

Bestimmung von 15 polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Wässern mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Fluoreszenzdetektion

1 Arbeitsgrundlagen

- EN ISO 17993 – F 18; Bestimmung von 15 polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Wasser durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion nach Flüssig-flüssig-Extraktion (Juni 2003)
- DIN 38414 – S23; Bestimmung von 15 polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Fluoreszenzdetektion (Februar 2002)
- DIN 32645; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze Ermittlung unter Wiederholbedingungen Begriffe, Verfahren, Auswertung (Mai 1994)
- DIN 38 402 – A51; Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen (Mai 1986)
- DEV A0-4; Leitfaden zur Abschätzung der Messunsicherheit aus Validierungsdaten
- AQS-Merkblätter für die Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
Herausgegeben von der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA)
Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., Berlin 1991

Weitere Literatur siehe Abschnitt 6.

2 Zweck

Dieses Merkblatt ergänzt die Norm EN ISO 17993 zur Bestimmung von 15 polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Trink-, Grund- und Oberflächenwasser, stellt Ausführungen der Norm richtig und gibt Hinweise zur praktischen Durchführung. Es legt außerdem Maßnahmen zur "Analytischen Qualitätssicherung" (AQS) fest.

3 Anwendungsbereich

Die Norm und das AQS-Merkblatt können für weitere hier nicht genannte PAK angewendet werden, vorausgesetzt, dass die Richtigkeit im Einzelnen durch laborinterne Verfahrenskenndaten dokumentiert wird.

Das Verfahren hat sich auch für die Bestimmung von PAK in Abwasser (Massenkonzentration $>1\mu\text{g/l}$) als geeignet erwiesen (siehe Anhang 1).

Bei der Extraktion von schwebstoffhaltigen Wasserproben werden die an partikulärem Material adsorbier- ten PAK unvollständig erfasst. Je nach Beschaffenheit der Schwebstoffe sind Wiederfindungsraten von ca. 40 % – 70 % zu erwarten.

4 Maßnahmen zur Qualitätssicherung

Die in Tabelle 1 der Norm angegebenen prozentualen Gehalte an Kohlenstoff sind bei folgenden PAK auf nachstehende Werte zu korrigieren: Acenaphthen 93,5, Phenanthren 94,3, Benzo(a)anthracen 94,7, Dibenzo(a,h)anthracen 94,9, Fluoren 93,9, Anthracen 94,3, Chrysen 94,7.

4.1 Reagenzien

Anmerkung 1: *Methanol und N,N-Dimethylformamid sind giftig. Dichlormethan ist krebserzeugend. Auf die gesundheitsschädigende Wirkung von Methanol, N,N-Dimethylformamid und Dichlormethan wird ausdrücklich hingewiesen. Zur Zeit können jedoch keine Alternativen vorgeschlagen werden.*
Entgegen dem Warnhinweis der Norm sind die Lösemittel Acetonitril und Hexan nach derzeitigem Kenntnisstand als gesundheitsschädlich eingestuft.
Entgegen der Norm sollte kein destilliertes Wasser verwendet werden. Das Wasser muss der Analysenqualität „zur HPLC“ entsprechen.

Entgegen Abschnitt 5.1.2 der Norm werden N,N-Dimethylformamid und Aceton nicht für die Extraktreinigung, sondern für die Anreicherung von Extrakten nach Abschnitt 8.3 der Norm benötigt.

Die Reinigung von Natriumsulfat nach Abschnitt 5.3 der Norm ist nicht erforderlich, wenn das Material die Anforderungen nach Abschnitt 5 der Norm erfüllt.

4.1.1 N,N-Dimethylformamidlösung

Lösung von 25% (v/v) N,N-Dimethylformamid in Aceton (z.B. 25 ml N,N-Dimethylformamid in einem 100 ml-Messkolben vorlegen und mit Aceton zur Marke auffüllen).

4.1.2 Säulentestlösung

Lösung von Naphthalin, Fluoren und Phenanthren in Methanol oder einer Mischung von Acetonitril und Wasser entsprechend den Anfangsbedingungen der chromatographischen Trennung (Massenkonzentration jeweils 0,5 µg/ml).

4.1.3 Kontrollsubstanzen

Substanzen für die Richtigkeitskontrolle nach Abschnitt 5.1.2, z.B. 1-Fluornaphthalin und 6-Methylchrysen.

Kontrollsubstanzen dürfen in Proben nicht vorkommen und müssen von den Analyten chromatographisch vollständig getrennt werden. Sie dürfen die zu bestimmenden PAK in nachweisbaren Konzentrationen nicht enthalten.

Hinweis: *Fluorierte PAK können z.B. bei der Fa. Campro Scientific (Berlin) bezogen werden. Nach neuen Untersuchungen ist 3-Fluorfluoranthren in entsprechender Reinheit verfügbar und als Kontrollsubstanz geeignet.*

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

4.1.4 Stamm- und Bezugslösungen

Hinweis: *Die in der Norm verwendete Bezeichnung „Referenzlösungen“ wird hier nicht übernommen. Diese Lösungen werden in Anlehnung an bestehende Normen weiterhin als „Bezugslösungen“ bezeichnet..*

4.1.4.1 Mehrkomponenten-Stammlösung

Zertifizierte Standardlösung ggf. mit Zusatz der Kontrollsubstanzen (siehe Abschnitt 4.1.3).

Die Richtigkeit der Lösung ist stichprobenartig gegen eine zertifizierte Standardlösung anderer Herkunft zu prüfen (siehe Abschnitt 4.1.4.2).

4.1.4.2 Kontrollstandard

Unabhängig von der Mehrkomponenten-Stammlösung hergestellte Bezugslösung, z.B. aus einer zertifizierten Standardlösung anderer Herkunft.

4.1.4.3 Stammlösung der Kontrollsubstanzen

Lösung von z.B. 1-Fluornaphthalin und 6-Methylchrysen in Acetonitril. Die Massenkonzentrationen der Kontrollsubstanzen sollten den Massenkonzentrationen der Analyten in der Mehrkomponenten-Stammlösung (siehe Abschnitt 4.1.4.1) entsprechen, z.B. 10 µg/ml.

4.1.4.4 Dotierlösung

Verdünnung der Stammlösung der Kontrollsubstanzen (siehe Abschnitt 4.1.4.3) in Acetonitril oder einer Mischung von Acetonitril und Wasser, z.B. Massenkonzentration 2 µg/ml bei der Dotierung der Probe mit 100 µl dieser Lösung.

4.1.4.5 Bezugslösungen (nach Abschnitt 5.9 der Norm)

In Ergänzung zur Norm kann an Stelle von Methanol oder Acetonitril zum Ansetzen der Bezugslösungen auch eine Mischung mit Wasser passend zu den Anfangsbedingungen der chromatographischen Trennung verwendet werden (siehe Abschnitt 4.5.1).

4.2 Geräte

4.2.1 Enghals-Standflasche aus braunem Glas

Enghals-Standflaschen aus braunem Glas mit flachem Boden (siehe Abschnitt 6.1 der Norm) sind nicht handelsüblich. Anstelle dieser Flaschen können auch handelsübliche 1000-ml-Enghals-Standflaschen mit leicht gewölbtem Boden zur Durchführung des Verfahrens verwendet werden. Die Flaschen müssen auf dem Magnetrührer ausgerichtet werden, um einen stabilen Lauf des Rührstabs zu gewährleisten.

4.2.2 Mikroliterspritzen

In Ergänzung zu Abschnitt 6.5 der Norm werden zum Ansetzen der Bezugslösungen 50-µl-Spritzen benötigt.

4.2.3 Zentrifuge

Das Zentrifugieren von brennbaren Lösemitteln erfordert aus Gründen der Arbeitssicherheit spezielle Zentrifugen. Geeignet sind ex-geschützte Zentrifugen oder solche, bei denen der Schleuderraum mit Inertgas (z.B. Stickstoff) geflutet wird.

4.2.4 Mikrofilter

Einmal-Spritzenvorsatzfilter mit minimalem Totvolumen, z.B. Durchmesser ≤ 15 mm mit Membran aus regenerierter Cellulose.

4.2.5 Messkolben

Zur Durchführung des Verfahrens werden in Ergänzung der Norm Messkolben, Volumen 5 ml, vorzugsweise aus braunem Glas benötigt, z.B. Messkolben DIN EN ISO 1042-A5-10.

Für die alternative Aufarbeitung der Extrakte nach Abschnitt 4.4.3 werden 2-ml-Messkolben benötigt, z.B. Messkolben DIN EN ISO 1042-A2-10.

4.2.6 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph mit Fluoreszenzdetektor

In Ergänzung zu Abschnitt 6.15 der Norm muss der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph mit einem Probeaufgabesystem für Injektionsvolumina von 1 µl – 100 µl ausgestattet sein. Der Säulentermostat (siehe Abschnitt 6.15.3 der Norm) muss einen Arbeitsbereich von 20° C – 50° C abdecken.

Entgegen der Norm sind nur Fluoreszenzdetektoren (siehe Abschnitt 6.15.4 der Norm) mit Monochromatoren (Anregung und Emission) zur Durchführung des Verfahrens geeignet. Um die Identität und gegebenenfalls die Reinheit der Peaks prüfen zu können, sollten vorzugsweise Fluoreszenzdetektoren verwendet werden, mit denen eine kontinuierliche Aufnahme von Anregungs- bzw. Emissionsspektren möglich ist.

4.3 Probenahme und Proben

Anaerobe Grundwasserproben mit H_2SO_4 auf einen pH-Wert von 2 ansäuern, um die Bildung von Eisenhydroxid zu verhindern.

4.4 Probenaufarbeitung

Aus praktischen Gründen wird empfohlen, für die Abtrennung der Hexan- von der Wasserphase Mikroseparator nach Bild B.3 der Norm zu verwenden. Zur Arbeitsweise siehe Anhang 2.

Entgegen den Ausführungen in Abschnitt 8.1 der Norm ist bei auftretenden Emulsionen nicht die Probe, sondern die abgetrennte Emulsion zu zentrifugieren.

Anmerkung 2: *Bei der Extraktion von Trink- und Grundwasser treten üblicherweise keine nennenswerten Emulsionen auf.*

4.4.1 Anforderungen

Entgegen Abschnitt 3 der Norm dürfen die Extrakte nicht „eingedampft“, sondern müssen nach Abschnitt 8.3 der Norm in Gegenwart von N,N-Dimethylformamid aufkonzentriert werden.

Vor der Anwendung des Analysenverfahrens ist die Probenvorbereitung zu optimieren und die Bedingungen festzulegen. Hierbei müssen bei Trink- oder Reinstwasser für alle PAK mittlere Wiederfindungsraten von 80% bis 110% erreicht werden. Dabei sollte eine Standardabweichung der mittleren Wiederfindungsraten von 5% nicht überschritten werden.

4.4.2 Alternative Aufarbeitung der Extrakte

Bei der üblichen Graduierung von Reduzierkolben kann bei einem Volumen von 2 ml ein Volumenfehler von bis zu 10% auftreten. Deshalb wird eine andere Aufarbeitung empfohlen:

a) ungefärbte Extrakte

- Dem auf etwa 1 ml eingeeengten Extrakt im Reduzierkolben 1 ml der N,N-Dimethylformamidlösung (siehe Abschnitt 4.1.1) zusetzen.
- Extrakt auf ca. 200 μ l einengen und in einen 2-ml-Messkolben überführen.
- Reduzierkolben mehrmals entweder mit Methanol oder mit dem Anfangsgemisch der chromatographischen Trennung nachspülen und die Spüllösungen ebenfalls in den Messkolben überführen (siehe Anmerkung 6).
- Messkolben mit dem verwendeten Lösemittel bis zur Marke auffüllen.

b) gefärbte Extrakte

- Dem nach Abschnitt 8.4 der Norm erhaltenen Eluat 1 ml der N,N-Dimethylformamidlösung (siehe Abschnitt 4.1.1) zusetzen.
- Eluat auf ca. 200 μ l einengen, in einen 2-ml-Messkolben überführen und wie bei den ungefärbten Extrakten weiterverfahren.

Anmerkung 3: *Bei Trink-, Grund- und Oberflächenwasser ist eine Reinigung üblicherweise nicht notwendig.*

Anmerkung 4: *Bei der Extraktreinigung können Verluste an PAK auftreten. Durch Ermittlung der Wiederfindungsraten ist sicherzustellen, dass die Anforderungen nach Abschnitt 4.4.2 eingehalten werden.*

4.4.3 Störungen

Geringe Wiederfindungsraten

Der Extrakt darf nicht unter 200 µl eingengt werden, da sonst Verluste bei den leichtflüchtigen PAK auftreten.

Kontamination, Blindwerte

Um Querkontamination zu vermeiden, können die Glasgeräte bei 420° C ausgeheizt werden.

Luftblasen im Mikroseparator

Luftblasen können sich beim Befüllen des Mikroseparators im oberen Flaschenteil und im Aufsatz bilden. Dadurch kann das Lösemittel u.U. heraustreten oder –spritzen. Durch langsames Befüllen kann die Bildung von Luftblasen verhindert werden.

4.5 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

4.5.1 Anforderungen

4.5.1.1 Chromatographische Trennung

Die in der Norm empfohlenen Leistungsdaten (siehe nationales Vorwort zur Norm) zur Sicherstellung der Qualität der Trennung durch Injektion einer Säulentestlösung (siehe Abschnitt 4.1.2) unter isokratischen Bedingungen im k' - Bereich von 2 bis 5 ermitteln (Beispiel siehe Anhang 3).

Anstelle der in der Norm angegebenen Gleichung zur Berechnung der chromatographischen Auflösung R kann auch Gleichung (1) verwendet werden:

$$R = 1,177 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{b_{h1} + b_{h2}} \right) \quad (1)$$

mit:

t_{R1} = Retentionszeit des ersten Peaks, in Minuten

t_{R2} = Retentionszeit des zweiten Peaks, in Minuten

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

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

Anmerkung 5: Zur Trennung von Dibenzo(a,h)anthracen, Benzo(ghi)perylen und Indenopyren haben sich Säulentemperaturen im Bereich von 20°C – 30°C als günstig erwiesen.

Anmerkung 6: Die Robustheit der Chromatographie wird verbessert, wenn anstelle von Methanol oder Acetonitril eine Mischung mit Wasser entsprechend den Anfangsbedingungen der chromatographischen Trennung verwendet wird.

Liegt die Messlösung in Methanol/DMF vor, kann bei Säulen mit einem Innendurchmesser von 2mm ein Volumen von höchstens 5 µl und bei Säulen mit einem Innendurchmesser von 3 mm von höchstens 10 µl injiziert werden.

Liegt die Messlösung in einer Mischung von Acetonitril/Wasser/DMF entsprechend den Anfangsbedingungen der chromatographischen Trennung vor, kann bei Säulen mit einem Innendurchmesser von 2 bzw. 3 mm ein Injektionsvolumen von mindestens 20 µl injiziert werden, ohne dass eine nennenswerte Peakverbreiterung auftritt.

4.5.1.2 Wiederholpräzision der Retentionszeiten

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

4.5.1.3 Detektion

Die Schaltung der Wellenlängen und die Änderung der Abschwächung dürfen zu keinen Störungen der Peakdetektion führen und deshalb nur zwischen Peaks vorgenommen werden, die mit einer Auflösung von mindestens $R = 2,5$ getrennt sind.

Die notwendige Auflösung R_{min} kann nach Gleichung 2 berechnet werden.

$$R_{min} = 1,177 \frac{[b_1 + a_2 + t_s + 3(s_1 + s_2)]}{b_{h1} + b_{h2}} \quad (2)$$

mit:

b_1 = Distanz vom Peakmaximum bis zum Peakende des ersten Peaks, gemessen an der Peakbasis, in Minuten

a_2 = Distanz Peakanfang bis zum Peakmaximum des zweiten Peaks, gemessen an der Peakbasis, in Minuten

t_s = Zeit, die der Detektor benötigt, um die Wellenlängen zu ändern, in Minuten

s_1 = Wiederholpräzision der Retentionszeit für den ersten Peak

s_2 = Wiederholpräzision der Retentionszeit für den zweiten Peak

b_{h1}, b_{h2} siehe Gleichung 1

Anstelle des in der Norm angegebenen Wellenlängenprogramms kann auch das in DIN 38414-23 in Tabelle 2 als Beispiel B angeführte Wellenlängenprogramm (siehe Seite 8 der Norm) verwendet werden.

4.5.1.4 Identifizierung

Die Anwesenheit eines PAK in einer Probe gilt als nachgewiesen, wenn die Abweichung der Retentionszeiten zwischen dem Peak in der Probe und der Referenzsubstanz weniger als $\pm 0,15$ min beträgt.

Die nach der Norm (Abschnitt 8.5.4) vorgeschlagene Absicherung von positiven Befunden über den Vergleich der Anregungs- bzw. Emissionsspektren erfordert einen Fluoreszenzdetektor nach 4.2.6.

Die Spektrenqualität solcher Geräte ist nach dem heutigen Stand für eine Absicherung von Befunden ab Massen von etwa 25 pg (abs.), je nach Substanz und chromatographischen Bedingungen, ausreichend. Bevorzugt sollten die Anregungsspektren zur Absicherung der Identifizierung herangezogen werden. Beispiele für Spektren siehe DIN 38 414-23.

Bei der zusätzlichen Verwendung eines Dioden-Array-Detektors ist eine Absicherung von positiven Befunden über den Vergleich der Absorptionsspektren unter den üblichen Bedingungen ab Massen von etwa 250 pg (abs.), je nach Substanz, möglich.

Anmerkung 7: *Die zur Identifizierung herangezogenen Referenzspektren müssen unter den gleichen Bedingungen gemessen werden wie die Spektren der Stoffe in der Probe. Die Spektren müssen mit den Untergrundspektren korrigiert sein, die möglichst zeitnah zum Peak liegen, z. B. Mittelwert der Basislinienspektren vor und nach dem Peak. Für die Aufnahme der Anregungsspektren sollte ein Wellenlängenbereich ab 200 nm gewählt werden. Die obere Wellenlänge darf höchstens der Emissionswellenlänge des Wellenlängenprogramms abzüglich der Bandbreite des Detektors entsprechen, um den Einfall von Streulicht zu vermeiden. Für den Spektrenvergleich ist jeweils das Spektrum im Peakmaximum (Apexspektrum) heranzuziehen. Hinweise zur Peakreinheit können über den Vergleich der Peakspektren mit dem Apexspektrum erhalten werden.*

Anmerkung 8: *Ein positiver Befund kann durch Aufdotieren der Probe mit der jeweiligen Referenzsubstanz abgesichert werden. Die Messung der aufgestockten Probe darf dabei keine Veränderung der Peakbreite und der Peakspektren ergeben. Eine weitere Absicherung ist mit GC-MS nach Vornorm DIN 38407-F39 möglich.*

4.5.2 Störungen

Richtigstellung zu Abschnitt 4.2 der Norm:

Substanzen, die fluoreszieren oder die Fluoreszenz unterdrücken und mit den PAK ko-eluieren, können die Bestimmung stören. Diese Störungen können zu unvollständig aufgelösten Signalen führen und, abhängig vom Ausmaß, die Richtigkeit der Analyseergebnisse beeinträchtigen. Die Störungen treten besonders bei Naphthalin, Acenaphthen, Fluoren, Phenanthren und Pyren auf und können z. B. durch Alkyl-naphthaline verursacht werden. Unsymmetrische Peaks und solche, die breiter sind als die Peaks der Referenzsubstanzen, weisen auf Störungen hin. Peaküberlagerung kann dazu führen, dass die Angabe eines Analyseergebnisses für den betreffenden Analyten nicht zulässig ist. Durch Vergleich von Anregungsspektren kann die Identität abgesichert und die Peakreinheit geprüft werden (siehe Abschnitt 4.2.6 und 4.5.1 4).

4.5.2.1 Chromatographie

Anstieg des Säulenvordrucks

Bei Routinebetrieb kann der Eingangsdruck der Trennsäule infolge von Partikelablagerungen, z. B. aus unfiltrierten Proben auf den Eingangssieben 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 9: *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 der Norm wiederholt unterschritten und arbeitet das System fehlerfrei, ist eine neue Trennsäule zu verwenden.

Auftreten von Störpeaks

Störpeaks können hervorgerufen werden durch Verschleppung von hydrophoben Begleitsubstanzen aus Proben.

Die Störungen können ggf. durch Verlängerung der Spülphase behoben werden.

Bei stärkerer Verschmutzung kann die Trennsäule durch Spülen mit einer Mischung von Tetrahydrofuran und Acetonitril im Verhältnis von 1:1 gereinigt werden.

Peakverbreiterung

Peakverbreiterung kann auftreten, wenn das Injektionsvolumen für die gewählten chromatographischen Bedingungen zu groß ist (vgl. Abschnitt 4.5.1).

Reste von Hexan, Aceton oder Dichlormethan führen ebenfalls zu Peakverbreiterung und können auch die Ursache für Peaksplitting und Verschiebung der Retentionszeiten sein.

Peakverbreiterung kann auch durch Peaküberlagerung auftreten. Unsymmetrische und gegenüber den Referenzsubstanzen verbreiterte Peaks weisen darauf hin. Die Peaküberlagerungen können durch Spektrenvergleich (siehe Abschnitt 4.5.1) erkannt werden.

4.5.2.2 Detektion

Rauschen

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

- Alterung der FLD-Lampe oder der Gitter,
- Verschmutzung der Messzelle,

- Unzureichend entgaste Eluenten, die zur Bildung von Luftblasen in der Messzelle führen können (Basislinienspikes).

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

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

Fluoreszenzminderung

Fluoreszenzminderung und schwankende Peakintensität durch gelösten Sauerstoff im Eluenten tritt besonders bei Pyren auf.

Der Sauerstoffgehalt im Eluenten ist durch kontinuierliche Entgasung des Eluenten möglichst niedrig und konstant zu halten.

Hohe Fluoreszenz durch Begleitstoffe

Störungen durch aliphatische Kohlenwasserstoffe (z.B. bei Abwasseruntersuchungen).

4.6 Kalibrierung

Begriffe und Richtigstellung der Norm: Die Festlegung und Prüfung des Arbeitsbereiches sind Gegenstand der Validierung des Analysenverfahrens. Die Grundkalibrierung ist nach DIN 38402-51 definiert als Kalibrierung des Messverfahrens. Die in der Norm vorgenommene Unterscheidung zwischen der Grundkalibrierung und der Anwendung der Grundkalibrierung (Routinekalibrierung) wird hier nicht übernommen. Der Begriff „Routinekalibrierung“ ist in den Regelwerken nicht definiert.

Kalibrierungen sind in Anlehnung an DIN 38402-51 durchzuführen.

Es wird eine Grundkalibrierung des HPLC-Messverfahrens unter Verwendung von Bezugslösungen (siehe Abschnitte 4.1.4.5 und 5.9 der Norm) durchgeführt. Der Arbeitsbereich ist den realen Anforderungen anzupassen, z. B. für die Untersuchung von Grund- und Trinkwasser einen Arbeitsbereich von $0,005 - 0,05 \mu\text{g/l}$ wählen. In dem gewählten Arbeitsbereich müssen die Kalibrierfunktionen linear sein.

Anmerkung 10: *Üblicherweise werden im Bereich von $0,005 - 0,1 \mu\text{g/l}$ lineare Kalibrierfunktionen erhalten. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Steigung der Kalibrierfunktionen in Folge von Quencheffekten ab.*

Mit der Grundkalibrierung werden die Verfahrenskenndaten und die mittleren substanzspezifischen Wiederfindungsraten ermittelt.

Die relativen Verfahrensstandardabweichungen der Kalibrierfunktionen sollten für die untersuchten Substanzen einen Wert von $v_{x0} \leq 3\%$ ergeben.

Die Gültigkeit der Kalibrierung ist solange gegeben, wie die Anforderungen gemäß Abschnitt 5.1.2.1 erfüllt sind.

4.7 Bestimmung der mittleren substanzspezifischen Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten nach 8.8 der Norm ist blindwertfreies Wasser, z.B. Trinkwasser, mit PAK zu dotieren. Hierzu Bezugslösung nach 4.1.4.5 oder eine Mehrkomponenten-Stammlösung mit höherer Konzentration (z.B. $1 \mu\text{g/ml}$) verwenden. Bei Richtigkeitskontrolle nach 5.1.2.3 zusätzlich die mittleren Wiederfindungsraten der Kontrollsubstanzen bestimmen.

Für die Wiederfindungsraten der Kontrollsubstanzen gelten die gleichen Anforderungen wie für die zu bestimmenden PAK (siehe Abschnitt 4.4.2).

Die aus Trinkwasser ermittelten Wiederfindungsraten sind für die Korrektur von Analyseergebnissen heranzuziehen. Sie sind üblicherweise auch für Oberflächenwasser gültig. Die Bestimmung der Wiederfindungsraten durch Standardaddition ist entgegen der Norm nur bei Matrixeinfluss notwendig. Dieser Matrixeinfluss kann bei Richtigkeitskontrolle durch Kontrollsubstanzen nach Abschnitt 5.1.2.3 erkannt werden.

4.8 Messunsicherheit

Zur Ermittlung der Messunsicherheit sind verschiedene Verfahren in DEV A04 beschrieben. Anhang 5 gibt beispielhaft Messunsicherheiten wieder, die durch Wiederfindungsraten ermittelt wurden.

4.9 Blindwerte

Blindwertmessungen müssen bei jeder Änderung des Analysenverfahrens (Personal, Geräte und Chemikalien) durchgeführt werden und sollten zusätzlich in jeder Analysenserie mitbestimmt werden. Werden in Blindproben PAK in Massenkonzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze festgestellt, ist die Ursache der Kontamination durch systematische Untersuchungen, z. B. durch Untersuchung einzelner Arbeitsschritte oder einzelner Reagenzien, zu ermitteln und zu beseitigen.

Anmerkung 11: *Blindwerte können besonders bei Naphthalin und Phenanthren auftreten.*

5 Maßnahmen zur Analytischen Qualitätskontrolle (AQK)

5.1 Interne Qualitätskontrolle

5.1.1 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 4.6) mit allen Verbindungen im niedrigsten angestrebten Arbeitsbereich,
- Berechnung der Verfahrenskenngrößen,
- Bestimmung der mittleren substanzspezifischen Wiederfindungsraten,
- Bestimmung der Blindwerte.

5.1.2 Richtigkeitskontrolle

Bei der Untersuchung von Oberflächenwasser sollte die Richtigkeitskontrolle durch Kontrollsubstanzen nach Abschnitt 5.1.2.3 erfolgen, um Matrixeinflüsse erkennen zu können.

5.1.2.1 Richtigkeitskontrolle durch regelmäßige Untersuchung von unabhängigen Kontrollstandards

Zur Prüfung der Gültigkeit der Grundkalibrierung sind vor und während der Analysenserie (siehe Nationales Vorwort zur Anmerkung 8.6.4 der Norm) Kontrollstandardlösungen (nach Abschnitt 4.1.4.2) zu analysieren. Die Massenkonzentrationen der PAK in der Kontrollstandardlösung müssen gem. Abschnitt 8.6.4 der Norm zwischen 40 % und 80 % des Arbeitsbereiches liegen. Die Ergebnisse sind für jede Messsequenz zu dokumentieren und für mindestens ein PAK, z.B. Benzo(a)pyren, in einer Sollwertzielkarte mit Ausschlussgrenzen von $\pm 10\%$ zu führen.

Bei Überschreitung der Ausschlussgrenzen ist die Prüfung mit frisch angesetzten Kontrollstandards zu wiederholen. Bestätigt sich die Überschreitung, ist eine neue Grundkalibrierung vorzunehmen.

5.1.2.2 Kontrolle der Probenvorbereitung durch regelmäßige Untersuchung von synthetischen Proben

Zur Prüfung der Probenvorbereitung sind in jeder Analysenserie 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.

Dabei sollen für beide Konzentrationsniveaus von mindestens 3 Substanzen aus unterschiedlichen Bereichen des Chromatogrammes (z.B. Naphthalin, Fluoranthen, Benzo(a)pyren) Wiederfindungs-Zielkarten mit der mittleren Wiederfindungsrate der jeweiligen Substanz (siehe Abschnitt 4.7) als Zentrallinie geführt werden. Die Ausschlussgrenzen betragen $\pm 15\%$.

Bei gegebener Gültigkeit der Grundkalibrierung ist bei Überschreitung der Ausschlussgrenzen die Probenvorbereitung zu prüfen und gegebenenfalls sind die mittleren substanzspezifischen Wiederfindungsraten neu zu bestimmen.

5.1.2.3 Kontrolle der Probenvorbereitung durch Kontrollsubstanzen in jeder Probe

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

Hierzu sollen mindestens zwei Kontrollsubstanzen verwendet werden. Geeignete Kontrollsubstanzen sind z. B. 1-Fluornaphthalin und 6-Methylchrysen (siehe Abschnitt 4.1.3), die üblicherweise nicht in den Proben vorhanden sind.

Die Kontrollsubstanzen sind der Probe mit der Dotierlösung (siehe Abschnitt 4.1.4.4) zuzugeben. Die Massenkonzentrationen der Kontrollsubstanzen sind dabei so zu bemessen, dass sich bei 100 % Wiederfindungsrate eine Konzentration im oberen Arbeitsbereich ergibt.

Bei der Prüfung der Probenvorbereitung durch Kontrollsubstanzen ist für jede Kontrollsubstanz jeweils für eine Messsequenz eine Wiederfindungs-Zielkarte mit der mittleren Wiederfindungsrate der Kontrollsubstanz (siehe Abschnitt 4.7) als Zentrallinie (Ausschlussgrenze $\pm 15\%$) zu führen (Beispiel siehe Anhang 6).

Wenn die gemessenen Wiederfindungsraten A_i der Kontrollsubstanzen innerhalb der Ausschlussgrenzen liegen, hat sich die Probenvorbereitung als stabil erwiesen. In diesem Fall sind die festgestellten Massenkonzentrationen für die einzelnen Analyten in dieser Probe mit den nach Abschnitt 4.7 ermittelten Wiederfindungsraten \overline{A}_i zu korrigieren.

Liegt die gemessene Wiederfindungsrate einer Kontrollsubstanz bei drei aufeinanderfolgenden Proben einer Analysenserie außerhalb der Ausschlussgrenzen, ist die Probenvorbereitung zu prüfen und ggf. sind die mittleren Wiederfindungsraten (vgl. Abschnitt 4.7) 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 Analyseergebnis für diese Probe ist entsprechend zu kommentieren.

Überschreitungen der oberen Ausschlussgrenze sind meist auf Peaküberlagerungen durch Begleitstoffe zurückzuführen.

In diesen Fällen ist das Analyseergebnis als unsicher anzugeben.

5.2 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.

6 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 EN ISO 1042; Laborgeräte aus Glas - Messkolben
- ENV ISO 13530; Wasserbeschaffenheit - Richtlinie zur analytischen Qualitätssicherung in der Wasseranalytik (Oktober 1998)
- DEV-A0-3 Strategien für die Wasseranalytik: Verfahrensentwicklung, Validierung und Qualitätssicherung in der Routine. (36. Lieferung)

Anhang 1: Verfahrenskenndaten für die Matrix Abwasser

Tabelle A1: Ringversuchsergebnisse von einem Kokereiabwasser (aus Ringversuch zur Vorgängernorm DIN 38407-18)

Parameter	L	N	NAP %	X µg/l	SR µg/l	VR %	SI µg/l	VI %
Naphthalin	34	134	0	3800	1486	39,11	497,7	13,1
Acenaphthen	33	130	0,76	546,8	135,7	24,82	47,40	8,7
Fluoren	32	126	5,97	202,4	50,06	2473	16,78	8,3
Phenanthren	32	125	6,72	189,1	51,37	27,17	18,77	9,9
Anthracen	32	125	3,85	32,72	7,835	23,95	3,781	11,6
Fluoranthren	34	134	0	33,56	8,342	24,86	4,706	14,0
Pyren	32	127	4,51	20,54	5,001	24,35	2,739	13,3
Benzo(a)anthracen	33	129	2,27	3,830	1,313	34,29	0,672	17,6
Chrysen	34	129	0	4,019	1,522	37,87	0,769	19,1
Benzo(b)fluoranthren	33	129	0	2,609	0,982	37,64	0,503	19,3
Benzo(k)fluoranthren ¹⁾	27	91	5,21	1,340	0,264	19,73	0,163	12,2
Benzo(a)pyren	32	122	3,17	2,310	0,672	29,08	0,318	13,8
Dibenz(ah)anthracen ²⁾								
Benzo(ghi)perylen ³⁾	24	83	7,78	1,454	0,292	20,08	0,210	14,4
Indeno(1,2,3-cd)pyren ⁴⁾	23	85	0	1,638	0,478	29,20	0,255	15,5

Es bedeuten:

L	Anzahl der Laboratorien	SR	Vergleichsstandardabweichung
N	Anzahl der Messwerte	VR	Vergleichsvariationskoeffizient
NAP	Anteil der Ausreißerwerte	SI	Wiederholstandardabweichung
X	Gesamtmittelwert	VI	Wiederholvariationskoeffizient

^{1,2,3,4)} Einzelwerte von < 1 µg/l (untere Anwendungsgrenze des Verfahrens für Abwasser), wurden bei der Auswertung des Ringversuches nicht berücksichtigt.

²⁾ Der Parameter wurde nur bei einem von 34 Laboratorien mit einer Massenkonzentration > 1 µg/l nachgewiesen, so dass eine Auswertung nicht möglich ist.

Anhang 2: Arbeitsweise bei Verwendung des Mikroseparators nach Bild B.3 der Norm

- Magnetrührstab in die Probenahmeflasche geben und die Flasche mit dem Mikroseparator (nach Bild B.3 der Norm) verschließen.
- Probe mittels Magnetrührer 60 min bei etwa 1000 min⁻¹ rühren und anschließend etwa 10 min absetzen lassen.
- Hexanphase bzw. Emulsion durch Zugabe von destilliertem Wasser in das seitliche Rohr des Mikroseparators vollständig in den Scheidetrichteraufsatz verdrängen.
- Hahn des Trichters schließen, das Wasser aus dem seitlichen Rohr des Mikroseparators über den Spindelhahn ablassen und die wässrige Phase weitgehend von der Hexanphase trennen
- Bei Emulsionen die gesamte Emulsion in ein Zentrifugenglas, z.B. nach Bild B.2 der Norm, überführen, Scheidetrichteraufsatz mit etwa 5 ml n-Hexan nachspülen und das n-Hexan ebenfalls in das Zentrifugenglas geben.

Anhang 3: Ermittlung der Kapazitätsfaktoren und der theoretischen Bodenzahl

- k' -Wert (Kapazitätsfaktor) nach Gleichung (A3.1) ermitteln.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (\text{A3.1})$$

mit:

t_R = Retentionszeit, in Minuten

t_0 = Totzeit, in Minuten

- Bodenzahl N nach Gleichung (A3.2) berechnen:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{b_h} \right)^2 \quad (\text{A3.2})$$

mit:

t_R = siehe Gleichung 1

b_h = Breite des Peaks in halber Höhe, in Minuten

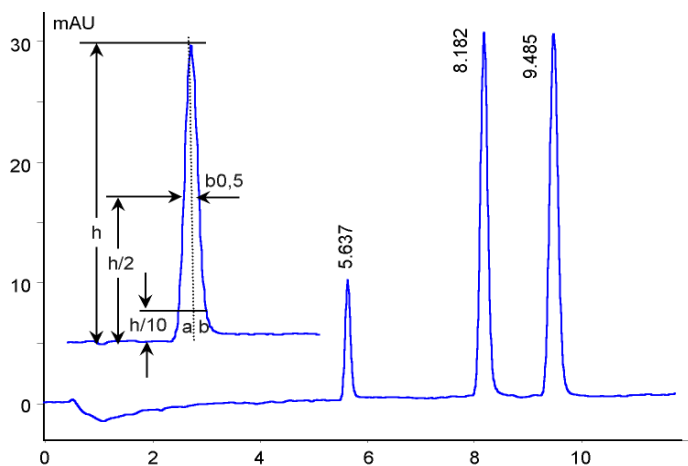
- Peakasymmetrie nach Gleichung (A3.3) berechnen:

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}} \quad (\text{A3.3})$$

mit:

$a_{0,1}$ = Distanz Peakanfang bis zum Peakmaximum, gemessen bei 10 % der Peakhöhe, in Minuten

$b_{0,1}$ = Distanz vom Peakmaximum bis zum Peakende, gemessen bei 10 % der Peakhöhe, in Minuten

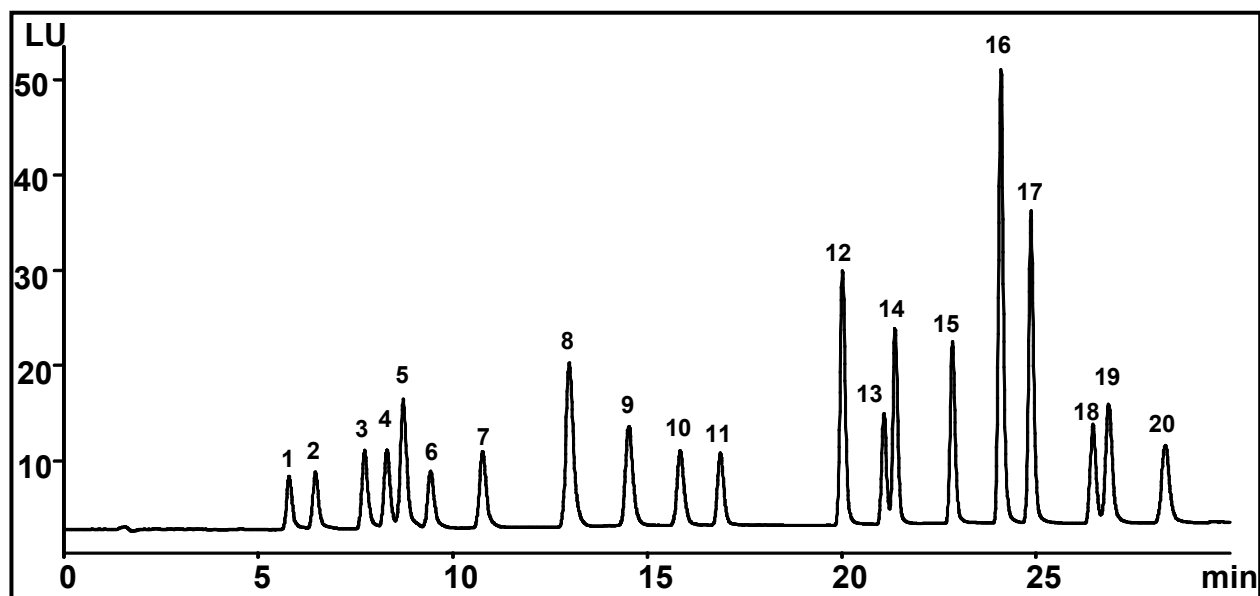


Injektion: 2 μ l Säulentestlösung (4.1.3)
 Säule: MZ-PAH C18, 5 μ m
 (250 mm x 2,1 mm)
 Fluss: 0,2 ml/min
 Temp.: 30°C
 Eluent: Acetonitril-Wasser 7:3 (V/V)
 Detektion: Fluoreszenz
 Anregungswellenlänge 250 nm
 Emissionswellenlänge 410 nm

t_R (min)	PAK	K'	b_h (min)	N	T
5,637	Naphthalin	1,97	0,1080	16093	0,86
8,182	Fluoren	3,31	0,1467	17240	0,89
9,485	Phenanthren	4,99	0,1689	17474	0,90

Bild A.3: HPLC-Chromatogramm der Säulentestlösung unter isokratischen Bedingungen und Testergebnisse

Anhang 4: Beispiel für Messbedingungen



Säule	MZ-PAK, 5 µm (250 mm x 2 mm)					
Injektionsvolumen	5 µl (PAK-Standard βi = 40 ng/ml)					
Elutionsmittel	Gradientenelution Wasser (A) – Acetonitril/Methanol 4+1 V/V (B) 0 - 10 min: 60 % B nach 70 % B 10 - 20 min: 70 % B nach 100 % B 20 - 30 min: 100 % B 20 min Posttime: 60 % B					
Fluss	0,3 ml/min					
Temperatur	30 °C					
Druck	bei Anfangsbedingungen: 130 bar, bei Endbedingungen: 59 bar					
Detektion	Fluoreszenz Wellenlängenprogramm					
	Peak-Nr.	Substanzen	λ _{EX}	λ _{EM}	PMT	Scan, Step 5 nm
	1	Naphthalin	275	350	11	200 - 320
	2	1-Fluornaphthalin				
	3	1-Methylnaphthalin				
	4	2-Methylnaphthalin				
	5	Acenaphthen				
	6	Fluoren				
	7	Phenanthren				
	8	Anthracen	260	420	11	200 – 280
	9	Fluoranthren	270	440	12	200 – 390
	10	Pyren				
	11	3-Fluorfluoranthren				
	12	Benzo(a)anthracen	260	420	11	200 – 340
	13	Chrysen				
	14	6-Methylchrysen				
	15	Benzo(b)fluoranthren	290	430	11	200 – 390
	16	Benzo(k)fluoranthren	290	430	10	200 – 400
	17	Benz(a)pyren				
	18	Dibenzo(ah)anthracen				
	19	Benzo(ghi)perylen				
	20	Indeno(1,2,3-cd)pyren	250	500	12	200 - 450
Zusätzlich im Chromatogramm: 1-Methylnaphthalin, 2-Methylnaphthalin und 3-Fluorfluoranthren						

Anhang 5: Beispiel für Messunsicherheiten

Kurzbeschreibung des Verfahrens:

Für die Berechnung der erweiterten Messunsicherheit wurden jeweils 8 Trinkwasserproben mit 10 ng/l bzw. 100 ng/l dotiert. Die Proben wurden an verschiedenen Tagen aufgearbeitet und in einer Messsequenz analysiert. Die Prüfung der Kalibrierung in der Messsequenz erfolgte mit einem unabhängigen Kontrollstandard (n=10, NIST 1647d).

Die Unsicherheitskomponente für die Reproduzierbarkeit (u_{RW}) wurde ermittelt aus den Standardabweichungen der Kontrollmessungen und der Wiederfindungsraten für das jeweilige Konzentrationsniveau.

Zur Berechnung der Unsicherheitskomponente für die systematische Abweichung (u_{bias}) wurde die Abweichung des Kontrollstandards vom zertifizierten Sollwert und die Abweichung der einzelnen Wiederfindungsraten von der jeweiligen mittleren Wiederfindungsrate zu Grunde gelegt.

Konzentrationsniveau	10 ng/l					100 ng/l				
	\bar{A}_i	s_{rel}	u_{RW}	u_{bias}	U	\bar{A}_i	s_{rel}	u_{RW}	u_{bias}	U
Parameter										
Naphthalin	89,9	5,2	5,32	5,52	15	84,5	3,8	3,91	3,84	11
1-Fluornaphthalin	80,3	3,8	4,93	6,81	17	80,3	5,5	5,62	7,16	11
Acenaphthen	92,7	1,6	1,78	3,98	9	93,5	1,8	1,93	2,83	7
Fuoren	92,5	1,9	2,27	2,79	7	94,3	1,3	1,75	1,76	5
Phenanthren	107,9	1,1	1,33	2,45	6	97,9	1,2	1,36	2,05	5
Anthracen	94,9	1,6	2,04	5,62	12	95,2	1,5	1,98	2,88	7
Fluoranthren	101,3	1,9	2,35	3,03	8	98,3	1,2	1,79	1,74	5
Pyren	103,8	2,2	2,43	2,65	7	100	0,8	1,36	1,49	4
Benzo(a)anthracen	95,9	1,1	1,71	3,80	8	99,5	1,0	1,69	1,36	4
Chrysen	96,8	1,5	1,98	5,28	11	98,8	0,9	1,52	1,35	4
6-Methylchrysen	90,0	1,6	2,19	5,40	12	98,3	0,9	1,73	5,07	11
Benzo(b)fluoranthren	95,9	1,3	1,90	3,77	8	98,3	1,3	1,89	1,69	5
Benzo(k)fluoranthren	90,3	0,7	1,89	4,12	9	101	1,1	2,08	2,76	6
Benzo(a)pyren	85,1	1,1	1,93	11,4	23	90,0	0,7	1,77	1,76	5
Dibenz(ah)anthracen	71,1	0,7	1,55	13,1	26	96,8	0,9	1,61	6,27	13
Benzo(ghi)perylen	91,5	1,6	2,11	7,93	16	97,1	0,6	1,53	3,58	8
Indeno(1,2,3-cd)pyren	96,3	2,6	3,42	7,04	16	97,8	1,2	2,56	2,36	7

Alle Angaben in Prozent

\bar{A}_i Mittlere Wiederfindungsrate für das Konzentrationsniveau

s_{rel} Relative Standardabweichung von \bar{A}_i

u_{RW} Unsicherheitskomponente für die Reproduzierbarkeit

u_{bias} Unsicherheitskomponente für systematische Abweichungen

U Erweiterte Unsicherheit (Erweiterungsfaktor = 2)

Anhang 6: Beispiel für Richtigkeitskontrolle mit Kontrollsubstanzen

Ergebnisse aus der Untersuchung von Oberflächengewässern (Rhein und Nebenflüsse, einschließlich Em-scher)

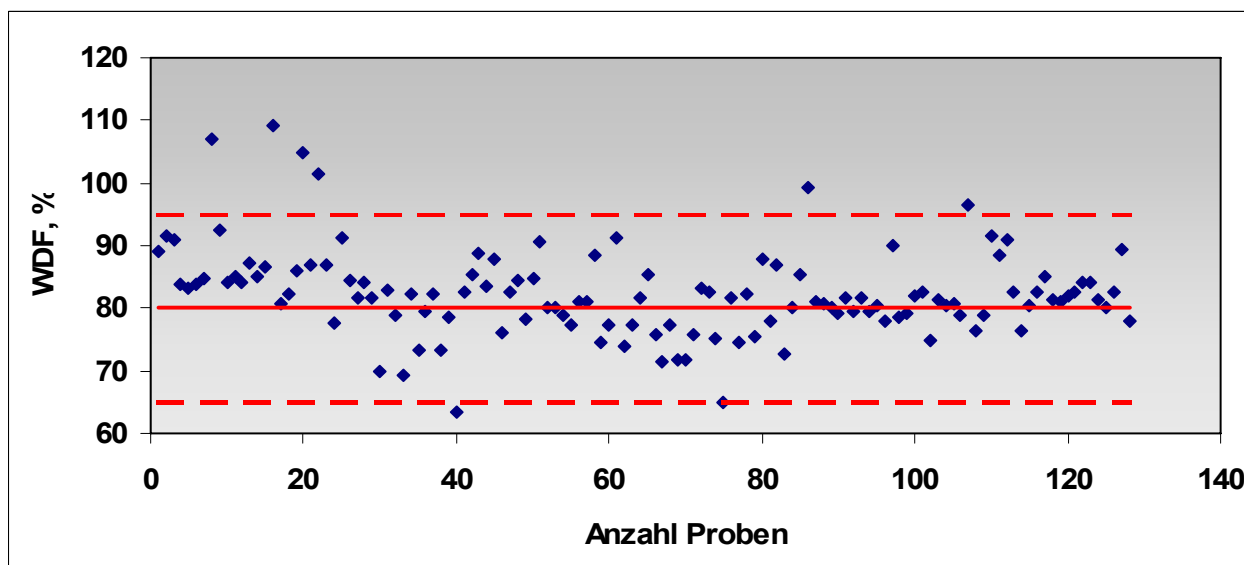


Bild A6.1: Wiederfindungs-Zielkarte für 1-Fluornaphthalin

\bar{A} (1-Fluornaphthalin) = 80 %, UKG 65 %, OKG 95 %

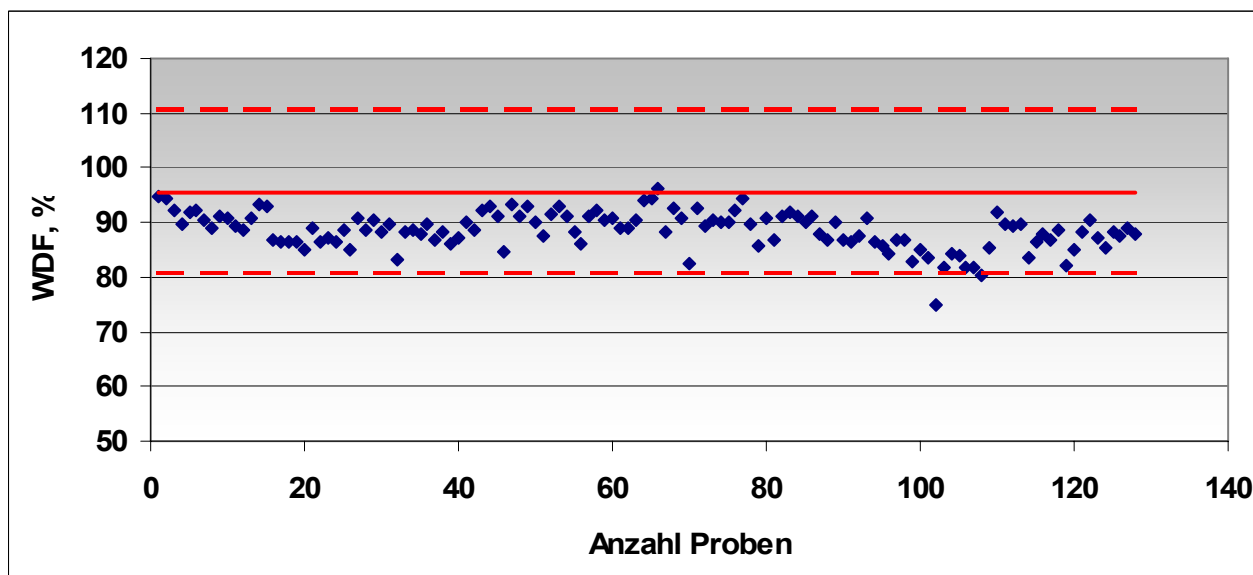


Bild A6.2: Wiederfindungs-Zielkarte für 6-Methylchrysen

\bar{A} (6-Methylchrysen) = 95 %, UKG 80 %, OKG 110 %