

NA 119-01-03 AA N 1005**Validierungsdokument zur Norm DIN 38413-6****Bestimmung von Acrylamid - Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) (P 6)****Gliederung der Dokumentation**

Primäre Validierung genormter Verfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

1	Allgemeine Angaben zur Erarbeitung des Verfahrens.....	2
1.1	Einleitung	2
1.2	Beginn und Ende der Bearbeitung.....	2
1.3	Vollständige Liste der AK-Mitglieder	3
2	Anwendungsbereich.....	5
2.1	Erfasster Parameter und Erweiterungsmöglichkeiten	5
2.2	Arbeitsbereich	6
2.2.1	Geprüfte Matrices	6
2.2.2	Geprüfter und kalibrierter Konzentrationsbereich	6
3	Grundlage des Verfahrens	6
3.1	Prinzip	6
3.2	Erläuterungen und Grundlagen	7
4	Störungen und allgemeine Empfehlungen zur Durchführung.....	7
4.1	Probenahme, Probenvorbehandlung und Probenlagerung.....	7
4.2	Extraktion	8
4.3	Technik.....	10
4.4	Störungen bei der Hochleistungs-Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie.....	10
5	Reagenzien, Geräte	11
5.1	Reagenzien und Lösungsmittel	11
5.2	Referenzsubstanzen und Bezugslösungen	11
5.3	Materialien und Geräte	12
6	Probenahme und Probenvorbehandlung	15
7	Durchführung.....	16
8	Ermittlung der Verfahrenskenndaten	17
8.1	Kalibrierung und Linearität	17
8.2	Bestimmungsgrenzen	17
9	Untersuchungen zur Richtigkeit und Extraktionsausbeute	18
9.1	Referenzmaterialien	18
9.2	Bestimmung der laborinternen Wiederfindung	18
10	Untersuchungen zur Präzision	19
11	Robustheit.....	19
12	Verfahrenskenndaten aus Ringversuchen	20
12.1	Erster interner Ringversuch des Arbeitskreises im April 2005	20
12.2	abschließender (externer) Ringversuch auf der Grundlage des Normentwurfs.....	24
13	Messunsicherheit.....	29
14	Auswertung.....	30
14.1	Kriterien für die Identifizierung von Substanzen	30
14.2	Angabe des Ergebnisses	31
15	Literatur.....	31
Anhang 1	Teilnehmer am externen Ringversuch zur Norm DIN 38413-6.....	32
Anhang 2	Ergebniserfassungsbogen zum externen Ringversuch	33
Anhang 3	UV-Detektion (Informationen ohne normativen Charakter)	38

1 Allgemeine Angaben zur Erarbeitung des Verfahrens

1.1 Einleitung

Genormte Verfahren gelten nach ihrer Erstellung als validiert.

Nach DIN EN ISO 9000 ist "Validierung" definiert als: "Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Anforderungen für einen spezifischen beabsichtigten Gebrauch oder eine spezifische beabsichtigte Anwendung erfüllt worden sind".

Die hier beschriebene Validierung von Normverfahren (im folgenden "primäre Validierung" genannt) kann nicht den gesamten Validierungsprozess abdecken. Sie beschäftigt sich lediglich mit den im Zuge der Erstellung eines Analysenverfahrens notwendigen Validierungsschritten.

Ziel der primären Validierung ist es, durch gemeinsame Untersuchungen der am Normungsprozess beteiligten Laboratorien nachzuweisen, dass das genormte Verfahren in der täglichen Praxis die Anforderungen der vorgesehenen analytischen Anwendung erfüllt. In die primäre Validierung werden deshalb neben den reinen Verfahrenskennwerten auch solche Erfahrungen aus dem Normungsprozess einbezogen, die den Analytiker über die experimentellen Grundlagen informieren und ihm wertvolle Hilfen bei der Anwendung der Norm bieten.

Der die primäre Validierung abschließende Ringversuch wird nach DEV A0-3 durchgeführt. Die weiteren notwendigen Validierungsschritte (Verifizierung der Validierungsdaten im eigenen Labor, Vergleich mit den Qualitätsforderungen des Auftraggebers und der Nachweis ihrer Erfüllung) müssen in der Praxis durch den Anwender erbracht werden.

Um die primäre Validierung nachvollziehbar zu machen, werden in den nachfolgenden Kapiteln zu den einzelnen Abschnitten der Norm erläuternde Angaben gemacht.

1.2 Beginn und Ende der Bearbeitung

Die Gründungssitzung zum DIN Arbeitskreis AK 14 im Normenausschuss Wasserwesen NA119-01-03-02-14 AK „Acrylamid“ fand am 4. November 2003 in Köln (DIN) statt. Die Normungsarbeit zum o.g. Verfahren „Bestimmung von Acrylamid - Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) (P 6)“ wurden im Anschluss mit der ersten regulären Sitzung des neu formierten Arbeitskreises am 16. März 2004 aufgenommen.

Die Normungsarbeit des AK 14 wird mit Verabschiedung der DIN 38413-6 (voraussichtlich in der 2. Hälfte des Jahres 2006) zunächst ruhen. Im Januar 2006 wurde der abschließende externe Ringversuch (siehe 12.2) erfolgreich durchgeführt. Die 7. und vorläufig letzte Sitzung des AK 14 fand am 21. März 2006 in Mülheim an der Ruhr statt. Auf der Sitzung wurden unter anderem die Ergebnisse des Ringversuchs besprochen und alle noch notwendigen Vereinbarungen zur Fertigstellung des vorliegenden Validierungsdokumentes getroffen.

1.3 Vollständige Liste der AK-Mitglieder

Adressenliste und Verteiler: DIN Arbeitskreis AK 14 (NA 119-01-03-02)
„Acrylamid“

Stand: 19.06.2006

<u>Obmann DIN AK 14</u>	<u>stellvertr. Obmann DIN AK 14</u>
<p>Herr Dr. Friedrich Werres IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser Beratungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH Moritzstr. 26 45476 Mülheim an der Ruhr</p> <p>Tel.: 0208-40303-(0)-220 Fax: 0208-40303-80 E-Mail: f.werres@iww-online.de</p>	<p>Herr Dipl.-Ing. Ocke Rörden RheinEnergie AG Wasserwirtschaft Labor (WLC) Parkgürtel 24 50823 Köln</p> <p>Tel.: 0221-178-4127 Fax: 0221-178-84127 E-Mail: o.roerden@rheinenergie.com</p>
<p>Herr Roger Albert Zweckverband Landeswasserversorgung Betriebs- und Forschungslaboratorium Am Spitzigen Berg 1 89129 Langenau</p> <p>Tel.: 07345-9638-2273 Fax: 07345-9638-2290 E-Mail: Albert.R@LW-ONLINE.DE</p>	<p>Herr Dr. Peter Balsaa IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser Beratungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH Moritzstr. 26 45476 Mülheim an der Ruhr</p> <p>Tel.: 0208-40303-(0)-221 Fax: 0208-40303-80 E-Mail: p.balsaa@iww-online.de</p>
<p>Herr Dr. Achim Bockhorn SOFIA GmbH Rudower Chaussee 29 12489 Berlin</p> <p>Tel.: 030-677985-6 /-81 Fax: 030-677985-88 E-Mail: abockhorn@sofia-gmbh.de</p>	<p>Herr Dipl.-Ing. Frank Brille Bergisches Wasser- und Umweltlabor der BTV-GmbH Schützenstraße 34 42281 Wuppertal</p> <p>Tel.: 0202-569-4311 Fax: 0202-569-4300 E-Mail: brille@bwlabor.com</p>
<p>Frau Dipl.-Ing. Ursula Hechler Dr. Weßling Laboratorien GmbH Oststraße 6 48341 Altenberge</p> <p>Tel.: 02505-89-(0)-118 Fax: 02505-89-119 E-Mail: ursula.hechler@wessling-gruppe.de</p>	<p>Frau Dr. Katrin Hoenicke Eurofins / Wiertz-Eggert-Jörissen GmbH Handelslabor Stenzelring 14 B 21107 Hamburg</p> <p>Tel.: 040-752709-479 Fax: 040-752709-35 E-Mail: katrin.hoenicke@wej.de</p>

<p>Herr Ing. Willem Hesselink Mallinckrodt Baker B.V. P.O.Box 1 7400 AA DEVENTER NIEDERLANDE</p> <p>Tel.: +31 (0)570-687613 Fax: +31 (0)570-687574 E-Mail: willie.hesselink@emea.tycohealthcare.com</p>	<p>Herr Dipl.-Ing. Hans-Werner Kelm Dr. Weißling Laboratorien NAFU-Labor GmbH&Co.KG Haynauer Straße 67 A 12249 Berlin</p> <p>Tel.: 030-77 507 409 Fax: 030-77 507 555 E-Mail: hans-werner.kelm@wessling-gruppe.de</p>
<p>Frau Dr. Lilli Reinhold Nds. Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit Lebensmittelinstitut Braunschweig Dresdenstr. 2 und 6 38124 Braunschweig</p> <p>Tel.: 0531-6804-115 Fax: 0531-6804-101 E-Mail: Lilli.Reinhold@Laves.niedersachsen.de</p>	<p>Herr Dr. Michael Rost SGS Institut Fresenius GmbH Im Maisel 14 65232 Taunusstein Neuhof</p> <p>Tel.: 06128-744113 Fax: 06128-744246 E-Mail: michael.rost@institut-fresenius.de</p>
<p>Herr Dipl.-Chem. Jochen Türk Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA) Bereich Umweltmedizin / Analytik Bliersheimer Str. 60 47229 Duisburg</p> <p>Tel.: 02065-418 179 Fax: 02065-418 211 E-mail: Tuerk@iuta.de</p>	<p>Herr Dr. Hinrich Woldmann Labor Dr. Kaiser & Dr. Woldmann GmbH Stresemannstraße 313 A 22761 Hamburg</p> <p>Tel.: 040-85304-(0)-112 Fax: 040-85304-222 E-Mail: woldmann@kaiser-woldmann.de</p>
<p><u>Gast:</u></p> <p>Herr Dr. Frank Michel Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstr. 5 82024 Taufkirchen</p> <p>Tel.: 089-6513 1353 Fax: 089-6513 1399 E-Mail: fmichel@europe.sial.com</p>	<p><u>Gast:</u></p> <p>Frau Dr. Antje Töpfer BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung Richard-Willstätter-Str. 11 12489 Berlin</p> <p>Tel.: 030-8104-5519 Fax: 030-8104-1127 E-Mail: antje.toepfer@bam.de</p>

<p><u>Nachrichtlich an:</u></p> <p>Frau Dr. Sibylle Schmidt Morsbroicher Str. 40 51375 Leverkusen</p> <p>Tel.: 0214-850 5963 Fax: 0214-850 5964 E-Mail: sibschmidt@t-online.de</p>	<p><u>Nachrichtlich an:</u></p> <p>Frau Silvia Sandner DIN Deutsches Institut für Normung e.V. Normenausschuss Wasserwesen (NAW) Burggrafenstraße 6 10787 Berlin</p> <p>Tel.: 030-2601-2467 Fax: 030-2601-1187 E-Mail: SILVIA.SANDNER@DIN.DE</p>
--	---

2 Anwendungsbereich

2.1 Erfasster Parameter und Erweiterungsmöglichkeiten

Die Norm legt ein Verfahren für die Bestimmung von Acrylamid (siehe Tabelle 1) in Trinkwasser, Oberflächenwasser und Rohwasser, das für die Trinkwasseraufbereitung bestimmt ist, fest. Das Verfahren wurde für die genannten Matrices validiert und schließt die Hochleistungs-Flüssigchromatographie gekoppelt mit der massenspektrometrischen Detektion (HPLC-MS/MS) nach positiver Ionisierung mittels APCI (atmospheric pressure chemical ionisation) oder ESI (electrospray chemical ionisation) ein. Als Massenspektrometer wurden Systeme (z. B. Triple Quadrupol, Ion-Trap) validiert, die über eine MS/MS Option verfügen.

In Abhängigkeit von der Matrix kann von einem Arbeitsbereich oberhalb von 0,03 µg/l ausgegangen werden. Die Bestimmungen werden mit Probenvolumina zwischen 100 ml und 500 ml durchgeführt.

Tabelle 1 — Stoffbezogene physikalische und chemische Daten von Acrylamid.

Name	Summenformel	Strukturformel	CAS-Nr ^a	Molare Masse g/mol
Acrylamid	C ₃ H ₅ NO	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}=\text{CH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	79-06-1	71,08
^a CAS: Chemical Abstracts System				

- Bei entsprechender Empfindlichkeit des verwendeten HPLC-MS/MS-Systems kann auf den Extraktionsschritt (Festphasenextraktion der Analyten mittels Sorbentien auf der Basis von A-Kohle nach 9.2 der Norm) verzichtet werden. In diesem Fall wird eine Direktinjektion der Wasserprobe nach ggf. notwendiger Filtration vorgenommen.

2.2 Arbeitsbereich

2.2.1 Geprüfte Matrices

Die folgenden Matrices wurden geprüft:

- Unterschiedliche Trinkwässer (desinfiziert und nicht desinfiziert) aus Versorgungsunternehmen in Baden-Württemberg, Berlin, Niedersachsen, Hamburg, Hessen, Nordrhein-Westfalen und aus dem Bereich Deventer (Niederlande) - z. B. aus dem Bereich Mülheim an der Ruhr (Nordrhein-Westfalen) mit einem mittleren Härtegrad (Härtebereich 2), DOC ca. 0,75 mg/l, nicht desinfiziert, gewonnen aus Uferfiltrat und Aufbereitung mittels Ozonung, Mehrschichtfiltration (Kies, Sand, Aktiv-Kohle),
- verschiedene Grundwässer aus mehreren der oben genannten Bereiche - z. B. aus dem Bereich nördliches Ruhrgebiet, weich (Härtebereich 1), DOC ca. 0,35 mg/l, nicht reduziertes Tiefbrunnenwasser (gefördert aus ca. 65 m Tiefe),
- verschiedene Oberflächenwässer, z. B. Rhein, Ruhr, Tegel, Havel, Weser.

Die Anwendbarkeit auf weitere Matrices (z. B. Kläranlagenabläufe) ist möglich, sie muss jedoch im Einzelfall geprüft werden.

2.2.2 Geprüfter und kalibrierter Konzentrationsbereich

Das Verfahren wurde für Acrylamid mehrfach von den Teilnehmern auf Linearität überprüft. Hierzu wurden von den Laboratorien Mehrpunktkalibrierungen durchgeführt. Für das Gesamtverfahren (einschließlich der Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion, der HPLC und der massenspektrometrischen Detektion mittel ESI+ bzw. APCI+ MS/MS-Detektion konnte im Bereich von 0,03 µg/l bis 0,5 µg/l für Acrylamid eine Linearität mit Korrelationskoeffizienten von > 0,999 erreicht werden.

Das Verfahren kann – in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit des verwendeten HPLC-MS/MS Systems – auch bei niedrigeren Konzentrationen von gelöstem Acrylamid angewandt werden. In jedem Fall ist der erweiterte Kalibrierbereich (auch für höhere Konzentrationen) mit einer ausreichenden Anzahl an Konzentrationspunkten (möglichst äquidistant verteilt) auf Linearität zu überprüfen.

3 Grundlage des Verfahrens

3.1 Prinzip

Acrylamid wird mittels Festphasenextraktion (SPE) aus der Wasserprobe extrahiert. Hierzu werden mit geeigneter Aktivkohle befüllte Polypropylen- bzw. Glaskartuschen verwendet. Zur chromatographischen Bestimmung wird die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) eingesetzt. Für die Kalibrierung ist der Einsatz eines internen Standards erforderlich.

- Probenflaschen und Entnahme: Zur Probenahme vorzugsweise braune, sorgfältig gereinigte, Labor-Glasflaschen mit Glasschliffstopfen in den gängigen Größen (z. B. 100 ml bis 500 ml) verwenden. Die Probenflaschen vollständig mit dem zu untersuchenden Wasser füllen. Hierdurch wird ein übermäßiges Bewegen der Wasserprobe und eine ggf. damit einhergehende Begünstigung eines Zersetzungsprozesses in der Flasche vermindert.
- Zugabe von Reduktionsmitteln: Wasserproben, die eine Restkonzentration von Oxidationsmitteln (Chlor, Chlordioxid, Ozon) enthalten, müssen unmittelbar nach der Entnahme mit Natriumthiosulfat-Pentahydrat versetzt werden, um Abbauprozessen vorzubeugen. Empfehlenswert ist die Zugabe von ca. 50 mg bis 100 mg des kristallinen Reagenzes unmittelbar vor dem Verschließen der Flasche. Anschließend wird die Flasche einige Male kräftig geschüttelt.

Die Notwendigkeit der Zugabe von Reduktionsmitteln wurde durch mehrere Versuche mit aufgestocktem Trinkwasser (10 mg/l Acrylamid), das mit Chlorbleichlaugung auf eine Restkonzentration von 1 mg/l an freiem Chlor eingestellt wurde (Messung mittels DPD-Methode) belegt. Innerhalb eines Zeitraums von 7 Stunden war eine kontinuierliche Abnahme der Acrylamid-Konzentration zu beobachten, wobei nach 7 Stunden ein Verlust von ca. 25 % zu beobachten war.

- Haltbarkeit der Proben und Probenlagerung: Der Arbeitskreis hat den folgenden Wortlaut für die Übernahme in die Norm beschlossen:

Die Wasserproben so bald wie möglich nach der Probenahme aufarbeiten. Ist eine Lagerung nicht zu vermeiden, die Proben bei höchstens 6 °C im Dunkeln aufbewahren. Ist eine Lagerung von mehr als einem Tag notwendig, durch Oberflächenwasser beeinflussten Proben (z. B. Flusswasser oder Uferfiltrat) Natriumazid zufügen, so dass sich eine Konzentration von etwa 40 mg/l ergibt. Auf diese Weise konservierte Proben dürfen höchstens sieben Tage gelagert werden.

Erläuterung zum o.g. Text aus der Norm:

Es wurden umfangreiche Experimente zur Haltbarkeit aufgestockter Proben mit der Matrix Trinkwasser und besonders mit matrixbelastetem Flusswasser durchgeführt. Die Experimente wurden im Rahmen der vorbereitenden Arbeiten zum externen Ringversuch durchgeführt und sollten unter anderem den Probentransport unter ungünstigen Temperaturbedingungen sowie ausgedehnte Lagerzeiten simulieren. Einzelheiten zu den Versuchen sind im Kapitel 6 beschrieben. Die dort beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Zusammensetzung der Proben für die in der Norm genannte Zeit (siehe auch obenstehender Text) sicher gewährleistet ist. Zu weiteren Haltbarkeits-Experimenten, siehe auch Kapitel 12.2 (letzter Abschnitt: „Anmerkung zur Stabilität der Ringversuchsproben“).

- Eine Filtration der Wasserprobe über Glasfaserfilter wird empfohlen, wenn die Wasserprobe Schwebstoffe (ggf. erkennbar an einer Trübung) enthält, um einer Verstopfung der Extraktionskartuschen vorzubeugen. Auch ist bei einer erkennbaren Trübung der Wasserprobe eine Filtration der Wasserprobe immer dann angebracht, wenn eine Direktinjektion geplant ist. Andernfalls können ggf. kürzere Lebensdauern der HPLC-Säulen die Folge sein.

4.2 Extraktion

ANMERKUNG Bei entsprechender Empfindlichkeit des verwendeten HPLC-MS/MS-Systems kann auf den Extraktionsschritt verzichtet werden. In diesem Fall wird die filtrierte Wasserprobe direkt injiziert.

- **Wiederfindung:** Die im Handel erhältlichen Adsorbentien sind oft von unterschiedlicher Beschaffenheit (Beispiele: siehe Kapitel 5.3). Auch können von Charge zu Charge Schwankungen in der Selektivität der Materialien auftreten, so dass mitunter deutlich abweichende Wiederfindungen erhalten werden. Dies beeinträchtigt prinzipiell nicht deren Eignung. Im Allgemeinen werden nach dem beschriebenen Verfahren Wiederfindungen >75 % erzielt. Niedrige und stark schwankende Wiederfindungen deuten auf Matrixeffekte und/oder Schwierigkeiten bei der Extraktion hin. Es wurden zahlreiche Untersuchungen zu den Extraktionsausbeuten und Wiederfindungen durchgeführt. Ergebnisse hierzu werden im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Richtigkeit im Kapitel 9.2 gegeben. In jedem Fall ist die Kalibrierung und Messung jeweils mit einem Adsorbens derselben Charge durchzuführen.
- **Adsorbentien:** Der Arbeitskreis hat mehrere der sich im Handel befindlichen Adsorbentien auf der Basis von Aktivkohle speziell auf ihre Verwendbarkeit für die Extraktion von Acrylamid getestet. Hierbei wurden die besten Extraktionsausbeuten mit Materialien erzielt, die eine Oberfläche von >1000 m²/g aufwiesen (siehe Kapitel 5.3). Alle Untersuchungen zur Validierung wurden ausschließlich mit diesen Materialien durchgeführt. Andere Phasen können ggf. verwendet werden, jedoch ist deren Eignung durch eigene Experimente genau zu prüfen.
- **Durchflussgeschwindigkeit während der Probenextraktion:** Um die Präzision und Richtigkeit der Messergebnisse sicherzustellen sind Durchflussgeschwindigkeiten für die Probenextraktion im Bereich von 5 ml/min bis 20 ml/min zu wählen und die gewählte Durchflussgeschwindigkeit sowohl für die zu untersuchenden Proben als auch für die Kalibrierproben einigermaßen genau einzuhalten (siehe auch Kapitel 7).

Eine Abhängigkeit der Wiederfindung von der Extraktionsgeschwindigkeit konnte in verschiedenen Versuchen eindeutig festgestellt werden. In Versuchen wurde die Extraktionsgeschwindigkeit in Stufen von 10 ml/min auf 20 ml/min erhöht. Hierbei zeigte es sich, dass die Wiederfindungen von 88 % auf 78 % zurückgingen.

- **Restfeuchtigkeit in den Kartuschen:** Ebenfalls aus Gründen der Präzision und Richtigkeit sollte die Trocknungszeit der Kartuschen sowohl für die zu untersuchenden Proben als auch für die Kalibrierproben möglichst gleich gehalten werden, um einen vergleichbaren Wasseranteil im Eluat zu erhalten. Der Arbeitskreis empfiehlt eine Trocknung mit Stickstoff oder Luft für 15 bis 30 min. Eine Restfeuchtigkeit des Adsorbens führt nicht zu Störungen, wenn das Eluat auf ein Endvolumen von 2 ml (keinesfalls aber auf weniger als 1 ml) aufkonzentriert wird. Bei stärkerem Einengen (z. B. auf <1 ml) kann der relativ hohe Wasseranteil im Eluat zu Störungen (schlechtere Reproduzierbarkeit, breitere Peaks) führen. Der Prozess des Aufkonzentrierens wird darüber hinaus stark verlangsamt. Der Arbeitskreis führte verschiedene Experimente zu dieser Thematik durch, die im Kapitel 7 beschrieben werden. Ist ein stärkeres Aufkonzentrieren des Eluates aus Gründen der Nachweisempfindlichkeit nicht unbedingt erforderlich, sollte ein Endvolumen von etwa 2 ml nicht unterschritten werden.
- **Durchbruch von Feinstaub:** Einige Sorbensmaterialien auf der Basis von Aktivkohle enthalten in Abhängigkeit von ihrem Herstellungsprozess Feinstaubanteile, die von der PE-Fritte der Extraktionskartusche nicht vollständig zurückgehalten werden können. Diese Feinstäube können während des Elutionsschrittes in das Eluat gelangen. Werden

solche Materialien verwendet, gegebenenfalls eine Eluatfiltration mit einem Spritzenfilter vornehmen, um einer Verstopfung des Injektionssystems vorzubeugen. Im Laufe der Normungsarbeiten wurden die Produkte durch die Hersteller ständig verbessert, so dass inzwischen Materialien erhältlich sind, die diese Eigenschaften nicht mehr aufweisen (Beispiele, siehe Kapitel 5.3).

4.3 Technik

- In Abhängigkeit von den chromatographischen Bedingungen werden meist Retentionszeiten für Acrylamid zwischen 2,5 min und 10 min erreicht. Um Störungen der Peaksymmetrie zu vermeiden, die chromatographischen Bedingungen so wählen, dass die Retentionszeit (*RT*) mindestens der doppelten Totzeit entspricht.
- Die Peaksymmetrie kann durch große Injektionsvolumen nachteilig beeinträchtigt werden, wenn zum Zeitpunkt der Injektion eine größere Abweichung der Lösungsmittelzusammensetzung der injizierten Probe und des Laufmittelgemisches vorliegt. Dies ist auch bei einer Direktinjektion der Wasserprobe (ohne vorherige Festphasenextraktion) zu berücksichtigen.

4.4 Störungen bei der Hochleistungs-Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie

- Systematisch auftretende Kontaminationen (aus Chemikalien, Lösungsmitteln, verwendeten Geräten) wurden nicht festgestellt.
- Allgemeine Störungen, die durch das Injektionssystem, Undichtigkeiten, Verstopfungen von Leitungen oder durch unzureichende chromatographische Auflösung begründet sind, werden aufgrund spezieller Laborerfahrung und unter Zuhilfenahme der zum Gerät gehörenden Betriebsanleitung umgangen. Die Betriebsbedingungen des gesamten HPLC-MS Messplatzes sind nach den Angaben des Herstellers einzustellen und regelmäßig zu kontrollieren. In Abhängigkeit von der Probenmatrix sollte die verwendete HPLC-Trennsäule regelmäßig auf ihre Trennschärfe geprüft werden.
- Störungen können zum Beispiel durch das Injektionssystem (z. B. zu großes Aufgabevolumen und/oder zu hoher Methanolanteil im aufgegebenen Probenextrakt) bzw. durch mangelhafte chromatographische Abtrennung störender Matrixbestandteile hervorgerufen werden. Die Leistungsfähigkeit und Stabilität des Analysensystems sollte z. B. in regelmäßigen Abständen unter Verwendung eines Messstandards geprüft werden.
- Bei der Umstellung eines HPLC-MS/MS Systems auf einen neuen Parameter kann es insbesondere bei kleinen, polaren Analyten wie Acrylamid zu Schwierigkeiten kommen. Diese werden in der Regel sichtbar in einer deutlich geringeren Anzeigeempfindlichkeit des Systems. Meist sind beide Analyten (Acrylamid und der isotonenmarkierte Standard Acrylamid-d₃) in gleicher Weise betroffen. Abhängig vom Gerät bzw. Problem kann es notwendig sein,
 - a) das Interface bzw. die Ionisierungsquelle zu reinigen (auf eine Equilibrierungszeit nach der Umrüstung achten),

- b) das Chromatographiesystem zu warten, z. B. die Vorsäule zu tauschen (in der Regel sollte eine spezielle Trennsäule für die Messung von Acrylamid verwendet werden).
- Durch Infundieren einer Lösung von Acrylamid im Eluenten in einer Konzentration von bis zu 10 µg/ml kann das Produktionenspektrum überprüft werden. Liegen die Massenpeaks um mehr als 0,2 amu neben den in der Methode abgelegten Massen, so sollte ggf. entweder die Methode angepasst werden oder die Massenchse des Massenspektrometers rekali­briert werden.

5 Reagenzien, Geräte

5.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Reagenzien dürfen keine Blindwerte bei der HPLC-MS/MS Bestimmung verursachen. Als Reagenzien werden, soweit erhältlich, solche des Reinheitsgrades „zur Analyse“ oder „zur Rückstandsanalyse“ verwendet. Der Gehalt der Reagenzien an Verunreinigungen, die zum Blindwert beitragen, muss vernachlässigbar klein sein. Der Blindwert muss regelmäßig, und vor allem bei Verwendung einer neuen Charge, geprüft werden. Die benötigten Reagenzien und Lösungsmittel können u.a. bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Promochem (Wesel) oder Merck (Darmstadt) bezogen werden.

- Wässrige Kalibrierlösungen werden mit blindwertfreiem Wasser angesetzt. Die Beschaffenheit des Wassers muss geprüft werden (z. B. Reinstwasser aus Millipore-Anlage Milli-Q Gradient A10, H₂O Gradient grade oder unbelastetes Tiefengrundwasser).
- Bei Verwendung von Lösungsmitteln der Qualität „zur Rückstandsanalyse“ wurden keine das Verfahren störenden Blindwerte festgestellt. Vorzugsweise sollte zum Ansetzen der Stammlösung das Lösungsmittel Methanol (CH₃OH, z. B. von J.T. Baker HPLC Grade) verwendet werden (siehe Kapitel 5.2).

Nachfolgend einige Bezugsadressen:

- Millipore GmbH: Am Kronberger Hang 5, 65824 Schwalbach, Deutschland,
- Mallinckrodt Baker BV.: P.O Box 1, 7400 AA Deventer, die Niederlande,
- Merck KgaA: Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Deutschland.

5.2 Referenzsubstanzen und Bezugslösungen

- Acrylamid Standardsubstanz sowie deuteriertes Acrylamid-d₃ sind u.a. bei Promochem (Wesel), Dr. Ehrenstorfer (Augsburg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) zu beziehen.
- Interner Standard (ISTD): Während der Normungsarbeiten wurden mehrere Interne Standards (jedoch meist deuteriertes Acrylamid-d₃) erprobt und verwendet. Im Rahmen des abschließenden Ringversuchs kamen die folgenden 3 Stoffe in den Teilnehmerlabors zum Einsatz: Acrylamid-d₃, Acrylamid-¹³C₃ und Methacrylamid.

Es ist grundsätzlich zu empfehlen, wegen der wesentlich besseren Haltbarkeit von methanolischen Acrylamid-Lösungen (im Vergleich zu wässrigen Lösungen von Acrylamid) jeweils eine höher konzentrierte erste Stammlösung in Methanol anzusetzen. Ganz besonders gilt dies naturgemäß für den deuterierten internen Standard Acrylamid-d₃. Alle weiteren Verdünnungen werden anschließend mit Wasser angesetzt.

- Der Arbeitskreis führte Untersuchungen zur Haltbarkeit von Acrylamid-Stammlösungen in Methanol über einen Zeitraum von 6 Monaten durch. Die Lösungen enthielten Acrylamid in einer Konzentration von 500 mg/l und wurden im Kühlschrank (bei 4 bis 6 °C) aufbewahrt. Sie waren über den gesamten Zeitraum hin stabil.
- Zusätzlich wurden zur Klärung eines denkbaren Deuterium-Austauschs (bei Verwendung des deuterierten internen Standards) über den gleichen Zeitraum Experimente mit Acrylamid-d₃ durchgeführt. Dazu wurde eine entsprechende methanolische Stammlösung nach 6 Monaten auf eine Konzentration von 0,3 µg/l verdünnt und mittels HPLC-MS vermessen. Die Ionen m/z=72; 73; 74 und 75 wurden beobachtet; jedoch wurden über den gesamten Messzeitraum keine Signale bzw. Intensitätszunahmen der Massenspuren m/z 72; 73 und 74 festgestellt. Die Experimente zeigen, dass ein Deuteriumaustausch bei Lagerung methanolischer Stammlösungen von Acrylamid-d₃ unter den gegebenen Bedingungen nicht zu erwarten ist. Darüber hinaus wurde eine frisch angesetzten Stammlösung gegengemessen (m/z = 75). Eine Veränderung der Ausgangskonzentration konnte nicht festgestellt werden.

Wässrige Lösungen von Acrylamid waren unter gleichen Bedingungen (Lagerung im Dunkeln bei ca. 4 bis 6 °C) für einen Zeitraum von mehr als 3 Wochen ebenfalls stabil. Dennoch empfiehlt der Arbeitskreis aus Sicherheitsgründen den arbeitstäglichen Ansatz von wässrigen Zwischenverdünnungen und Bezugslösungen, die durch Verdünnung der methanolischen Stammlösung mit Wasser jeweils frisch hergestellt werden. Eine vorzeitige Verkeimung insbesondere sehr starker Verdünnungen kann andernfalls nicht ausgeschlossen werden, da besonders in wässrigen Lösungen mit einem nur geringen Methanolanteil eine Aufkeimung ggf. stark begünstigt wird.

5.3 Materialien und Geräte

Adsorbentien auf der Basis von A-Kohle: Zur Extraktion von Acrylamid aus der Wasserprobe eignen sich Adsorbentien auf der Basis von Aktivkohle. Der Arbeitskreis hat im Laufe der Normungsarbeiten unterschiedliche Materialien getestet. Zu Beginn der Arbeiten waren auf dem Markt jedoch noch keine Aktivkohlen verfügbar, die den Anforderungen hinsichtlich Körnung, spezifischer Oberfläche des Adsorbens sowie einer geeigneten Konfektionierung (z. B. in Glas- oder PP-Kartuschen) genügten. Daher wurde zunächst entsprechend vorliegender Ergebnisse aus einer Forschungsarbeit (siehe Literatur) verfahren und auf technische Aktivkohlen zurückgegriffen, die auch in der Wasseraufbereitung zu Trinkwasser Verwendung finden. Bestimmte Kohlen des Herstellers NORIT mit einer spezifischen Oberfläche von >1000 m²/g eigneten sich nach entsprechender Vorbehandlung am besten. Nachteilig war, dass die Kohlen, die zum Teil in Stäbchenform vorlagen (z. B. NORIT ROX 0,8) zunächst mit einer Kugelmühle gemahlen und schließlich auf eine Körnung von 100 bis 200 µm ausgesiebt werden mussten. Auch die Befüllung von 6-ml-PP Leerkartuschen mit je 1 bis 2 g des Materials gestaltete sich als aufwendig. Darüber hinaus enthielten die Materialien einen geringen Anteil von aus dem Mahlprozess stammenden Stäuben, die mitunter auch die Poren der PE-Fritten passierten (siehe Kapitel 4.2).

Inzwischen kann eine fertig gemahlene und auf eine Korngröße von 100 – 200 µm ausgesiebte A-Kohle (Über- und Unterkorn abgesiebt) auf der Basis der NORIT ROX 0,8 von nachstehender Firma bezogen werden. Der Preis muss beim Hersteller erfragt werden. Er lag 2004 im Bereich von 180,00 € bis 250,00 € je kg. Die Befüllung dieses Materials muss jedoch selbst erfolgen (z. B. mittels Baker 6-ml-PP Leerkartuschen mit 2 PE Fritten).

UVR-FIA GmbH
Verfahrensentwicklung Umweltschutztechnik Recycling
Ansprechpartner und GF: Hr. Dr. Cichos
Chemnitzer Straße 40
D-09596 Freiberg / Sachsen
Tel: 03731 / 797-202
Fax: 03731 / 797-203
E-Mail: info@uvr-fia.de
<http://www.uvr-fia.de>

Andere Firmen haben inzwischen auch fertig befüllte PP-Kartuschen auf der Basis von A-Kohle in ihr reguläres Programm aufgenommen, z. B.:

- Baker (BAKERBOND™ Carbon, 1300 m²/g, Ansprechpartner: Willem Hesselink – sen. Prod. Specialist, Deventer, NL) und
- Supelco (Carboxen – 1000, 1200 m²/g)

Beide oben genannte Materialien wurden vom Arbeitskreis ebenso wie das NORIT-Material validiert und erfolgreich eingesetzt. Ferner wurden die genannten Adsorbentien von verschiedenen Teilnehmern im abschließenden Ringversuch verwendet (siehe Kapitel 12.2).

HPLC-Chromatographiesäulen: Im Arbeitskreis wurden verschiedene Trennphasen für die Hochleistungs-Flüssigchromatographie eingesetzt und während der Verfahrensvalidierung verwendet. Um Störsignale abzutrennen kann es notwendig sein, eine alternative Säule zu verwenden. Aus diesem Grund sind nachfolgend einige Säulen genannt, die sich nach Prüfung als geeignet erwiesen haben. Tabelle 2 zeigt verschiedene Anwendungsbeispiele, die mit den Säulen gefahren wurden. In der Regel ist eine isokratische Betriebsweise zu empfehlen.

- Hypersil ODS, 250 x 3 mm, 5 µ (Thermo Electron)
- LUNA, 150 x 3 mm, 5 µ (Phenomenex)
- Hypercarb, 150 x 3 mm oder 100 x 2,1 mm, 5 µ (Thermo Electron)
- Purospher C18, 250 x 3 mm, 5 µ (Merck)
- Aqua C18, 150 x 4,6 mm, 3 µ (MZ)

Tabelle 2 — Liste der von den Teilnehmern des AK 14 häufig verwendeten Gerätetypen und Betriebsbedingungen.

Bezeichnung (Gerät)	Hersteller	MS-Typ	Quelle	Säule	Temperatur (Säule)	Inj.-Vol. in µl	Laufmittel (isokratisch)	Fluss µl/min
LCQ Duo	Thermo	Ion-Trap	APCI+	Hypersil ODS 250 x 3 mm, 5 µ	45 °C	20	Methanol / Wasser (6 % / 94 %)+0,05 % Ameisensäure	800
1100 Series LC/MSD Trap	Agilent	Ion-Trap	ESI+	Phenomenex LUNA 150 x 3 mm	40 °C	20	90 % Wasser + 10 % Methanol	250
Quattro Micro	MicroMass	TSQ	ESI +	Phenomenex LUNA 150 x 3	40 °C	20	97 % (0,5 ml Ameisensäure + 5ml Methanol + 500 ml Wasser) / 3 % ACN	200
API 2000	Applied Biosystem	TSQ	ESI +	Merck LiChrospher 100 CN	25 °C	40	50 % ACN + 50 % 1 %-ige Essigsäure	700
TSQ Quantum Discovery	Thermo	TSQ	APCI+	Phenomenex LUNA 150 x 3 mm, 3 µ	40 °C	10	1 %ige Ameisensäure / Methanol = 90 / 10	400
Quattro Premier, Quattro LC	MicroMass	TSQ	ESI +	Aqua C18 150 x 4,6 mm, 3 µ	40 °C	10	15 % Methanol / 85 % Wasser	300
Quattro Premier, Quattro LC	MicroMass	TSQ	ESI +	Hypercarb 100 x 2,1 mm, 5 µ	40 °C	10	5 % Methanol / 95 % Wasser	200
API 3000	Applied Biosystems	TSQ	ESI +	Hypercarb 150 x 3 mm, 5 µ	30 °C	20	Wasser / ACN = 99 / 1	500
API 3000	Applied Biosystems	TSQ	ESI +	Hypercarb 150 x 2,1 mm, 5 µ	30 °C	20	0,1 % Essigsäure in Wasser <u>alternativ:</u> Methanol / Wasser (3 % / 97 %) + 0,1 % Essigsäure	300
API 4000	Applied Biosystems	TSQ	ESI +	Purospher C18 endcap. 250 x 3 mm, 5 µ	30°C	20	Methanol / Wasser / Ameisensäure (10:90:0,1;v/v/v)	250
1100 Series LC/MS	Agilent	SQ	ESI +	Phenomenex LUNA 150 x 2 mm				

HPLC-MS Systeme: Es wurden verschiedene HPLC-MS Systeme eingesetzt (Tabelle 2). Die meisten Teilnehmer an den Arbeiten setzten Triple-Stage-Quadrupol (TSQ) Massenspektrometer ein, jedoch wurden auch einige Ion-Trap Geräte mit Erfolg verwendet. Darüber hinaus wurden für einige Validierungsaufgaben auch Single-Quad (SM) MS Systeme verwendet. Die positive Ionisierung wurde meist im ESI Modus (in einigen Fällen aber auch mittels APCI) durchgeführt.

6 Probenahme und Probenvorbehandlung

Die Probenahme vorzugsweise mit Labor-Standflaschen aus Glas mit Glasschliffstopfen durchführen. Vorzugsweise Gefäße der Größe 200-ml bis 1000-ml verwenden. Die Wasserproben so bald wie möglich nach der Probenahme aufarbeiten. Ist eine Lagerung nicht zu vermeiden, die Wasserprobe bei höchstens 6 °C (Kühlschrank) im Dunkeln aufbewahren. Wasserproben, die eine Restkonzentration an Desinfektionsmitteln (Chlor, Chlordioxid) aber auch Ozon enthalten, Natriumthiosulfat zugeben. Weitere Hinweise zur Probenahme und zu Störungen können Kapitel 4.1 entnommen werden.

Es wurden umfangreiche Experimente zur Haltbarkeit aufgestockter Proben mit der Matrix Trinkwasser und besonders mit matrixbelastetem Flusswasser durchgeführt. Begonnen wurde mit aufgestockten Trinkwässern und Uferfiltraten (0,3 µg/l Acrylamid), die mit unterschiedlichen Konservierungsmitteln versetzt wurden, um deren Einfluss auf die Probenstabilität aber auch auf die Analytik zu studieren. Die folgenden Konservierungsmittel wurden in zahlreichen Experimenten getestet:

- Zugabe von 40 mg Natriumazid je Liter Probe,
- Zugabe von 400 µl Acetonitril je Liter Probe,
- Zugabe von 5 ml Formaldehyd je Liter Probe.

Es wurden Messungen (jeweils 4-fach Bestimmung) nach einer Lagerzeit von 1, 2 und 7 Tagen durchgeführt. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurde jeweils eine arbeitstäglich frisch angesetzte Kalibrierlösung (dotierte 0-Wasserprobe) verwendet. Hierbei wurde auch die Stammlösung jeweils frisch angesetzt. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- Trinkwasser und Grundwasser war bei Kühlung über den gesamten Zeitraum auch ohne Zugabe von Konservierungsmitteln stabil. Die Zugabe von Natriumazid und Acetonitril zeigte keinen negativen Effekt.
- Ein negativer Einfluss auf die Wiederfindung aber auch weitere Störungen wurden bei allen mit Formaldehyd stabilisierten Proben beobachtet, so dass dieser Stoff als Konservierungsmittel ausschied.
- Natriumazid zeigte die günstigsten Eigenschaften und ließ sich besser handhaben als Acetonitril, daher wurden die noch ausstehenden Ergebnisse zur Konservierung von Oberflächenwasser ausschließlich mit Natriumazid durchgeführt.

Untersuchungen zur Stabilität von Oberflächenwasserproben wurden wie folgt durchgeführt:

- 1) Oberflächenwasser (Ruhr, Mülheim an der Ruhr) wurde mit 0,3 µg/l Acrylamid dotiert. Ein Teil der Proben wurde durch Zugabe von Natriumazid (40 mg/l) stabilisiert. Alle Pro-

ben wurden bei 4 °C gelagert. Nach Lagerung der Proben von 1, 2, 3, 7, 14 und 21 Tagen wurden die Proben in 4-fach-Bestimmung aufgearbeitet und gemessen. Zur Ermittlung der Wiederfindungen wurden alle Proben mit dotierten und am gleichen Tage aufgearbeiteten 0-Wasserproben verglichen. Bei den Proben ohne Natriumazid-Zugabe wurde nach 2 Tagen Lagerung bereits eine Abnahme der Acrylamid-Konzentration von mehr als 10 %, nach 6 Tagen Lagerung von bis zu 75 % beobachtet. Bei den mit Natriumazid stabilisierten Proben konnte selbst nach 21 Tagen Lagerung keine relevante Konzentrationsabnahme festgestellt werden.

2) In parallel durchgeführten Versuchen in einem anderen Labor und mit anderen Oberflächenwässern (Teltowkanal, Berlin) wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Auch hier konnte gezeigt werden, dass unfiltrierte, bei 7°C gelagerte, Oberflächenwasserproben für mindestens 7 Tagen keinen signifikanten Verlust an Acrylamid zeigen, wenn eine Konservierung vorgenommen wird.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse hält der Arbeitskreis eine Konservierung der zu untersuchenden Wasserproben immer dann für unbedingt notwendig, wenn die Proben direkt oder indirekt durch Oberflächenwasser beeinflusst wurden. Entsprechende Proben müssen spätestens im Untersuchungslabor durch Zugabe von Natriumazid (ca. 40 mg/l) konserviert werden.

Aufgrund der vorliegenden Daten und vor dem Hintergrund der nicht unproblematischen Handhabung von Natriumazid bei der Probenahme wird eine Zugabe vor Ort von allen Teilnehmern als nicht erforderlich erachtet.

Zu weiteren Haltbarkeits-Experimenten, siehe auch Kapitel 12.2 (letzter Abschnitt: „Anmerkung zur Stabilität der Ringversuchsproben“).

7 Durchführung

Ausführliche Hinweise zur Durchführung und besonders zu möglichen Störungen sind auch dem Kapitel 4 zu entnehmen.

Sorbens-Trocknung: Versuche, die in verschiedenen Labors zur Trocknung des Adsorbens durchgeführt wurden, ergaben, dass eine Verlängerung der Trocknungszeit von 15 auf 30 min (aber auch darüber hinaus bis 1 Stunde) nur zu einer unwesentlichen Verbesserung der Trocknungsergebnisse führte (siehe auch Kapitel 4.2). Für die NORIT ROX 0,8 Kohle (Partikeldurchmesser 100 bis 200 µm) wurden beispielsweise die folgenden gerundeten Werte zur Restfeuchte auf der Basis von Mehrfachuntersuchungen (Anzahl der Messungen: n=6) erhalten.

Trockengewicht einer 6-ml-PP Kartusche mit 1 g Kohle gefüllt:	4,55 g
Nassgewicht der nach Probenaufgabe:	6,38 g
Gewicht nach 15 min Trocknungszeit:	5,37 g
Gewicht nach 30 min Trocknungszeit:	5,20 g

Die Versuche zeigen, dass 1 g der o.g. Kohle nach der Anreicherung ca. 1,83 g Wasser enthält.

- Nach 15 min Trocknung enthält die Kartusche noch ca. 0,82 g Wasser. Das entspricht einer Restfeuchtigkeit von ca. 45 %.
- Nach 30 min Trocknungszeit enthält das Adsorbens in der Kartusche noch 0,65 g Wasser, was einer Restfeuchtigkeit von ca. 36 % entspricht, d.h. die Verlängerung der Trocknung um 15 min führt nur zur einer Elimination von weiteren 0,17 g Restfeuchte (etwa 21 %).

Einige Teilnehmer des Arbeitskreises führten zur Verbesserung der Ergebnisse die Trocknung mittels vorgewärmtem Stickstoffgas durch. Es wurden erwartungsgemäß etwas kürzere Trocknungszeiten erhalten.

- Mit 70 °C warmen Stickstoff ließ sich jedoch die Restfeuchtigkeit auch erst nach 30 min auf Werte < 30 % absenken,
- mit 110 °C warmen Stickstoff konnte der ursprüngliche Feuchtigkeitsgehalt des Adsorbens schon nach einer Trocknungszeit von 15 min auf ca. 30 % reduziert werden.

Der Aufwand der Trocknung mittels vorgewärmtem Stickstoff steht jedoch kaum im richtigen Verhältnis zur Zugewinn an Effektivität. Darüber hinaus führt eine verbleibende Feuchtigkeit im Adsorbens nicht zu einer Störung des Verfahrens. Aus diesem Grund beschloss der Arbeitskreis, auf eine Vorwärmung des Stickstoff zu verzichten. Die Trocknung kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden und muss nicht über 15 min ausgedehnt werden.

8 Ermittlung der Verfahrenskenndaten

8.1 Kalibrierung und Linearität

Für das Bestimmungsverfahren soll sich eine lineare Abhängigkeit vom Messsignal zur Konzentration ergeben. Die für Acrylamid ermittelte Kalibrierfunktion gilt nur für den damit abgedeckten Konzentrationsbereich; sie ist außerdem abhängig vom Betriebszustand des HPLC-MS/MS Systems und muss regelmäßig geprüft werden. Für Acrylamid wurden Mehrpunktkalibrierungen mit mindestens meist 5 oder mehr Punkten durchgeführt. Für die Aufstellung der Bezugfunktion und Überprüfung der Linearität wurden in mehreren Experimenten von verschiedenen Teilnehmern die in der Norm beschriebenen Arbeitsweisen angewandt. Der geprüfte Arbeitsbereiche lag zwischen 0,01 µg/l und 10,0 µg/l.

Für die Untersuchungen wurden aufgestockte Trinkwasserproben verwendet. Die gewählten Konzentrationsniveaus wurden über den gewählten Arbeitsbereich etwa gleichmäßig verteilt. Für Acrylamid wurden Korrelationskoeffizienten besser als 0,993 (meist > 0,998) erreicht. Tabelle 3 zeigt typische Beispiele aus verschiedenen Labors zu Ergebnissen aus Kalibrierungen des Gesamtverfahrens mit internem Standard.

8.2 Bestimmungsgrenzen

Im Zusammenhang mit den in Kapitel 8.1 beschriebenen Versuchen zur Ermittlung der Linearität wurde auch die Bestimmungsgrenze ermittelt. Tabelle 3 zeigt Beispiele für die erhaltenen Ergebnisse. Die Auswertung erfolgte jeweils nach einem der beiden nachfolgend genannten Verfahren:

Verfahren 1 Berechnung nach DIN 32645 und

Verfahren 2 Abschätzung unter Berücksichtigung eines Signal/Rausch Verhältnisses von $S/N = 3$ und darüber hinaus unter der Einbeziehung von Identifizierungskriterien (siehe Kapitel 14.1).

Tabelle 3 Typische Ergebnisse aus den Laboratorien einiger Teilnehmer zur Linearität und der Bestimmungsgrenze bei Messung über das Gesamtverfahren (Mit Acrylamid aufgestockte Trinkwasserproben).

Beispiel	Linearität	kalibrierter Bereich	Anzahl der Konz.-Niveaus	Bestimmungsgrenze
Nr.	Korrelationskoeffizient (r)	von → bis (in µg/l)	(n)	BG (in µg/l)
1	0,9990	0,1 → 10,0	10	0,006 *
2	0,9999	0,1 → 0,8	5	0,03 **
3	0,9930	0,01 → 0,03	3	0,005 **
4	0,9993	0,009 → 0,4	10	0,04 *
5	0,9994	0,05 → 0,5	6	0,008 **

* Berechnung nach DIN 32645

** Berechnung aus Signal/Rausch Verhältnisses ($S/N = 3$)

9 Untersuchungen zur Richtigkeit und Extraktionsausbeute

9.1 Referenzmaterialien

Acrylamid einschließlich geeignete interne Standards können im Handel entweder als zertifizierte Standards oder auch als gebrauchsfertige Lösungen – gelöst in Methanol oder anderen organischen Lösungsmitteln – bezogen werden. Einzelheiten zu den Bezugsquellen können dem Kapitel 5 entnommen werden.

9.2 Bestimmung der laborinternen Wiederfindung

Zur Bestimmung der laborinternen Wiederfindung wurden sowohl matrixfreie Grundwässer als auch Oberflächenwässer mit Acrylamid dotiert und aufgearbeitet. Die Wiederfindungen in den matrixfreien Grundwasserproben lagen dabei zwischen 90 und 117 %. Es zeigte sich, dass der Einfluss von Matrixbestandteilen, wie sie in Oberflächengewässer auftreten, auf die Wiederfindung vernachlässigt werden kann.

10 Untersuchungen zur Präzision

Die Teilnehmer des Arbeitskreises führten Untersuchungen zur Wiederholstandardabweichung durch. Hierzu wurden aufgestockte Trink-, Grund- und Oberflächenwasserproben mehrfach vermessen und die Standardabweichung bestimmt. Es wurden Messungen auf unterschiedlichen Konzentrationsniveaus (von 0,05 µg/l bis 0,5 µg/l) durchgeführt. Tabelle 4 zeigt Beispiele aus mehreren Labors für die erhaltenen prozentualen Wiederholstandardabweichungen, die aus Einzelmessungen gespikter Trinkwasserproben erhalten wurden. Die Ergebnisse stimmen sehr gut mit den im abschließenden Ringversuch (siehe Kapitel 12.2) gefundenen Werten überein.

Tabelle 4 Typische Ergebnisse aus den Laboratorien einiger Teilnehmer zur Verfahrenspräzision. Bestimmung der Wiederholstandardabweichung bei Messung über das Gesamtverfahren (Mit Acrylamid aufgestockte Trinkwasserproben).

Beispiel	Wiederhol- Standardabweichung CV_r (in %)	Anzahl der Wiederholmessungen (n)
Nr.		
1	10,4	10
2	1,5	6
3	7,5	12
4	3,8	20
5	5,0	10

11 Robustheit

Der Arbeitskreis führte gezielte Untersuchungen mit systematischer Variation bestimmter Einflussfaktoren durch. Einzelheiten können den folgenden Kapiteln entnommen werden:

Variation der Durchflussgeschwindigkeit	Kapitel 4.2
Variation der Trocknungszeiten	Kapitel 4.2 und 7
Einfluss der Adsorbentien	Kapitel 4.2
Variation des Elutionsmittels	Kapitel 4.2
Einfluss von Stabilisierungsreagenzien	Kapitel 6
Variation und Prüfung des Matrixeinflusses	Kapitel 9.2 und 12.2

12 Verfahrenskenndaten aus Ringversuchen

12.1 Erster interner Ringversuch des Arbeitskreises im April 2005

Zum Einüben des Verfahrens und zur Sammlung von Erfahrungen zu Auswirkungen aus der praktischen Durchführung (Probenansatz, Versand, Lagerung) wurde im März 2005 ein erster AK-interner Ringversuch durchgeführt, an dem sich 12 Labore aus dem Arbeitskreis beteiligten. Die organisatorische Abwicklung orientierte sich exakt an der im AK gemeinsam vereinbarten Zeitschiene. Probenversand war der 05. April 2005. Arbeitsgrundlage bildete das Arbeitspapier zum Normentwurf (N0046) und die auf der 4. Sitzung getroffenen Vereinbarungen. Es wurden 4 Proben an jeden Teilnehmer verschickt:

- Probe 1: Trinkwasser (ungechlort), Sollkonzentration: 0,06 µg/l Acrylamid
- Probe 2: Trinkwasser (ungechlort), Sollkonzentration: 0,12 µg/l Acrylamid
- Probe 3: Rohwasser (Uferfiltrat), Sollkonzentration: 0,18 µg/l Acrylamid
- Probe 4: Standardlösung in Wasser, Sollkonzentration: 12,5 µg/l Acrylamid

Die Proben 1 bis 3 sollten jeweils 3-fach aufgearbeitet und vermessen werden. Probe 4 diente ausschließlich der Überprüfung des chromatographischen Bestimmungsschrittes. Diese Probe konnte ohne Aufarbeitung direkt vermessen werden (3-fach Bestimmung).

12 Teilnehmer beteiligten sich am Ringversuch. Hiervon nahmen 2 Labors, die als Detektor einen UV-PDA Detektor einsetzten, lediglich außer der Wertung teil. 1 Labor konnte wegen technischer Probleme (Geräteausfall) nicht rechtzeitig die Ergebnisse abliefern und ein weiteres Labor hat nur einzelne Messwerte (keine Mehrfachbestimmung) abgeliefert. Somit blieben 8 Labors mit ihren Ergebnissen in der Auswertung. Von diesen Labors setzten 7 ein TSQ und ein Labor ein Ion-Trap Gerät ein. 5 Labors setzten 500 ml Probe, 2 Labors 200 bis 250 ml Probe und 1 Labor 100 ml Probe zur Probenaufbereitung ein. Ein Labor analysierte die Proben 1 bis 3 jeweils 2 mal nach Festphasenextraktion und einmal (mit guter Übereinstimmung der Werte) mittels API 4000 direkt aus der Wasserprobe. Zur statistischen Bewertung wurden nur die Werte berücksichtigt, die über das Gesamtverfahren ermittelt wurden. Als Adsorbens wurde von den Laboren etwa zur Hälfte die Norit ROX 0,8 als auch Baker Carbon A eingesetzt.

Die Ergebnisse wurden entsprechend DIN 38402-42 ausgewertet und auf der 5. Sitzung des AK 14 vorgestellt und besprochen. Wenn davon abgesehen wird, dass die Anzahl der sich in der Bewertung befindenden Labors mit 8 etwas niedrig ist, sind die Ergebnisse insgesamt dennoch sehr zufriedenstellend (siehe Tabelle 5 und Bilder 2a bis 2d). Auffällig ist, dass die Wiederfindung der Probe 3 (Rohwasser, Uferfiltrat) mit ca. 80,6 % relativ niedrig liegt. Da bei diesem Ringversuch jedoch keinerlei Probenkonservierung vorgenommen wurde und einige Labore ihre Proben leider erst relativ spät aufgearbeitet haben, kann es in dieser durch Oberflächenwasser beeinflussten Probe zu einem Abbau gekommen sein. Die Wiederholstandardabweichung ist doppelt so hoch wie die bei Trinkwasser. Bei Probe 2 gab es einen statistischen Ausreißer vom Typ 2 (stark abweichender Labormittelwert), nach dessen Eliminierung die Vergleichsstandardabweichung deutlich niedriger ausfiel. Die Verfahrenskenndaten der Auswertung ohne Ausreißereliminierung sind in Tabelle 5 getrennt ausgewiesen. Die graphische Auswertung lässt erkennen, dass das Verfahren meist gut beherrscht wurde. Auch wurden insgesamt recht niedrige Wiederholvariationskoeffizienten erreicht, was auf eine gute laborinterne Reproduzierbarkeit hinweist.

Die Ergebnisse des Ringversuchs wurden von allen Teilnehmern positiv bewertet und daher im Dezember 2005 dem Hauptausschuss NA 119-01-03 AA bei der Verabschiedung des Normentwurfs als vorläufiges Ergebnis vorgelegt. Zur Verbesserung der statistischen Bewertung auf der Basis einer größeren Teilnehmerzahl wurde jedoch bereits auf der 5. Sitzung des AK 14 festgelegt, einen weiteren Ringversuch durchzuführen, an dem sich zusätzliche (auch externe) Laboratorien beteiligen sollten.

Tabelle 5 **DIN-Arbeitskreis interner Ringversuch zum Verfahren nach DIN 38402-42 ausgewertet (Ergebnisse zu Probe 2 nach Eliminierung eines Ausreißers vom Typ 2 sind getrennt dargestellt).**

Ringversuch „Acrylamid mittels HPLC-MS“, Verfahrenskenndaten nach DIN 38402 Teil 42

(Messergebnisse in µg/l)

Probe	Matrix	l	n	n_{AP} in %	\bar{x}	x_{soll}	η in %	s_R	CV_R in %	s_r	CV_r in %
1	Trinkwasser	8	23	0,0	0,057	0,060	94,7	0,0100	17,6	0,0015	2,72
2	Trinkwasser	7	20	13,0	0,118	0,120	98,4	0,0085	7,19	0,0028	2,39
3	Rohwasser	8	23	0,0	0,145	0,180	80,6	0,0296	20,4	0,0083	5,73
4	Standardlösung	7	20	0,0	12,86	12,50	102,9	1,805	14,0	0,354	2,75

l	Anzahl der Laboratorien nach Ausreißereliminierung
n	Anzahl der Analysenergebnisse nach Ausreißereliminierung
n_{AP}	Ausreißeranteil in Prozent
\bar{x}	Gesamtmittelwert aller ausreißerfreien Analysenwerte im Ringversuch
x_{soll}	Sollwert
η	Wiederfindungsrate in %
s_R	Vergleichsstandardabweichung
CV_R	Vergleichsvariationskoeffizient in %
s_r	Wiederholstandardabweichung
CV_r	Wiederholvariationskoeffizient in %

Auswertung ohne Ausreißereliminierung

Probe	Matrix	l	n	n_{AP} in %	\bar{x}	x_{soll}	η in %	s_R	CV_R in %	s_r	CV_r in %
2	Trinkwasser	8	23	0,0	0,112	0,120	93,2	0,0189	16,9	0,0027	2,41

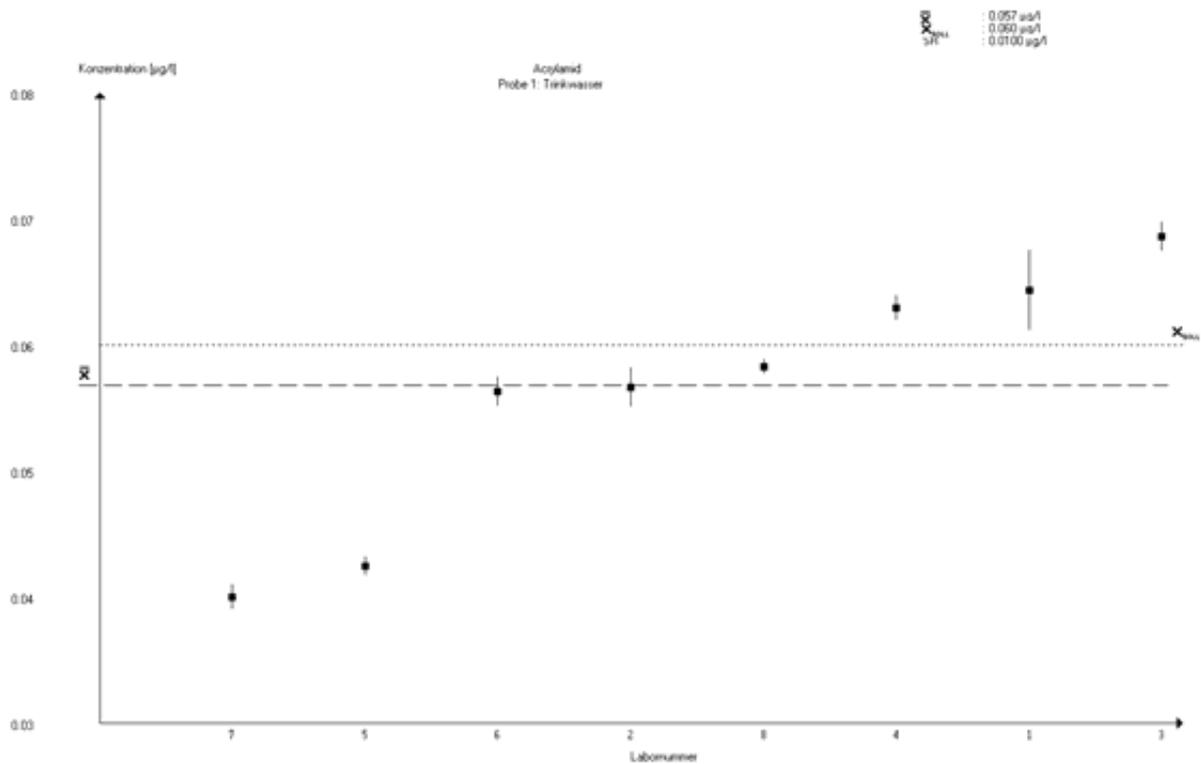


Bild 2a — Graphische Darstellung der Ergebnisse von Probe 1 (Trinkwasser ungechlort, Sollkonzentration 0,06 µg/l Acrylamid).

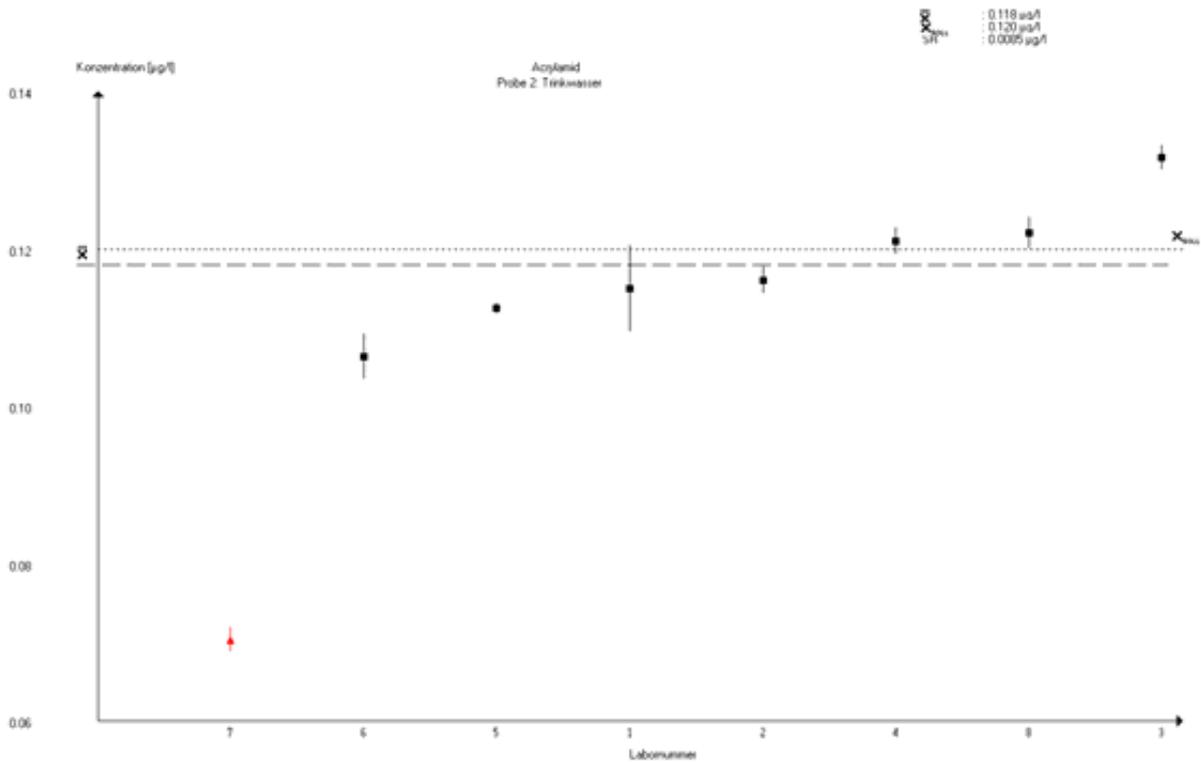


Bild 2b — Graphische Darstellung der Ergebnisse von Probe 2 (Trinkwasser ungechlort, Sollkonzentration 0,12 µg/l Acrylamid, ein Ausreißer Typ 2: Labor 7).

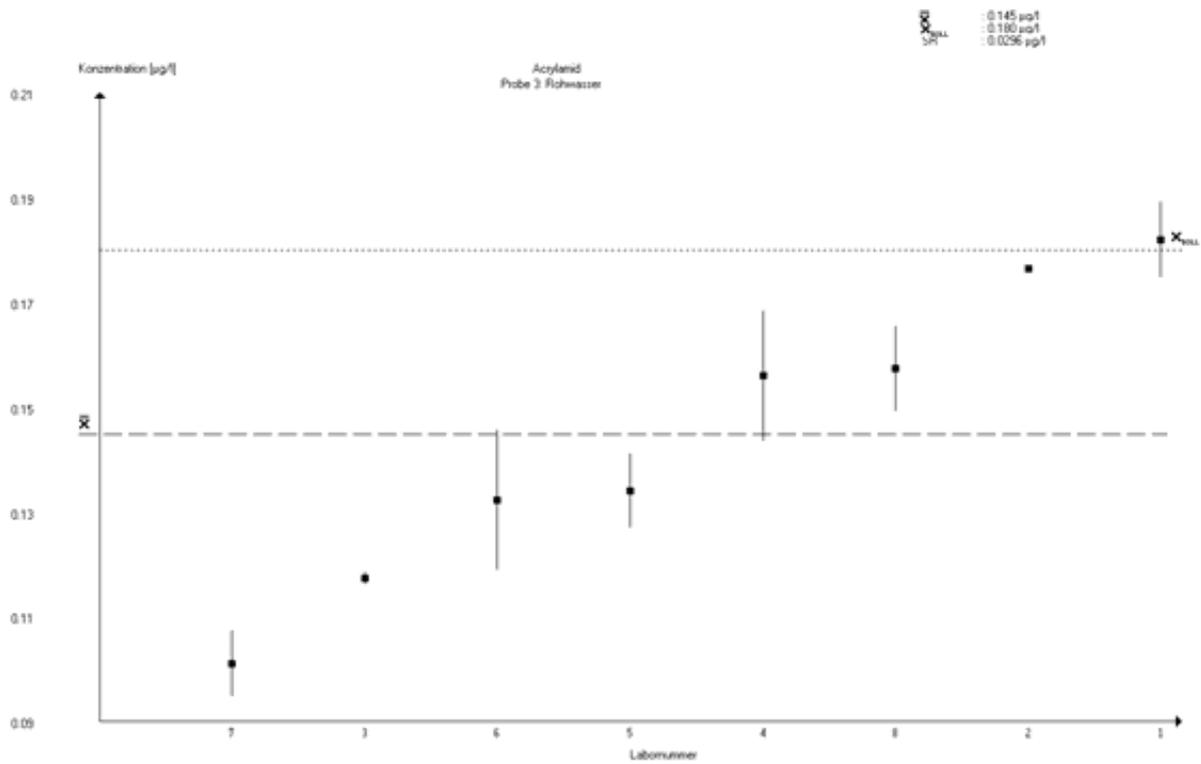


Bild 2c — Graphische Darstellung der Ergebnisse von Probe 3 (Rohwasser, Uferfiltrat, Sollkonzentration 0,18 µg/l Acrylamid).

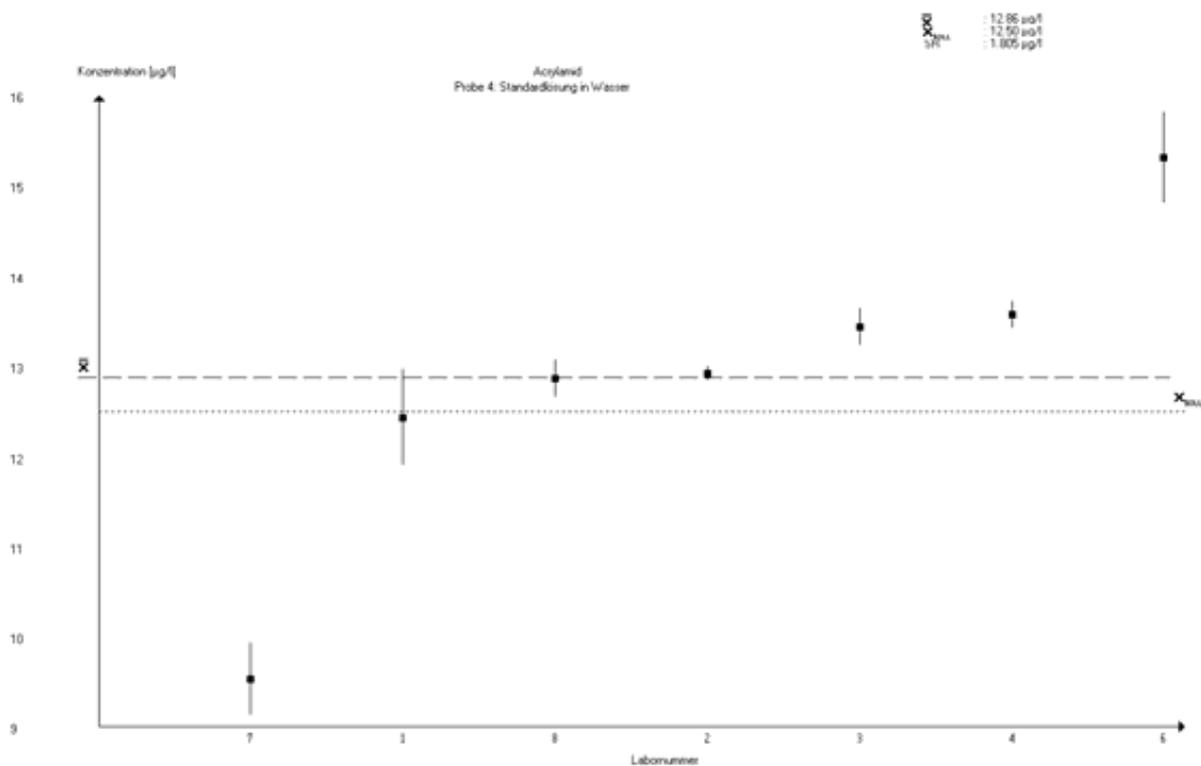


Bild 2d — Graphische Darstellung der Ergebnisse von Probe 4 (Standardlösung in Wasser, Sollkonzentration 12,5 µg/l Acrylamid).

12.2 abschließender (externer) Ringversuch auf der Grundlage des Normentwurfs

Der Arbeitskreis beschloss auf seiner 5. Sitzung im Mai 2005, einen zusätzlichen, abschließenden Ringversuch durchzuführen, an dem sich weitere (vor allem externe) Laboratorien beteiligen sollten. Letzte Einzelheiten sowie der genaue Zeitplan wurden bis zur 6. Sitzung (September 2005) festgelegt. Probenversand sollte der 17. Januar 2006 sein. Alle Proben sollten mit Natriumazid (40 mg/l) konserviert werden, um einem möglichen Abbau von Acrylamid in den Wasserproben (insbesondere im Oberflächenwasser) vorzubeugen. Es waren 3 Proben zum Versand vorgesehen, und zwar im einzelnen

- eine Trinkwasserprobe niedriger Konzentration (zu erwartender Konzentrationsbereich: 0,04 bis 0,10 µg/l Acrylamid),
- eine Grundwasserprobe mittlerer Konzentration (zu erwartender Konzentrationsbereich: 0,08 bis 0,2 µg/l Acrylamid) und
- eine Oberflächenwasserprobe mittlerer Konzentration (zu erwartender Konzentrationsbereich: 0,1 bis 0,50 µg/l Acrylamid).

Die Proben wurden mit dem Paketdienst im „24-Stunden-Service“ versandt, und erreichten mit nur einer Ausnahme ihr Ziel innerhalb von 24 Stunden. Jeder Teilnehmer erhielt 2 Liter je Probe. Von jeder der 3 Proben waren 4 Wiederholmessungen durchzuführen und die Ergebnisse in Datenblätter einzutragen (siehe Anhang 2). Die Teilnehmer wurden explizit darauf hingewiesen, dass alle Proben innerhalb von 72 Stunden analysiert werden sollten. Der Rücklauf der Ergebnisse erfolgte vereinbarungsgemäß bis zum 17.02.2006. Anschließend wurden die Ergebnisse an der Fachhochschule Gießen einer statistischen Bewertung entsprechend DIN 38402-42 unterzogen. Die Besprechung der Ergebnisse des Ringversuchs erfolgte auf der 7. Sitzung des AK 14 im März 2006.

Bis auf ein Labor, dem die Proben offenbar erst am 19.01.2006 zugestellt wurden, haben alle die Proben am vereinbarungsgemäß am 18.01.2006 erhalten. Die Proben enthielten die nachfolgenden Konzentrationen an Acrylamid:

Probe 1 (Trinkwasser) :	Sollwert 0,040 µg/l
Probe 2 (Grundwasser):	Sollwert 0,090 µg/l
Probe 3 (Oberflächenwasser):	Sollwert 0,120 µg/l

Für den Ringversuch konnten die Ergebnisse von 14 Laboren ausgewertet werden. Ein weiteres Labor, dessen Ergebnisse nicht in der statistischen Auswertung berücksichtigt wurden, verwendete einen UV/PDA (Diodenarray) als Detektor. Die Ergebnisse dieses Labors sind ebenfalls sehr gut ausgefallen. Sie wurden in einer getrennten Excel Auswertung neben denen der anderen aufgeführt (siehe Bilder 3a bis 3c).

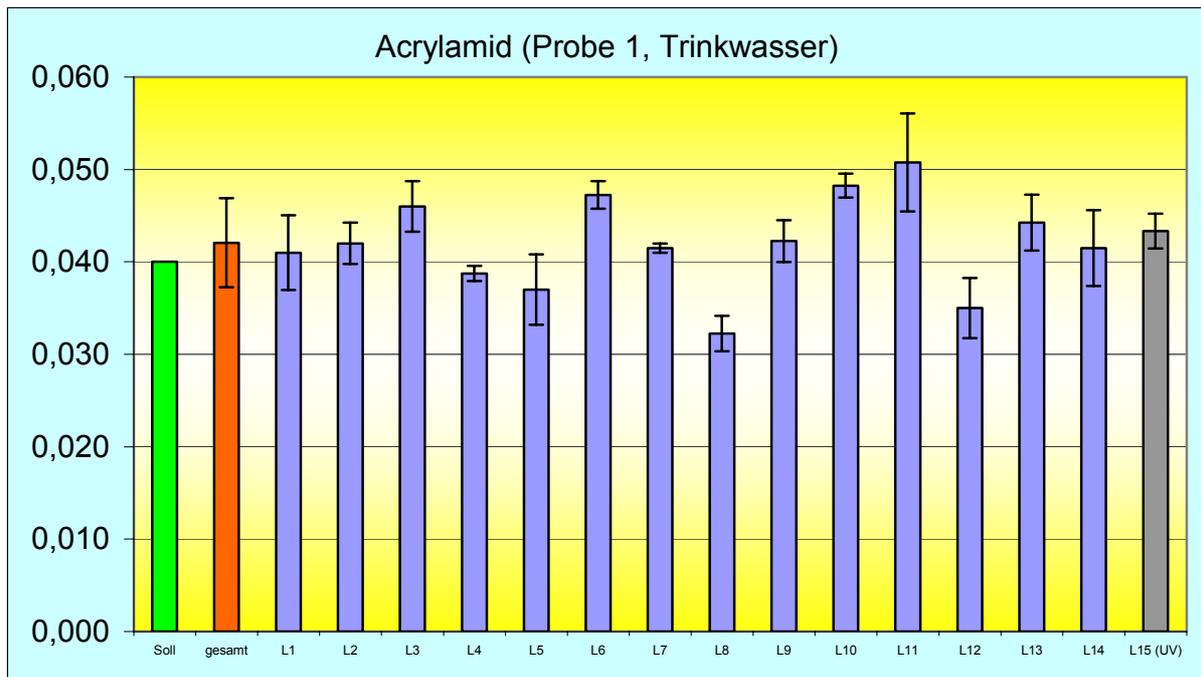


Bild. 3a: zusätzliche Balkengraphik zu Probe 1 unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Labors 15 mit UV/PDA-Detektion.

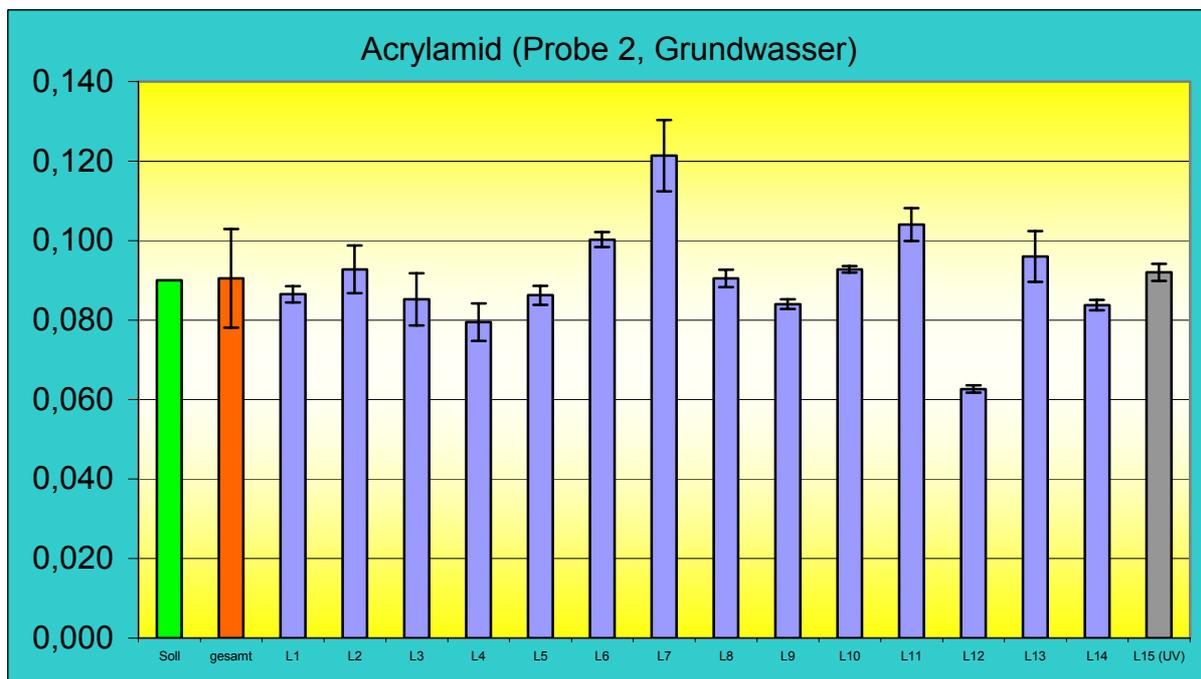


Bild. 3b: zusätzliche Balkengraphik zu Probe 2 unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Labors 15 mit UV/PDA-Detektion.

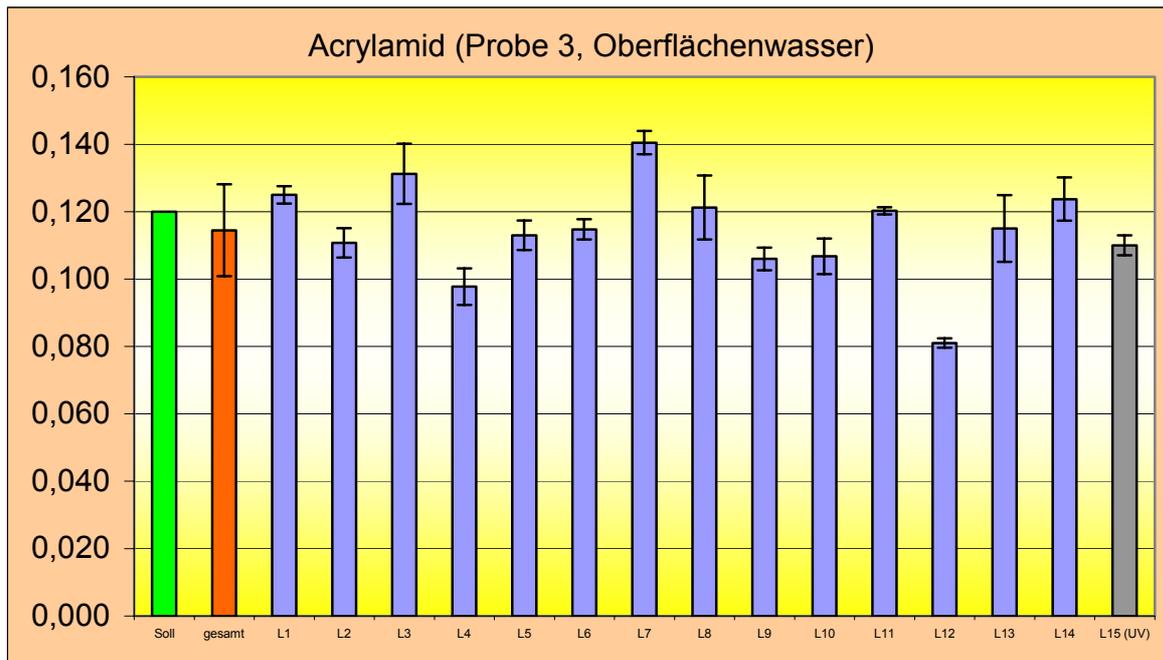


Bild. 3c: zusätzliche Balkengraphik zu Probe 3 unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Labors 15 mit UV/PDA-Detektion.

Von den teilnehmenden Labors waren 4 Labors „extern“, d.h. ihre Vertreter waren keine Mitglieder des DIN-Arbeitskreises NA 119-01-03-02-14 AK. Von den ursprünglich 5 Laboratorien, die sich für eine Direktinjektion (ohne Probenvorbereitung) angemeldet hatten, lieferten zwei Labore Ergebnisse ab (Labor-Nr. 1 und 5). Die anderen konnten wegen technischer Störungen und/oder terminlicher Engpässe keine Messungen durchführen. Die Detektion erfolgte jeweils mittels Massenspektrometrie. Im ESI+ Modus arbeiteten 10 Labors, im APCI+ Modus vier. Die ausreichend hohe Anzahl der Labore bildete eine gute Basis für eine verlässliche statistische Bewertung. Als interner Standard wurde von fast allen Labors Acrylamid- d_3 verwendet. Ein Labor setzte Acrylamid- $^{13}C_3$ und ein weiteres Methacrylamid ein. Als Adsorbens wurde von den Laboren 3-mal Norit (ROX 0,8), 7-mal BAKERBOND™ Carbon und einmal Supelco Carboxen-1000 eingesetzt. Zwei weitere externe Labors verwendeten andere – dem Arbeitskreis nicht bekannte – Adsorbentien, ebenfalls auf A-Kohle Basis („Mitsubishi for TOX“, 1 g sowie eine Kohle von Dräger, 1 g).

Die Auswertung der Datensätze erfolgte nach DIN 38402-42. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind zusammen mit den Verfahrenskenndaten (Soll- und Istwerte, Wiederfindungen, Vergleichs- und Wiederholvariationskoeffizient, Ausreißereliminierung etc.) in der folgenden Tabelle 6 wiedergegeben. Die graphische Darstellung der Auswertung enthält die separat gekennzeichneten Ausreißer (siehe Bilder 4a bis 4c). Der Arbeitskreis bewertete die Ergebnisse als sehr gut. Es wurden niedrige Vergleichsvariationskoeffizienten für alle Probenmatrices gefunden wodurch die Anwendbarkeit des Verfahrens in belasteteren Matrices wie Oberflächenwasser eindeutig belegt werden konnte. Die Wiederfindung lag jeweils bei etwa 100 % und die Anteil der Ausreißer unter 2 %. Nach Ansicht des Arbeitskreises stellt die Verwendung des internen Standards einen der Gründe für das gute Gelingen des Ringversuchs dar. Ferner wird die inzwischen gute Stabilität der am Markt befindlichen und auch von den Teilnehmern eingesetzten HPLC-MS/MS Systemen hervorgehoben.

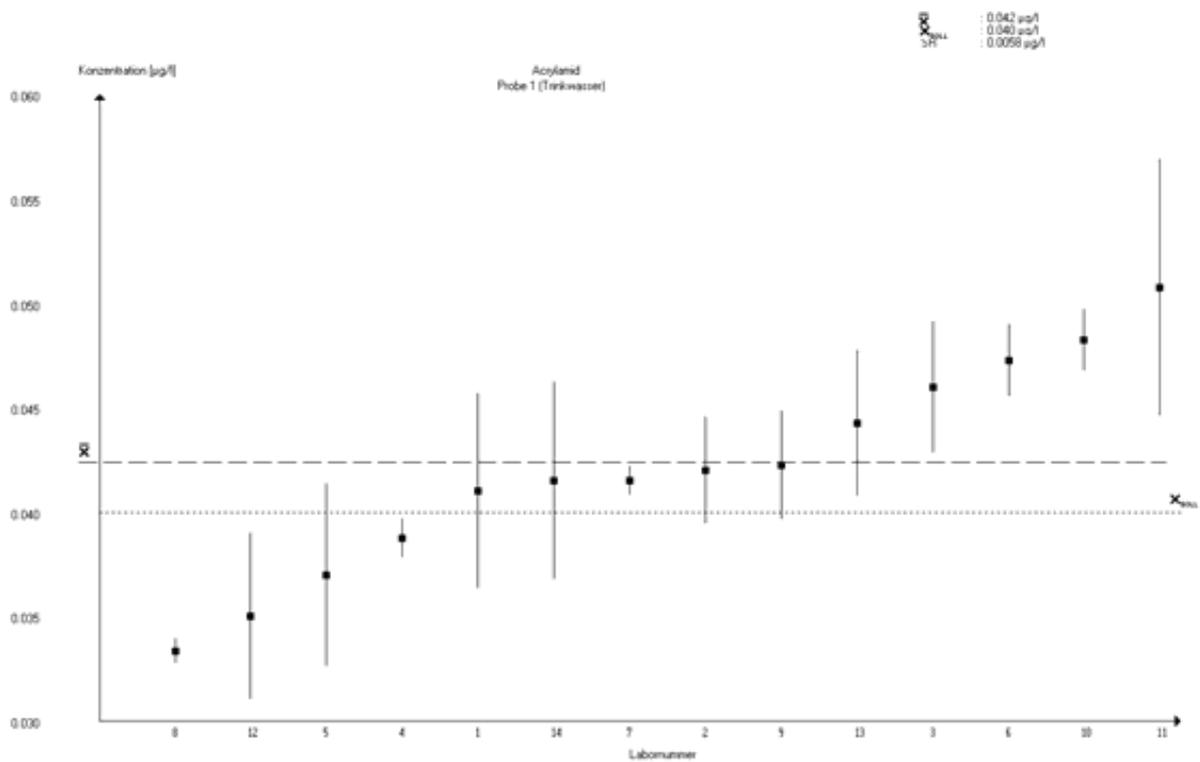
Tabelle 6 Verfahrenskenndaten des abschließenden externen DIN-Ringversuchs nach DIN 38402-42.

Ringversuch zu DIN 38413-6 „Acrylamid mittels HPLC-MS/MS“, Verfahrenskenndaten nach DIN 38402 Teil 42

(Messergebnisse in µg/l)

Probe	Matrix	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>n</i> _{AP} in %	\bar{x}	<i>x</i> _{soll}	<i>η</i> in %	<i>s</i> _R	CV _R in %	<i>s</i> _r	CV _r in %
1	Trinkwasser	14	52	1,9	0,042	0,040	106,0	0,0058	13,6	0,0035	8,2
2	Grundwasser	14	53	1,9	0,090	0,090	99,5	0,0115	12,9	0,0043	4,8
3	Oberflächenwasser	14	53	0,0	0,114	0,120	95,4	0,0145	12,6	0,0067	5,9

- l* Anzahl der Laboratorien nach Ausreißereliminierung
n Anzahl der Analyseergebnisse nach Ausreißereliminierung
*n*_{AP} Ausreißeranteil in Prozent
 \bar{x} Gesamtmittelwert aller ausreißerfreien Analysenwerte im Ringversuch
*x*_{soll} Sollwert
 η Wiederfindungsrate in %
*s*_R Vergleichsstandardabweichung
CV_R Vergleichsvariationskoeffizient in %
*s*_r Wiederholstandardabweichung
CV_r Wiederholvariationskoeffizient in %

**Bild. 4a: Graphische Darstellung der Ergebnisse – Probe 1, Trinkwasser, Sollkonzentration 0,04 µg/l; ein Ausreißer Typ 1 (Einzelwert von Labor 8).**

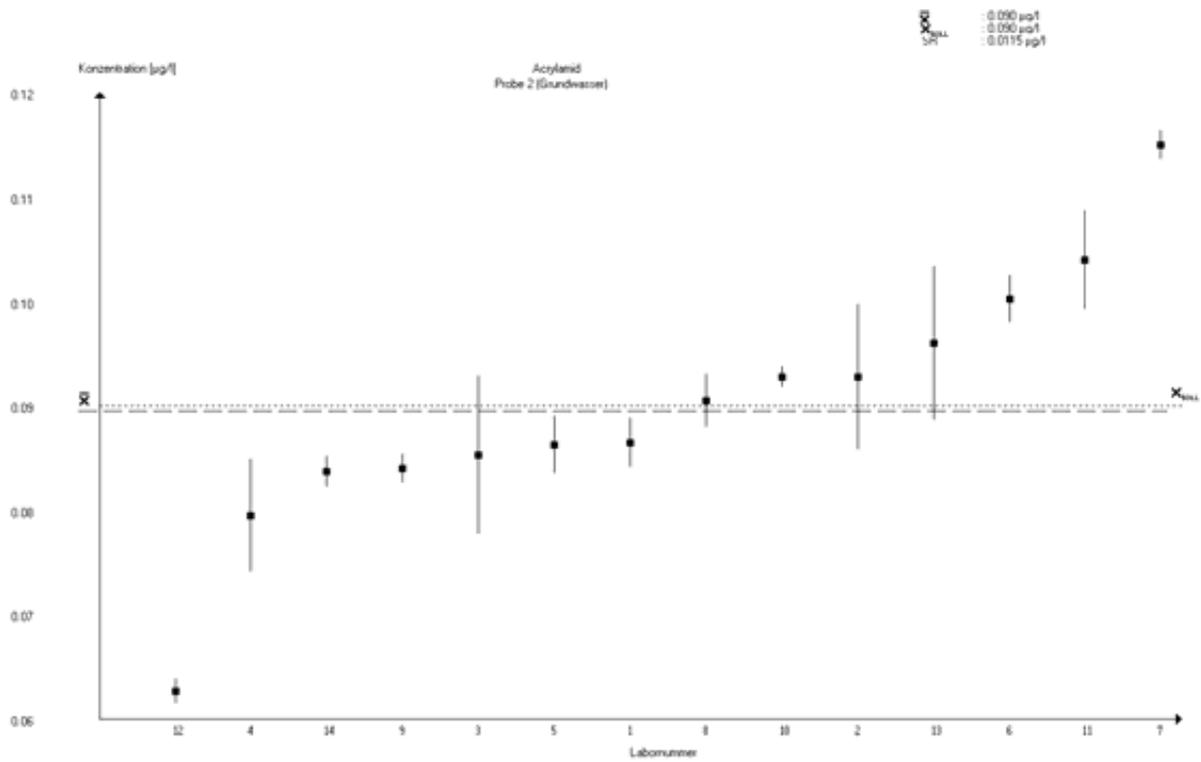


Bild. 4b: Graphische Darstellung der Ergebnisse – Probe 2, Grundwasser, Sollkonzentration 0,09 µg/l; ein Ausreißer Typ 1 (Einzelwert von Labor 7).

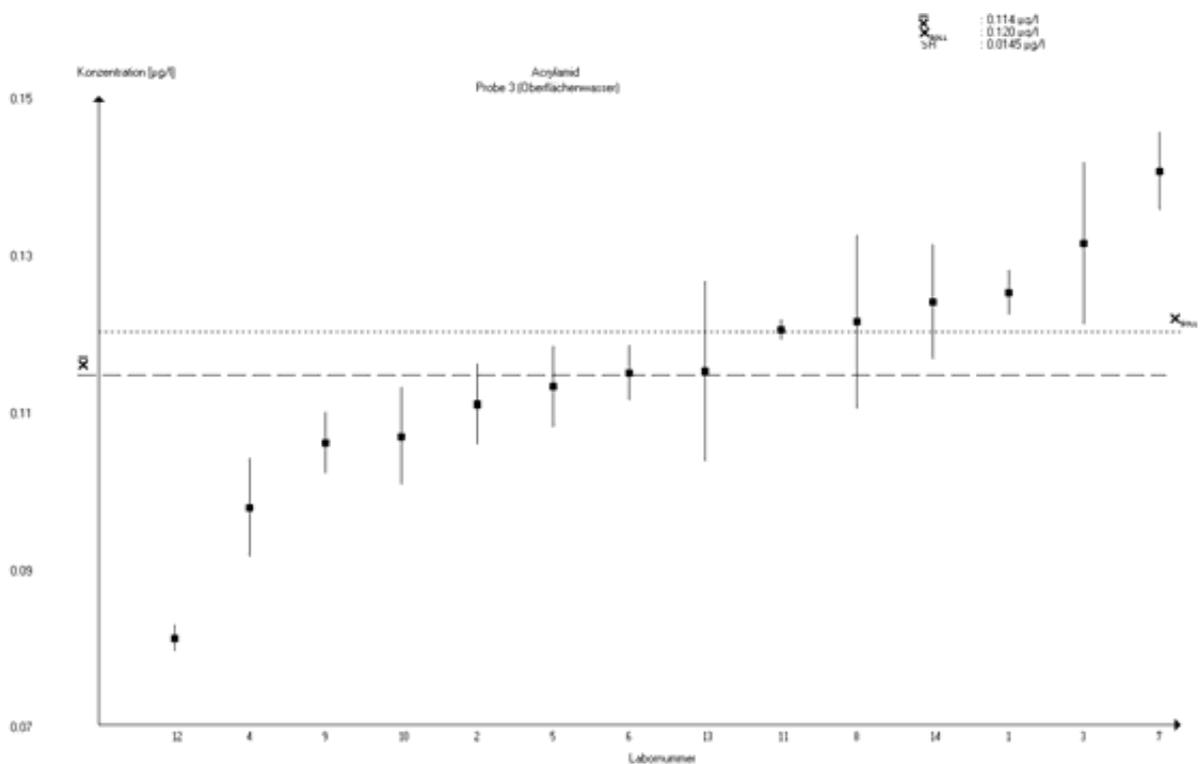


Bild. 4c: Graphische Darstellung der Ergebnisse – Probe 3, Oberflächenwasser, Sollkonzentration 0,12 µg/l; kein Ausreißer.

Anmerkung zur Stabilität der Ringversuchsproben:

Labor-Nr. 5 (externer Teilnehmer) führte mit den Ringversuchsproben zusätzliche Untersuchungen zur Probenstabilität durch. Hierzu wurden die Proben

1. regulär vermessen, d.h. noch am Tag der Probenanlieferung → Ergebnisse des Labors mit der Nummer 5 und
2. zunächst 23 Tage im Kühlschrank (dunkel, 4 bis 6 °C) gelagert, um eine Einschätzung über die Haltbarkeit nach Konservierung mit Natriumazid zu gewinnen.

Beide Messungen erfolgten ohne Probenextraktion mittels Direktinjektion. Tabelle 7 zeigt, dass die erhaltenen Ergebnisse beider Messungen außerordentlich gut übereinstimmen. In den Proben 1 und 2 werden keine Konzentrationsänderungen beobachtet. Selbst im Oberflächenwasser wird nur eine sehr geringfügige Konzentrationsabnahme gemessen, die einen Abbau von Acrylamid kaum erkennen lässt. Dieser zusätzliche Versuch konnte erneut zeigen, dass sich die Probenstabilisierung mittels Natriumazid in der Praxis sehr bewährt.

Tabelle 7 Vergleich der Messergebnisse (Labor 5), die ohne Probenlagerung gewonnen wurden mit denen nach einer Lagerdauer von 23 Tagen im Kühlschrank.

Acrylamid				
	1. Best. (µg/l)	2. Best. (µg/l)	3. Best. (µg/l)	4. Best. (µg/l)
Probe 1 direkt gemessen	0,039	0,042	0,032	0,035
nach 23 Tagen	0,041	0,035	0,038	0,036
Probe 2 direkt gemessen	0,083	0,085	0,089	0,088
nach 23 Tagen	0,083	0,084	0,084	0,088
Probe 3 direkt gemessen	0,120	0,113	0,111	0,108
nach 23 Tagen	0,107	0,106	0,095	0,093

13 Messunsicherheit

Die bei der Anwendung dieser Norm erhaltenen Analysenergebnisse sind mit einer Messunsicherheit behaftet, die bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen ist. Für die Ermittlung der Messunsicherheit sind Verfahren entwickelt worden, die es erlauben, diese aus laborinternen Validierungsdaten, Routine-Qualitätssicherungsmaßnahmen (Range- bzw. Mittelwert-Regelkarten) sowie Validierungs- und Zulassungsringversuchen abzuschätzen. Die Messunsicherheit wird vorzugsweise als erweiterte Messunsicherheit angegeben. Dazu wird die ermittelte kombinierte Standardmessunsicherheit - ausgedrückt als Standardabweichung oder Variationskoeffizient (siehe Kapitel 12, Tabelle 6) - mit einem Erweiterungsfaktor von 2 multipliziert. Dies entspricht einem Vertrauensniveau von ca. 95%.

In der vorliegenden Norm werden zur Abschätzung der Messunsicherheit die im Validierungsringversuch erhaltenen Vergleichsvariationskoeffizienten CV_R herangezogen und mit 2 multipliziert. Die daraus abgeleitete erweiterte Messunsicherheit U des Verfahrens kann bei der Ermittlung der laborinternen Messunsicherheit nur als Orientierung dienen und die Abschätzung der eigenen Messunsicherheit aus laborinternen Daten nicht ersetzen.

ANMERKUNG Die Messunsicherheit ist konzentrations- und matrixabhängig und im unteren Anwendungsbereich des Verfahrens am größten.

14 Auswertung

14.1 Kriterien für die Identifizierung von Substanzen

ANMERKUNG: Erfahrungsgemäß können für aufgenommene Massenspektren einschließlich der beobachteten Massenübergänge und relative Peakintensitäten nicht immer allgemeingültige Qualitätsgrenzen eindeutig festgelegt werden. Diese Parameter können z. B. aufgrund von Schwankungen bestimmter Geräteparameter oder von Matrixeffekten einzelner Proben stark beeinflusst sein. Die sichere Identifizierung erfordert somit immer die Erfahrung eines Fachmannes und geschulten Anwenders. Acrylamid grundsätzlich mittels MS/MS-Modus bestimmen um die Nachweissicherheit zu erhöhen. Hierzu positive Ionisierung (ESI oder APCI) wählen. Zur Identifizierung und Quantifizierung den Massenübergang $m/z = 72 \rightarrow 55$ einstellen (siehe auch Tabelle 8).

Tabelle 8 Massenübergänge zur Identifizierung und Quantifizierung.

Bezugsverbindung	Ausgewählte Ionen zur Identifizierung und Quantifizierung im MS/MS-Modus
	<i>m/z</i>
Acrylamid	72 → 55 Identifizierung + Quantifizierung 72 → 44 Identifizierung (schwacher Übergang)
Interner Standard (Beispiel)	
Acrylamid-d ₃	75 → 58 Identifizierung + Quantifizierung 75 → 44 Identifizierung (schwacher Übergang)

Acrylamid gilt in der Probe als identifiziert, wenn im MS/MS-Chromatogramm der Massenspur des Tochterions ($m/z = 55$) ein Signal erkennbar ist, dessen Retentionszeit bezogen auf eine unter gleichen Bedingungen gemessene Retentionszeit der Referenzsubstanz Acrylamid einer Bezugslösung innerhalb einer Grenzabweichung von ± 5 s liegt. Zusätzlich kann zur Identifizierung der schwächere Übergang $m/z = 72 \rightarrow 44$ herangezogen werden.

Bei ausreichendem Vorwissen über die Wasserprobe – und insbesondere zur Bestätigung eines negativen Befundes – kann auch im SIM-Modus analysiert werden. Als SIM-Masse ist dann die Masse $m/z = 72$ zu verwenden.

14.2 Angabe des Ergebnisses

Die Massenkonzentration von Acrylamid wird in Mikrogramm je Liter auf zwei signifikante Stellen angegeben. Bei Massenkonzentrationen unter 0,1 µg/l wird nur eine signifikante Stelle angegeben.

BEISPIEL

Acrylamid: 1,2 µg/l
 0,31 µg/l
 0,06 µg/l

15 **Literatur**

- DIN EN 1407:1998 „Produkte zu Aufbereitung von Wasser für den menschlichen Gebrauch – anionische und nicht-ionische Polyacrylamide“
- Hashimoto, A.: Improved Method for the Determination of Acrylamide Monomer in Water by Means of Gas-Liquid Chromatography with an Electron-capture Detector. *Analyst*, 101, 932-938 (1976).
- EPA-Methode „Method 8032 A“: Acrylamide by Gas Chromatography. Revision 1, Dezember 1996.
- Martin, E., Samec, J., Vogel, J.: Détermination de l'acrylamide dans l'eau par chromatographie en phase gazeuse (GC). *Trav. chim. aliment. hyg.*, 81, 327-330 (1990).
- Lange-Ventker, M.: Entwicklung neuer Verfahren zum Nachweis anthropogener organischer Stoffe in der aquatischen Umwelt mittels HPLC-MS. Dissertation, Arbeit eingereicht am 15.05.2004, TU Braunschweig.

Anhang 1 Teilnehmer am externen Ringversuch zur Norm DIN 38413-6

- Herr Roger Albert, Zweckverband Landeswasserversorgung, Betriebs- und Forschungslaboratorium, Am Spitzigen Berg 1, 89129 Langenau
- Herrn Dr. Achim Bockhorn, SOFIA GmbH, Rudower Chaussee 29, 12489 Berlin
- Herrn Dr. Thomas Brandsch, Limnologisches Institut Dr. Nowak, Mayenbrock 1, 28870 Ottersberg
- Herrn Dr. Jürgen Buhler, Chemisches u. Veterinäruntersuchungsamt Sigmaringen, Hedingerstr. 2/1, 72488 Sigmaringen
- Frau Dr. Birgit Christall, SGS Institut Fresenius GmbH, Tegeler Weg 33, 10589 Berlin
- Herrn Ing. Willem Hesselink, Mallinckrodt Baker B.V., P.O.Box 1, 7400 AA DEVENTER, NIEDERLANDE
- Frau Cathrin Hoferer, Chemisches Untersuchungslabor Dr. Zipfel, Waldstr. 26 c, 77654 Offenburg
- Herrn Hans-Werner Kelm, Dr. Weißing Laboratorien, NAFU-Labor GmbH&Co.KG, Haynauer Straße 67 A, 12249 Berlin
- Frau Dr. Lilli Reinhold, Nds. Landesamt f. Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit - Lebensmittelinstitut Braunschweig, Dresdenstr. 2 und 6, 38124 Braunschweig
- Herrn Dr. Michael Rost, SGS Institut Fresenius GmbH, Im Maisel 14, 65232 Taunusstein
- Herrn Dipl.-Ing. Ocke Rörden, GEW RheinEnergie AG, Wasserlabor / Gebäude 22, Parkgürtel 24, 50823 Köln
- Herrn Dr. I. Simon, IUQ Dr. Kregel GmbH, Grüner Weg 16 a, 23936 Grevesmühlen
- Frau Dr. Antje Töpfer, BAM Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung, Richard-Willstätter-Str. 11, 12489 Berlin
- Herrn Dipl.-Chem. Jochen Türk, Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA) – Bereich Umweltmedizin, Bliersheimer Str. 60, 47229 Duisburg
- Herr Dr. Friedrich Werres, IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser Beratungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH, Moritzstr. 26, 45476 Mülheim an der Ruhr

Anhang 2 Ergebniserfassungsbogen zum externen Ringversuch

bitte **bis zum 17. Februar 2006** zurücksenden an:

bei Rückfragen:

Tel.: 0208 / 40303-220

Fax.: 0208 / 40303-80

E-Mail: f.werres@iww-online.de

Herrn
Dr. Friedrich Werres
IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser
Beratungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH
Moritzstraße 26
45476 Mülheim an der Ruhr

**Ergebniserfassungsbogen zum DIN Ringversuch „Acrylamid“
im DIN NA 119-01-03-02 AK 14**

entsprechend Normentwurf DIN 38413-6

**„Bestimmung von Acrylamid – Verfahren mittels Hochleistungs-
Flüssigchromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS)“**

Labor:

Straße / PLZ:

Postfach / PLZ:

Ort:

Ansprechpartner:

Tel.: Nr.:

Fax-Nr.:

E-Mail:

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des Bearbeiters

Allgemeines

Probeneingang: (Datum)
Bedingungen der Probenlagerung: bei ° C
Beginn der Probenbearbeitung: (Datum)

interner Standard über das Gesamtverfahren: ja
interner Standard: nein Normabweichung !!)

Probenvorbehandlung

Filtration:

Probe 1	ja <input type="checkbox"/>	, nein <input type="checkbox"/>
Probe 2	ja <input type="checkbox"/>	, nein <input type="checkbox"/>
Probe 3	ja <input type="checkbox"/>	, nein <input type="checkbox"/>

Wenn ja, Filtermaterial:

Wurde die Bestimmung mittels Direktinjektion der Wasserprobe (ohne Fest-Flüssig Extraktion) durchgeführt?

ja , nein

wenn ja, weiter bei Punkt 4

Fest-Flüssig Extraktion

Extraktionssäule: Fertigkartusche
 Selbst gefüllte Kartusche

Kartusche: Glas , Kunststoff

Sorbens: Material:

Hersteller, Bezeichnung:

Menge je Probe: g

Extraktionssystem (z.B. Vakuumeinheit mit Wasserstrahlpumpe, Autotrace® etc.):

.....
.....

eingesetztes Probenvolumen: ml

Probendurchfluss: ca. ml/min

Sonstiges:

Sorbens-Trocknung: Trocknungsgas: Luft , Stickstoff

Dauer: min

Methode:

Elution: (Angaben nur, falls abweichend vom Normentwurf)

.....
.....

Einengen des Eluates (z.B. auf unterhalb 2 ml und Auffüllen mit Wasser auf 2 ml)

Methode des Einengens:

.....

Endvolumen (ggf. geschätzter Wert, da ISTD kein exaktes Volumen fordert):

..... ml

Sonstiges (z.B. Eluatfiltration) / Anmerkungen:

.....
.....

Blindwerte und Störungen:

Blindwert der Probenaufbereitung geprüft: ja , nein

Blindwerte vorhanden: ja , nein

Störungen: ja , nein

Wenn ja, welcher Art:

.....

Hochleistungs-Flüssigchromatographie / Massenspektrometrie:HPLC-MS System:

Hersteller / Typ:

MS-Typ: Single-Q , Triple-Q , Ion-Trap

HPLC-Säule:

Temperatur der Säule: ° C

Injektionsvolumen: µl

Fluss: ml

Laufmittelgemisch und (Gradienten-) Programm

Interface und Betriebsart / Ionisierung (ESI, APCI):

Ausgewählte Ionen (MS) bzw. Übergänge (MS/MS):

Sonstiges:

Kalibrierung und Auswertung:Kalibrierung durchgeführt: ja , nein

Kalibrierbereich: von bis µg/l

Kalibrierpunkte:

Bezugsfunktion: linear ja , nein

ERGEBNISBLATT

zum DIN Ringversuch „Acrylamid“ – Januar 2006
im DIN NA 119-01-03-02 AK 14

Labor Nr.:

(nicht ausfüllen)

Ergebnisse bitte in $\mu\text{g/l}$ angeben (Bitte drei Nachkommastellen angeben)

Probe 1: Trinkwasser (ungechlort)				
Niedrige Konzentration	1. Best.	2. Best.	3. Best.	4. Best.
	($\mu\text{g/l}$)	($\mu\text{g/l}$)	($\mu\text{g/l}$)	($\mu\text{g/l}$)
<u>Acrylamid</u>				

Probe 2: Trinkwasser - unbehandeltes Grundwasser, (ungechlort)				
Mittlere Konzentration	1. Best.	2. Best.	3. Best.	4. Best.
	($\mu\text{g/l}$)	($\mu\text{g/l}$)	($\mu\text{g/l}$)	($\mu\text{g/l}$)
<u>Acrylamid</u>				

Probe 3: Rohwasser (Flusswasser)				
Mittlere Konzentration	1. Best.	2. Best.	3. Best.	4. Best.
	($\mu\text{g/l}$)	($\mu\text{g/l}$)	($\mu\text{g/l}$)	($\mu\text{g/l}$)
<u>Acrylamid</u>				

Anhang 3 UV-Detektion (Informationen ohne normativen Charakter)

Nach einer sachlichen Diskussion und Abwägung zu Beginn der Normungsarbeiten um die ggf. Aufnahme eines informativen Parts zur Detektion mittels Photodiodenarray-Detektor (UV/PDA) entschied sich der Arbeitskreis für eine Nicht-Aufnahme in den Normentwurf. Der UV/PDA wird von den Teilnehmern zur alleinigen Detektion und Befundabsicherung als nicht geeignet angesehen. Hierfür gibt es verschiedene Gründe. Unter anderem fällt das UV-Spektrum von Acrylamid, das bei etwa bei etwa 200 nm liegt, in den Vakuum-UV-Bereich. Auf der abfallenden Flanke >200 nm (z. B. 205 nm oder 210 nm) ist zwar prinzipiell eine Detektion möglich. Die spektrale Information ist jedoch nicht selektiv und wird durch Matrixeinfluss gestört. Als zusätzliche Information oder im Rahmen rein interner Überwachungsaufgaben kann ein derartiges Verfahren bei Vorwissen über die Wasserprobe ggf. als Bestätigung eines negativen Befundes – unter Berücksichtigung der damit verbundenen Bestimmungsgrenze – nützlich sein. Ein positiver Nachweis mittels UV-Detektion muss in jedem Fall mittels LC-MS/MS abgesichert werden.

Es wird an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass der DIN AK 14 des NA 119-01-03-02 AA im Rahmen seiner Normungsarbeiten dieses Verfahren nicht berücksichtigt hat. Zwei Laborvertreter aus dem Arbeitskreis haben jedoch umfangreiche Erfahrungen mit der Bestimmung von Acrylamid mittels HPLC-UV/PDA und haben einige ihrer Daten dem Arbeitskreis zur Verfügung gestellt. Eins dieser Labore hat dieses Verfahren auch im abschließenden Ringversuch zur Normung (jedoch ohne Einbeziehung der Daten in die statistische Auswertung) angewendet (siehe Kapitel 12). Aus diesem Grund werden nachfolgend einige Anmerkungen und Informationen zum Verfahren gegeben sowie entsprechende Chromatogramme und UV-Spektren ausgewiesen. Das Absorptionsmaximum von Acrylamid liegt im Bereich von 195 – 200 nm (siehe Bild 5).

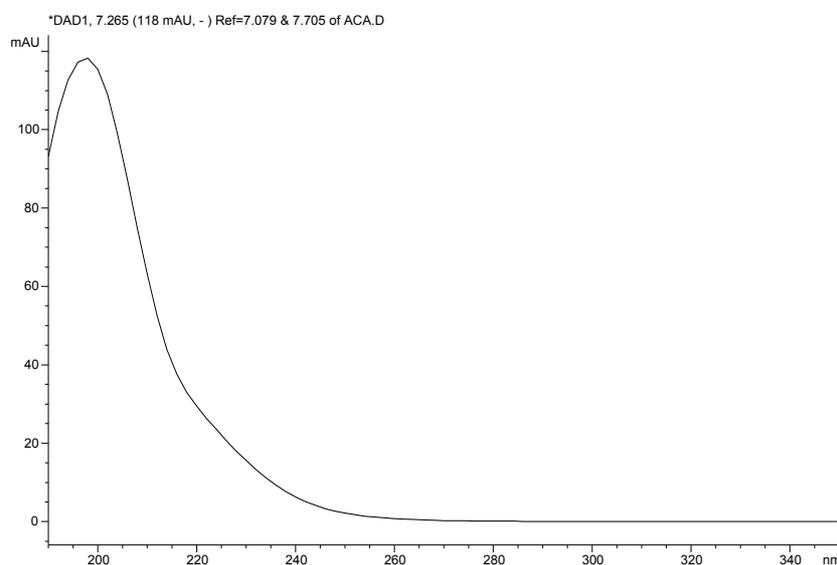


Bild. 5: UV-Spektrum von Acrylamid.

Methodik-1

Detektion bei einer Wellenlänge von 195 nm (Quantifizierung) und 210 nm (Qualifizierung). HPLC-Säule: Kromasil 200 mm x 4 mm mit 5 µm Partikeldurchmesser (T = 30 °C), Laufmittel: Acetonitril/Wasser Gradient (0,5 ml/min).

Zeit (min)	% Acetonitril
0,0	1,2
8,0	1,2
10,0	50,0
12,0	97,0
14,0	97,0
19,0	1,2
30,0	1,2

Es können Störungen der Chromatographie durch die Gegenwart von Nitrationen auftreten. Zur Entfernung von Nitrat und Beseitigung der Überlagerung in den Chromatogrammen sollte das Adsorbens nach der Extraktion mit 5 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser gewaschen werden (Spülschritt, siehe Bild 6). Der Einfluss von Huminstoffen sowie der des pH-Wertes wurden nicht untersucht. Weitere Störungen der Detektion wurden durch Methanol im Probenextrakt hervorgerufen. Der Anteil an Methanol sollte daher möglichst gering gehalten werden.

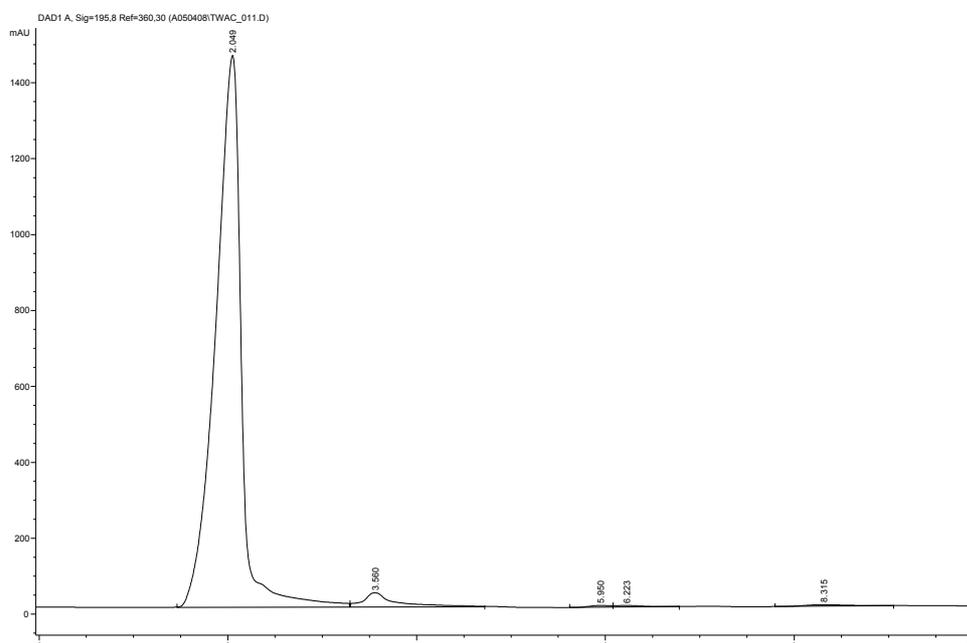


Bild. 6: Chromatogramm von Acrylamid (RT: 3,6 min) in Gegenwart von Nitrationen (RT: 2,0 min) nach Waschen des Adsorbens mit entionisiertem Wasser (Spülschritt). Die Detektion erfolgte mittels UV/PDA bei 195 nm.

Methodik-2

Detektion bei 220 nm (Bw 4 nm) und 206 nm (Bw 4 nm). HPLC-Säule: Zorbax SBC18 150 mm x 3 mm mit 3,5 µm Partikeldurchmesser (T = 25 °C), Laufmittel: Wasser / Methanol = 95/5 (v/v) – isokratisch (0,5 ml/min)

Im Rahmen der Untersuchungen zu Linearität wurden Messungen mit 6 Konzentrationslevel im Bereich von 0,1 bis 0,3 µg/l über das gesamte Verfahren durchgeführt und Korrelationskoeffizienten $r > 0,992$ erhalten. Zu den Varianzhomogenitäten siehe Tabelle 9. Die Bestimmungsgrenzen lagen bei 0,05 µg/l.

Tabelle 9 Versuche zur Varianzhomogenität des HPLC-UV/PDA-Verfahrens.

Überprüfung der Varianzhomogenität nach DIN 38402 A51				
inkl. Ausreissertest nach Grubbs				
Meßwerte 0,1 µg/L			Meßwerte 0,3 µg/L	
0,13492		✓	0,30665442	
0,14332		✓	0,29234918	
0,1331		✓	0,29234851	
0,1286		✓	0,27929625	
0,1367		✓	0,32164023	
0,13821		✓	0,34121443	
0,100531		✓	0,30976646	
0,0825736		✓	0,33016932	
0,0928124		✓	0,32354045	
0,0042156		✓	0,3026006	
0,11349026		Mittelwert MV	0,31027053	
0,02390359		Standardabw. Sx	0,0191308	
		MW ohne Ausreisser		
		Sx ohne Ausreisser		
21,06		Relative Standardabweichung	6,17	
Die Varianzen sind homogen				
Die Arbeitsbereiche sind ausreißerfrei				
P=99% PG: 1,56			VG: 5,35	