Auswertung der wichtigsten in Deutschland durchgeführten Monitoringstudien zu Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Nichtzielorganismen. Endbericht, aus http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_492018/DE/04_Pflanzenschutzmittel/00_doks_downloads/studie_psm_wirk_nicht_ziel_org.templateId=raw,property=publicationFile.pdf/studie_psm_wirk_nicht_ziel_org.pdf
- [37] LEBER, G. (1983) Historische Entwicklung, Herstellung und Anwendung von HCH und Lindan. Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg.): Hexachlorcyclohexan als Schadstoff in Lebensmitteln. Forschungsbericht, Materialien aus zwei Kolloquien der Senatskommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln am 28./29. November 1979 und am 6. März 1980. Verlag Chemie, Weinheim.
- [38] Absatz an Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland Ergebnisse der Meldungen gemäß § 19 Pflanzenschutzgesetz für das Jahr 2009, aus: http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/meld_par_19_2009.pdf?__blob=publicationFile&v=2
- [39] Zimmermann, O. (2004) Die Anwendung von Nützlingen im biologischen Pflanzenschutz in Deutschland. Gesunde Pflanzen, Volume 56, Nummer 6, 151 – 156.
- [40] Gorges, T. (2006) Ökologischer Landbau - Pro und Contra Bio. Seminararbeit im Fachbereich VI Geographie / Geowissenschaften, Universität Trier.

- [41] Grashoff, K. (2007) Prävention durch bunte Vielfalt Ernährung. Wissenschaft und Praxis, Volume 1, Nummer 9, November 2007, 414 – 416.
- [42] 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 (ABl. L 309 vom 24.11.2009, S. 1).
- [43] Richtlinie 91/414/EWG des Rates vom 15. Juli 1991 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln (Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 230 vom 19.08.1991).
- [44] Verordnung (EG) Nr. 396/2005 des europäischen Parlaments und des 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 (Amtsblatt der Europäischen Union L 70 vom 16.3.2005).
- [45] Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (2007) Pestizidreport, aus: <http://www.umwelt.nrw.de/verbraucherschutz/lebensmittel/pestizidreport/index.php>
- [46] Pflanzenschutzgesetz vom 14.5.98 (BGBl. I. S. 950), zuletzt geändert durch: Art. 2 § 3 des Gesetzes zur Neuordnung des Lebensmittel- und des Futtermittelrechts vom 1. 9. 2005 (BGBl. I S. 2618).
- [47] Allen, B. C., Kavlock, R. J., Kimmel C. A. und Faustman, E. M. (1994) Dose - Response Assessment for Developmental Toxicity- II. Comparison of Generic Benchmark Dose Estimates with No Observed Adverse Effect Levels. Toxicological Sciences, Volume 23, Nummer 4, 487-495.
- [48] Banasiak U., Heseke H., Sieke C., Sommerfeld C. und Vohmann C. (2005) Abschätzung der Aufnahme von Pflanzenschutzmittel-Rückständen in der Nahrung mit neuen Verzehrsmengen für Kinder. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz Nr. 48, 84-98.
- [49] Kreiselmaier, J. (2008) Pflanzenschutzmittelrückstände minimieren - Grenzen und Möglichkeiten. Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) – Rheinpfalz, Neustadt/Wstr., aus http://www.llh-hessen.de/gartenbau/erwerbsgartenbau/gemuesebau/fachveranstaltungen/2008/ldw_woche_suedhessen/kreiselmaier.pdf

- [50] Smolka S. (2009) Das neue EU-Pestizidrecht: Chance und Herausforderung für eine Minimierung von Pestizidrisiken in der konventionellen Landwirtschaft. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, Volume 21, Number 6, 490-49.
- [51] Pflanzenschutzmittelgesetz 1997: Bundesgesetz über den Verkehr mit Pflanzenschutzmitteln (PflSchG), BGBl. I Nr. 60/1997.
- [52] DIN EN 12393-1, Pflanzliche Lebensmittel - Multiverfahren zur gaschromatographischen Bestimmung von Pestizidrückständen - Teil 1: Allgemeines; Deutsche Fassung EN 12393-1:2008.
- [53] DIN EN 12393-2 Pflanzliche Lebensmittel - Multiverfahren zur gaschromatographischen Bestimmung von Pestizidrückständen - Teil 2: Verfahren zur Extraktion und Reinigung; Deutsche Fassung EN 12393-2:2008.
- [54] DIN EN 12393-3 Pflanzliche Lebensmittel - Multiverfahren zur gaschromatographischen Bestimmung von Pestizidrückständen - Teil 3: Verfahren zur Bestimmung und Absicherung; Deutsche Fassung EN 12393-3:2008.
- [55] Specht, W. und Tillkes, M. (1985): Gas-chromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach Clean-up über Gel- Chromatographie und Mini-Kieselgel-Säulen-Chromatographie, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 322: 443-455.
- [56] Specht, W., Pelz, S. und Gilsbach, W. (1995): Gas-chromatographic determination of pesticide residues after clean-up by gel-permeation chromatography and mini-silica gel-column chromatography, 6. Communication: replacement of dichloromethane by ethyl acetate/cyclohexane in liquid-liquid partition and simplified conditions for extraction and liquid-liquid partition, *Fresenius J. Anal. Chem.* 353: 183-190.
- [57] Untersuchung von Lebensmitteln - Modulare Multimethode zur Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen in Lebensmitteln (Erweiterte Neufassung der DFG-Methode S 19) L 00.00-34, Amtliche Analysenverfahren für Rückstände von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln in Lebensmitteln nach § 64 LFGB.
- [58] Schweizerisches Lebensmittelbuch, Probenahmeverfahren zur Kontrolle von Pestizidrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln, SLMB-Methode (2008).

- [59] Fernández, M., Picó, Y. und, Mañes, J. (2000) Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 871: 43-56.
- [60] Lehotay, S.J. (1997) Supercritical fluid extraction of pesticides in foods, *J. Chromatogr. A* 785: 289-312.
- [61] Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Pérez, R.A. und Fernández, M. D. (2000): Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables, *J. Chromatogr. A* 882: 175-191.
- [62] *Scherz, H. und Senser, F. (2000) Souci Fachmann Kraut: Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen, Medpharm, 6. Aufl. Stuttgart, 1182 S.*
- [63] Stan, H.-J. (2000): Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection, State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation, *J. Chromatogr. A* 892: 347-377.
- [64] Koinecke, A., Kreuzig, R., Bahadir, M., Siebers, J. und Nolting, H.G. (1994): Investigations on the substitution of dichloromethane in pesticide residue analysis of plant materials, *Fresenius J. Anal. Chem.* 349: 301-305.
- [65] Thier, H.-P. und Frehse, H. (1986) *Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln*, Stuttgart; New York: Thieme.
- [66] Kromidas, S. (2000) *Handbuch Validierung in der Analytik*, Verlag Wiley-VCH, Weinheim.
- [67] Hogendoorn, E. und van Zoonen, P. (2000) Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. *J. Chromatogr. A* 892: 435-453.
- [68] Van der Hoff G.R. und van Zoonen R. (1999) Trace Analysis of Pesticides by Gas Chromatography, *J. Chromatogr. A* 843 S. 301.
- [69] Torres, C.M., Picó, Y. und Mañes, J.(1996): Determination of pesticide residues in fruit and vegetables, *J. Chromatogr. A* 754: 301-331.

- [70] Motohashi, N., Nagashima, H., Párkány, C., Subrahmanyam, B. und Zhang, G.-W. (1996): Official multiresidue methods of pesticide analysis in vegetables, fruits and soil, *J. Chromatogr. A* 754: 333-346.
- [71] Thier, H.-P. und Frehse, H. (1986) *Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln*, Stuttgart; New York: Thieme.
- [72] Mukherjee, I. und Gopal, M. (1996) Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residues, *J. Chromatogr. A* 754: 33-42 83.
- [73] Yang, S. S., Goldsmith, A. I. und Smetena, I. (1996) Recent advances in the residue analysis of N-methylcarbamate pesticides, *J. Chromatogr. A* 754: 3-16.
- [74] Skoog, D. A. und Leary, J.J. (1996) *Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen*, Springer, Heidelberg.
- [75] Böcker, J. (1997) *Chromatographie*, 1. Auflage, Vogelbuchverlag, Würzburg.
- [76] Schwedt, G. (1994) *Chromatographische Trennmethoden, Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen*, 3. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- [77] Böcker J. (1997) *Chromatographie: Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese*, Vogel Buchverlag, Würzburg (1997) S. 106-107.
- [78] Jandera, P und Churacek, K. (1985) *Gradient Elution in column liquid chromatography*, Elsevier, Amsterdam.
- [79] Naumer, H. und Heller, W. (Hrsg) (2002) *Untersuchungsmethoden in der Chemie*, Weinheim: WILEY-VCH, 3.Auflage.
- [80] Zrostlíková, J., Hajšlová, J., Kovalczuk, T., Štěpán, R., Poustka, J. (2003) Determination of seventeen polar/thermolabile pesticides in apples and apricots by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 86(3): 612-622.
- [81] Taylor, M.J., Hunter, K., Hunter, K.B., Lindsay, D., Le Bouhellec, S. (2002) Multiresidue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 982: 225-236.

- [82] Yoshioka, N., Akiyama, Y., Teranishi, K. (2004) Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionisation, *J. Chromatogr. A* 1022: 145-150.
- [83] Alder, L., Greulich, K., Kempe, G. and Vieth, K. (2006) Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS?, *Mass Spectrometry Reviews*, Volume 25 Issue 6, pp 838 – 865.
- [84] Blasco, C., Picó, Y., Mañes, J., Font, G. (2002) : Determination of fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 947: 227-235.
- [85] Banerjee, K., Oulkar, D. P., Dasgupta, S., Patil, S. B., Patil, S. H., Savant, R. und Adsule, P. G. (2007) Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 1173, Issues 1-2, pp 98-109.
- [86] Klein, J. und Alder, L. (2003): Applicability of gradient liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the simultaneous screening for about 100 pesticides in crops, *J. AOAC Int.* 86 (5): 1015-1037.
- [87] Sagratini, G., Mañes, J., Giardiná, D., Damiani, P. und Picó, Y. (2007) **Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry**, *Journal of Chromatography A*, Volume 1147, Issue 2, pp 135-143.
- [88] Ji, F., Zhao, L., Yan W., Fen, Q. und Lin, J-M. (2008) Determination of triazine herbicides in fruits and vegetables using dispersive solid-phase extraction coupled with LC-MS, *Journal of High Resolution Chromatography*, Volume 31 Issue 6-7, pp 961 – 968.
- [89] Community Reference Laboratory of Single Residue Methods, CVUA Stuttgart: Quick Method for the LC-MS/MS Analysis of Highly Polar Pesticides in Food of Plant Origin involving a Common Extraction Step with Methanol, Version V1 (2009).

- [90] Grey, L., Nguyen, P. and Yang, P. (2002) Liquid chromatography-electrospray ionization isotopic dilution mass spectrometry analysis of paraquat and diquat using conventional and multilayer solid-phase extraction cartridges, *J. Chromatography A*, 958, pp. 25-33.
- [91] Stan H.-J. Pesticides in: Gordon, M. H., *Principles and Applications of Gas Chromatography in Food Analysis*, Hrsg.: Ellis Horwood, New York (1990) S. 261-325.
- [92] Gordon M. H. (1990) *Principles of Gas Chromatography* in: Gordon, M. H., *Principles and Applications of Gas Chromatography in Food Analysis*, Hrsg.: Ellis Horwood, New York (1990) S. 11-58.
- [93] Dressler M. (1986) Selective Gas Chromatographic Detectors, *Journal of Chromatography* 36, S. 15-90.
- [94] Otto, M. (2006) *Analytische Chemie*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- [95] Dominik, A. und Steinhilber, D. (2002) *Instrumentelle Analytik*, Deutscher Apotheker Verlag, 2. überarbeitete und aktualisierte Auflage.
- [96] Gross, J. H. (2004) *Mass Spectrometry, A Textbook*, Springer, Heidelberg, 2004.
- [97] Niessen, W.M.A. (1998) Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques, *J. Chromatography A* 794: 407-435.
- [98] Hesse, M., Meier, H. und Zeeh, B. (2005) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.
- [99] Budzikiewicz, H. und Schäfer, M. (2005) *Massenspektrometrie. Eine Einführung*, Wiley-VCH, Weinheim, 5. Auflage.
- [100] DeHoffmann E. und Stroobant, V. (2007) *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, 3. Auflage.
- [101] McLafferty, F. W. und Turecek F. (1995) *Interpretation von Massenspektren*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [102] Hajšlová, J., Zrostlíková, J. (2003): Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices, *Review, J. Chromatogr. A* 1000: 181-197.

- [103] Ferrer, I., García-Reyes, J. F., Mezcua, M., Thurman E. M. und Fernández-Alba, A. R. (2005) Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 1082, Issue 1, pp 81-90.
- [104] Anastassiades, M., Maštovská, K. und Lehotay, S.J. (2003) Evaluation of Analyte Protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides, *Journal of Chromatography A*, Volume 1015 pp. 163-184.
- [105] Cajka, T., Mastovska, K., Lehotay, S.J. and Hajslova, J. (2005) Use of automated direct sample introduction with analyte protectants in the GC-MS analysis of pesticide residues, *Journal of separation science*, Volume 28, Issue 9-10, pp. 1048-1060.
- [106] Mastovska, K., Lehotay, S.J. und Anastassiades, M. (2005) Study of a combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrices, *Analytical Chemistry* 77 (24), pp. 8129-8137.
- [107] Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH, Berlin – Was ist Akkreditierung?, aus: http://www.dakks.de/was_ist_akkreditierung
- [108] Kromidas, S. (2000) *Handbuch Validierungen in der Analytik*, Verlag Wiley-VCH, Weinheim.
- [109] EURACHEM Guide (1998) *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, First English Edition 1.0, Teddington, Middlesex, United Kingdom.
- [110] Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH, Berlin – Anforderungen an Laboratorien hinsichtlich der Akkreditierung einer Wirkstoff-Multimethode in der Pestizidanalytik, aus: http://www.dakks.de/doc_pl-umwelt
- [111] DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (1994) *Internationales Wörterbuch der Metrologie*, 2. Auflage, Beuth Verlag GmbH, Berlin-Wien-Zürich.
- [112] Hernla, M. (1996) Messunsicherheit und Fähigkeit. *Qualität und Zuverlässigkeit*, München, 41, 10, pp. 1156-1162.

- [113] ISO/IEC Guide 98-3:2008, Uncertainty of measurement – Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995).
- [114] EURACHEM / CITAC Guide CG 4 (2000) Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd edition.
- [115] Alder, L., Korth, W., Patey, A. L., van der Schee, H.A. und Schoeneweiss, S. (2001) Estimation of measurement uncertainty in pesticide residue analysis. J AOAC Int. Vol. 84, No. 5, pp. 1569-78.
- [116] Anastassiades, M., Schwack, W. und Scherbaum, E. (1998) Analysis of Several N-Methyl-O-Aryl-Carbamates in Fruits and Vegetables after Supercritical Fluid Extraction. Poster at 2nd European Pesticide Residue Workshop in Almería/Spainien.
- [117] Horwitz, W. & Albert, R. (1997) The concept of uncertainty as applied to chemical measurements. Analyst 122: 615-617.
- [118] EA-4/02 (1996) Expression of the Uncertainty of Measurement in Calibration requirements document, European cooperation for Accreditation of Laboratories (Utrecht, The Netherlands).
- [119] DKD-3 (1997) Angabe der Messunsicherheit bei Kalibrierungen Deutsche Fassung der Publikation EA-4/02, Herausgegeben von der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt, Braunschweig, Verlag für neue Wissenschaft, Bremerhaven 1998.
- [120] Kunze, Udo R. (1995) Grundlagen der quantitativen Analyse. 3. neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [121] Horwitz, W. (1982) Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. Anal. Chem., 1982, 54 (1), pp 67A–76A.
- [122] Thompson, M. (2000) Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. Analyst, Vol. 125, pp. 385-386.
- [123] International Organization for Standardization. ISO Guide 43: Proficiency testing by interlaboratory comparisons - Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes, Geneva, Switzerland (1994).

- [124] General criteria for the operation of various types of bodies performing inspection (ISO/IEC 17020:1998); German and English version EN ISO/IEC 17020:2004.
- [125] International Laboratory Accreditation Cooperation. ILAC Guide 13:2007: Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing (comprising ISO/IEC Guide 43-1:1997 as well as relevant elements of ISO/IEC 17025:2005 applicable to characterisation, homogeneity and stability testing of proficiency testing materials and relevant elements of ISO-9000:2005 relating to quality systems).
- [126] International Organization for Standardization. ISO/IEC 17043 Conformity assessment – General requirements for proficiency testing (ISO/IEC 17043:2010). English version EN ISO/IEC 17043:2010.
- [127] International Organization for Standardization. ISO 13528: Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparisons. English version ISO 13528:2005.
- [128] Analytical Methods Committee (1989) Robust statistics - how not to reject outliers: Part 1 Basic concepts. Analyst 114, 1693.
- [129] P.J. Huber, P.J. (1981) Robust statistics. Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics. John Wiley & Sons, New York etc., 1981.
- [130] Lippold, U. und Lippold R. (2010) Pestizide in fettarmen Lebensmitteln, Untersuchung einer „Paprika“ auf 175 mögliche Pestizide. LVU Gbr, Durchführung von Laborvergleichsuntersuchungen, 79336 Herbolzheim, aus: <http://www.lvus.de>
- [131] Thompson, M. (2002) Bump-hunting for the proficiency tester: Searching for multimodality. Analyst 127,1359–1364.
- [132] European Union Proficiency Test for pesticides in Fruits and Vegetables doe Screening methods 02 (EUPT-FV-SM-02) 2010, Specific Protocol, aus: http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/fv/FV-SM02_SpecificProtocol.pdf
- [133] LGC Standards, QFCS – Quality in Food Chemistry Scheme, Round 170: Pesticides in tomatoe puree. Issued 30th July 2010.

- [134] J.-L. Multon (1996) Quality Control for Foods and Agricultural products. Wiley-VCH, New York, Toronto, 1. Auflage.
- [135] The e-Pesticide Manual Version 4.0; 2006 BCPC (British Crop Production Council)
- [136] Cochran, W.G. (1947) The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Annals of Eugenics* 11, pp. 47-61.
- [137] Hartung, J., Elpelt, B. und Klösener, K-H. (1999) Statistik. 12. Auflage, Oldenburg, pp. 156 ff.
- [138] Kromidas, S. (1999): Validierung in der Analytik. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto. Wiley-VCH.

Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
Abb. 1:	Problemstellung und Zielsetzung	11
Abb. 2:	Marktanteile der verschiedenen Pestizidgruppen in der Bundesrepublik Deutschland: Inlandsabgabe an Wirkstoffen im Jahr 2009 [38].	15
Abb. 3:	Zusammenhänge zwischen NOAEL, ADI sowie ARfD	18
Abb. 4:	Berechnungsmodell zur ARfD-Wert Ausschöpfung	19
Abb. 5:	Überwachung von QS-Produkten durch QS-anerkannte Labore	22
Abb. 6:	Ablaufschema der Multimethode DFG S 19 [57]	27
Abb. 7:	Theorie der Böden	32
Abb. 8:	Van-Deemter-Diagramm	33
Abb. 9:	Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers [96]	38
Abb. 10:	Aufbau einer ESI-Ionenquelle [100]	40
Abb. 11:	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation [98, 99]	41
Abb. 12:	Ablenkung der Ionen mit bestimmten m/z-Werten im Quadrupol-Massenspektrometer	42
Abb. 13:	Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie [100]	43
Abb. 14:	Ionentrennung in einem Flugzeit-Massenspektrometer [98]	43
Abb. 15:	Elutionsbereich von Pirimicarb in der Matrix Süßkirsche [21]	46
Abb. 16:	Elutionsbereich von Cyprodinil in der Matrix Johannisbeere [21]	46
Abb. 17:	Retentionszeitverschiebungen von 20 µg/kg Mepanipyrim in Gurke [21]	47
Abb. 18:	Ablaufschema der Multimethode L 00.00-115 (QuEChERS, [10])	50
Abb. 19:	Ablaufschema der Multimethode L 00.00–113 (BfR-Methode [9])	53
Abb 20:	Normalverteilung: Mittelwert μ sowie Standardabweichung σ	57
Abb. 21:	Einflüsse auf die Abweichungen bei der Ermittlung von Messergebnissen [112]	59
Abb. 22:	Bestimmung der Messunsicherheit [113, 114]	60
Abb. 23:	Verhältnis Variationskoeffizient zu Analyt-Konzentration (Horwitz-Trompete)	62
Abb. 24:	Vertrauensbereich bei vorausgesetzter normalverteilter Grundgesamtheit	63

Nummer	Titel	Seite
Abb. 25:	Verhältnis der Vergleichsstandardabweichung $\hat{\sigma}_H$ zur erweiterten Messunsicherheit	64
Abb. 26:	Die Datenpunkte (hier Punkte auf der X-Achse) werden als Kerne der um sie gelegten Normalverteilungen dargestellt	73
Abb. 27:	Verhältnis der Vergleichsstandardabweichung $\hat{\sigma}_H$ zur erweiterten Messunsicherheit: Ein Labor, welches 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ berichtet, ist mit dem Referenzwert von 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (assigned value) noch genauso vergleichbar, wie ein Labor welches 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ misst. Beide Labore berichten unter Anwendung der erweiterten Messunsicherheit von 50% bezogen auf den assigned value (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) gerade noch vergleichbare Ergebnisse.	76
Abb. 28:	Laboreignungstest der LVU Frühjahr 2009: Pymetrozin in Tomaten. Bei einem Dotierungsniveau von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Pymetrozin zum Testmaterial konnten Labore (hier: Labor 28 und 17), die Gehalte nahe des Dotierungsniveaus berichten, nicht zufriedenstellende z-scores erzielen, da sie zu stark vom Labordurchschnitt (Median: 0,031 $\mu\text{g}/\text{kg}$) abwichen.	79
Abb. 29:	Verwendete Methoden je nach Zielsetzung	84
Abb. 30:	Ausgestrichenes Traubenhomogenat auf Millimeterpapier (Prüfung der Partikelgröße)	85
Abb. 31:	Testmaterialien aus dotiertem Bio-Traubenhomogenat, aufgemacht als Gegenprobe	87
Abb. 32:	Klassifizierung von Ausreißern bei der Homogenitätsprüfung [136, 137]	92
Abb. 33:	Differenzen zwischen Analysenpaar-Messwerten bei Fludioxinil	104
Abb. 34:	Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul) nach Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31)	110
Abb. 35:	Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul) - Standardaddition von Deltamethrin mit gespikten Probenextrakten	111
Abb. 36:	Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Wiederhol- und Laborpräzision (nicht korrigiert mit internem Standard)	113

Nummer	Titel	Seite
Abb. 37:	Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Wiederfindungen (%) unter Labor- und Wiederholbedingungen (nicht korrigiert mit internem Standard)	114
Abb. 38:	Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul) – Standardaddition von Boscalid mit dotiertem Probenmaterial	117
Abb. 39:	Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul) - Vergleich der Variationskoeffizienten unter Wiederhol- und Laborbedingungen gegen Matrix	119
Abb. 40:	Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul) - Vergleich der Wiederfindungen unter Wiederhol- und Laborbedingungen gegen Matrix	120
Abb. 41:	Messung gegen Matrix-Standard (BfR-Methode GC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Variationskoeffizienten mit und ohne Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31)	123
Abb. 42:	Messung gegen Matrix-Standard (DFG S 19 Methode GC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Variationskoeffizienten mit und ohne Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31)	127
Abb. 43:	Messung gegen Matrix-Standard (DFG S 19 Methode GC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Variationskoeffizienten mit und ohne Korrektur mit einem internen Standard (PCB-31)	128
Abb. 44:	Acetamidrid – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)	144
Abb. 45:	Acetamidrid – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)	144
Abb. 46:	Bifenthrin – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)	145
Abb. 47:	Bifenthrin – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)	146
Abb. 48:	Boscalid – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)	147
Abb. 49:	Boscalid – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)	147
Abb. 50:	Cyhalothrin-lambda – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)	148

Nummer	Titel	Seite
Abb. 51:	Cyhalothrin-lambda – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)	149
Abb. 52:	Cyprodinil – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)	150
Abb. 53:	Cyprodinil – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)	150
Abb. 54:	Deltamethrin – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)	151
Abb. 55:	Deltamethrin – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)	152
Abb. 56:	Fenhexamid – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)	153
Abb. 57:	Fenhexamid – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)	153
Abb. 58:	Fludioxinil – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)	154
Abb. 59:	Fludioxinil – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)	155
Abb. 60:	Iprodion – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)	156
Abb. 61:	Iprodion – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)	156
Abb. 62:	Pyrimethanil – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Labortest)	157
Abb. 63:	Pyrimethanil – z-scores der Laborteilnehmer (Labortest)	158
Abb. 64:	Chemisch-physikalische Eigenschaften von Ethephon [135]	169
Abb. 65:	Ethephon – z-scores der Laborteilnehmer (Methodenvergleich)	172
Abb. 66:	Ethephon – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Methodenvergleich)	172
Abb. 67:	Chlormequat – z-scores der Laborteilnehmer (Methodenringversuch)	175
Abb. 68:	Chlormequat – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Methodenringversuch)	175
Abb. 69:	Mepiquat – z-scores der Laborteilnehmer (Methodenringversuch)	176
Abb. 70:	Mepiquat – Ausschöpfung des dotierten Gehaltes im Testmaterial (Methodenringversuch)	176

Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
Tabelle 1:	Unterscheide zwischen Multi-, Gruppen- und Einzelmethoden (beispielhaft)	12
Tabelle 2:	Pestizidgruppen nach Verwendungszweck.	13
Tabelle 3:	Spezifikationen des LEH in der Übersicht [49]	21
Tabelle 4:	Biphenyl-haltige Pflanzenschutzmittelformulierung SCORE für frische Kräuter	23
Tabelle 5:	Einfluss der Matrix auf die Peakverstärkung (Hemmerling et al. [20])	45
Tabelle 6:	Anforderungen an die Validierung / Verifizierung (Auszug) [110]	66
Tabelle 7:	Vergleich zwischen der Horwitz-Gleichung und dem modifizierten Modell [122]	69
Tabelle 8:	Designs von Laboreignungstests für fettarme Lebensmittel (Obst/Gemüse)	77
Tabelle 9:	Design des Testmaterials (Trauben-Homogenat-Proben)	83
Tabelle 10:	Stammlösungen für die Erstellung des Mischstandards	83
Tabelle 11:	Mischstandard für die Dotierungen	83
Tabelle 12:	Wirkstoffe und daraus hergestellte Stammlösungen	86
Tabelle 13:	Herstellung der Dotierungslösung und daraus resultierende Sollgehalte (bezogen auf 8,0kg Testmaterial)	86
Tabelle 14:	GC-MS-Betriebsbedingungen	88
Tabelle 15:	LC-MS/MS-Betriebsbedingungen	89
Tabelle 16:	GC-Betriebsbedingungen	96
Tabelle 17:	LC-Betriebsbedingungen	97
Tabelle 18:	Ergebnisse des Homogenitätstest	103
Tabelle 19:	Ergebnisse des Cochran-Tests sowie der einfaktoriellen Varianzanalyse	104
Tabelle 20:	Ergebnisse des Stabilitätstests	105
Tabelle 21:	Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul)	108

Nummer	Titel	Seite
Tabelle 22:	Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS GC-MS/MS-Modul) – Standardaddition an gespikten Extrakten und dotierten Proben im Vergleich	111
Tabelle 23:	Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul)	115
Tabelle 24:	Messung gegen Lösungsmittelstandard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul)	116
Tabelle 25:	Messung gegen Matrix-Standard (QuEChERS LC-MS/MS-Modul) – Vergleich der Standardaddition von dotiertem <u>Probenmaterial</u> und gespikten <u>Probenextrakten</u>	118
Tabelle 26:	Messung gegen Matrix-Standard (BfR-Methode GC-MS/MS-Modul)	122
Tabelle 27:	Messung gegen Matrix-Standard (BfR-Methode LC-MS/MS-Modul)	124
Tabelle 28:	Messung gegen Lösungsmittelstandard (BfR-Methode LC-MS/MS-Modul)	125
Tabelle 29:	Messung gegen Matrix-Standard (DFG S 19 Methode GC-MS/MS-Modul)	126
Tabelle 30:	Messung gegen Matrix-Standard (DFG S 19 Methode LC-MS/MS-Modul)	129
Tabelle 31:	Methodenvergleich QuEChERS-, BfR-, DFG S 19-Methode (Befunde)	130
Tabelle 32:	Methodenvergleich QuEChERS-, BfR-, DFG S 19-Methode (Wiederfindungen)	131
Tabelle 33:	Falsch-negative Befunde im Rahmen des Labortests mit verdeckten Proben	136
Tabelle 34:	Labortest mit verdeckten Proben: Richtigkeit der berichteten Laborergebnisse	137
Tabelle 35:	Labortest mit verdeckten Proben: Wiederfindungen von Acetamiprid, Cyprodinil und Deltamethrin	138
Tabelle 36:	Labortests mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Richtigkeit in der Übersicht	139
Tabelle 37:	Labortest mit verdeckten Proben: Übersicht statistischer Kenngrößen hinsichtlich der Vergleichbarkeit	140

Nummer	Titel	Seite
Tabelle 38:	Labortest mit verdeckten Proben: Robuste Standardabweichung und Zielstandardabweichung im Vergleich	141
Tabelle 39:	Labortest mit verdeckten Proben: Gesamtergebnis hinsichtlich der Vergleichbarkeit	141
Tabelle 40:	Labortests mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Vergleichbarkeit in der Übersicht	142
Tabelle 41:	Acetamid - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)	143
Tabelle 42:	Bifenthrin - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)	145
Tabelle 43:	Boscalid - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)	146
Tabelle 44:	Cyhalothrin-lambda - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)	148
Tabelle 45:	Cyprodinil - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)	149
Tabelle 46:	Deltamethrin - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)	151
Tabelle 47:	Fenhexamid - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)	152
Tabelle 48:	Fludioxinil - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)	154
Tabelle 49:	Iprodion - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)	155
Tabelle 50:	Pyrimethanil - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Labortest)	157
Tabelle 51:	Soll-Gehalte im Vergleich zum Labordurchschnitt sowie zur Richtigkeit (Labortest)	158
Tabelle 52:	Zusammenfassung der Vergleichbarkeit und der Richtigkeit der berichteten Ergebnisse (Labortest)	161
Tabelle 53:	Labortest mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse unter Berücksichtigung des „korrigierten“ Medians und einer Zielstandardabweichung von 22%	162
Tabelle 54:	Labortest mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse hinsichtlich der jeweiligen Wirkstoffe unter Berücksichtigung des Medians sowie einer Zielstandardabweichung von 22%	163

Nummer	Titel	Seite
Tabelle 55:	Labortest mit verdeckten Proben – Vergleich der Auswertung des Wirkstoffes Fenhexamid mit unterschiedlichen Referenzwerten (Median/wahrer Wert)	164
Tabelle 56:	Labortest mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse unter Berücksichtigung des Medians sowie einer Zielstandardabweichung von 25%	165
Tabelle 57:	Labortest mit verdeckten Proben: Zufriedenstellende Ergebnisse hinsichtlich der jeweiligen Wirkstoffe unter Berücksichtigung des Medians sowie einer Zielstandardabweichung von 25%	165
Tabelle 58:	Statistische Parameter für die Bewertung der Vergleichbarkeit (Ethephon) [121,122,128]	171
Tabelle 59:	Ethephon - Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Methodenvergleich)	171
Tabelle 60:	Chlormequat / Mepiquat - Ergebnisse des Methodenringversuches	174

Abkürzungsverzeichnis

AP	Analyte Protectants
AOAC	Association of Analytical Chemists
ARfD	Akute Referenzdosis
Bipea	Bureau InterProfessionnel d'Étude Analytique
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
CRL	Community Reference Laboratory
<i>D</i>	Differenz des Analysenpaares einer Doppelbestimmung
DAkkS	Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH
ECD	Electron Capture Detector
EW	Einwaage
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme
FFP RSD	Fit-For-Purpose Relative Standard Deviation
FID	Flame Ionisation Detector
FPD	Flame Photometric Detector
GC	Gaschromatographie (Gas Chromatography)
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie
LC	Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography)
LEH	Lebensmitteleinzelhandel
LLE	Liquid-Liquid Extraction
LoD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LoQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
LVU	LVU GbR - Durchführung von Laborvergleichsuntersuchungen
MS	Massenselektive Detektion
MSC	Mini Silicar Column
<i>n</i>	Anzahl der Messwerte
μ	Mittelwert der Grundgesamtheit (Wert der größten Häufigkeit)
PflSchG	Pflanzenschutzmittelgesetz
PSA	Primäres-sekundäres Amin
PSM	Pflanzen- und Schädlingsbekämpfungsmittel

PTV	Programmed Temperature Vaporizer Einlasssystem
RHG	Rechtlich geregelter Pestizid-Rückstandshöchstgehalt in mg/kg
RSD%	Relative Standard Deviation (%)
$\hat{\sigma}$	Zielstandardabweichung nach Horwitz für die Auswertung von Laboreignungstests
σ_{all}^2	Erlaubte (<i>allowable</i>) Sampling-Varianz zwischen Testmaterial-Einheiten eines Ringversuchs
σ_{an}	Angemessene analytische Wiederholpräzision für die Prüfung auf Homogenität von Ringversuchs-Testmaterial
$\hat{\sigma}_H$	Vergleichsstandardabweichung (relative Standardabweichung der Vergleichspräzision) nach Horwitz
σ	Standardabweichung der Grundgesamtheit
s	Standardabweichung einer <u>Stichprobe</u>
s_{an}^2	Varianz einer Doppelbestimmung bei der Prüfung auf Homogenität von Ringversuchs-Testmaterial
s_{sam}^2	<i>sampling</i> -Varianz zwischen Testmaterial Einheiten eines Ringversuchs
s_B	Standardabweichung des Blindwertes
SLE	Solid Supported Liquid Extraktion
SPE	Solid Phase Extraction
V_S	Populationsvarianz (Varianz aller Stichproben aus der gleichen Population (z.B. Ergebnisse eines Homogenitätstests))
x	ein Messwert einer Stichprobe
\bar{x}	Mittelwert einer Stichprobe
x_a	assigned value
\bar{x}_B	Mittlerer Blindwert
z	z-score

Anhang

A. Tabellen

Tabelle A1: Physikalisch-chemische Eigenschaften der zu analysierenden Analyten [135]

Wirkstoff	Molmasse [g/mol]	pKs-Wert (bei 25°C)	Löslichkeit [mg/l] 25°C	Log K _{ow}
Acetamiprid	222,68	0.7	$4,25 \times 10^3$	0.8
Bifenthrin	422.87	--	0.1	≤ 6
Boscalid	343.21	--	6	2.96
Cyhalothrin-lambda	449.9	> 9	0.005	6.9
Cyprodinil	225.30	4.44	13	4.00
Deltamethrin	505.2	--	< 0.2 µg/l	4.6
Fenhexamid	302.2	--	20	3.51
Fludioxinil	248.19	< 0	1.8	4.12
Iprodion	330.2	--	13	3.0
Pyrimethanil	199.25	3.52	121	2.84

Tabelle A2: Ergebnisse des Homogenitätstests

Acetamiprid				
Anzahl der Messungen	Ergebnis 1. Aufarbeitung [µg/kg]	Ergebnis 2. Aufarbeitung [µg/kg]	Mittelwert [µg/kg]	Wiederfindung %
1	44	42	43	92
2	41	40	41	
3	44	42	43	Standardabweichung 1,1891
4	41	41	41	
5	42	39	41	Variation in % 2,86
6	40	40	40	
7	40	41	41	Soll (µg/kg) 45
8	42	42	42	
9	44	42	43	Soll (µg/kg) 45
10	42	42	42	
Mittelwert	42			

Bifenthrin				
Anzahl der Messungen	Ergebnis 1. Aufarbeitung [µg/kg]	Ergebnis 2. Aufarbeitung [µg/kg]	Mittelwert [µg/kg]	Wiederfindung %
1	30	31	31	100
2	31	33	32	
3	39	35	37	Standardabweichung 2,8067
4	37	35	36	
5	32	39	36	Variation in % 8,04
6	35	34	35	
7	37	29	33	Soll (µg/kg) 35
8	37	40	39	
9	35	31	33	Soll (µg/kg) 35
10	38	40	39	
Mittelwert	35			

Boscalid				
Anzahl der Messungen	Ergebnis 1. Aufarbeitung [µg/kg]	Ergebnis 2. Aufarbeitung [µg/kg]	Mittelwert [µg/kg]	Wiederfindung %
1	99	95	97	98
2	98	100	99	
3	109	107	108	Standardabweichung 8,4387
4	127	109	118	
5	131	109	120	Variation in % 7,51
6	118	121	120	
7	114	110	112	
8	123	114	119	Soll (µg/kg) 115
9	112	122	117	
10	114	116	115	
Mittelwert	112			

Cyhalothrin-lambda				
Anzahl der Messungen	Ergebnis 1. Aufarbeitung [µg/kg]	Ergebnis 2. Aufarbeitung [µg/kg]	Mittelwert [µg/kg]	Wiederfindung %
1	86	87	87	109
2	83	76	80	
3	77	88	83	Standardabweichung 4,3910
4	92	91	92	
5	77	84	81	Variation in % 5,24
6	71	91	81	
7	87	80	84	
8	98	70	84	Soll (µg/kg) 77
9	85	73	79	
10	91	90	91	
Mittelwert	84			

Cyprodinil				
Anzahl der Messungen	Ergebnis 1. Aufarbeitung [µg/kg]	Ergebnis 2. Aufarbeitung [µg/kg]	Mittelwert [µg/kg]	Wiederfindung %
1	142	136	139	97
2	174	148	161	
3	177	146	162	Standardabweichung 8,0417
4	158	161	160	
5	171	148	160	Variation in % 5,05
6	160	154	157	
7	179	156	168	
8	166	167	167	Soll (µg/kg) 165
9	165	149	157	
10	163	167	165	
Mittelwert	159			

Deltamethrin				
Anzahl der Messungen	Ergebnis 1. Aufarbeitung [µg/kg]	Ergebnis 2. Aufarbeitung [µg/kg]	Mittelwert [µg/kg]	Wiederfindung %
1	57	52	55	106
2	53	50	52	
3	55	50	53	Standardabweichung 2,5282
4	60	55	58	
5	55	49	52	Variation in % 4,69
6	56	52	54	
7	63	53	58	
8	55	50	53	Soll (µg/kg) 51
9	57	54	56	
10	50	51	51	
Mittelwert	54			

Fenhexamid				
Anzahl der Messungen	Ergebnis 1. Aufarbeitung [µg/kg]	Ergebnis 2. Aufarbeitung [µg/kg]	Mittelwert [µg/kg]	Wiederfindung %
1	340	362	351	99
2	365	365	365	
3	376	360	368	Standardabweichung 10,9012
4	359	368	364	
5	318	350	334	Variation in % 3,09
6	365	350	358	
7	353	347	350	
8	349	349	349	Soll (µg/kg) 355
9	347	349	348	
10	341	340	341	
Mittelwert	353			

Fludioxonil				
Anzahl der Messungen	Ergebnis 1. Aufarbeitung [µg/kg]	Ergebnis 2. Aufarbeitung [µg/kg]	Mittelwert [µg/kg]	Wiederfindung %
1	63	62	63	102
2	59	64	62	
3	67	66	67	Standardabweichung 2,6714
4	67	66	67	
5	61	72	67	Variation in % 4,02
6	68	69	69	
7	75	61	68	
8	70	65	68	Soll (µg/kg) 65
9	67	66	67	
10	72	69	71	
Mittelwert	66			

Iprodion				
Anzahl der Messungen	Ergebnis 1. Aufarbeitung [µg/kg]	Ergebnis 2. Aufarbeitung [µg/kg]	Mittelwert [µg/kg]	Wiederfindung %
1	932	901	917	88
2	786	841	814	
3	855	839	847	Standardabweichung 30,9094
4	869	842	856	
5	832	840	836	Variation in % 3,68
6	853	832	843	
7	852	831	842	
8	817	806	812	Soll (µg/kg) 950
9	804	839	822	
10	824	808	816	
Mittelwert	840			

Pyrimethanil				
Anzahl der Messungen	Ergebnis 1. Aufarbeitung [µg/kg]	Ergebnis 2. Aufarbeitung [µg/kg]	Mittelwert [µg/kg]	Wiederfindung %
1	1321	1343	1332	91
2	1272	1301	1287	
3	1345	1305	1325	Standardabweichung 27,5316
4	1262	1284	1273	
5	1245	1264	1255	Variation in % 2,15
6	1274	1257	1266	
7	1287	1253	1270	
8	1258	1273	1266	Soll (µg/kg) 1400
9	1279	1258	1269	
10	1259	1248	1254	
Mittelwert	1279			

Tabelle A3: Überprüfung der Anforderungen an die Homogenität des Trauben-Testmaterials (Acetamidrid)

Acetamidrid	Ergebnis a	Ergebnis b	Differenz D (= a - b)	Summe S (= a + b)	D ² = (a - b) ²	(S _i - \bar{S}) ²
	Konz. Wirkstoff	Konz. Wirkstoff				
Probe	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]				
1	44	42	2	86	4	8,4
2	41	40	1	81	1	4,4
3	44	42	2	86	4	8,4
4	41	41	0	82	0	1,2
5	42	39	3	81	9	4,4
6	40	40	0	80	0	9,6
7	40	41	-1	81	1	4,4
8	42	42	0	84	0	0,8
9	44	42	2	86	4	8,4
10	42	42	0	84	0	0,8
SUMME				831	23	50,9
			Mittelwert Summe (\bar{S})	83,1		
Mittelwert (über alle 20 Messwerte)	41,55				Varianz (V _S)	5,66

Standardabweichung [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	1,2
Variationskoeffizient [rel %]	2,9
Variationskoeffizient nach Horwitz [122] [$\mu\text{g}/\text{kg}$] und [%]	9,14 / 22
Dotierung (Soll) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	45
Wiederfindung [%] bezogen auf die Dotierung	92

Test auf ausreichende Homogenität [18]

$s_{an}^2 = \sum D_i^2 / 2m$	1,15
s_{an}	1,072
$V_S = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m-1)$	5,66
$s_{sam}^2 = (V_S/2 - s_{an}) / 2$	0,878
σ_p [122]	9,14
$\sigma_{all}^2 = (0,3\sigma_p)^2$	7,52
F ₁ und F ₂ (F-Verteilung für m = 10) für m = 10	1,88 bzw. 1,01
Kritischer Wert = F ₁ σ_{all}^2 + F ₂ s_{an}^2	15,30
$s_{sam}^2 <$ Kritischer Wert	Erfüllt
Da $s_{sam}^2 = 0,878 < 15,30$ ist die Homogenität statistisch belegt.	

Tabelle A4: Überprüfung der Anforderungen an die Homogenität des Trauben-Testmaterials (Bifenthrin)

Bifenthrin	Ergebnis a	Ergebnis b	Differenz D (= a - b)	Summe S (= a + b)	D ² = (a - b) ²	(S _i - \bar{S}) ²
	Konz. Wirkstoff	Konz. Wirkstoff				
Probe	[µg/kg]	[µg/kg]				
1	30	31	-1	61	1	77,4
2	31	33	-2	64	4	33,6
3	39	35	4	74	16	17,6
4	37	35	2	72	4	4,8
5	32	39	-7	71	49	1,4
6	35	34	1	69	1	0,6
7	37	29	8	66	64	14,4
8	37	40	-3	77	9	51,8
9	35	31	4	66	16	14,4
10	38	40	-2	78	4	67,2
SUMME				698	168	283,6
				Mittelwert Summe (\bar{S})	69,8	
Mittelwert (über alle 20 Messwerte)	34,9				Varianz (V _S)	31,51

Standardabweichung [µg/kg]	2,8
Variationskoeffizient [rel %]	8
Variationskoeffizient nach Horwitz [122] in [µg/kg] und [%]	7,68 / 22
Dotierung (Soll) [µg/kg]	35
Wiederfindung [%] bezogen auf die Dotierung	100

Test auf ausreichende Homogenität [18]

$s_{an}^2 = \sum D_i^2 / 2m$	8,4
S _{an}	2,898
$V_S = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m-1)$	31,51
$s_{sam}^2 = (V_S/2 - s_{an}) / 2$	6,429
σ _p [122]	7,68
$\sigma_{all}^2 = (0,3\sigma_p)^2$	5,31
F ₁ und F ₂ (F-Verteilung für m = 10) für m = 10	1,88 bzw. 1,01
Kritischer Wert = F ₁ σ _{all} ² + F ₂ s _{an} ²	18,46
s _{sam} ² < Kritischer Wert	Erfüllt
Da s _{sam} ² = 6,429 < 18,46 ist die Homogenität statistisch belegt.	

Tabelle A5: Überprüfung der Anforderungen an die Homogenität des Trauben-Testmaterials (Boscalid)

Boscalid	Ergebnis a	Ergebnis b	Differenz D (= a - b)	Summe S (= a + b)	D ² = (a - b) ²	(S _i - \bar{S}) ²
	Konz. Wirkstoff	Konz. Wirkstoff				
Probe	[µg/kg]	[µg/kg]				
1	99	95	4	194	16	948,6
2	98	100	-2	198	4	718,2
3	109	107	2	216	4	77,4
4	127	109	18	236	324	125,4
5	131	109	22	240	484	231,0
6	118	121	-3	239	9	201,6
7	114	110	4	224	16	0,6
8	123	114	9	237	81	148,8
9	112	122	-10	234	100	84,6
10	114	116	-2	230	4	27,0
SUMME				2248	1042	2563,6
				Mittelwert Summe (\bar{S})	224,8	
Mittelwert (über alle 20 Messwerte)	112,4				Varianz (V _S)	284,84
Standardabweichung [µg/kg]						8,4
Variationskoeffizient [rel %]						7,5
Variationskoeffizient nach Horwitz [122] in [µg/kg] und [%]						24,6 / 21,9
Dotierung (Soll) [µg/kg]						115
Wiederfindung [%] bezogen auf die Dotierung						98

Test auf ausreichende Homogenität [18]

$s_{an}^2 = \sum D_i^2 / 2m$	52,1
s_{an}	7,218
$V_S = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m-1)$	284,84
$s_{sam}^2 = (V_S/2 - s_{an}) / 2$	67,602
σ_p [122]	24,6
$\sigma_{all}^2 = (0,3\sigma_p)^2$	54,46
F ₁ und F ₂ (F-Verteilung für m = 10) für m = 10	1,88 bzw. 1,01
Kritischer Wert = F ₁ σ _{all} ² + F ₂ s _{an} ²	155,01
s _{sam} ² < Kritischer Wert	Erfüllt
Da s _{sam} ² = 67,6 < 155 ist die Homogenität statistisch belegt.	

Tabelle A6: Überprüfung der Anforderungen an die Homogenität des Trauben-Testmaterials (Cyhalothrin-lambda)

Cyhalothrin-lambda	Ergebnis a	Ergebnis b	Differenz D (= a - b)	Summe S (= a + b)	D ² = (a - b) ²	(S _i - \bar{S}) ²	
	Konz. Wirkstoff	Konz. Wirkstoff					
Probe	[µg/kg]	[µg/kg]					
1	86	87	-1	173	1	28,1	
2	83	76	7	159	49	75,7	
3	77	88	-11	165	121	7,3	
4	92	91	1	183	1	234,1	
5	77	84	-7	161	49	44,9	
6	71	91	-20	162	400	32,5	
7	87	80	7	167	49	0,5	
8	98	70	28	168	784	0,1	
9	85	73	12	158	144	94,1	
10	91	90	1	181	1	176,9	
SUMME				1677	1599	694,1	
				Mittelwert Summe (\bar{S})	167,7		
Mittelwert (über alle 20 Messwerte)	83,85					Varianz (V _S)	77,12
Standardabweichung [µg/kg]						4,4	
Variationskoeffizient [rel %]						5,2	
Variationskoeffizient nach Horwitz [122] in [µg/kg] und [%]						18,45 / 22	
Dotierung (Soll) [µg/kg]						77	
Wiederfindung [%] bezogen auf die Dotierung						109	

Test auf ausreichende Homogenität [18]

$s_{an}^2 = \sum D_i^2 / 2m$	79,95
s_{an}	8,941
$V_S = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m-1)$	77,12
$s_{sam}^2 = (V_S/2 - s_{an}^2) / 2$	14,810
σ_p [122]	18,45
$\sigma_{all}^2 = (0,3\sigma_p)^2$	30,64
F ₁ und F ₂ (F-Verteilung für m = 10) für m = 10	1,88 bzw. 1,01
Kritischer Wert = F ₁ σ _{all} ² + F ₂ s _{an} ²	138,35
$s_{sam}^2 < \text{Kritischer Wert}$	Erfüllt
Da $s_{sam}^2 = 14,81 < 138,35$ ist die Homogenität statistisch belegt.	

Tabelle A7: Überprüfung der Anforderungen an die Homogenität des Trauben-Testmaterials (Cyprodinil)

Cyprodinil	Ergebnis a	Ergebnis b	Differenz D (= a - b)	Summe S (= a + b)	D ² = (a - b) ²	(S _i - \bar{S}) ²
	Konz. Wirkstoff	Konz. Wirkstoff				
Probe	[µg/kg]	[µg/kg]				
1	142	136	6	278	36	1656,5
2	174	148	26	322	676	10,9
3	177	146	31	323	961	18,5
4	158	161	-3	319	9	0,1
5	171	148	23	319	529	0,1
6	160	154	6	314	36	22,1
7	179	156	23	335	529	265,7
8	166	167	-1	333	1	204,5
9	165	149	16	314	256	22,1
10	163	167	-4	330	16	127,7
SUMME				3187	3049	2328,1
				Mittelwert Summe (\bar{S})	318,7	
Mittelwert (über alle 20 Messwerte)	159,35				Varianz (V _S)	258,68

Standardabweichung [µg/kg]	8
Variationskoeffizient [rel %]	5
Variationskoeffizient nach Horwitz [122] in [µg/kg] und [%]	33,61 / 21,1
Dotierung (Soll) [µg/kg]	165
Wiederfindung [%] bezogen auf die Dotierung	97

Test auf ausreichende Homogenität [18]

$s_{an}^2 = \sum D_i^2 / 2m$	152,45
s_{an}	12,35
$V_S = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m-1)$	258,68
$s_{sam}^2 = (V_S/2 - s_{an}) / 2$	58,50
σ_p [122]	33,61
$\sigma_{all}^2 = (0,3\sigma_p)^2$	101,67
F ₁ und F ₂ (F-Verteilung für m = 10) für m = 10	1,88 bzw. 1,01
Kritischer Wert = F ₁ σ _{all} ² + F ₂ s _{an} ²	345,11
s _{sam} ² < Kritischer Wert	Erfüllt
Da s _{sam} ² = 58,5 < 345,11 ist die Homogenität statistisch belegt.	

Tabelle A8: Überprüfung der Anforderungen an die Homogenität des Trauben-Testmaterials (Deltamethrin)

Deltamethrin	Ergebnis a	Ergebnis b	Differenz D (= a - b)	Summe S (= a + b)	D ² = (a - b) ²	(S _i - \bar{S}) ²
	Konz. Wirkstoff	Konz. Wirkstoff				
Probe	[µg/kg]	[µg/kg]				
1	58	52	6	110	36	4,8
2	53	50	3	103	9	23,0
3	55	50	5	105	25	7,8
4	60	55	5	115	25	51,8
5	55	49	6	104	36	14,4
6	56	52	4	108	16	0,0
7	63	53	10	116	100	67,2
8	55	50	5	105	25	7,8
9	57	54	3	111	9	10,2
10	50	51	-1	101	1	46,2
SUMME				1078	282	233,6
				Mittelwert Summe (\bar{S})	107,8	
Mittelwert (über alle 20 Messwerte)	53,9				Varianz (V _S)	25,96
Standardabweichung [µg/kg]						2,5
Variationskoeffizient [rel %]						4,7
Variationskoeffizient nach Horwitz [122] in [µg/kg] und [%]						11,86 / 22
Dotierung (Soll) [µg/kg]						51
Wiederfindung [%] bezogen auf die Dotierung						106

Test auf ausreichende Homogenität [18]

$s_{an}^2 = \sum D_i^2 / 2m$	14,1
s_{an}	3,75
$V_S = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m-1)$	25,96
$s_{sam}^2 = (V_S/2 - s_{an}) / 2$	4,61
σ_p [122]	11,86
$\sigma_{all}^2 = (0,3\sigma_p)^2$	12,66
F ₁ und F ₂ (F-Verteilung für m = 10) für m = 10	1,88 bzw. 1,01
Kritischer Wert = F ₁ σ _{all} ² + F ₂ s _{an} ²	38,04
s _{sam} ² < Kritischer Wert	Erfüllt
Da s _{sam} ² = 4,61 < 38,04 ist die Homogenität statistisch belegt.	

Tabelle A9: Überprüfung der Anforderungen an die Homogenität des Trauben-Testmaterials (Fenhexamid)

Fenhexamid	Ergebnis a	Ergebnis b	Differenz D (= a - b)	Summe S (= a + b)	D ² = (a - b) ²	(S _i - \bar{S}) ²
	Konz. Wirkstoff	Konz. Wirkstoff				
Probe	[µg/kg]	[µg/kg]				
1	340	362	-22	702	484	10,9
2	365	365	0	730	0	610,1
3	376	360	16	736	256	942,5
4	359	368	-9	727	81	470,9
5	318	350	-32	668	1024	1391,3
6	365	350	15	715	225	94,1
7	353	347	6	700	36	28,1
8	349	349	0	698	0	53,3
9	347	349	-2	696	4	86,5
10	341	340	1	681	1	590,5
SUMME				7053	2111	4278,1
				Mittelwert Summe (\bar{S})	705,3	
Mittelwert (über alle 20 Messwerte)	352,65				Varianz (V _S)	475,34

Standardabweichung [µg/kg]	10,9
Variationskoeffizient [rel %]	3,1
Variationskoeffizient nach Horwitz [122] in [µg/kg] und [%]	65,99 / 18,7
Dotierung (Soll) [µg/kg]	355
Wiederfindung [%] bezogen auf die Dotierung	99

Test auf ausreichende Homogenität [18]

$s_{an}^2 = \sum D_i^2 / 2m$	105,55
S_{an}	10,27
$V_S = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m-1)$	475,34
$s_{sam}^2 = (V_S/2 - S_{an}) / 2$	113,70
σ_p [122]	65,99
$\sigma_{all}^2 = (0,3\sigma_p)^2$	391,92
F ₁ und F ₂ (F-Verteilung für m = 10) für m = 10	1,88 bzw. 1,01
Kritischer Wert = F ₁ σ _{all} ² + F ₂ s _{an} ²	843,42
s _{sam} ² < Kritischer Wert	Erfüllt
Da s _{sam} ² = 113,7 < 843,42 ist die Homogenität statistisch belegt.	

Tabelle A10: Überprüfung der Anforderungen an die Homogenität des Trauben-Testmaterials (Fludioxonil)

Fludioxonil	Ergebnis a	Ergebnis b	Differenz D (= a - b)	Summe S (= a + b)	D ² = (a - b) ²	(S _i - \bar{S}) ²
	Konz. Wirkstoff	Konz. Wirkstoff				
Probe	[µg/kg]	[µg/kg]				
1	63	62	1	125	1	62,4
2	59	64	-5	123	25	98,0
3	67	66	1	133	1	0,0
4	67	66	1	133	1	0,0
5	61	72	-11	133	121	0,0
6	68	69	-1	137	1	16,8
7	75	61	14	136	196	9,6
8	70	65	5	135	25	4,4
9	67	66	1	133	1	0,0
10	72	69	3	141	9	65,6
SUMME				1329	381	256,9
				Mittelwert Summe (\bar{S})	132,9	
Mittelwert (über alle 20 Messwerte)	66,45				Varianz (V _S)	28,54

Standardabweichung [µg/kg]	2,7
Variationskoeffizient [rel %]	4
Variationskoeffizient nach Horwitz [122] in [µg/kg] und [%]	14,62 / 22
Dotierung (Soll) [µg/kg]	65
Wiederfindung [%] bezogen auf die Dotierung	102

Test auf ausreichende Homogenität [18]

$s_{an}^2 = \sum D_i^2 / 2m$	19,05
S_{an}	4,36
$V_S = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m-1)$	28,54
$s_{sam}^2 = (V_S/2 - S_{an}) / 2$	4,95
σ_p [122]	14,62
$\sigma_{all}^2 = (0,3\sigma_p)^2$	19,24
F ₁ und F ₂ (F-Verteilung für m = 10) für m = 10	1,88 bzw. 1,01
Kritischer Wert = F ₁ σ _{all} ² + F ₂ s _{an} ²	55,41
s _{sam} ² < Kritischer Wert	Erfüllt
Da s _{sam} ² = 4,95 < 55,41 ist die Homogenität statistisch belegt.	

Tabelle A11: Überprüfung der Anforderungen an die Homogenität des Trauben-Testmaterials (Iprodion)

Iprodion	Ergebnis a	Ergebnis b	Differenz D (= a - b)	Summe S (= a + b)	D ² = (a - b) ²	(S _i - \bar{S}) ²
	Konz. Wirkstoff	Konz. Wirkstoff				
Probe	[µg/kg]	[µg/kg]				
1	932	901	31	1833	961	23317,3
2	786	841	-55	1627	3025	2840,9
3	855	839	16	1694	256	187,7
4	869	842	27	1711	729	942,5
5	832	840	-8	1672	64	68,9
6	853	832	21	1685	441	22,1
7	852	831	21	1683	441	7,3
8	817	806	11	1623	121	3283,3
9	804	839	-35	1643	1225	1391,3
10	824	808	16	1632	256	2332,9
SUMME				16803	7519	34394,1
				1680, 3		
				Mittelwert Summe (\bar{S})		
Mittelwert (über alle 20 Messwerte)		840,15		Varianz (V _S)		3821,57
Standardabweichung [µg/kg]						30,9
Variationskoeffizient [rel %]						3,7
Variationskoeffizient nach Horwitz [122] in [µg/kg] und [%]						137,97 / 16,4
Dotierung (Soll) [µg/kg]						950
Wiederfindung [%] bezogen auf die Dotierung						88

Test auf ausreichende Homogenität [18]

$s_{an}^2 = \sum D_i^2 / 2m$	375,95
s_{an}	19,39
$V_S = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m-1)$	3.821,57
$s_{sam}^2 = (V_S/2 - s_{an}) / 2$	945,70
σ_p [122]	137,97
$\sigma_{all}^2 = (0,3\sigma_p)^2$	1.713,21
F ₁ und F ₂ (F-Verteilung für m = 10) für m = 10	1,88 bzw. 1,01
Kritischer Wert = F ₁ σ _{all} ² + F ₂ s _{an} ²	3.600,55
s _{sam} ² < Kritischer Wert	Erfüllt
Da s _{sam} ² = 945,7 < 3.600,55 ist die Homogenität statistisch belegt.	

Tabelle A12: Überprüfung der Anforderungen an die Homogenität des Trauben-Testmaterials (Pyrimethanil)

Pyrimethanil	Ergebnis a	Ergebnis b	Differenz D (= a - b)	Summe S (= a + b)	D ² = (a - b) ²	(S _i - \bar{S}) ²
	Konz. Wirkstoff	Konz. Wirkstoff				
Probe	[µg/kg]	[µg/kg]				
1	1321	1343	-22	2664	484	11067,0
2	1272	1301	-29	2573	841	201,6
3	1345	1305	40	2650	1600	8317,4
4	1262	1284	-22	2546	484	163,8
5	1245	1264	-19	2509	361	2480,0
6	1274	1257	17	2531	289	772,8
7	1287	1253	34	2540	1156	353,4
8	1258	1273	-15	2531	225	772,8
9	1279	1258	21	2537	441	475,2
10	1259	1248	11	2507	121	2683,2
SUMME				25588	6002	27287,6

Mittelwert Summe (\bar{S}) 2558,8

Mittelwert (über alle 20 Messwerte)	1279,4	Varianz (V _S)	3031,96
---	--------	------------------------------	---------

Standardabweichung [µg/kg]	27,5
Variationskoeffizient [rel %]	2,2
Variationskoeffizient nach Horwitz [122] in [µg/kg] und [%]	197,21 / 15,4
Dotierung (Soll) [µg/kg]	1400
Wiederfindung [%] bezogen auf die Dotierung	91

Test auf ausreichende Homogenität [18]

$s_{an}^2 = \sum D_i^2 / 2m$	300,1
s_{an}	17,32
$V_S = \sum (S_i - \bar{S})^2 / (m-1)$	3.031,96
$s_{sam}^2 = (V_S/2 - s_{an}^2) / 2$	749,33
σ_p [122]	197,21
$\sigma_{all}^2 = (0,3\sigma_p)^2$	3.500,26
F ₁ und F ₂ (F-Verteilung für m = 10) für m = 10	1,88 bzw. 1,01
Kritischer Wert = F ₁ σ _{all} ² + F ₂ s _{an} ²	6.883,59
s _{sam} ² < Kritischer Wert	Erfüllt
Da s _{sam} ² = 749,33 < 6.883,59 ist die Homogenität statistisch belegt.	

Tabelle A13: Auswertung über den Median sowie über eine Zielstandardabweichung von maximal 22% (Tabelle 1v3)

Labor Code	Acetamidrid Dotierung: 45 µg/kg		Bifenthrin Dotierung: 35 µg/kg		Boscalid Dotierung: 115 µg/kg		Cyhalothrin-lambda Dotierung: 77 µg/kg	
	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score
1	32	-0,8	29	0,1	109	0,8	75	0,7
2	30	-1,0	30	0,2	80	-0,6	40	-1,7
3	40	0,2	30	0,2	120	1,4	60	-0,3
4	47	1,0	35	1,0	120	1,4	57	-0,6
5	50	1,3	42	2,2	118	1,3	85	1,4
6	22	-1,9	21	-1,2	90	-0,1	46	-1,3
7	12	*	28	-0,1	65	-1,3	56	-0,6
8	42	0,4	30	0,2	101	0,4	72	0,5
9	30	-1,0	30	0,2	90	-0,1	70	0,3
10	39	0,1	<10	*	92	0,0	67	0,1
11	50	1,3	33	0,7	110	0,9	74	0,6
12	43	0,5	21	-1,2	63	-1,4	74	0,6
13	30	-1,0	50	*	140	2,4	130	*
14	180	*	28	-0,1	100	0,4	84	1,3
15	48	1,1	20	-1,4	60	-1,6	30	-2,4
16	27	-1,3	21	-1,2	83	-0,4	62	-0,2
17	38	-0,1	25	-0,6	84	-0,4	63	-0,1
18	30	-1,0	20	-1,4	40	-2,6	30	-2,4
19	65	*	41	2,0	130	1,9	83	1,3

*Werte werden nicht berücksichtigt da sie nach dem ersten Schritt der Medianermittlung um mehr als 5 Zielstandardabweichungen oder um mehr als 50% vom Median abweichen.

Tabelle A14: Auswertung über den Median sowie über eine Zielstandardabweichung von maximal 22% (Tabelle 2v3)

Labor Code	Cyprodinil Dotierung: 165 µg/kg		Deltamethrin Dotierung: 51 µg/kg		Fenhexamid Dotierung: 355 µg/kg		Fludioxonil Dotierung: 65 µg/kg	
	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score
1	94	-1,0	35	-1,2	246	-0,8	63	0,2
2	120	0,0	10	*	170	-2,1	30	-2,3
3	140	0,8		n.r.	420	2,2	80	1,5
4	144	0,9	61	1,4	522	*	63	0,2
5	163	1,6	39	-0,8	283	-0,1	113	*
6	84	-1,4	27	-2,0	380	1,5	72	0,9
7	54	-2,5	33	-1,4	350	1,0	40	-1,5
8	135	0,6	48	0,1	328	0,6	59	-0,1
9	120	0,0	50	0,3	210	-1,4	60	0,0
10	100	-0,8		n.r.	260	-0,5	61	0,0
11	140	0,8	52	0,5	300	0,1	62	0,1
12	80	-1,5		n.r.	282	-0,2	47	-1,0
13	220	*	70	2,2	420	2,2	100	3,0
14	120	0,0	54	0,7	1140	*	72	0,9
15	60	-2,3	40	-0,7	360	1,2	40	-1,5
16	90	-1,1	45	-0,2	270	-0,4	60	0,0
17	98	-0,8	41	-0,6	202	-1,5	60	0,0
18	130	0,4		n.r.	20	*	50	-0,8
19	140	0,8	56	0,9	320	0,5	77	1,2

*Werte werden nicht berücksichtigt da sie nach dem ersten Schritt der Medianermittlung um mehr als 5 Zielstandardabweichungen oder um mehr als 50% vom Median abweichen.

Tabelle A15: Auswertung über den Median sowie über eine Zielstandardabweichung von maximal 22% (Tabelle 3v3)

Labor Code	Iprodion Dotierung: 950 µg/kg		Pyrimethanil Dotierung: 1400 µg/kg	
	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score
1	853	0,3	717	-2,2
2	750	-0,5	1050	-0,4
3	810	0,0	1200	0,4
4	980	1,2	1297	0,9
5	728	-0,7	1623	2,7
6	630	-1,4	1200	0,4
7	800	-0,1	710	-2,3
8	840	0,2	1142	0,1
9	710	-0,8	930	-1,1
10	1100	2,1	1400	1,5
11	730	-0,6	1300	1,0
12	1044	1,7	1454	1,8
13	960	1,1	2800	*
14	1000	1,4	1110	-0,1
15	820	0,0	710	-2,3
16	500	-2,4	1100	-0,1
17	591	-1,7	1089	-0,2
18	90	*	1100	-0,1
19	840	0,2	1300	1,0

*Werte werden nicht berücksichtigt da sie nach dem ersten Schritt der Medianermittlung um mehr als 5 Zielstandardabweichungen oder um mehr als 50% vom Median abweichen.

Tabelle A16: Auswertung über den Median sowie die Fit-For-Purpose Relative Standard Deviation (FFP RSD) von $\pm 25\%$ (Tabelle 1v3)

Labor Code	Acetamipride Dotierung: 45 µg/kg		Bifenthrine Dotierung: 35 µg/kg		Boscalid Dotierung: 115 µg/kg	
	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score
1	32	-0,7	29	-0,1	109	0,7
2	30	-0,9	30	0,1	80	-0,5
3	40	0,1	30	0,1	120	1,2
4	47	0,8	35	0,7	120	1,2
5	50	1,1	42	1,7	118	1,1
6	22	-1,7	21	-1,2	90	-0,1
7	12	-2,8	28	-0,2	65	-1,2
8	42	0,3	30	0,1	101	0,4
9	30	-0,9	30	0,1	90	-0,1
10	39	0,0	<10		92	0,0
11	50	1,1	33	0,5	110	0,8
12	43	0,4	21	-1,2	63	-1,3
13	30	-0,9	50	2,8	140	2,1
14	180	14,5	28	-0,2	100	0,3
15	48	0,9	20	-1,3	60	-1,4
16	27	-1,2	21	-1,2	83	-0,4
17	38	-0,1	25	-0,6	84	-0,3
18	30	-0,9	20	-1,3	40	-2,3
19	65	2,7	41	1,6	130	1,7

Tabelle A17: Auswertung über den Median sowie die Fit-For-Purpose Relative Standard Deviation (FFP RSD) von $\pm 25\%$ (Tabelle 2v3)

	Cyhalothrin-lambda Dotierung: 77 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Cyprodinil Dotierung: 165 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Deltamethrin Dotierung: 51 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
Labor Code	Ergebnis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	z-score	Ergebnis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	z-score	Ergebnis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	z-score
1	75	0,5	94	-0,9	35	-0,9
2	40	-1,6	120	0,0	10	-3,1
3	60	-0,4	140	0,7		n.r.
4	57	-0,6	144	0,8	61	1,4
5	85	1,1	163	1,4	39	-0,5
6	46	-1,3	84	-1,2	27	-1,6
7	56	-0,7	54	-2,2	33	-1,1
8	72	0,3	135	0,5	48	0,3
9	70	0,2	120	0,0	50	0,4
10	67	0,0	100	-0,7		n.r.
11	74	0,4	140	0,7	52	0,6
12	74	0,4	80	-1,3		n.r.
13	130	3,8	220	3,3	70	2,2
14	84	1,0	120	0,0	54	0,8
15	30	-2,2	60	-2,0	40	-0,4
16	62	-0,3	90	-1,0	45	0,0
17	63	-0,2	98	-0,7	41	-0,4
18	30	-2,2	130	0,3		n.r.
19	83	1,0	140	0,7	56	1,0

Tabelle A18: Auswertung über den Median sowie die Fit-For-Purpose Relative Standard Deviation (FFP RSD) von $\pm 25\%$ (Tabelle 3v3)

Labor Code	Fenhexamid Dotierung: 355 µg/kg		Fludionil Dotierung: 65 µg/kg		Iprodion Dotierung: 950 µg/kg		Pyrimethanil Dotierung: 1400 µg/kg	
	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score	Ergebnis (µg/kg)	z-score
1	246	-0,7	63	0,1	853	0,2	717	-1,5
2	170	-1,7	30	-2,0	750	-0,3	1050	-0,3
3	420	1,6	80	1,2	810	0,0	1200	0,2
4	522	3,0	63	0,1	980	0,8	1297	0,5
5	283	-0,2	113	3,4	728	-0,4	1623	1,7
6	380	1,1	72	0,7	630	-0,9	1200	0,2
7	350	0,7	40	-1,4	800	0,0	710	-1,5
8	328	0,4	59	-0,1	840	0,1	1142	0,0
9	210	-1,2	60	-0,1	710	-0,5	930	-0,7
10	260	-0,5	61	0,0	1100	1,4	1400	0,9
11	300	0,0	62	0,1	730	-0,4	1300	0,6
12	282	-0,2	47	-0,9	1044	1,2	1454	1,1
13	420	1,6	100	2,6	960	0,7	2800	5,8
14	1140	11,2	72	0,7	1000	0,9	1110	-0,1
15	360	0,8	40	-1,4	820	0,0	710	-1,5
16	270	-0,4	60	-0,1	500	-1,5	1100	-0,1
17	202	-1,3	60	-0,1	591	-1,1	1089	-0,2
18	20	-3,7	50	-0,7	90	-3,6	1100	-0,1
19	320	0,3	77	1,0	840	0,1	1300	0,6

Tabelle A19: Auswertung des Methodenringversuches „Chlormequat/Mepiquat in Pilzen“
(Richtigkeit und Vergleichbarkeit beim *Chlormequat*)

Labor- code	Austernpilz <i>Chlormequat (wahrer Wert 40 µg/kg)</i> Dotierungsniveau: 33 µg/kg				
	Ergebnis (µg/kg)	Wiederfindung (%)	LoQ (µg/kg)	z-score	Ausschöpfung der Dotierung (%)
1	35	99	10	-0,5	106
2	44	70-120	10	0,5	133
3	45	75	10	0,6	136
4	33,9	98,4	10	-0,7	103
5	41*	60	5	0,2	124
6	29	77	10	-1,2	88
7	38,3	75-89	5	-0,2	116
8	44	98	5	0,5	133
9	30	90	10	-1,1	91
10	34,6	101	10	-0,6	105
11	45	85	10	0,6	136
12	52	70	20	1,4	158
13	35,5	102	1	-0,5	108
14	66**	102	5	3,0	200

*Wiederfindungskorrigiert

** Ausreißer nach Grubbs

Tabelle A20: Auswertung des Methodenringversuches „Chlormequat/Mepiquat in Pilzen“
(Richtigkeit und Vergleichbarkeit beim *Mepiquat*)

Labor- code	Austernpilz <i>Mepiquat (wahrer Wert 14 µg/kg)</i> Dotierungsniveau: 12 µg/kg				
	Ergebnis (µg/kg)	Wiederfindung (%)	LoQ (µg/kg)	z-score	Ausschöpfung der Dotierung (%)
1	13	97	10	-0,3	108
2	15	70-120	10	0,4	125
3	20	75	10	2,0	167
4	8,21	95,6	10	-1,8	68
5	8	96	5	-1,9	67
6	11	107	10	-0,9	92
7	15,5	86-94	5	0,6	129
8	16	106	5	0,7	133
9	10	96	10	-1,3	83
10	12,5	106	10	-0,4	104
11	21,4	120	50	2,5	178
12	45**	70	20	10,3	375
13	11,1	103	1	-0,9	93
14	13	98	5	-0,3	108

** Ausreißer nach Grubbs

B. Dokumentationen

Dokument B1: Begleitschreiben zur Traubenprobe (Labortest)

Untersuchungsauftrag
EILUNTERSUCHUNG B-PROBE

Homogenat – Probennummer Labor 2012-310721

Wir bitten Sie für beiliegende Muster die MULTIMETHODE durchzuführen. Wir bitten Sie alle Infos dieses Blattes auf das Untersuchungsergebnis zu übertragen und sofern Rückstände an Pestiziden nachgewiesen wurden, eine ARFD-AUSWERTUNG hinzuzufügen.

Probennummer / Sample number: 2012-310721

Warenart / Sorte / Menge / Article / Variety / Quantity: Thompson seedless; Tafeltrauben;
Homogenat

Pos. Nr.: R0651493

Ursprungsland / Country of origin: GR

Datum der Probenahme / Date of sampling: 25.10.2010

Ort der Probenahme / Place of sampling: Harmsen & De Groot, Rotterdam

Exporteur / Exporter: Global F. Trad. Ltd.

Produzent / Grower number: 4050373193582

Rückverfolgbarkeitscode / Traceability code: 10033005 7003@000

Schiff / Vessel / LKW / Truck: AE 99783

Lotto / Lot number:

Name des Probennehmers / Name of the sampler: Ryan Stanley

Eine Kopie dieses Auftrages / A copy of this order for: Labor / Laboratory

Mit freundlichen Grüßen

Unterschrift Probennehmer / Signature of the sampler

Dokument B2: Begleitschreiben zur Tomatenprobe (Methodenringversuch Ethephon)

Ethephon in tomato purée – Ring test including the comparison of applied analytical methods

Dear participant,

please find attached the ring test sample spiked with Ethephon.

IMPORTANT REMARKS:

- Treat the test material as if it was a frozen sample for routine analysis. Please store the test material at -18° bis -20° C until analysis.
- The test material consists of tomato purée and contains Ethephon at an unknown quantity level.

The laboratories are expected to test the material for Ethephon according to the individual method established in the participant's laboratory.

Please report the quantified level of Ethephon in $\mu\text{g}/\text{kg}$ and inform us about the corresponding recoveries in per cent (%). The results must NOT be corrected using recovery factors. If the laboratory usually corrects the results using their recoveries, they should provide the correction factor for each pesticide as informative data only. It must also be reported if recoveries originated from experiments performed in connection with the test or if they have originated from the validation data. Furthermore, please report also the corresponding limit of quantification (LoQ). To facilitate the reporting of results, please make use of Appendix I „Result sheet“.

In order to provide the participating laboratories a comprehensive comparison of applied analytical methods, you are requested to provide relevant information according to appendix II „Analytical procedures“.

Transfer your final report by Email the latest until 8th May 2009 to the following address:
info@lach-bruns.de

You will be given your individual laboratory code together with the report related to the evaluation of the analytical results and the comparison of applied methods. This report will also consider the evaluation of the other participants in an anonymous way.

All participating laboratories will be named at the beginning of the report (overview of participants without any link to the corresponding laboratory code). This enables the participating laboratories to get in contact with each other directly if preferred and thus to exchange information.

In case of any questions, please feel free to contact us,

best regards,

Silke Bruns

Dokument B3: Anweisungen zur Ergebnisabgabe - Methodenringversuch Ethephon
(Appendix I: Result sheet)

APPENDIX I:

Pesticide	Result ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	Recovery originated from experiments performed in connection with the test	Recovery originated from the validation data	Limit of quantification (LOQ) in $\mu\text{g}/\text{kg}$

Dokument B4: Anweisungen zur Angabe über die verwendeten Methoden – Methodenring-
versuch Ethephon (Appendix II: Analytical Methods applied by the participating
laboratories)

APPENDIX II:

Information about the analytical procedure(s) used is required from each laboratory according to this appendix.

If more than one method has been used, please label this and provide the relevant information for each method individually.

Please provide the information the latest 8th May 2009.

Notes:

- Provide the information in German or English language
- Feel free to provide also additional information (not explicitly asked for) you consider of importance
- Feel free to use this document or to provide the information in your individual style

1) Title / Name / Headline of applied method

2) Is the method accredited?

3) Sample preparation

Taking under consideration the following aspects:

- Sample weight used for analysis
- Any addition information not explicitly listed here but considered relevant

4) Sample conditioning

Taking under consideration the following aspects:

- Extraction technique used
- Extraction solvent(s)
- Adjustment of extract (like pH adjustment)?
- Clean-up steps and used instruments (e.g. columns and their fillings / filters)
- Any addition information not explicitly listed here but considered relevant

- 5) Calibration (for Quantification)
 - Matrix-matched
 - Solvent
 - Multi-level
 - Single-level
 - Standard addition
 - Any addition information not explicitly listed here but considered relevant
- 6) Source of Standard (the organisation that sold the standard to you)
- 7) Is the quoted recovery (%) measured in the same analytical batch as the test material
- 8) If measured in this batch, at what stage was the spike added?
- 9) Level of spike ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
- 10) Composition of blank commodity used for spiking
 - Taking under consideration the following aspects:
 - Blank provided
 - Test material provided
 - Other?
- 11) GC-Column type
- 12) GC-Injection volume and other parameters (PVT etc.)
- 13) GC Detector
- 14) Quantification procedure
 - including mass transitions in case of MS detection

If LC-modules are used, please refer to the following aspects:

- 15) Pre-column
 - Taking under consideration the following aspects:
 - length
 - packaging
 - Any addition information not explicitly listed here but considered relevant
- 16) Column
 - Taking under consideration the following aspects:
 - length
 - packaging
 - Any addition information not explicitly listed here but considered relevant
- 17) Mobile Phase components (eluent)
 - Taking under consideration the following aspects:
 - Kind of eluent (e.g. water)
 - Special Preparation of Eluent (e.g. pH adjustment)

- 18) Mobile Phase programme including the flow rate
Taking under consideration the following aspects:
- Flow (ml/min)
 - Description of gradient (if used)
- 19) Ionisation mode
- 20) Injection volume
- 21) Detector type
- 22) Quantification procedure
including mass transitions
-

Confirmation method:

- Same one?
- Different one(s)

If (a) different confirmation method(s) was (were) applied, please go through questions 1 – 20 again and answer to the suitable ones.

Dokument B5: Begleitschreiben zur Pilz / Pilzsubstratprobe (Methodenringversuch
Chlormequat / Mepiquat)

Chlormequat / Mepiquat in mushroom and substrate purée – Method Ring Test

Dear participant,

please find attached the following sample :

- Mushroom **Test Material 1**
- Mushroom **Test Material 2**
- Mushroom Blank Material
- ***SUBSTRATE* Test Material**
- ***SUBSTRATE* Blank Material**

IMPORTANT REMARKS:

- Treat the test material as if it was a frozen sample for routine analysis.
Please store the test material at -18° bis -20°C until analysis.
- The test material consists of mushroom purée and *substrate* purée containing Chlormequat – or Chlormequat and/or Mepiquat at unknown quantity levels.
 - Mushroom Test Material: Two different test materials are provided. One Test Material is spiked with Chlormequat and/or Mepiquat, the other test material consist of incurred residues of Chlormequat and/or Mepiquat.
 - *SUBSTRATE* Test material: *ONE* Test Material of substrate is provided consisting of straw and additional nutrients like bran, fatty additives and nitrogen additives. This test material is spiked with Chlormequat and/or Mepiquat

The laboratories are expected to analyse the Test Materials for Chlormequat and Mepiquat according to the individual method established in the participant's laboratory.

Please report the quantified levels of Chlormequat and Mepiquat in $\mu\text{g}/\text{kg}$. Report them as such (and not as Chlormequat-Chloride / Mepiquat-Chloride). Inform us about the corresponding recoveries in per cent (%). The results must NOT be corrected using recovery factors. If the laboratory usually corrects the results using their recoveries, they should provide the correction factor for each pesticide as informative data only. It must also be reported if recoveries originated from experiments performed in connection with the test or if they have originated from the validation data. Furthermore, please report also the corresponding limit of quantification (LoQ). We also would like to ask you to report any traces of Chlormequat and/or Mepiquat below the reporting limit. To facilitate the reporting of results, please make use of Appendix I „Result sheet“.

In order to provide the participating laboratories a comprehensive comparison of applied analytical methods, you are requested to provide relevant information according to Appendix II „Analytical procedures“.

Transfer your final report by Email the latest until 30th September 2009 to the following address:

info@lach-bruns.de

You will be given your individual laboratory code together with the report related to the evaluation of the analytical results and the comparison of applied methods. This report will also consider the evaluation of the other participants in an anonymous way.

All participating laboratories will be named at the beginning of the report (overview of participants without any link to the corresponding laboratory code). This enables the participating laboratories to get in contact with each other directly if preferred and thus to exchange information.

In case of any questions, please feel free to contact us,

best regards,

Silke Bruns

Dokument B6: Anweisungen zur Ergebnisabgabe - Methodenringversuch Chlormequat / Mepiquat (Appendix I: Result sheet)

APPENDIX I:

Mushroom Test Material 1:

Pesticide	Result (µg/kg)	Recovery (%)	Recovery originated from experiments performed in connection with the test*	Recovery originated from validation data**	Limit of quantification (LOQ) in µg/kg
Chlormequat					
Mepiquat					

Mushroom Test Material 2:

Pesticide	Result (µg/kg)	Recovery (%)	Recovery originated from experiments performed in connection with the test*	Recovery originated from validation data**	Limit of quantification (LOQ) in µg/kg
Chlormequat					
Mepiquat					

Substrate Test Material:

Pesticide	Result (µg/kg)	Recovery (%)	Recovery originated from experiments performed in connection with the test*	Recovery originated from validation data**	Limit of quantification (LOQ) in µg/kg
Chlormequat					
Mepiquat					

*: Please answer with YES or No

** : Please answer with YES or No

Dokument B7: Anweisungen zur Angabe über die verwendeten Methoden – Methodenringversuch Chlormequat / Mepiquat (Appendix II: Analytical Methods applied by the participating laboratories)

APPENDIX II:

Information about the analytical procedure(s) used is required from each laboratory according to this appendix.

If more than one method has been used, please label this and provide the relevant information for each method individually.

Please provide the information the latest 30th September 2009.

Notes:

- Provide the information in German or English language
 - Feel free to provide also additional information (not explicitly asked for) you consider of importance
 - Feel free to use this document or to provide the information in your individual style
-

23) Title / Name / Headline of applied method

24) Is the method accredited?

25) Sample preparation

Taking under consideration the following aspects:

- Sample weight used for analysis
- Any addition information not explicitly listed here but considered relevant

26) Sample conditioning

Taking under consideration the following aspects:

- Extraction technique used
- Extraction solvent(s)
- Adjustment of extract (like pH adjustment)?
- Clean-up steps and used instruments (e.g. columns and their fillings / filters)
- Any addition information not explicitly listed here but considered relevant

27) Calibration (for Quantification)

- Matrix-matched
- Solvent
- Multi-level
- Single-level
- Standard addition
- Isotopic labelled Standard
- Any addition information not explicitly listed here but considered relevant

28) Source of Standard (the organisation that sold the standard to you)

29) Is the quoted recovery (%) measured in the same analytical batch as the test material

30) If measured in this batch, at what stage was the spike added?

31) Level of spike ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

32) Composition of blank commodity used for spiking

Taking under consideration the following aspects:

- Blank provided
- Test material provided
- Other?

33) Pre-column

Taking under consideration the following aspects:

- length
- packaging
- Any addition information not explicitly listed here but considered relevant

34) Column

Taking under consideration the following aspects:

- length
- packaging
- Any addition information not explicitly listed here but considered relevant

35) Mobile Phase components (eluent)

Taking under consideration the following aspects:

- Kind of eluent (e.g. water)
- Special Preparation of Eluent (e.g. pH adjustment)

36) Mobile Phase programme including the flow rate

Taking under consideration the following aspects:

- Flow (ml/min)
- Description of gradient (if used)

37) Ionisation mode

38) Injection volume

39) Detector type

40) Quantification procedure
including mass transitions

Confirmation method:

- Same one?
- Different one(s)

If (a) different confirmation method(s) was (were) applied, please go through questions 1 – 18 again and answer to the suitable ones.

Eigene Veröffentlichungen

Publikationen:

Bruns, S., Lach, G. and Parlar, H. (2009): Analysis of Ethephon Residues in Tomato Purée Method Performance Assessment. Fresenius Environmental Bulletin, iss. 11a, pp. 2219-2223.

Bruns, S., Lach, G. and Parlar, H. (2010): Analysis of Chlormequat / Mepiquat in mushrooms and corresponding mushroom substrate (straw) Method Performance Assessment. Fresenius Environmental Bulletin, iss. 11, pp. 2597-2607.

Posterbeiträge:

Bruns, S., Lach, G. and Parlar, H., Reliability of pesticide residue analysis in food products on a day-to-day routine level. European Pesticide Residue Workshop (EPRW), Strasbourg 2010.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Silke Bruns
Geburtsdatum/-ort: 03.10.1971, Buxtehude
Wohnsitz: Vahrenwinkelweg 63, 21075 Hamburg

Schulbildung

1988 - 1991 Vincent-Lübeck-Gymnasium in Stade (allg. Hochschulreife)

Akademische Ausbildung

10/1991 - 07/1997 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg
03/1995 - 12/1995 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Dr. H. Steinhardt:
Charakterisierung von Hühnereiklarproteinen mittels Kapillarelektrophorese
03/1996 Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemikerin (1. Staatsexamen)
05/1996 - 10/1996 Lebensmittelüberwachung: Routineanalytik, Ringversuchsauswertungen;
Central Science Laboratory, Norwich, England
11/1996 - 04/1997 Überwachung von Kosmetika / Lebensmitteln: Analytik und
rechtliche Beurteilung (Gutachten); Hygiene Institut, Hamburg
08/1997 2. Staatsexamen zur staatlich geprüften Diplom-Lebensmittelchemikerin

Sonstige Tätigkeiten

02/1998 – 05/2000 Angestellte in einem Kosmetikunternehmen für Naturkosmetik
(KDH Cosmetics, Barmstedt)
06/2000 – 12/2000 Angestellte im Produktbereich Obst- und Gemüse bei der bofrost*
Dienstleistungs GmbH & Co. KG, Straelen
01/2001 – 08/2005 Angestellte bei der Eurofins-Gruppe an den Standorten Wiertz-Eggert-
Jörissen (allgemeine Lebensmittelanalytik und Kontaminanten) sowie Dr.
Specht Laboratorien (Pestizidrückstandsanalytik) in Hamburg
seit 09/2005 Partnerin der Lach & Bruns Partnerschaft, Beratende Chemiker
(Hamburg)

Sprachkenntnisse: Englisch, Französisch