

Berichte

aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Reports

from the Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry

Heft 43

1998

Leitlinie:

Rückstandsanalysenmethoden für die Überwachung

Stand: 21. Juli 1998

Guideline:

Residue analytical methods for post-registration control purposes

Date: 21st July 1998

Bearbeitet von
compiled by

Ralf Hänel und Johannes Siebers

Abteilung für Pflanzenschutzmittel und Anwendungstechnik
Department for Plant Protection Products and Application Techniques

Herausgeber

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Braunschweig, Deutschland

Verlag:

Eigenverlag

Vertrieb:

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Messeweg 11/12
D-38104 Braunschweig

ISSN-Nummer: 0947-8809

Kontaktadresse:

Dr. Ralf Hänel

Dr. Johannes Siebers

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Abteilung für Pflanzenschutzmittel und Anwendungstechnik
Messeweg 11/12

D-38104 Braunschweig

Telefon +49(0)5 31/299-35 10

-35 11

Telefax +49(0)5 31/299-30 04

© Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funk- sendung, der Wiedergabe auf fotomechanischen oder ähnlichen Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Vorwort

Das vorliegende Dokument soll allen Antragstellern eine Orientierung bezüglich der Datenanforderungen und Bewertung von Rückstandsanalysenmethoden für Überwachung und Monitoring ermöglichen. Es zielt darauf ab, den Antragstellern eine Hilfestellung zur Auslegung der Anhänge II, Teil A Nr. 4 und III, Teil A Nr. 5 der Richtlinie 91/414/EWG des Rates, geändert durch die Richtlinie 96/46/EG der Kommission zu geben, die die Mindestanforderungen für die Validierung von Rückstandsanalysenmethoden festlegen. In einigen Fällen kann es notwendig sein, Methoden in größerem Umfang zu validieren (z. B. mit einer erhöhten Anzahl an Zusatzversuchen oder zusätzlichen Testmatrices). Wenn der Leitlinie nicht gefolgt werden kann, muß eine vollständige Begründung vorgelegt werden, die dann im Rahmen einer Einzelfallentscheidung bewertet wird.

Das zur Zeit vom Ständigen Ausschuß Pflanzenschutz diskutierte Dokument "Guidance document on residue analytical methods, 8064/VI/97" wurde in dieser Leitlinie berücksichtigt. Die Leitlinie ist für Zulassungsanträge nach § 12 des Pflanzenschutzgesetzes (Fassung der Bekanntmachung vom 14. Mai 1998, BGBl. I S. 971, 1527), die ab dem 1. Februar 1999 gestellt werden, verbindlich.

Foreword

This document provides guidance to applicants on data requirements and assessment for residue analytical methods for post registration control and monitoring purposes. The document therefore attempts to provide guidance to applicants on possible interpretations of the provisions of section 4, part A of Annex II and section 5, part A of Annex III of Council Directive 91/414/EEC as amended by Commission Directive 96/46/EEC, which represents the minimum validation requirements for residue analytical methods. In certain cases it may be essential to validate methods on a larger scale (e. g. an increased number of fortification levels or additional test matrices). In cases where the guideline cannot be followed, full justification must be submitted and this will be evaluated on a case by case basis.

The "Guidance document on residue analytical methods" which is discussed by the Standing Committee on Plant Health at present was taken into account in this guideline. The guideline is obligatory for applications for authorisation according to article 12 of the Plant Protection Act (Version of 14th May 1998, Federal Law Gazette, Bundesgesetzblatt - BGBl. I S. 971, 1527) which will be submitted from 1st February 1999.

Inhalt

- 1 Allgemeines
 - 1.1 Methodenbeschreibung
 - 1.2 Allgemein gebräuchliche analytische Techniken
 - 1.3 Multimethoden
 - 1.4 Einzel- und Totalmethoden
 - 1.5 Methodvalidierung
 - 1.6 Chromatographische Absicherungsverfahren
 - 1.7 Immunoassays
 - 1.8 Gefährliche Reagenzien
- 2 Analysenmethoden für Rückstände in Pflanzen, pflanzlichen Erzeugnissen, Lebensmitteln (pflanzlichen und tierischen Ursprungs), Futtermitteln (*Anhang IIA Punkt 4.2.1 der Richtlinie 91/414/EWG*)
 - 2.1 Probenmaterialien
 - 2.2 Probenumfang
 - 2.3 Bestimmungsgrenze
 - 2.4 Unabhängige Laborvalidierung (Independent laboratory validation, ILV)
 - 2.5 Abstreifbare Rückstände
- 3 Analytische Methoden für Rückstände in Boden (*Anhang IIA, Punkt 4.2.2*)
 - 3.1 Probenmaterialien
 - 3.2 Probenumfang
 - 3.3 Bestimmungsgrenze
- 4 Analytische Methoden für Rückstände in Wasser (*Anhang IIA, Punkt 4.2.3*)
 - 4.1 Probenmaterialien
 - 4.2 Probenumfang
 - 4.3 Bestimmungsgrenze
- 5 Analytische Methoden für Rückstände in Luft (*Anhang IIA, Punkt 4.2.4*)
 - 5.1 Probenmaterial
 - 5.2 Probenumfang
 - 5.3 Bestimmungsgrenze
- 6 Analytische Methoden für Rückstände in Körperflüssigkeiten und Gewebe (*Anhang IIA, Punkt 4.2.5*)
 - 6.1 Probenmaterialien
 - 6.2 Parameter
 - 6.3 Probenumfang
- 7 Literatur

Content

- 1 General
 - 1.1 Description of an analytical method
 - 1.2 Analytical techniques considered commonly available
 - 1.3 Multi-residue methods
 - 1.4 Single methods and common moiety methods
 - 1.5 Method validation
 - 1.6 Confirmatory chromatographic methods
 - 1.7 Immunological methods of analysis
 - 1.8 Hazardous reagents
- 2 Analytical methods for residues in plants, plant products, foodstuff (of plant and animal origin), feedingstuff (*Annex IIA Point 4.2.1 of Directive 91/414/EEC*)
 - 2.1 Commodities
 - 2.2 Sample set
 - 2.3 Limit of quantification
 - 2.4 Independent laboratory validation (ILV)
 - 2.5 Dislodgeable residues
- 3 Analytical methods for residues in soil (*Annex IIA, Point 4.2.2*)
 - 3.1 Commodities
 - 3.2 Sample set
 - 3.3 Limit of quantification
- 4 Analytical methods for residues in water (*Annex IIA, Point 4.2.3*)
 - 4.1 Commodities
 - 4.2 Sample set
 - 4.3 Limit of quantification
- 5 Analytical methods for residues in air (*Annex IIA, Point 4.2.4*)
 - 5.1 Commodities
 - 5.2 Sample set
 - 5.3 Limit of quantification
- 6 Analytical methods for residues in body fluids and tissues (*Annex IIA, Point 4.2.5*)
 - 6.1 Commodities
 - 6.2 Parameter
 - 6.3 Sample set
- 7 References

1 Allgemeines

Nach der Leitlinie 7109/VI/94 rev. 6 (Anwendbarkeit der Guten Laborpraxis auf Datenanforderungen nach Anhang II Teil A und Anhang III Teil A der Richtlinie 91/414/EWG des Rates), die dem Ständigen Ausschuss für Pflanzenschutz vorgelegen hat, unterliegt die Entwicklung und Validierung einer Methode für Überwachung und Monitorings nicht der GLP. Wird diese Methode jedoch bei der Erarbeitung von Daten für die Zulassung angewendet, z. B. zur Ermittlung von Rückstandsdaten, dann müssen diese Untersuchungen nach GLP durchgeführt werden.

Die in Richtlinie 91/414/EWG des Rates genannten Anforderungen an Probenahme und Lagerung werden im vorliegenden Papier nicht behandelt (Orientierung in diesem Bereich gibt die Richtlinie 96/68/EWG der Kommission). Bis zur Entwicklung detaillierter Leitlinien für Boden, Wasser und Luft sollten allgemeine Informationen zur Lagerstabilität in Boden, Wasser und Adsorptionsmaterialien wie RP C18, Tenax und XAD mit der Beschreibung der Analysemethoden vorgelegt werden, es sei denn, es werden eigene Versuche zur Lagerstabilität durchgeführt.

1.1 Beschreibung der Analysemethoden

Die validierten Methoden müssen vollständig beschrieben werden. Die vorgelegten Beschreibungen sollten die folgenden Punkte enthalten:

- Einleitung, einschließlich Definition der zu analysierenden Substanz bzw. Substanzen und des Anwendungsbereiches der Methode
- Zusammenfassung der Methode, einschließlich validierter Matrices, Bestimmungsgrenzen und die Bereiche der Wiederfindungsraten sowie der Zusatzniveaus
- Geräte
- Reagenzien (einschließlich Hersteller und Reinheitsgrad sowie vollständige Angaben zur Reinheit der verwendeten Standardsubstanzen und zum zugehörigen Bestimmungsverfahren oder eindeutige Angabe der Herkunft bei im Handel erhältlichen Chemikalien)
- Probenvorbereitung
- Verfahren (Extraktion, Reinigung, Derivatisierung, Endbestimmung)
- Berechnung (einschl. Kalibrierkurven, Linearität, Korrelationskoeffizient r)
- Bewertung (Spezifität, Wiederfindungsraten, Bestimmungsgrenze, Wiederholbarkeit)
- Wichtige Punkte und besondere Hinweise für die Analyse (z. B. matrixabhängige Abweichung, Stabilität von Reagenzien)
- Repräsentative, eindeutig beschriftete Chromatogramme (Blindprobe, Standard, kleinster Zusatz [entsprechend der Bestimmungsgrenze] und Proben [wo möglich]) und/oder Spektren. Die Beschriftung sollte eine Beschreibung der Probe, eine chromatographische

Skala sowie eine Kennzeichnung aller relevanten Komponenten des Chromatogramms enthalten.

- Gefahren oder erforderliche Vorsichtsmaßnahmen
- Quellen/Literaturangaben

1.2 Allgemein gebräuchliche Analysentechniken

Die im folgenden zusammengestellte Methodik wird als allgemein gebräuchlich betrachtet:

- GC: PND, FPD, ECD, FID, MS-Detektor
- HPLC: UV, DAD, Fluoreszenz-Detektor, elektrochemischer Detektor, Normalphase, Umkehrphase, Ionenaustauscher, Ionenpaarchromatographie, Säulenschaltung
- AAS
- In begründeten Ausnahmefällen kann bei der Bestimmung der Analyte die Verwendung anderer Analysentechniken akzeptiert werden, die teuer und/oder nicht allgemein gebräuchlich sind bzw. viel Zeit für die Probenvorbereitung verlangen (z. B. die Bestimmung phytotoxischer Verbindungen im Boden).

Andere Techniken können leistungsfähige Hilfsmittel für die Rückstandsanalyse sein. Daher sollte in angemessenen Abständen diskutiert werden, ob weitere Verfahren als geeignet für Überwachungsmethoden angesehen werden können. Die analytische Methodik unterliegt einem ständigen Innovationsprozeß, jedoch vergeht bis zur allgemeinen Anerkennung und Verfügbarkeit neuer Verfahren immer einige Zeit. Daher gilt die vorliegende Liste, um einer Weiterentwicklung nicht im Wege zu stehen, zunächst bis zum 31. Dezember 2000.

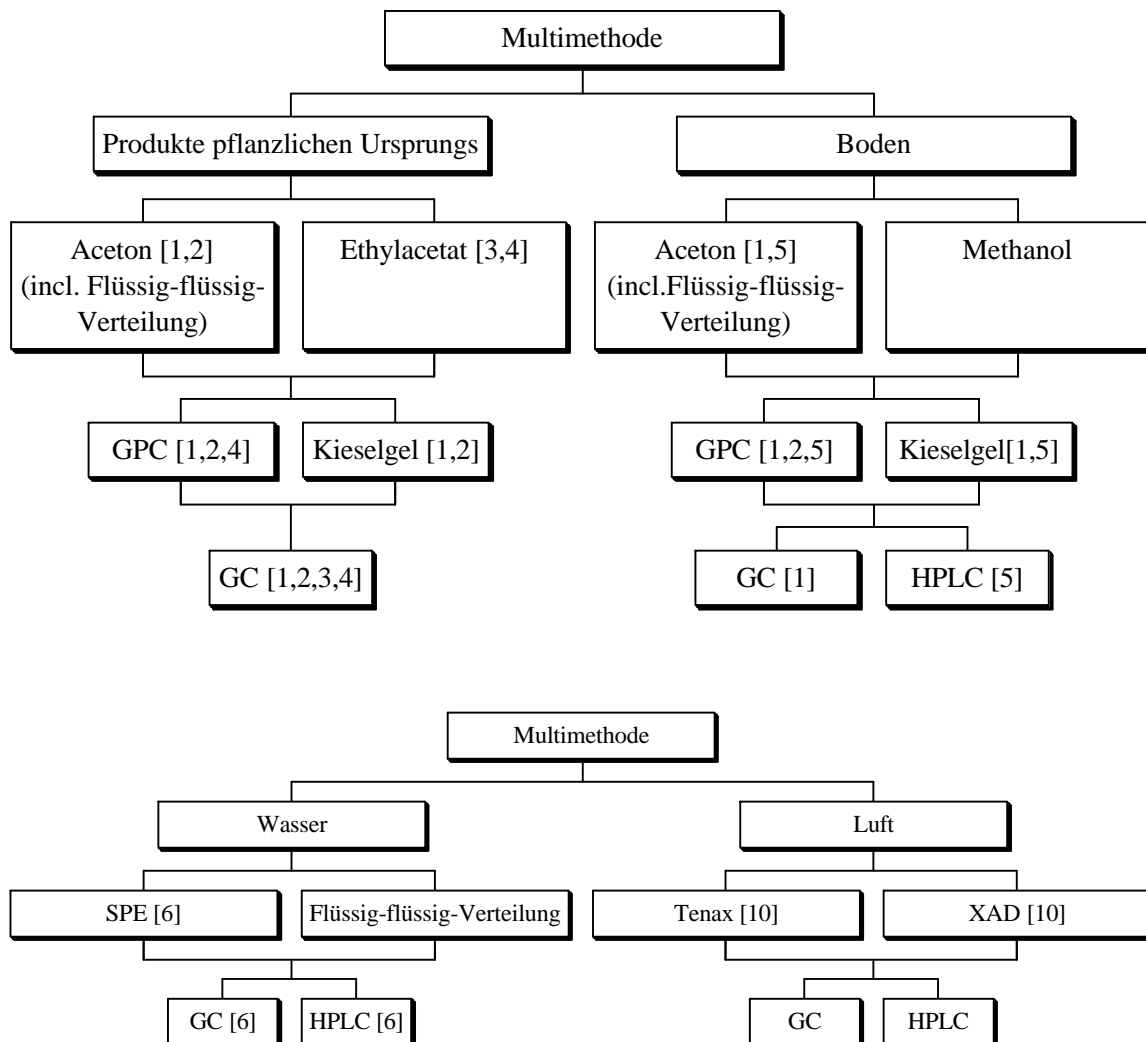
Anmerkung: Obwohl die MS-MS-Kopplung eine leistungsfähige Analysentechnik ist, wurde sie nicht in die obige Liste aufgenommen, da die Ausrüstung gegenwärtig nicht allgemein verfügbar ist. Die Situation wird jedoch, wie oben erwähnt, überprüft werden.

1.3 Multi-Methoden

Die vorgeschlagenen Rückstandsmethoden sollten grundsätzlich Multimethoden sein. Eine Standard-Multimethode, bestehend aus den unten aufgeführten Bausteinen, muß auf ihre Eignung geprüft und das Ergebnis der Prüfung einer vollständig validierten Methode muß berichtet werden¹. Die Methode zur Überwachung der Höchstmengen muß geeignet sein, alle in der Rückstandsdefinition enthaltenen Verbindungen zu bestimmen. Ebenfalls müssen alle Verbindungen von toxikologischer und/oder ökotoxikologischer Bedeutung in Boden, Wasser

¹ Diese Liste kann bei Bedarf ergänzt werden.

und Luft bestimmbar sein. Die Wahl der Multimethode hängt von den Eigenschaften der Analysensubstanzen ab. Das folgende Diagramm gibt einen Überblick über die Bestandteile der meisten Multimethoden (einschließlich Literaturangaben).



Wenn in den zitierten Methodensammlungen ausreichende Validierungsdaten vorliegen, ist es nicht erforderlich, weitere Versuche zur Anwendbarkeit durchzuführen.

Wegen der Komplexität der Multimethoden für tierische Erzeugnisse ist es hier nicht möglich, eine einfache Übersicht zusammenzustellen. Es wird hier auf die in den Quellen [4] und [11] beschriebenen Methoden verwiesen.

Für Körperflüssigkeiten und -gewebe gibt es keine speziell entwickelten Multimethoden. Die Matrix Gewebe kann jedoch zum Teil durch Methoden für Erzeugnisse tierischer Herkunft abgedeckt werden.

1.4 Einzelmethode und Totalmethoden

Können Pflanzenschutzmittelrückstände nicht mit einer Multimethode bestimmt werden, so muß eine andere Methode vorgeschlagen werden. Die Methode zur Überwachung der Höchstmengen muß geeignet sein, alle in der Rückstandsdefinition enthaltenen Verbindungen zu bestimmen. Ebenfalls müssen alle Verbindungen von toxikologischer und/oder ökotoxikologischer Bedeutung in Boden, Wasser und Luft bestimmbar sein. Wenn diese Anforderung dazu führt, daß eine Vielzahl von Methoden benötigt wird, kann eine Totalmethode akzeptabel sein. Diese muß jedoch ausreichend spezifisch sein und ihre Anwendung muß begründet werden. Die Anwendung von Totalmethoden sollte jedoch vermieden werden.

Bei der Analyse einiger Verbindungen, z. B. solcher mit hoher Polarität oder mit unzureichenden chromatographischen Eigenschaften, kann eine Derivatisierung erforderlich sein. Die Verbindungen können entweder vor der chromatographischen Untersuchung oder im Verlauf derselben derivatisiert werden (Vor- oder Nachsäulenderivatisierung). Wird ein Derivatisierungsverfahren angewendet, so muß es vollständig beschrieben und begründet werden. Das Derivat muß stabil sein und mit hoher Ausbeute (> 70%), bei akzeptabler Wiederholbarkeit, gebildet werden. Beruht die Quantifizierung auf der Bestimmung eines Derivats, so muß die Kalibrierung mit Standardlösungen dieses Derivats erfolgen. Diese Anforderungen gelten nicht, wenn die Derivatisierung Teil eines Online-Systems ist. Die Genauigkeit des Derivatisierungsschrittes in einem Online-System muß dennoch demonstriert werden. Das Verfahren wird für die analysierte Substanz als spezifisch betrachtet, wenn das Derivat für die analysierte Substanz spezifisch ist. Sofern das Derivat ein gemeinsames Derivat von zwei oder mehr Wirkstoffen bzw. ein anderer Wirkstoff ist, kann das Verfahren als nicht ausreichend spezifisch und daher als ungeeignet angesehen werden.

1.5 Methodvalidierung

Validierungsdaten sollten für repräsentative zu analysierende Probenmatrices vorgelegt werden. Wenn eine bereits zuvor validierte Methode verwendet wurde, müssen Validierungsdaten für zusätzliche repräsentative Matrices vorgelegt werden.

Die analytische Kalibrierung sollte sich über einen Bereich erstrecken, der von der niedrigsten bis zur höchsten nominalen Konzentration der Analysesubstanz \pm mindestens 20% reicht. Es müssen entweder je zwei Bestimmungen bei drei oder mehr Konzentrationen oder je eine Bestimmung bei fünf oder mehr Konzentrationen durchgeführt werden. Die Gleichung der Kalibrierkurve und der Korrelationskoeffizient (r) müssen berichtet und eine typische Kalibrierkurve vorgelegt werden.

Die Wiederholbarkeit sollte durch die relative Standardabweichung (%) und die Anzahl der Proben (n) ausgedrückt. Die relative Gesamt-Standardabweichung für jede Matrix wie auch die relative Standardabweichung für jedes Zusatzniveau müssen experimentell bestimmt und berichtet werden. Die relative Standardabweichung sollte im allgemeinen $\leq 20\%$ betragen. In bestimmten begründeten Ausnahmefällen, z. B. bei der Bestimmung von Rückständen in Boden unterhalb von 0.01 mg/kg, kann eine höhere Variabilität akzeptiert werden. Die durch eine geeignete Methode (z. B. den Grubbs^[7]- oder Dixons^[8]-Test) festgestellten Ausreißer können eliminiert werden. Wenn Ausreißer eliminiert wurden, muß dies deutlich angezeigt werden. Es muß eine geeignete Erklärung für das Auftreten einzelner Ausreißerwerte gegeben werden. Bei jedem Zusatzniveau darf höchstens ein Ausreißerwert eliminiert werden. Wird bei einem Zusatzniveau mehr als ein Ausreißerwert festgestellt, so müssen zusätzliche Proben untersucht werden.

Es muß eine geeignete Bestimmungsgrenze (BG; *limit of quantification, LOQ*) gemäß der Definition in der Richtlinie 96/46/EG einschließlich der einzelnen und der durchschnittlichen Wiederfindungsraten berichtet werden. Die mittlere Wiederfindungsrate sollte bei jedem Zusatzniveau und Substrat im Bereich von 70 - 110% liegen (in bestimmten begründeten Ausnahmefällen werden auch Wiederfindungsraten außerhalb dieses Bereichs akzeptiert). Sofern notwendig sollten die Wiederfindungsraten durch Blindwerte korrigiert werden. Die nicht korrigierten Wiederfindungsraten müssen, ebenso wie die Blindwerte, angegeben werden. Letztere müssen für die in den Zusatzversuchen verwendeten Matrix bestimmt werden und sollten 30% der Bestimmungsgrenze nicht überschreiten.

Wenn ein interner Standard mit aufgearbeitet wird (procedural internal standard), müssen Daten vorgelegt werden, die belegen, daß die Wiederfindungsraten der Analysesubstanz und des Standards ähnlich sowie reproduzierbar sind, um eine genaue Bestimmung der Rückstände zu ermöglichen.

Mögliche Matrixeffekte sind zu benennen. Gegebenenfalls sollte die Kalibrierung der Methode mit Hilfe von Standardlösungen in einer für die Analysesubstanz relevanten Matrix erfolgen. So sollten Matrix-Standards dort verwendet werden, wo die Wiederfindungsraten aufgrund von Störwirkungen durch die Matrix außerhalb des zulässigen Bereiches liegen.

1.6 Chromatographische Absicherungsverfahren

Zur Demonstration der Spezifität sind Absicherungsverfahren erforderlich. Bei der Wahl eines geeigneten Verfahrens sollten die Eigenschaften des Analyten in Betracht gezogen werden. Die folgenden Techniken werden als akzeptable Absicherungsverfahren angesehen:

- GC-MS, eine ausreichende Anzahl von Fragmentionen muß gemessen und der Grund für ihre Auswahl angegeben werden.
- HPLC-DAD, sofern das UV-Spektrum charakteristisch ist. In diesem Falle muß ein unter den Bedingungen der Bestimmung aufgenommenes UV-Spektrum vorgelegt werden.
- Das chromatographische Prinzip unterscheidet sich von dem der Originalmethode (HPLC \Leftrightarrow GC).
- Alternatives Detektionsverfahren
- Derivatisierung, sofern die zu bestätigende Methode keine Derivatisierung beinhaltet.
- Unterschiedliche stationäre und/oder mobile Phase unterschiedlicher Selektivität

In besonderen Fällen kann zusätzlich die Modifikation von Verteilungs- und/oder Reinigungsschritten für die Absicherung von Nutzen sein.

Anmerkung:

Je nach den Eigenschaften der Analysesubstanz muß ein angemessenes Absicherungsverfahren gewählt werden. Die Entwicklung eines Absicherungsverfahrens ist nicht notwendig, wenn die ursprüngliche Methode GC-MS oder eine andere hochspezifische Methode ist. GC-MS wird als hochspezifisch betrachtet, wenn mindestens drei Fragmentionen mit einem m/z -Verhältnis von > 100 für die Identifizierung und Quantifizierung verwendet wurden. Die Ionen sowie eine Begründung für die Auswahl sind anzugeben.

1.7 Immunoassays

Grundsätzlich können Immunoassays für Überwachungszwecke angewendet werden, vorausgesetzt die jeweilige Methode wurde adequat validiert und es existiert ein unabhängiges Absicherungsverfahren. Bei der Anwendung solcher Methoden sind jedoch einige wichtige Punkte zu beachten, die im folgenden diskutiert werden.

Methodenbeschreibung:

- Es müssen vollständige Beschreibungen der Bildung von Antikörpern oder ihrer Herkunft, der Hapten-Synthese, von Details sämtlicher Reaktionsschritte der Methode und ggf. der Enzymreaktion vorgelegt werden.
- Test-Kits sollten im Handel erhältlich sein. Die Adresse des Vertreibers muß genannt werden.
- Statt Chromatogrammen müssen repräsentative Daten, wie z. B. die Kalibrierkurve der Standardsubstanz, vorgelegt werden.

Methodenvalidierung:

- Die Validierung muß für jede relevante Probenmatrix durchgeführt werden. Ein möglicher Einfluß der Probenmatrix auf die Durchführung des Tests muß angegeben werden. Werden

Matrixeinflüsse beobachtet, sollten Kalibrierstandards verwendet werden, die aus Extrakten unbehandelter Proben hergestellt wurden.

- Andere strukturell verwandte Wirkstoffe, Verunreinigungen oder Metabolite können mit den für die zu untersuchende Substanz entwickelten Antikörpern Kreuzreaktionen zeigen. Die Kreuzreaktivität potentieller Störsubstanzen sollten im Vergleich zur Untersuchungssubstanz ausgedrückt werden (z. B. durch das Verhältnis der Konzentrationen, die einen bestimmten Meßwert im Test ergeben). Bei gleichzeitiger Bestimmung mehrerer Analysesubstanzen (z. B. der gleichzeitigen Bestimmung von Ausgangsverbindung und relevanten Metaboliten) sollte das Verhältnis der Kreuzreaktivitäten so sein, daß eine für die gesamte Bestimmung ausreichende Genauigkeit erreicht wird. Zu diesem Zweck müssen Kreuzreaktivitäten entweder bekannt sein oder es muß gezeigt werden, daß diese additiv sind. Potentielle Kreuzreaktivitäten mit allen strukturell verwandten Verbindungen und einer repräsentativen Probe anderer Wirkstoffe müssen berücksichtigt werden.
- Für die Extraktion sollten geeignete Lösemittel verwendet werden, die keine größeren Interferenzen verursachen. Die kritische Konzentration des Lösemittels muß angegeben werden.
- Die Spezifität der Methode muß der Rückstandsdefinition entsprechen.
- Alle Berechnungen und Transformationen der Konzentrations-Meßwert-Kurve müssen eindeutig berichtet und validiert werden. Die Transformierung von Daten muß validiert werden.
- Bei gleichzeitiger Bestimmung mehrerer Analyte sollte die Kalibrierkurve (Absorption in Abhängigkeit von der Analytkonzentration) mit dem selben Verhältnis der Analyte entwickelt werden, wie es in den Proben zu erwarten ist, da anzunehmen ist, daß die Kreuzreaktivität der einzelnen Analyte unterschiedlich sind.
- Bei der Bewertung der Genauigkeit gleichzeitiger Bestimmungen mehrerer Analyte gemäß der Rückstandsdefinition sollte die Aufstockung das in den Proben und im Kalibriergemisch zu erwartende Verhältnis der Analyte widerspiegeln.

Absicherungsverfahren:

- Zur eindeutigen Identifizierung der Analyten ist ein nicht-immunologisches Absicherungsverfahren erforderlich. Dieses sollte mit einer statistisch repräsentativen Anzahl² sowohl positiver als auch negativer Proben durchgeführt werden. Korrelationsdaten, die die Vergleichbarkeit des Immunoassays mit der herkömmlichen Methode zeigen, sollten berichtet werden.
- Die Identität des Analyten sollte in jeder Probe, die toxikologisch oder umweltrelevante Mengen des Analyts enthält, bestätigt werden.

1.8 Gefährliche Reagenzien

² Mindestens 5 Proben je aus den positiven und den negativen Proben der Rückstandsversuche.

Gefährliche Reagenzien sollten nach Möglichkeit nicht verwendet werden. Chloroform und Benzen (Benzol) dürfen nicht verwendet werden. Sie müssen durch weniger gefährliche Lösemittel ersetzt werden.

2 Analysenmethoden für Rückstände in Pflanzen, Pflanzenerzeugnissen, Lebensmitteln (pflanzlichen und tierischen Ursprungs), Futtermitteln (Anhang IIA Punkt 4.2.1 der Richtlinie 91/414/EWG)

Zweck

Analyse von Pflanzen, Pflanzenerzeugnissen und Lebensmitteln zur Überwachung der Rückstandshöchstmengen (HM)

Ausnahme: Wirkstoffe (z. B. Lecithin, Rapsöl, Rodentizide), für die keine Höchstmenge festgelegt oder vorgeschlagen wurde.

2.1 Probenmaterialien

- Pflanzen

Angaben über die Wiederfindungsraten müssen für repräsentative zu analysierende Probenmatrices vorgelegt werden. Zur Validierung von Methoden zur Bestimmung von Rückständen in Produkten pflanzlichen Ursprungs sollten repräsentative Probenmaterialien aus den folgenden Kulturgruppen verwendet werden:

- Getreide und andere trockene Erntegüter (z. B. Gersten, Weizen, Roggen, Hafer)
- Produkte mit hohem Wassergehalt (z. B. Salat, Tomaten, Kirschen, Erdbeeren)
- Produkte mit hohem Fettgehalt (z. B. Rapssamen, Leinsamen, Oliven, Nüsse, Avocado)
- Früchte mit hohem Säuregehalt (z. B. Zitronen, Orangen, Grapefruit, z. T. Äpfel)

Ist das beantragte Anwendungsgebiet auf eine der oben genannten Matrixgruppen beschränkt, so muß die Methode nur mit einer repräsentativen Matrix aus dieser Gruppen validiert werden, wenn für andere Erntegüter keine Höchstmenge festgelegt oder vorgeschlagen ist. Wenn das Pflanzenschutzmittel in schwer zu analysierenden Erzeugnissen (z. B. Hopfen, Brassica-Arten, Zwiebelgemüse, Kräuter, Tee) angewendet wird, so muß die Analysemethode für diese Matrices validiert werden.

- Lebensmittel tierischen Ursprungs

Zur Validierung von Methoden zur Bestimmung von Rückständen in Erzeugnissen tierischen Ursprungs sollten die folgenden tierischen Matrices verwendet werden, wenn eine Höchstmenge festgelegt wurde oder wahrscheinlich vorgeschlagen wird:

- Milch
- Eier
- Fleisch

- Fett, wenn der $\log P_{o/w} > 3$ und Metabolismusuntersuchungen auf signifikante Rückstände in Fett hindeuten (0.01 mg/kg oder über der Bestimmungsgrenze, sofern diese größer als 0.01 mg/kg ist).

Andere Gewebe wie Niere oder Leber nur, wenn für diese Gewebe eine Höchstmenge festgelegt oder vorgeschlagen wurde.

Wenn nach Richtlinie 96/68/EG keine Metabolismusuntersuchungen an Tieren erforderlich sind, ist ebenfalls keine Analysenmethode zur Bestimmung von Rückständen in Nahrungsmitteln tierischer Herkunft erforderlich. Wenn andererseits nach Richtlinie 96/68/EG (Punkt 6.4) eine Fütterungsstudie durchgeführt werden muß, muß eine Analysenmethode zur Bestimmung von Rückständen in Erzeugnissen tierischer Herkunft vorgelegt werden. Im übrigen ist eine Analysenmethode vorzulegen, wenn für die betreffenden Lebensmittel tierischen Ursprungs Höchstmengen festgelegt worden sind.

2.2 Probenumfang

Wiederfindungsraten müssen für die folgenden Zusatzniveaus angegeben werden:

- Bestimmungsgrenze (BG) 5 Proben
- 10fache BG oder HM, wenn $HM > 10$ fache BG 5 Proben
- Kontrolle 2 Proben

Sind Matrices schwer zu analysieren und wird das entsprechende Pflanzenschutzmittel nur in geringem Umfang eingesetzt (z. B. Lückenindikation), kann eine reduzierte Anzahl von Proben ausreichend sein. Das Minimum sind jedoch sechs Proben (drei für jedes Zusatzniveau) und eine Kontrolle.

2.3 Bestimmungsgrenze

Die Methode muß die folgenden Kriterien erfüllen, es sei denn, die (vorgeschlagene) Höchstmenge liegt auf der Bestimmungsgrenze:

HM (mg/kg)	BG (mg/kg)
> 0.1	≤ 0.1
0.1	≤ 0.05
0.05	≤ 0.02
< 0.05	$\leq HM \times 0.5$

2.4 Validierung durch ein unabhängiges Labor

Wenn die Methode für alle unter 2.1 aufgeführten Matrices identisch ist, kann es ausreichend sein, die Validierung durch ein unabhängiges Labor (independent laboratory validation - ILV) für Pflanzenmaterialien mit weniger, jedoch mindestens zwei, Matrices durchzuführen, wovon eine einen hohen Wassergehalt aufweisen muß. Bei Lebensmitteln tierischer Herkunft sollte die ILV mit mindestens zwei der unter 2.1 genannten Matrices durchgeführt werden.

Einzelmethode

Die Ergebnisse einer ILV müssen immer berichtet werden bei Analysemethoden für die Bestimmung von Rückständen in Pflanzenmaterialien und ebenso bei Analysemethoden für die Bestimmung von Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, sofern eine Methode vorgelegt werden muß.

Das Labor, das die unabhängige Validierung durchführen soll, darf nicht an der Methodenentwicklung und späteren Anwendung der Methode beteiligt gewesen sein. Ist dieses Kriterium erfüllt, kann das betreffende Labor auch Teil der Organisation des Antragstellers sein.

Wenn das betreffende Labor mit den Entwicklern der Methode Kontakt aufnehmen muß, um die Analyse nachzuvollziehen, so muß dies berichtet werden. Veränderungen oder Ergänzungen der ursprünglichen Methode müssen ebenfalls berichtet werden.

Im ILV-Bericht muß eine Aussage bezüglich der Eignung der Originalmethode gemacht werden.

Multimethode

Hier muß die Voraussetzung, daß das ILV-Labor nicht an der Entwicklung der Methode und ihrer anschließenden Anwendung beteiligt gewesen sein darf, nicht erfüllt werden. Allerdings muß die Eignung der Multimethode für den Wirkstoff und relevante Metabolite in einem zweiten Labor überprüft werden. Bei Alt-Wirkstoffen ist diese Überprüfung in einem anderen Labor nicht zwingend, wenn die Eignung der Methode für den betreffenden Wirkstoff in einer offiziellen Methodensammlung anerkannt ist. Jede Änderung oder Ergänzung an der Multimethode muß berichtet werden.

Der ILV-Bericht muß eine Aussage bezüglich der Eignung der Originalmethode enthalten.

2.4.1 Probenumfang

Wiederfindungsraten müssen für die folgenden Zusatzniveaus angegeben werden:

- Bestimmungsgrenze (BG) 5 Proben
- 10fache BG oder HM, wenn $HM > 10\text{fache BG}$ 5 Proben
- Kontrolle 2 Proben

Anmerkung:

Wenn eine validierte Methode als Überwachungsmethode für neue Erzeugnisse, die nicht den unter Punkt 2.1 genannten Gruppen von Erntegütern zuzuordnen sind, angewendet werden soll, dann muß für diese zusätzlichen Erzeugnisse eine Validierung in einem unabhängigen Labor vorgenommen werden.

2.5 Abstreifbare Rückstände

Daten zu den abstreifbaren Rückständen werden bei der Abschätzung der dermalen Exposition von Arbeitern, die mit behandelten Pflanzen in Berührung kommen, verwendet. Die Risikobewertung wird von Toxikologen vorgenommen. Allgemein ist für die Probenahme und Bestimmung von abstreifbaren Rückständen die Methode von Iwata et al.^[9] anwendbar. In besonderen Fällen sollte der Antragsteller/Notifizierer eine Aussage zu dieser Methode treffen.

3 Analysenmethoden für Rückstände in Boden (*Anhang IIA, Punkt 4.2.2*)

Zweck

Monitoring, Überwachung von Auflagen, Kontrollen nach der Zulassung, Sofortmaßnahmen im Falle eines Unfalls (Richtlinie des Rates 91/414/EWG, Richtlinie der Kommission 94/37/EG)

Ausnahme: Natürlich vorkommende nicht-toxische Wirkstoffe, bei denen eine Überwachung nicht sinnvoll ist (z. B. Lecithin, Rapsöl). Analysenmethoden für Rückstände in Boden sind nicht erforderlich, wenn die DT_{90} -Werte des Wirkstoffes und der relevanten Metaboliten unter 3 Tagen liegen³ (z. B. Fosetyl).

3.1 Probenmaterialien

- Repräsentativer Boden von landwirtschaftlich genutzter Fläche

3.2 Probenumfang

- BG (nicht höher als 0.05 mg/kg) 5 Proben
- 10fache BG 5 Proben
- Kontrolle 2 Proben

3.3 Bestimmungsgrenze

Wenn die für empfindlichen Kulturen phytotoxische Konzentration oder die für Nicht-Zielorganismen toxische Konzentration geringer als 0.05 mg/kg ist (dies entspricht einer Aufwandmenge von 75 g Wirkstoff/ha, bei einer Bodentiefe von 10 cm und einer Bodendichte von 1.5 g/cm³), muß die Bestimmungsgrenze der Methode kleiner oder gleich dieser Konzentration sein.

Methoden für besonders phytotoxische Verbindungen verlangen möglicherweise hochentwickelte Techniken, um die geforderte Bestimmungsgrenze zu erreichen. In solchen Fällen können auch nicht allgemein gebräuchliche Methoden wie HPLC-MS-MS akzeptiert werden. Als Screening-Test kann ein Biotest von Nutzen sein um auszuschließen, daß Rückstände von phytotoxischen Verbindungen vorkommen. Derartige Methoden ermöglichen zwar keine genaue Bestimmung der Menge des vorhandenen Wirkstoffes, noch kann mit ihrer Hilfe immer die Identität des Wirkstoffs festgestellt werden, jedoch erhält man eine ungefähre Orientierung bezüglich der Frage, ob biologisch aktive Wirkstoffmengen vorhanden sind.

³ Im allgemeinen sind Ergebnisse von Rückstandsanalysen nicht aussagekräftig, wenn der DT_{90} weniger als drei Tage beträgt.

4 Analysenmethoden für Rückstände in Wasser (Anhang IIA, Punkt 4.2.3)

Zweck

Überwachung des Trinkwassergrenzwertes oder des Oberflächenwassers, Monitoring, Sofortmaßnahmen im Falle eines Unfalls (Richtlinie des Rates 91/414/EWG, Richtlinie der Kommission 94/37/EG)

Ausnahme: Natürlich vorkommende nicht-toxische Wirkstoffe, bei denen eine Überwachung nicht sinnvoll ist (z. B. Lecithin, Rapsöl). Analysenmethoden sind für Rückstände in Wasser nicht erforderlich, wenn die DT₉₀-Werte des Wirkstoffes und der relevanten Metaboliten unter 3 Tagen liegen⁴ (z. B. Fosetyl).

4.1 Probenmaterialien

- Trinkwasser, Grundwasser
- Oberflächenwasser⁵ (z. B. Flußwasser, Teich- oder Meerwasser)

4.2 Probenumfang

- Bestimmungsgrenze (BG) 5 Proben
- 10fache BG 5 Proben
- Kontrolle 2 Proben

4.3 Bestimmungsgrenze

Für Trinkwasser muß die Bestimmungsgrenze bei 0,1 µg/l (EU-Trinkwassergrenzwert) oder darunter liegen. Für Oberflächenwasser darf die BG eine Konzentration nicht überschreiten, die nach den Kriterien des Anhang VI unannehmbare Auswirkungen auf Nicht-Zielorganismen hat. Die relevanten Konzentrationen sind wie folgt von den Arten abhängig und können den Toxizitätsuntersuchungen entnommen werden:

Fische*

Akuter Test: LC₅₀ Langzeittest: NOEC

Daphnien*

Akuter Test: EC₅₀ Langzeittest: NOEC

Algen: EC₅₀

Höhere Wasserpflanzen: EC₅₀

* Die EU-Richtlinie 8075/VI/97 gibt eine Orientierung darüber, ob die Werte des akuten oder des Langzeittests zu verwenden sind.

Diese Konzentrationen werden zur Bewertung herangezogen, bis in der EU harmonisierte Richtwerte für Konzentrationen in Oberflächenwasser festgelegt werden.

⁴ Im allgemeinen sind Ergebnisse von Rückstandsanalysen nicht aussagekräftig, wenn der DT₉₀ weniger als drei Tage beträgt.

⁵ Es müssen der Ort der Probenahme und die Eigenschaften der Probe (pH, DOC, Gesamthärte, ...) berichtet werden.

5 Analysenmethoden für Rückstände in der Luft (*Anhang IIA, Punkt 4.2.4*)

Zweck

Überwachung der Exposition von Anwendern, Betriebspersonal oder in der Nähe befindlichen Personen und Messungen am Arbeitsplatz.

Ausnahme: Wenn die Art der Anwendung keine relevante Exposition erwarten läßt und bei natürlich vorkommenden nicht-toxischen Wirkstoffen (z. B. Lecithin und Rapsöl).

5.1 Probenmaterialien

- Luft (bei Raumtemperatur und normaler Feuchtigkeit sowie bei ca. 35 °C und mindestens 80% Luftfeuchte). Bei ausreichenden Wiederfindungsraten genügen Versuche bei ca. 35 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von mindestens 80%.

5.2 Probenumfang

- BG ($\leq C$, wenn mögl. $\leq 0.1 C$) 5 Proben
- 10fache BG oder
erwarteter Konzentration 5 Proben
- Kontrolle 2 Proben

5.3 Bestimmungsgrenze

Wenn nach Richtlinie 80/1107/EWG Grenzwerte festgelegt wurden, muß die Bestimmungsgrenze (BG) bei diesem Grenzwert oder darunter liegen. Wenn kein Grenzwert festgelegt wurde, darf die BG die folgendermaßen definierte Konzentration C nicht übersteigen:

$$C = \frac{AOEL_{\text{inhalativ}} \cdot 0.1 \cdot 60}{20} \text{ [mg/m}^3 \text{ air]}$$

- 0.1 Sicherheitsfaktor
- 60 Körpergewicht in kg
- 20 Atemvolumen [Volumen pro Tag in m³]

Der $AOEL_{\text{inhalativ}}$ kann durch den $AOEL_{\text{systemisch}}$ ersetzt werden. Sollten beide AOEL-Werte nicht verfügbar sein, kann der festgelegte oder vorgeschlagene ADI-Wert verwendet werden. Die Methoden müssen geeignet sein, partikel-gebundene und gasförmige Rückstände zu erfassen. Als Nachweis genügt der Verweis auf Literatur, die belegt, daß die verwendeten Sorptionsmittel auch die partikelgebundenen Rückstände zurückhalten. Die Rückhaltekapazität des Sorptionsmittels muß bestimmt werden. Dies sollte durch Bestimmung der Wiederfindungsraten des Wirkstoffes und/oder Metaboliten bei einer definierten Lufttemperatur und -feuchtigkeit nach Durchfluß eines bestimmten Luftvolumens über mindestens 6 Stunden

erfolgen. Es muß das Durchbruchvolumen oder, wenn kein Durchbruch erfolgt, die maximale getestete Kapazität (μg Wirkstoff pro Adsorptionseinheit) angegeben werden^[10].

Die Gefahr einer Exposition für Anwender, Betriebspersonal und sich in der Nähe befindliche Personen durch Abtrift sowie partikelgebundene Wirkstoffe und/oder relevante Metabolite, muß berücksichtigt werden. Deshalb ist es notwendig, daß auch für Stoffe mit geringem Dampfdruck ($< 10^{-5}$ Pa) Analysenmethoden vorgelegt werden.

6 Analysenmethoden für Rückstände in Körperflüssigkeiten und Geweben (Anhang IIA, Punkt 4.2.5)

Zweck

Bestimmung von Stoffen, die für Mensch und Tier akut toxikologisch relevant sind.

Ausnahme: Der Wirkstoff ist nicht als toxisch oder sehr toxisch eingestuft.

6.1 Probenmaterialien

- Blut
- Gewebe (wenn nicht unter Lebensmittel validiert)

6.2 Parameter

- BG (allgemein):

Blut	0.05 mg/l
Gewebe	0.1 mg/kg

(Fleisch oder Leber, wenn nicht unter Lebensmittel tierischen Ursprungs, Abschnitt 2, untersucht)

6.3 Probenumfang

- BG 5 Proben
- Kontrolle 2 Proben

7 Literatur

- [1] *Manual of Pesticide Residue Analysis*, H.-P. Thier, H. Zeumer (Edit.), DFG Pesticides Commission, Vol. I + II, VCH Weinheim, **1987**.
- [2] W. Specht, S. Pelz, W. Gilsbach, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, 353, 183-190.
- [3] A. Anderson, H. Pålsheden, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1991**, 399, 365-367.
- [4] *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*, Ministry of Public Health, Welfare and Sport, The Netherlands, 6. Edition, **1996**.
- [5] Anonymous, *Agribiol. Res.* **1993**, 46 (2), 155-174.
- [6] *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung, physikalische, chemische, biologische und bakteriologische Verfahren*, Fachgruppe Wasserchemie i. d. GDCh mit dem Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im Deutschen Institut für Normung e. V. (DIN) (Edit.), Band V, VCH Weinheim, Beuth Verlag, Berlin **1996**, Gruppe F: Gemeinsam erfaßbare Stoffgruppen.
- [7] F. E. Grubbs, G. Beck, *Technometrics* **1972**, 14, 847.
- [8] W. J. Dixon, *Ann. Math. Stat.* **1951**, 22, 68.
- [9] Y. Iwata, J. B. Knaak, R. C. Spear, R. J. Foster, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1977**, 18, 649-655.
- [10] M. Blacha-Puller, J. Goedicke, K.-H. Leist, H.-G. Nolting, J. Pauluhn, D. Pick, R. Pfeil, K. Riegner, J. Siebers, *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **1994**, 46, 60-61.
- [11] EN 1528, Fatty food – Determination of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs), **1997**
 - Part 1: General
 - Part 2: Extraction of fat, pesticides and PCBs, and determination of fat content
 - Part 3: Clean-up methods
 - Part 4: Determination, confirmatory tests, miscellaneous