

Bestimmung von ausgewählten Pflanzenbehandlungsmitteln in Wässern mit Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und UV-Detektion nach Fest-Flüssig-Extraktion

1 Arbeitsgrundlagen

- DIN EN ISO 11369; Bestimmung ausgewählter Pflanzenbehandlungsmittel. Verfahren mit der Hochauflösungs-Flüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion nach Fest-Flüssig-Extraktion (November 1997)
- DIN 38 402 - A 51; Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen (Mai 1986)
- DIN 32 645; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze Ermittlung unter Wiederholbedingungen Begriffe, Verfahren, Auswertung (Mai 1994)
- AQS-Merkblätter für die Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
Herausgegeben von der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA)
Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., Berlin 1991

Weitere Literatur siehe Abschnitt 5

2 Zweck

Dieses Merkblatt ergänzt die Norm DIN EN ISO 11369 zur Bestimmung ausgewählter Pflanzenbehandlungsmittel und einiger ihrer Abbauprodukte in Grund- und Trinkwasser und gibt Hinweise zur praktischen Durchführung. Es legt außerdem Maßnahmen zur Analytischen Qualitätssicherung (AQS) fest.

Die Norm und das AQS-Merkblatt können darüber hinaus für weitere Pflanzenbehandlungsmittel und Abbauprodukte, z.B. die in Tabelle 1 genannten, angewendet werden, vorausgesetzt, dass die Richtigkeit im Einzelnen durch laborinterne Verfahrenskenndaten dokumentiert wird.

Die Eignung des Verfahrens für Oberflächenwasser und besonders für Abwasser ist im Einzelfall zu prüfen. Dabei ist bei Proben mit hohem Matrixanteil eine Reinigung des Probenextraktes vorzunehmen, um störende Begleitstoffe abzutrennen. Zusätzlich kann das im Anhang 3 beschriebene Vortrennungsverfahren angewendet werden.

Die Anweisungen zur Behebung von Störungen bzw. Fehlerquellen werden durch Kursivdruck dargestellt.

3 Maßnahmen zur Qualitätssicherung

3.1 Reagenzien

3.1.1 RP-C18 Adsorptionsmaterial

Anstelle von RP-C18-Material können auch andere Adsorbentien, z.B. auf Basis von Polystyrol / Divinylbenzol verwendet werden, vorausgesetzt die Materialien erfüllen die in Abschnitt 3.4.1.1 genannten Anforderungen.

3.1.2 Referenzsubstanzen

Reinheit > 98%, oder soweit verfügbar Lösungen mit definiertem Gehalt.

3.1.3 Stamm- und Bezugslösungen

Zum Ansetzen der Stamm- und Bezugslösungen sollen Acetonitril bzw. Methanol verwendet werden.

Entgegen Abschnitt 5.9 der Norm soll Aceton nicht als Lösemittel verwendet werden (siehe Abschnitt 3.4.2.2).

Vor Verdunstung schützen, Prüfung z.B. durch Wägung der Lösungen vor und nach Gebrauch.

3.1.3.1 Einzellösungen

Auf Grund der begrenzten Löslichkeit von Simazin in Acetonitril darf dessen Massenkonzentration in der Stammlösung nicht mehr als 0,1 mg/ml betragen.

3.1.3.2 Stammlösung

Zertifizierte Standardlösungen für die in den Tabellen 1 und 2 aufgeführten Stoffe sind im Handel erhältlich. Sie sind stichprobenartig gegen Standards anderer Herkunft (siehe Abschnitt 3.1.3.4) zu prüfen.

3.1.3.3 Bezugslösungen

Werden die Bezugslösungen länger als eine Woche verwendet, so ist die Haltbarkeit mit einer frisch hergestellten Bezugslösung exemplarisch nachzuweisen.

3.1.3.4 Kontrollstandard

Unabhängig von der Stammlösung hergestellte Standardlösung der Pflanzenbehandlungsmittel. Hinsichtlich der Haltbarkeit gilt das in Abschnitt 3.1.3.3 genannte Vorgehen.

3.1.4 Pufferlösung

Bei den üblichen HPLC-Säulen sind Pufferlösungen mit einer Stoffmengenkonzentration von 1-2 mmol/l normalerweise ausreichend, um stabile Retentionszeiten und symmetrische Peaks zu erhalten.

Die Pufferlösung für die Gradientenelution muss vor Gebrauch frisch angesetzt werden. Sie kann aus einer konzentrierten Pufferlösung hergestellt werden,

z.B. 1 ml einer Ammoniumacetatlösung, $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 1 \text{ mol/l}$, über ein Membranfilter (nach 3.2.1) zu 1000 ml Wasser (nach 5.1 der Norm) geben.

Die konzentrierte Pufferlösung ist vor Licht geschützt bei etwa 4 °C aufzubewahren. Sie ist bei sachgerechter Lagerung mindestens 1 Monat haltbar.

3.2 Geräte

3.2.1 Mikromembranfilter für die Klarfiltration von Extrakten

Einmal-Spritzenvorsatzfilter mit hydrophiler Membran und minimalem Totvolumen (z.B. 14 mm Durchmesser) entsprechend Abschn. 6.11 der Norm.

3.2.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph mit UV-Detektor (vorzugsweise DAD)

Bei der Inbetriebnahme des HPLC-Messplatzes sind die Anleitungen des Geräteherstellers zu beachten. Die Einhaltung der vom Hersteller garantierten Spezifikationen ist regelmäßig zu prüfen.

Bei den in Anhang 1 genannten Arbeitsbedingungen kann die erforderliche Temperaturkonstanz auch mit einem Säulenofen (anstelle eines Thermostaten) erreicht werden.

Der Detektor muss in der Lage sein, mindestens 3 Spektren pro Peak und mindestens ein zeitnahes Basislinienspektrum aufzunehmen. Dabei muss die spektrale Auflösung so hoch sein, dass das Absorptionsspektrum von Methabenzthiazuron deutlich eine Bande bei etwa 294 nm zeigt (s. Bild 1). Ein Festwellenlängendetektor ist entgegen der Norm nur zulässig für die Aussage, dass die Intensität des Messsignals unterhalb der des niedrigsten Arbeitsstandards liegt.

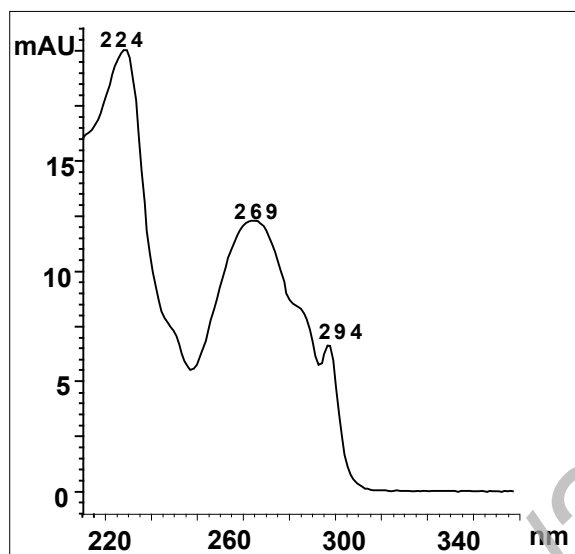


Bild 1: Absorptionsspektrum von Methabenzthiazuron

Chromatographische Bedingungen:

Säule: Hypersil ODS 3 μm (250 x 2 mm)

Temperatur: 42 °C

Flussrate: 0,2 ml/min

Eluent: A: 1 mmol Ammoniumacetat / Wasser,

B: Acetonitril, linearer Gradient von 12,5 % B nach 85 % B in 90 min

Injektion: 20 μl Pflanzenbehandlungsmittel - Standard, B (Methabenzthiazuron)= 500 ng/ml

Detektionsbedingungen:

Detektor: DAD, Zellevolumen=13 μl , d=10 mm

Wellenlängenbereich für die Spektrenaufnahme: 210 - 400 nm, Abtastrate 1 nm, Apexspektrum

3.3 Probennahme und Proben

Die Probennahme und Probenaufbewahrung ist unter Berücksichtigung der Besonderheiten der jeweiligen Probenmatrix (z.B. gemäß den Normen DIN 38402- A11 bis A21, ISO 5667) durchzuführen.

3.4 Durchführung

3.4.1 Probenvorbereitung

3.4.1.1 Anforderungen

Vor der Anwendung des Analysenverfahrens ist die Probenvorbereitung zu optimieren und die Bedingungen sind festzulegen. Hierbei müssen bei Trink- oder Reinstwasser für alle Substanzen der Tabelle 1 mittlere Wiederfindungsraten von 80 % bis 110 % erreicht werden. Dabei sollte eine Standardabweichung der mittleren Wiederfindungsraten (siehe Abschnitt 3.6) von ≤ 5 % erzielt werden.

Bei entsprechender Beschaffenheit des Adsorbens ist hierzu ein Phasenverhältnis (Sorbensmasse/Probenvolumen) von 2 g RP-C18-Material bzw. 0,2 g Polymermaterial/1000 ml Probe notwendig.

Anmerkung 1: Die o. g. Anforderungen können nicht immer erreicht werden z.B.:

- Bei Reinstwasser ohne Zusatz von NaCl bei einigen Substanzen (z.B. Prometryn, Terbutryn),
- bei anderen Matrices als Grund- und Trinkwasser,
- wenn zusätzliche Stoffe außer den in Tabelle 1 genannten bestimmt werden.

Anmerkung 2:

zu Abschn. 8.2 der DIN EN ISO 11369

Bei Polymermaterial etwa das Zehnfache des Bettvolumens verwenden und das Lösemittel etwa 5 min einwirken lassen. Anschließend mit dem gleichen Volumen an Wasser waschen.

3.4.1.2 Störungen

Oberflächenwasser - und getrübe Grundwasserproben sollten filtriert werden, um ein Verstopfen der Kartusche zu vermeiden. Durch die Filtration wird außerdem der Anteil an Begleitstoffen verringert.

Geringe Wiederfindungsraten können auftreten durch:

- ungeeignetes Sorbens oder mangelhafte Kartuschenpackung,
- keine ausreichende Benetzung des Sorbens durch zu geringes Volumen an Methanol oder durch Trockenlaufen während der Konditionierung oder der Anreicherung,
- zu hohe Flussraten (siehe Norm),

Anmerkung 3: *Entgegen der Norm kann die Anreicherung auch bei Flussraten unter 3 ml/min, z.B. bei hydrostatischer Arbeitsweise, durchgeführt werden.*

- keine optimale Trocknung des Sorbens,
- unvollständige Elution durch zu geringes Volumen an Lösemittel oder zu geringe Einwirkzeit. Die notwendige Einwirkzeit des Lösemittels ist u.a. abhängig vom Trocknungsgrad des Sorbens.

Kontamination, Blindwerte:

- Bei Elution mit Methanol können bei RP-C18 Sorbentien Störungen bei der HPLC-Analyse durch Begleitstoffe auftreten. Die Elution von Begleitstoffen ist geringer bei der Verwendung von Aceton oder Acetonitril.
- Bei unvollständiger Trocknung des Sorbens kann die Restfeuchte andere Polaritätsverhältnisse bei der Elution bewirken.
- Bei Trocknung des Sorbens im Luftstrom können Störkomponenten, z.B. aus dem Laborbereich, eingetragen werden.

3.4.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie**3.4.2.1 Anforderungen****a) Chromatographische Trennung**

Bei der Trennung der in der Norm genannten Pflanzenbehandlungsmittel (in Tabelle 1 hervorgehoben) ist eine chromatographische Auflösung R von mindestens 1,3 zwischen allen Substanzen anzustreben (Beispiel siehe Anhang 1).

Für kritische Trennungen gilt als Mindestanforderung die Auflösung R von 1,0.

Diese Anforderungen sind auch bei der Bestimmung weiterer Pflanzenbehandlungsmittel einzuhalten (Beispiel siehe Anhang 2).

Gleichung 1:

$$R = 1,177 (t_{R2} - t_{R1}) / (b_{h1} + b_{h2})$$

mit:

t_{R1} = Retentionszeit des ersten Peaks

t_{R2} = Retentionszeit des zweiten Peaks

b_{h1} = Breite des ersten Peaks in halber Höhe in Minuten

b_{h2} = Breite des zweiten Peaks in halber Höhe in Minuten

Anmerkung 4: Die Trennung der Pflanzenbehandlungsmittel ist von der Temperatur abhängig. Besonders bei den Substanzen Ethidimuron/Chloridazon/Desethylatrazin sowie Diuron/Isoproturon und Terbutylazin/Linuron kann die Auflösung durch Optimierung der Säulentemperatur häufig verbessert werden. Die optimale Säulentemperatur liegt üblicherweise in einem Bereich von 35 – 45 °C.

Anmerkung 5: Um Peakverbreiterungen zu vermeiden muss das Injektionsvolumen dem Querschnitt der Trennsäule angepasst werden und z. B. bei Säulen mit einem Innendurchmesser von 3 mm maximal 50 µl und mit einem Innendurchmesser von 2 mm maximal 25 µl betragen.

b) Wiederholpräzision

Die Standardabweichung der Retentionszeiten sollte bei 6 aufeinanderfolgenden Injektionen von Bezugslösungen einen Wert von kleiner als 0,05 min ergeben.

c) Identifizierung

Die Anwesenheit eines Pflanzenbehandlungsmittels in einer Probe gilt als nachgewiesen, wenn

- 1) die Abweichung der Retentionszeiten zwischen dem Peak in der Probe und der Referenzsubstanz weniger als $\pm 0,15$ min beträgt und
- 2) das Absorptionsspektrum des Stoffes gemessen im Peakmaximum mit dem Spektrum der zugeordneten Referenzsubstanz identisch ist und
- 3) das Spektrum auf der ansteigenden oder abfallenden Flanke des Peaks, z.B. bei etwa 50 % der Peakhöhe mit dem Absorptionsspektrum im Peakmaximum übereinstimmt.

Die Übereinstimmung der Absorptionsspektren oberhalb von 210 nm gemäß 2), z.B. Übereinstimmungsfaktor, soll bei Massenkonzentrationen $< 0,1 \mu\text{g/l}$ mindestens 95 %, bei Massenkonzentrationen $> 0,1 \mu\text{g/l}$ mindestens 98 % betragen.

Die Übereinstimmung der Peakspektren im gleichen Wellenlängenbereich gemäß 3) muss mindestens 80 % betragen.

Wird ein Pflanzenbehandlungsmittel durch Retentionszeitvergleich nachgewiesen und die Bedingungen nach 2 und 3 sind nicht erfüllt, dann liegt eine Überlagerung durch eine andere Substanz vor. Die Angabe eines quantitativen Ergebnisses ist in diesem Fall nicht zulässig.

Anmerkung 6: Die zur Identifizierung herangezogenen Referenzspektren müssen unter den gleichen Bedingungen gemessen werden wie die Spektren der Stoffe in der Probe und ebenfalls mit den Untergrundspektren korrigiert sein. Die Untergrundspektren sollten möglichst zeitnah zum Peak liegen, z.B. Mittelwert der Basislinienspektren vor und nach dem Peak.

Anmerkung 7: Ein positiver Befund kann durch Aufdotieren der Probe mit der zugeordneten Referenzsubstanz abgesichert werden. Die Messung der aufgestockten Probe darf dabei keine Veränderung der Peakbreite und der Peakspektren ergeben. Eine weitere Absicherung ist mit HPLC - MS möglich.

3.4.2.2 Störungen

a) Chromatographie

Schwankende Retentionszeiten

Ablagerungen von Partikeln und Verkeimungen (Puffer) auf den Ansaugfritten können bei ansonsten fehlerfrei arbeitendem Pumpensystem zu schwankenden Retentionszeiten führen.

Die Störungen können durch regelmäßige Reinigung der Vorratsflaschen insbesondere des Gefäßes für die Pufferlösung vermieden werden. Die Pufferlösung muss immer neu angesetzt werden. Restlösungen sind zu verwerfen.

Anstieg des Säulenvordrucks

Bei Routinebetrieb kann der Eingangsdruck der Trennsäule infolge von Partikelablagerungen, z.B. aus unfiltrierten Proben, durch Rostbildung oder Verkeimung (Puffer) auf den Eingangsieben bzw. Fritten, ansteigen. Je nach Arbeitsweise des Pumpensystems kann hierdurch die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten beeinträchtigt werden.

Die Störung kann durch Auswechseln der Fritten behoben werden.

Anmerkung 8: *Die Probenextrakte sollten, besonders bei längeren Sequenzen, immer filtriert werden, um Partikelablagerungen zu vermeiden.*

Verringerung der Trennleistung

Beim Gebrauch der Trennsäule verringert sich die Trennleistung und die Selektivität kann sich verändern. Wird die Mindestanforderung der chromatographischen Auflösung nach Abschnitt 3.4.2.1 wiederholt unterschritten und arbeitet das System fehlerfrei, ist eine neue Trennsäule zu verwenden.

Auftreten von Störpeaks

Störpeaks treten in der Regel gegen Ende der Chromatogramme auf und resultieren häufig aus angereicherten Verunreinigungen der verwendeten Eluenten. Sie können auch hervorgerufen werden durch Verschleppung von hydrophoben Begleitstoffen aus Proben.

Die Störungen können durch Verlängerung der Spülphase ggf. mit einem höheren Anteil des organischen Lösemittels und/oder durch Verwendung von Eluenten anderer Reinheit minimiert werden.

Peakverbreiterung

- 1) Peakverbreiterung kann auftreten wenn der Anteil des organischen Lösemittels in der Messlösung höher ist als der Anteil im Eluenten bei Anfangsbedingungen. Reste von Aceton in der Messlösung führen ebenfalls zu Peakverbreiterung.
- 2) Peakverbreiterung kann auch durch Peaküberlagerung auftreten. Unsymmetrische und gegenüber den Referenzsubstanzen verbreiterte Peaks weisen darauf hin. Die Peaküberlagerungen können durch Spektrenvergleich (siehe Abschnitt 3.4.2.1 Anstrich c) erkannt werden.

b) Detektion

Rauschen

Stärkeres als das für den Detektor übliche Rauschen (Spezifikationen) kann z.B. hervorgerufen werden durch:

- Alterung der DAD-Lampe oder des Diodenarrays,
- Verschmutzung der Messzelle,
- unzureichend entgaste Eluenten, die zur Bildung von Luftblasen in der Messzelle führen können (Basislinienspikes),
- unzureichende Mischung der Eluenten, besonders bei Flüssen < 0,5 ml/min (Mischungsrauschen).

Die Messzelle kann z.B. durch Spülen mit Isopropanol oder bei stärkeren Verschmutzungen mit Salpetersäure ($c = 6 \text{ mol/l}$) gefolgt von Wasser gereinigt werden.

Die Bildung von Luftblasen in der Messzelle kann durch einen nachgeschalteten Restriktor verhindert werden (maximale Druckbelastung der Messzelle beachten).

Bei fehlerfrei arbeitendem Pumpensystem kann Mischungsrauschen durch einen zusätzlichen statischen oder dynamischen Mischer geringen Totvolumens verringert werden.

3.5 Kalibrierung

Kalibrierungen sind in Anlehnung an DIN 38402-51 durchzuführen.

Es wird zwischen zwei Kalibrierverfahren unterschieden:

- a) Grundkalibrierung des HPLC-Messverfahrens
- b) Kalibrierung über das Gesamtverfahren.

Die Grundkalibrierung ist in jedem Fall durchzuführen, da sie zur Bestimmung der Verfahrenskenngrößen des Messverfahrens und zur Ermittlung der mittleren substanzspezifischen Wiederfindungsraten erforderlich ist.

Bei der Festlegung des Arbeitsbereiches ist zu beachten, dass die Anforderungen zur Identifizierung (nach Abschnitt 3.4.2.1 c) auch bei der niedrigsten Konzentration des Arbeitsbereiches erfüllt sind.

Die Verfahrensstandardabweichungen der Kalibrierfunktionen für den gewählten Arbeitsbereich sollten für die untersuchten Substanzen bei der Grundkalibrierung einen Wert von $s_{x_0} \leq 5 \text{ ng/ml}$ und bei der Kalibrierung über das Gesamtverfahren von $s_{x_0} \leq 20 \text{ ng/l}$ ergeben.

Die Gültigkeit des gewählten Arbeitsbereiches muss durch Ermittlung der Wiederfindungsraten (gleiche Konzentrationsniveaus wie bei der Grundkalibrierung) bestätigt werden. Sind die Anforderungen nach Abschnitt 3.4.1.1 nicht erfüllt, so sind die Wiederfindungsraten bei einzelnen Probenaufbereitungsschritten zu bestimmen und zu optimieren, ggf. ist der Arbeitsbereich für die Grundkalibrierung anzupassen.

Bei der Kalibrierung über das Gesamtverfahren ist die Streuung der Messwerte zur Ausgleichsgerade größer als bei der Grundkalibrierung, da die Streuungen der Wiederfindungsraten enthalten sind.

Die Gültigkeit der Kalibrierung ist solange gegeben, wie die Anforderungen gemäß Abschnitt 4.1.2 erfüllt sind.

3.6 Bestimmung der mittleren substanzspezifischen Wiederfindungsraten

Die bei der Erarbeitung des Verfahrens mit Hilfe dotierter Wasserproben (siehe Abschnitt 9.4 der Norm) zu bestimmenden mittleren substanzspezifischen Wiederfindungsraten \bar{A}_i können entgegen der Norm nur als arithmetischer Mittelwert nach Gleichung (3) der Norm berechnet werden, da bei der Berechnung aus dem Vergleich der Anstiege von Verfahrenskalibrierung und Grundkalibrierung konstante systematische Abweichungen nicht berücksichtigt werden.

3.7 Blindwerte

Blindwertmessungen müssen bei jeder Änderung des Analysenverfahrens (Personal, Geräte und Chemikalien) durchgeführt werden und sollten zusätzlich in jeder Analysenserie mitbestimmt werden.

3.8 Auswertung und Angabe der Ergebnisse

Die mittleren laborinternen Wiederfindungsraten der gemessenen Stoffe sind anzugeben.

4 Maßnahmen zur Analytischen Qualitätskontrolle (AQK)

4.1 Interne Qualitätskontrolle

4.1.1 Etablierung des Verfahrens

Laborintern sind für jeden HPLC-Messplatz und durch jeden Mitarbeiter

- bei Neuaufstellung,
- nach wesentlichen Änderungen am Messplatz,
- nach wesentlichen Änderungen des Analysenverfahrens

folgende Arbeiten durchzuführen:

- Kalibrierung (siehe Abschnitt 3.5) mit allen Verbindungen im niedrigsten angestrebten Arbeitsbereich,
- Berechnung der Verfahrenskenngrößen,
- Bestimmung der mittleren substanzspezifischen Wiederfindungsraten,
- Bestimmung der Blindwerte.

4.1.2 Richtigkeitskontrolle

4.1.2.1 Richtigkeitskontrolle durch regelmäßige Untersuchung von synthetischen Proben

Zur Kontrolle der Richtigkeit der Kalibrierung und der Stabilität des Verfahrens sind gemäß Abschnitt 10.1 der Norm vor und während jeder Analysenserie (üblich nach 4-6 Proben) mit Kontrollstandardlösungen (siehe Abschnitt 3.1.3.4) aufgestockte Wasserproben zu analysieren.

Die Massenkonzentrationen der Substanzen in den aufgestockten Wasserproben sollen bei etwa 20 % und 80 % des kalibrierten Arbeitsbereiches liegen. Hierbei können die Retentionszeiten kontrolliert und in der Peaktabelle ggf. angepasst werden.

Zur Prüfung sollen mindestens von 2 Substanzen aus unterschiedlichen Bereichen des Chromatogrammes Zielkarten für beide Konzentrationsniveaus geführt werden.

Bei Anwendung der Grundkalibrierung nach Abschnitt 9.2 der Norm sind Wiederfindungs-Zielkarten mit der mittleren Wiederfindungsrate \bar{A} der jeweiligen Substanz als Zentrallinie zu führen. Wird nach Abschnitt 9.3 der Norm eine Verfahrenskalibrierung angewandt, sind entsprechende Sollwert-Zielkarten zu führen. Die Ausschlussgrenzen betragen in beiden Fällen $\pm 15\%$, die Warngrenzen $\pm 10\%$.

Die Gültigkeit der Kalibrierfunktion für eine Substanz ist gegeben, solange die gemessenen Massenkonzentrationen für beide Kontrollstandards innerhalb der Ausschlussgrenzen liegen.

Anmerkung 9: *Bei konstanten chromatographischen Bedingungen ist die Grundkalibrierung üblicherweise über einen längeren Zeitraum stabil. Überschreitungen der o.g. Ausschlussgrenzen sind vorrangig auf Konzentrationsänderungen der Standardlösungen zurückzuführen oder weisen auf Störungen der Probenvorbereitung bzw. des HPLC-Gerätes hin.*

Bei Überschreitung der Ausschlussgrenzen ist zuerst die Grundkalibrierung mit ggf. neu angesetzten Kontrollstandards (nach Abschnitt 3.1.3.4) zu prüfen. Bestätigt sich die Überschreitung, ist eine neue Kalibrierung vorzunehmen.

Erweist sich die Grundkalibrierung als weiterhin gültig, so ist die Probenvorbereitung über die Wiederfindungsraten (Anforderungen siehe Abschnitt 3.4.1.1) zu prüfen und ggf. zu optimieren. Die Ergebnisse dieser Prüfung werden zur Ermittlung der mittleren substanzspezifischen Wiederfindungsraten respektive zur Kalibrierung über das Gesamtverfahren verwendet.

4.1.2.2 Richtigkeitskontrolle durch Kontrollsubstanzen in jeder Probe

Alternativ zur vorstehend beschriebenen Richtigkeitskontrolle kann die Stabilität der Probenvorbereitung durch Wiederfindungsraten einzelner Substanzen (Kontrollsubstanzen) geprüft werden, die jeder Probe vor der Aufarbeitung zuzugeben sind.

Hierzu müssen mindestens zwei Kontrollsubstanzen verwendet werden, die den Polaritätsbereich des Untersuchungsspektrums weitgehend abdecken. Geeignete Kontrollsubstanzen sind z. B. die Wirkstoffe Fenuron, Cyanazin, Norflurazon, und Prometryn, die üblicherweise bei der Untersuchung von Proben weniger relevant sind. Die Wiederfindungsrate von Fenuron z. B. gibt Aufschluss über die Anreicherung polarer Analyten und anhand der Wiederfindungsrate von Prometryn z. B. kann die Vollständigkeit der Elution geprüft werden.

Anmerkung 10: *Die Kontrollsubstanzen sind der Probe zweckmäßigerweise in einer Lösung (Lösemittel z. B. Acetonitril) zuzugeben. Das dotierte Volumen sollte auf 1000 ml der Probe höchstens 100 µl betragen. Die Massenkonzentration der Kontrollsubstanzen ist dabei so zu bemessen, dass sich bei 100 % Wiederfindungsrate eine Konzentration im oberen Arbeitsbereich ergibt.*

Die Gültigkeit der Grundkalibrierung vor und während der Analysenserie ist dabei regelmäßig mit Kontrollstandards (nach Abschn. 3.1.3.4) zu prüfen (Sollwertzielkarte, Ausschlussgrenze $\pm 10\%$, Warngrenze $6,7\%$). Bei Überschreitung der Ausschlussgrenzen ist die Prüfung mit frisch angesetzten Kontrollstandards zu wiederholen. Bestätigt sich die Überschreitung, ist eine neue Grundkalibrierung vorzunehmen (siehe Anmerkung 9).

Bei der Prüfung der Probenvorbereitung durch Kontrollsubstanzen ist für jede Kontrollsubstanz jeweils für eine Messsequenz eine Wiederfindungs-Zielkarte mit der mittleren Wiederfindungsrate \bar{A}_i als Zentrallinie (Ausschlussgrenze $\pm 15\%$, Warngrenze 10%) zu führen.

Wenn die gemessenen Wiederfindungsraten A_i der Kontrollsubstanzen innerhalb der Ausschlussgrenzen liegen, hat sich die Probenvorbereitung als stabil erwiesen und \bar{A}_i kann zur Auswertung verwendet werden.

Liegt die gemessene Wiederfindungsrate einer nach 3.4.2.1 identifizierten Kontrollsubstanz bei drei aufeinanderfolgenden Proben einer Analysenserie außerhalb der Ausschlussgrenzen, ist die Probenvorbereitung zu prüfen und ggf. sind die mittleren Wiederfindungsraten nach Abschnitt 9.4 der Norm (vgl. Abschn. 3.6) neu zu bestimmen.

Ergibt sich bei einer einzelnen Probe eine Überschreitung der Ausschlussgrenzen, ist die Aufarbeitung der Probe zu wiederholen. Bestätigt sich das Ergebnis, ist von einem Matrixeinfluss auszugehen und das Analysenergebnis für diese Probe ist entsprechend zu kommentieren.

Überschreitungen der oberen Ausschlussgrenze sind meist auf Peaküberlagerungen durch Begleitstoffe zurückzuführen. Dabei sind die Anforderungen zur Identifizierung nach 3.4.2.1 meist nicht erfüllt.

In diesen Fällen ist das Analysenergebnis als unsicher anzugeben.

Liegt eine Überschreitung der oberen Ausschlussgrenze vor und sind die Anforderungen der Identifizierung erfüllt, ist davon auszugehen, dass die entsprechende Kontrollsubstanz bereits in der Originalprobe vorhanden ist. Die entsprechende Substanz ist in diesem Fall als Kontrollsubstanz nicht geeignet und muss durch eine andere Substanz ersetzt werden.

4.2 Externe Qualitätskontrolle

An angebotenen Ringversuchen und Vergleichsuntersuchungen ist teilzunehmen. Qualitätsziele hierfür sind von den Veranstaltern festzulegen. Es wird darüber hinaus empfohlen, Vergleichsmessungen mit anderen Laboratorien durchzuführen.

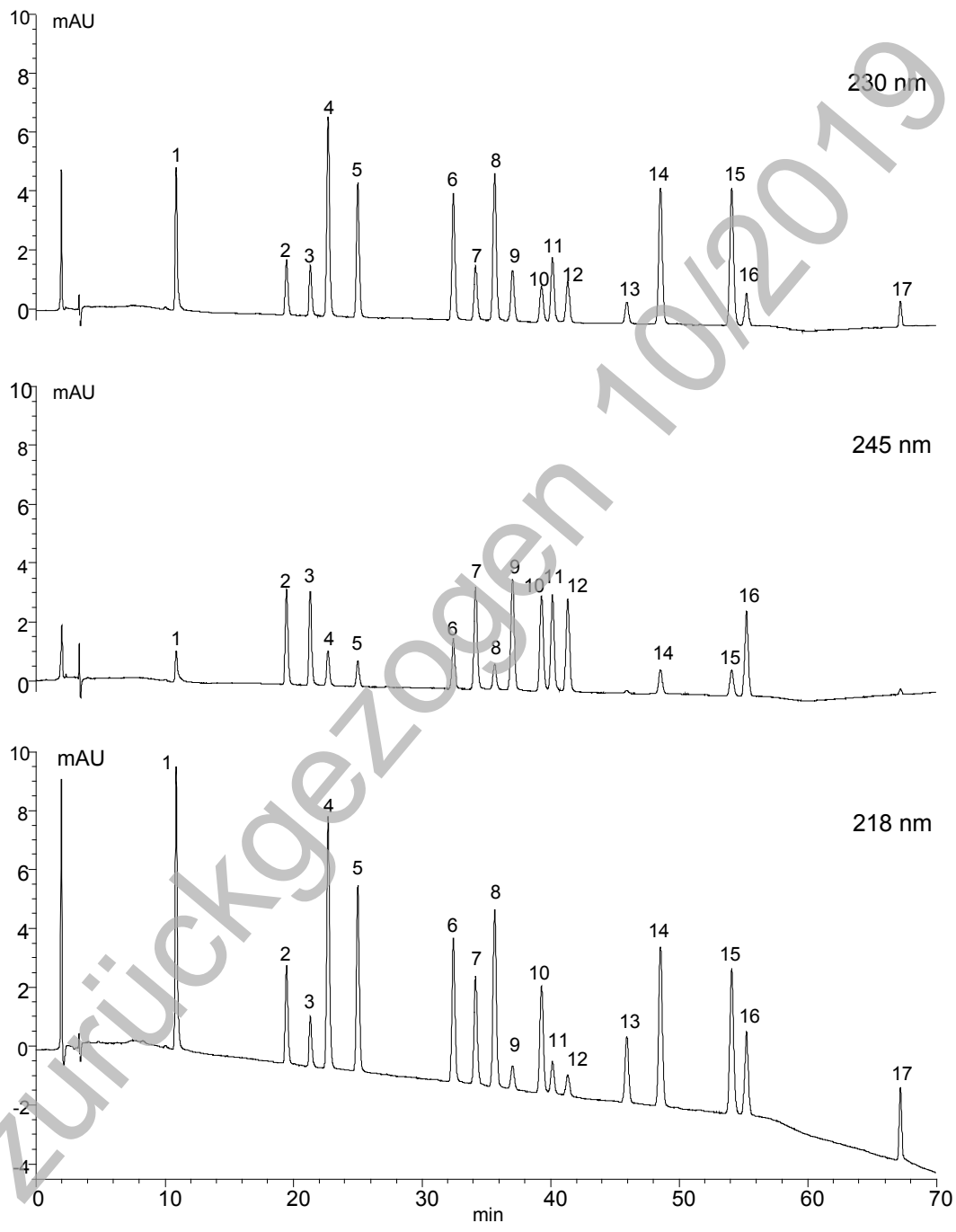
5 Literatur

[1] Normen

- DIN 38 402 - A 12; Probenahme aus stehenden Gewässern (Juni 1985)
- DIN 38 402 - A 13; Probenahme aus Grundwasserleitern (Dezember 1985)
- DIN 38 402 - A 14; Probenahme von Roh- und Trinkwasser (März 1986)
- DIN 38 402 - A 15; Probenahme aus Fließgewässern (Juli 1986)
- DIN V 38 402 - A 17; Probenahme von fallenden, nassen Niederschlägen in flüssigem Aggregatzustand (Mai 1988)
- DIN 38 402 - A 20; Probenahme aus Tidegewässern (August 1987)
- DIN EN-ISO 5667-3; Probenahme Teil 3, Anleitung zur Konservierung und Handhabung von Proben (April 1996)
- DIN 38 407 - F 11; Bestimmung ausgewählter organischer Pflanzenbehandlungsmittel mittels Automated-Multiple-Development (AMD)-Technik (Januar 1995)
- ENV ISO 13530; Wasserbeschaffenheit - Richtlinie zur analytischen Qualitätssicherung in der Wasseranalytik (Oktober 1998)
- DEV Strategien für die Wasseranalytik: Verfahrensentwicklung, Validierung und Qualitätssicherung in der Routine. (36. Lieferung)

Anhang 1

Bild 2: Chromatogramm eines Standardgemisches von 17 Pflanzenbehandlungsmitteln gemäß DIN EN ISO 11369



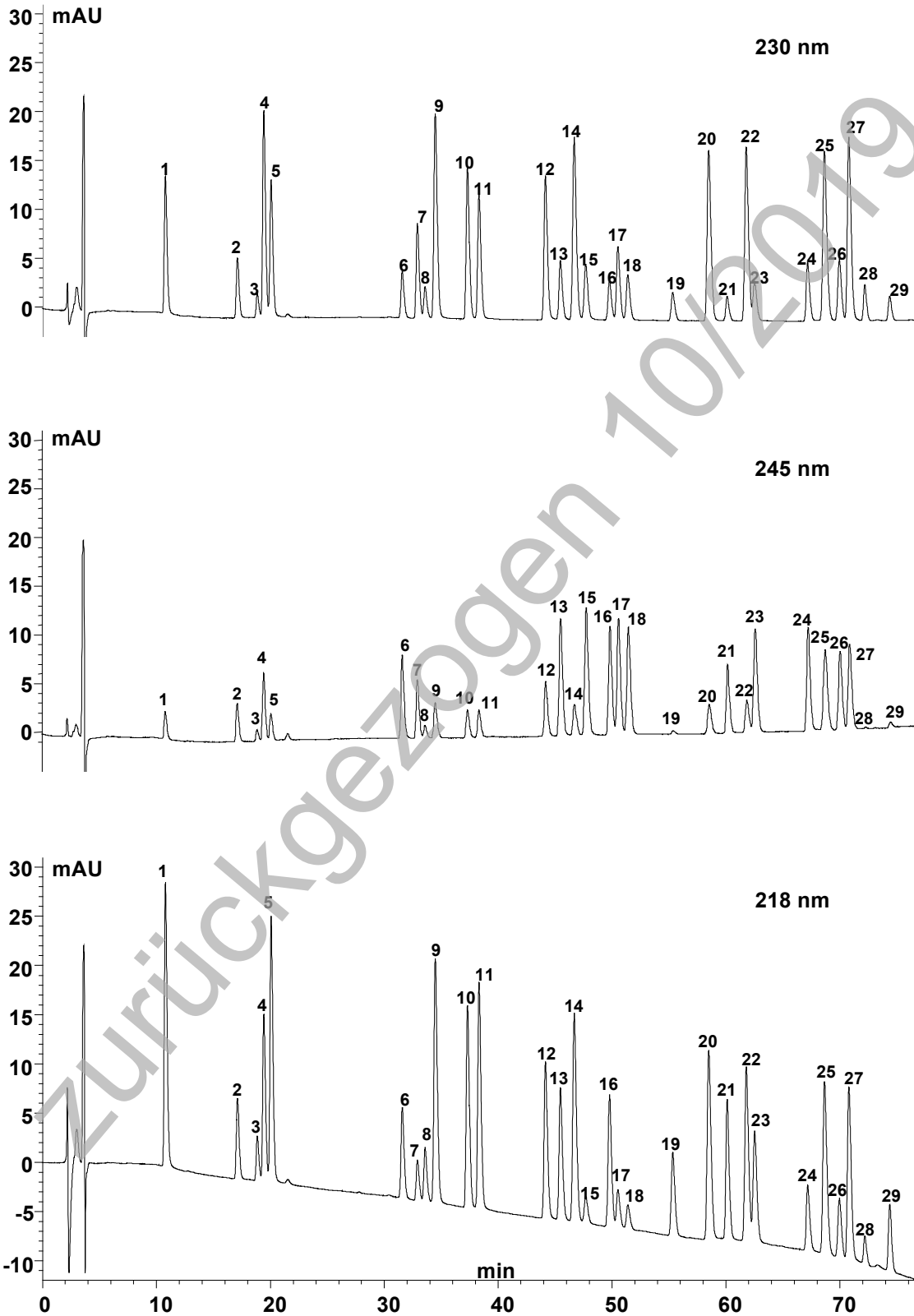
Chromatographische Bedingungen

Injektionsvolumen	:	20 µl Pflanzenbehandlungsmittel-Standardlösung, ρ = 100 pg/µl je Einzelsubstanz
Lösemittel	:	Acetonitril / Wasser 2:8
Trennsäule	:	MZ-PBM, 3 µm, 250 x 2,1 mm
Eluent	:	A: 1 mmol wässrige Ammoniumacetatlösung B: Acetonitril
Gradient	:	20% B bis 40% B in 50 min, 40% B bis 70% B in 20 min
Spülzeit	:	20 min mit Eluent B / 10% A
Gleichgewichtseinstellung	:	20 min unter Anfangsbedingungen
Durchfluss	:	0,2 ml/min
Temperatur	:	45 °C
Diodenarray-Detektor	:	Durchflusszelle: d = 10 mm, V = 13 µl Responsetime: 2 s Wellenlängen: 218 nm, 230 nm, 245 nm Bandbreite: 4 nm Referenzwellenlängen: 460 nm, Bandbreite 80 nm

Peak Nr.	Stoffname
1	Desethylatrazin
2	Metoxuron
3	Cyanazin
4	Simazin
5	Hexazinon
6	Monolinuron
7	Chlortoluron
8	Metobromuron
9	Atrazin
10	Methabenzthiazuron
11	Isoproturon
12	Diuron
13	Metazachlor
14	Sebuthylazin
15	Linuron
16	Terbuthylazin
17	Metolachlor

Anhang 2

Bild 3: Chromatogramm eines Standardgemisches von 29 Pflanzenbehandlungsmitteln



Chromatographische Bedingungen

Injektionsvolumen	:	20 µl Pflanzenbehandlungsmittel-Standardlösung, ρ = 500 pg/µl je Einzelsubstanz
Lösemittel	:	Acetonitril / Wasser 2:8
Trennsäule	:	MZ-PBM, 3 µm, 250 x 2,1 mm
Eluent	:	A: 2 mmol wässrige Ammoniumacetatlösung B: Acetonitril
Gradient	:	12,5 % B bis 45 % B in 60 min, 45 % B bis 90% B in 30 min
Gleichgewichtseinstellung	:	20 min unter Anfangsbedingungen
Durchfluss	:	0,2 ml/min
Temperatur	:	49 °C
Diodenarray-Detektor	:	Durchflusszelle: d = 10 mm, V = 13 µl Resonsetime: 2 s Wellenlängen: 218 nm, 230 nm, 245 nm Bandbreite: 4 nm Referenzwellenlängen: 460 nm, Bandbreite 80 nm

Peak Nr.	Stoffname	Peak Nr.	Stoffname
1	Desisopropylazin	21	Dimefuron
2	Metamitron	22	Terbuthylazin
3	Ethidimuron	23	Linuron
4	Chloridazon	24	Chloroxuron
5	Desethylatrazin	25	Prometryn
6	Metoxuron	26	Chlorpropham
7	Carbetamid	27	Terbutryn
8	Bromacil	28	Ethofumesat
9	Simazin	29	Metolachlor
10	Cyanazin		
11	Desethylterbuthylazin		
12	Methabenzthiazuron		
13	Chlortoluron		
14	Atrazin		
15	Monolinuron		
16	Diuron		
17	Isoproturon		
18	Metobromuron		
19	Metazachlor		
20	Propazin		

Tabelle 1: Liste analysierbarer Pflanzenbehandlungsmittel/Abbauprodukte

Stoffname	Summenformel	Molare Masse	Peak Nr. in Bild 2	Peak Nr. in Bild 3	Fraktion bei Vortrennung*
Atrazin	C₈H₁₄ClN₅	215,7	9	14	2
Bromacil	C ₉ H ₁₃ BrN ₂ O ₂	261,1		8	2
Carbetamid	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	236,3		7	2
Chloridazon	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O	221,6		4	2
Chlortoluron	C₁₀H₁₃ClN₂O	212,7	7	13	2
Chloroxuron	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O ₂	290,8		24	2
Chlorpropham	C ₁₀ H ₁₂ ClNO ₂	213,7		26	1
Cyanazin	C₉H₁₃ClN₆	240,7	3	10	2
Desethylatrazin	C₆H₁₀ClN₅	187,6	1	5	2
Desethylterbuthylazin	C ₃ H ₄ ClN ₅	145,6		11	2
Desisopropylazin	C ₅ H ₈ ClN ₅	173,6		1	2
Dimefuron	C ₁₅ H ₁₉ ClN ₄ O ₃	338,8		21	2
Diuron	C₉H₁₀Cl₂N₂O	233,1	12	16	2
Ethidimuron	C ₇ H ₁₂ N ₄ O ₃ S ₂	264,3		3	3
Ethofumesat	C ₁₃ H ₁₈ O ₅ S	286,3		28	1
Hexazinon	C₁₂H₂₀N₄O₂	252,3	5		3
Isoproturon	C₁₂H₁₈N₂O	206,3	11	17	2
Linuron	C₉H₁₀Cl₂N₂O₂	249,1	15	23	1
Metamitron	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O	202,2		2	3
Metazachlor	C₁₄H₁₆ClN₂O	277,8	13	19	2
Methabenzthiazuron	C₁₀H₁₁N₃OS	221,3	10	12	2
Metolachlor	C₁₅H₂₂ClNO₂	283,8	17	29	2
Metobromuron	C₉H₁₁BrN₂O₂	259,7	8	18	1
Metoxuron	C₁₀H₁₃ClN₂O₂	228,7	2	6	2
Monolinuron	C₉H₁₁ClN₂O₂	214,6	6	15	1
Prometryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	241,4		25	2
Propazin	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229,7		20	2
Sebuthylazin	C₉H₁₅ClN₅	228,7	14		2
Simazin	C₇H₁₂ClN₅	201,7	4	9	2
Terbuthylazin	C₉H₁₆ClN₅	229,7	16	22	2
Terbutryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	241,4		27	2

Die in DIN EN ISO genannten Pflanzenbehandlungsmittel sind durch Fettdruck hervorgehoben.

* siehe Anhang 3

Anhang 3**Vortrennung von Extrakten**

Bei der Untersuchung von Oberflächenwasser und insbesondere Abwasser können Peaküberlagerungen durch Begleitstoffe auftreten und die Bestimmung einzelner Wirkstoffe stören (siehe Abschnitt 3.4.2.2).

In diesem Fall sollte der Extrakt einer Rückstellprobe nach dem unten beschriebenen Verfahren vorgetrennt werden. Dadurch ist in vielen Fällen eine Abtrennung der Begleitstoffe möglich.

Das Verfahren der Vortrennung sollte grundsätzlich bei Proben mit hohem Matrixanteil, z.B. bei Abwasser, angewendet werden.

Bei der Vortrennung werden die PBM entsprechend ihrer Polarität auf drei Fraktionen verteilt und polare Begleitstoffe abgetrennt. Zur Verteilung der einzelnen PBM auf die Fraktionen 1 bis 3 siehe Tabelle 1.

Bei der Einführung einer neuen Charge an Silicagel-Kartuschen, sowie nach dem Ansetzen frischer Elutionsmittel sind die Wiederfindungsraten der PBM bei der Vortrennung neu zu ermitteln; sie müssen in einem Bereich von 90 - 100 % liegen.

Reagenzien

Hinsichtlich der Reinheit der Chemikalien gelten die Anforderungen nach 5.1 der Norm.

- Molekularsieb, 4 Å, Perlform
- Dichlormethan, CH₂Cl₂
- Ethylacetat, C₄H₈O₂
- Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator (Blaugel), Körnung 1-3 mm

Geräte

Hinsichtlich der Reinheit der Geräte gelten die Anforderungen nach 6.1 der Norm.

- Pasteurpipetten mit Saugball
- Vorrichtung zur Aufnahme von Einmaltrennsäulen, mit Absperrhähnen aus PTFE und Luerhülse
- Einmaltrennsäulen, aus Polypropylen, mit 500 mg Silicagel 60, Korngröße etwa 40 µm.

Die Einmaltrennsäulen sind bis zu ihrer Verwendung im Exsikkator über aktiviertem Blaugel aufzubewahren.

Durchführung

Die für die Vortrennung von Extrakten an Silicagel verwendeten Lösemittel bzw. Lösemittelgemische sind über aktiviertem Molekularsieb aufzubewahren.

- Eluat nach 8.4 der Norm zur Trockne eindampfen und den Rückstand in 500 µl Dichlormethan lösen.
- Silicagel-Material in der Kartusche mit 10 ml Ethylacetat reinigen und anschließend mit 10 ml Dichlormethan konditionieren.
- Dichlormethan-Extrakt der Probe vollständig auf das gerade noch mit Dichlormethan bedeckte Silicagel-Material, z. B. mittels einer Pasteurpipette auftragen und den Extrakt fast vollständig in die Packung einsickern lassen; Lösemittelablauf in einem Glasgefäß (nach 6.5 der Norm) sammeln.
- Glasgefäß der Probe mit 500 µl Dichlormethan nachspülen, den Extrakt ebenfalls auf die Einmaltrennsäule geben und in das Silicagel-Material einsickern lassen.
- Anschließend 4 ml einer Mischung von Dichlormethan/Ethylacetat 95:5 (V/V) auf die Packung geben und die 1. Fraktion der PBM eluieren; Eluat in dem Glasgefäß auffangen.
- Die 2. Fraktion der PBM mit 4 ml Ethylacetat und die 3. Fraktion mit 4 ml einer Mischung von Ethylacetat/Methanol 95:5 (V/V) eluieren; die Fraktionen getrennt in jeweils einem Glasgefäß (nach 6.5 der Norm) sammeln.
- Die Fraktionen in den Glasgefäßen zur Trockne eindampfen und die Rückstände in dem Eluentengemisch entsprechend den Anfangsbedingungen des Gradienten lösen (siehe 8.4 der Norm).

Anmerkung: *Der Extrakt darf keine Reste von Dichlormethan oder Ethylacetat enthalten, da diese Lösemittel bei der HPLC-Analyse zu Peakverbreiterungen führen können.*