

Dokumentation zur Basisvalidierung des Verfahrens „Bestimmung von 6 polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Trink- und Mineralwasser mittels Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatogra- phie (HPTLC)“ DIN 38407-7

Allgemeines

Bei der vorliegenden Norm handelt es sich um die Überarbeitung des unter gleichem Titel erschienenen Blaudrucks (DEV - 24. Lieferung 1991). Ziel der Überarbeitung war es, diese Norm so weit wie möglich an die HPLC-Norm für 6 PAK anzugleichen. So wurde u.a. die im Blaudruck beschriebene Schüttelextraktion durch die Röhrextraktion ersetzt.

1. Anwendungsbereich

Die Norm ist speziell für die Überwachung der in der Trinkwasserverordnung und in der Mineral- und Tafelwasserverordnung festgelegten Grenzwerte gedacht. Mit dem qualitativen Screening-Verfahren können Proben, deren PAK-Gehalte <25% des Grenzwertes liegen, aussortiert werden.

Das beschriebene quantitative Verfahren kann auch auf die verschiedenen zur Trinkwassergewinnung herangezogenen Rohwässer angewandt werden, vorausgesetzt es liegt keine zu hohe organische Belastung der Proben vor.

Der kalibrierte Konzentrationsbereich wurde so gewählt, daß die Einhaltung des Grenzwertes gut überwacht werden kann.

2. Störungen

Die Störungen betreffen hauptsächlich die Probenahme, Probenlagerung und Extraktion, d.h. hier gilt dasselbe wie bei den HPLC-Verfahren (DIN 38407-8 und -18).

Wegen der geringeren Trennleistung der HPTLC-Platten im Vergleich zu HPLC-Säulen kommt es bei höher belasteten Proben häufiger zu Peaküberlagerungen. In diesem Fall muß, falls ein clean up keine Verbesserung bringt, ein anderes Analysenverfahren angewendet werden.

3. Reagenzien / Geräte

Die Horizontalentwicklung erwies sich als ungeeignet für die quantitative Bestimmungsmethode.

Es sollten nur hochreine Lösungsmittel verwendet werden, besonders zur Extraktion, da es durch Extrakteinengung zur Aufkonzentrierung von Verunreinigungen kommt.

Die Haltbarkeit der Standardlösungen wurde in mehreren Laboratorien geprüft. Die PAK-Lösungen sind über lange Zeit (mind. 1 Jahr) haltbar, kritisch ist lediglich die Aufkonzentrierung der Lösungen durch Verdunstung des Lösungsmittels. Es ist daher sinnvoll, das Gewicht der Standardlösungen zu notieren und vor der Entnahme zu kontrollieren. Das Einfrieren von Standardlösungen hat sich nicht bewährt, da z.T. ausgefallenen Kristalle nur sehr schwer wieder in Lösung zu bringen waren.

Bei den coffeinimprägnierten HPTLC-Platten Kieselgel 60 erwiesen sich sowohl selbst imprägnierte als auch von Macherey & Nagel bzw. Merck erhältliche Fertigplatten als gut geeignet.

Die nur für das Screeningverfahren einsetzbaren HPTLC RP-C18 Platten weisen jedoch sehr unterschiedliche Trenneigenschaften auf, was auf verschiedene Umsetzungsgrade der RP-C18-Phase zurückzuführen ist. Daher mußten zwei alternative mobile Phasen angegeben werden (siehe dazu Schreiben von Frau Weins vom 25.04.1995). Mit den Platten vom Typ RP18w (wasserfest) ist überhaupt keine Trennung möglich.

Die Platten mit Konzentrierungszone sind vor allem für punktförmige Probenapplikation zu empfehlen und somit für kleine Laboratorien mit einfacher Ausstattung ein wichtiges Mittel, um gute Trennergebnisse zu erzielen.

Anstelle des in den HPLC-Normen (DIN 38407-8 und -18) angegebenen Reduzierkolbens mit 100 ml Nennvolumen wurde hier ein entsprechender Reduzierkolben mit 50 ml Nennvolumen aufgenommen, da einige Anwender auch die Einengung zur Trockene in diesem Kolben durchführen. Die zur Probenapplikation benötigten Mikroliterspritzen sind jedoch zu kurz für die 100ml-Reduzierkolben.

4. Proben / Probenaufbereitung

Wegen Verlusten durch Adsorption von PAK an die Glaswand ist die Extraktion innerhalb von 24h durchzuführen. Ansonsten muß das Extraktionsmittel bereits bei der Probenahme zugegeben und die Probe dann innerhalb von 72h extrahiert werden. Die Probenlagerung muß im Kühlschrank erfolgen.

Die Extrakte sind bei kühler und dunkler Lagerung über längere Zeit stabil und müssen nicht sofort analysiert werden.

Bei der Röhrextraktion ist es sehr wichtig, daß mit etwa 1000 min^{-1} gerührt wird. Niedrigere Umdrehungszahlen ergeben geringere Wiederfindungsraten.

Ein clean up an Silicagel ist besonders bei Huminsäure-haltigen Extrakten, z.B. von Grund- und Oberflächenwasserproben, erforderlich, da die Huminsäuren zu einer Vielzahl von Störpeaks im Bereich niedriger R_f -Werte führen.

5. Kalibrierung

Sowohl die Kalibrierung des HPTLC-Bestimmungsschrittes als auch die Kalibrierung des Gesamtverfahrens werden beschrieben. Für die Routineanalytik wird die Kalibrierung des HPTLC-Bestimmungsschrittes empfohlen, da das beschriebene Extraktionsverfahren Wiederfindungsraten von 95 bis 100 % liefert.

Die Tatsache daß in der Dünnschichtchromatographie Kalibrierstandards neben den Proben auf dieselbe Platte aufgetragen werden, bietet einen großen Vorteil gegenüber anderen Analysenverfahren, weil so Schwankungen in den chromatographischen Bedingungen ausgeglichen werden.

Aus Gründen der Toxizität sollten nach Möglichkeit im Handel erhältliche Lösungen verwendet werden. Hierbei sind zertifizierte Standardlösungen (z.B. von Promochem) zu bevorzugen.

Kalibrierter Konzentrationsbereich:

- für Benzo(a)pyren, Benzo(b)fluoranthen, Benzo(k)fluoranthen, Benzo(ghi)perylen und Indeno(1,2,3-cd)pyren 0,4 bis 2,4 ng/Chromatogrammzone
- für Fluoranthen 2 bis 12 ng/Chromatogrammzone

Die folgenden Kalibrierdaten wurden im Bayerischen Landesamt für Wasserwirtschaft im Rahmen des Ringversuches von einer wenig erfahrenen Mitarbeiterin ermittelt. Bessere Daten sind mehr als drei Jahre nach dem Ringversuch leider nicht auffindbar.

Kalibrierdaten:

Konzentration [ng/Fleck]	Meßwerte [counts]					Konzentration [ng/Fleck]	Meß. [counts] F
	BaP	BbF	BkF	BP	IP		
0,4	3,8	3,2	2,9	4,4	2,6	2	4,5
0,8	5,8	4,5	3,8	7,3	3,3	4	7,8
1,2	8,5	6,1	5,6	10,0	4,1	6	11,3
1,6	11,2	8,1	6,9	11,4	4,6	8	14,6
2,0	13,6	9,8	8,5	14,0	5,9	10	18,7
2,4	16,3	10,4	10,4	19,1	7,4	12	22,3

Verfahrenskenndaten nach DIN 38402-51:

Substanz	a	b	s _y	s _{xo}	V _{xo} [%]	x _p [ng]
BaP	1,01	6,33	0,207	0,0327	2,3	0,19
BbF	1,63	3,85	0,389	0,101	7,2	0,59
BkF	1,06	3,78	0,282	0,0746	5,3	0,43
BP	1,53	6,79	1,01	0,149	10,6	0,87
IP	1,42	2,31	0,371	0,161	11,5	0,94
F	0,70	1,79	0,258	0,144	2,1	0,84

Die beiliegende Kopie der Publikation von Möller und Sieber in GIT Spezial Chromatographie 2/94 zeigt, daß mit entsprechender Erfahrung deutlich bessere Kalibrierergebnisse erzielt werden können.

6. Untersuchung der Richtigkeit

Entsprechendes Referenzmaterial (PAK-belastete Wasserproben) ist nicht erhältlich. Versuche mit dotierten realen Proben (Trink-, Grund- und Oberflächenwasser) brachten gute Ergebnisse, es traten keine systematischen Abweichungen auf.

7. Untersuchungen zur Wiederfindung

Wiederfindungsraten wurden mit Trink-, Grund- und Oberflächenwasser ermittelt. Sie liegen meistens bei > 90%. Verluste traten hauptsächlich durch Adsorption an die Glaswand der Probenflasche auf, wenn die Extraktion nicht innerhalb weniger Stunden nach der Standardaddition erfolgte. Die Wiederfindungsraten schwanken in einem Bereich von ± 5%, sind also gut reproduzierbar.

8. Probleme bei der Probenuntersuchung

Stark partikelhaltige Wässer (z.B. Oberflächenwasser) zeigen bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion eine schlechte Phasentrennung bzw. Emulsionsbildung.

Die Entwicklung der DC-Platten bei -20°C ist gewöhnungsbedürftig, da die Laufstrecke nicht direkt beobachtet werden kann. Bei neuen Platten-Chargen kann es vorkommen, daß bei gleicher Entwicklungszeit längere oder kürzere Laufstrecken auftreten. Es empfiehlt sich daher, neues Material erst auszuprobieren.

Matrixeffekte können dazu führen, daß sich die R_f -Werte derselben Substanz bei Standardlösungen und Probenextrakten auf derselben Platte unterscheiden. Dies tritt besonders dann auf, wenn kleinere als in der Norm angegebene Bandbreiten bei der Probenapplikation gewählt werden.

9. Verfahrenskenndaten aus dem Ringversuch

Im November 1994 wurde ein Ringversuch mit 12 Laboratorien durchgeführt. Hierfür wurden zwei unbekannte Standardlösungen und jeweils vier mal 1 Liter dotiertes Trinkwasser und dotiertes Karstwasser von den Teilnehmern im Wasserwerk Langenau abgeholt. Die Dotierung erfolgte im Wasserwerk in die einzelnen Probenflaschen. Es wurden bewußt nicht alle 6 PAK zudotiert und auch deutlich unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen PAK gewählt, um reale Proben zu simulieren.

Die einzelnen Ergebnisse können in der Anlage eingesehen werden. Zusammenfassend läßt sich folgendes feststellen:

Die Ergebnisse waren recht gut, bei den Wasserproben wurden meist Vergleichsvariationskoeffizienten $< 30\%$ erzielt, die Wiederholvariationskoeffizienten lagen zwischen $5,9\%$ und $18,1\%$. Für die Standardlösungen wurden erwartungsgemäß bessere Wiederhol- und Vergleichspräzisionen erhalten, da hier der Extraktionsschritt entfiel.

Die Richtigkeit ist ebenfalls als gut zu bezeichnen. Die Wiederfindungsraten liegen bei den Standardlösungen zwischen $91,3\%$ und $101,6\%$. Für die Wasserproben wurden Wiederfindungsraten zwischen $80,2\%$ und $105,8\%$ erzielt, wobei Benzo(a)pyren die niedrigste WFR aufweist. Dies ist vermutlich auf Verluste durch Adsorption an die Glaswand der Probenflaschen zurückzuführen, denn in früheren Untersuchungen zeigte sich, daß Benzo(a)pyren besonders stark zur Adsorption neigt.

Zusätzlich zu den Ringversuchsproben wurden noch mehrere Flaschen eines mit PAK belasteten realen Trinkwassers verteilt. Da der Sollwert nicht bekannt war, konnten nur Aussagen zur Präzision erhalten werden; die erhaltenen Verfahrenskenndaten können als gut bezeichnet werden. An dem Zusatzversuch beteiligten sich aber nur 6 Laboratorien, daher wird das Ergebnis nicht in die Norm aufgenommen.

Anlagen:

- Schreiben von Frau Weins
- Publikation von Möller / Sieber
- Originaldaten des Ringversuchs
- Auswertung des Ringversuchs