

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
Gemeinsam erfaßbare Stoffgruppen (Gruppe F)
Teil 18: Bestimmung von 15 polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK)
durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion (F 18)

DIN
38407-18

ICS 13.060.50

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge — Jointly determinable substances (group F) — Part 18: Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (F 18)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des boues — Substances déterminables ensemble (groupe F) — Partie 18: Dosage des 15 hydrocarbures polycycliques avec la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et fluorescence détection (F 18)

Vorwort

Diese Norm wurde gemeinsam mit der Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker aufgestellt (siehe Anhang A).

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Zu DIN 38407 „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Gemeinsam erfaßbare Stoffgruppen (Gruppe F)“ gehören weitere Teile. Eine Übersicht der Gruppen A bis T der „Deutschen Einheitsverfahren“ enthält Anhang A.

Anhang A ist informativ.

Einleitung

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) kommen als Nebenprodukte natürlicher und industrieller Verbrennungsprozesse in nahezu allen Gewässern sowohl ungelöst, an Feststoffen (Sedimente, Schwebstoffe) adsorbiert, als auch in Wasser gelöst vor.

Einzelne Verbindungen aus der Gruppe der PAK werden als cancerogen bzw. cancerogenverdächtig angesehen [1].

1 Anwendungsbereich

Das Verfahren ist geeignet zur Bestimmung ausgewählter PAK (siehe Tabelle 1) in Trink- und Grundwasser in Massenkonzentrationen $> 0,005 \mu\text{g/l}$ und in Oberflächenwasser in Massenkonzentrationen $> 0,01 \mu\text{g/l}$.

Fortsetzung Seite 2 bis 31

Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

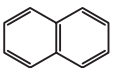
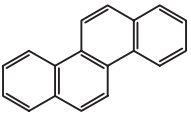
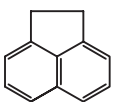
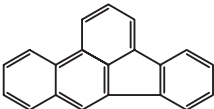
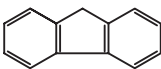
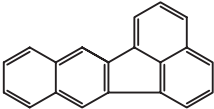
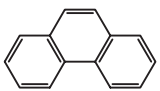
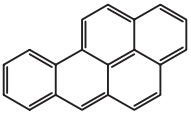
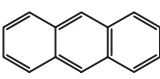
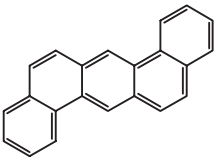
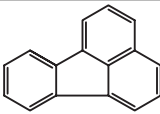
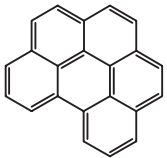
Bei der Untersuchung von Abwasser ist die untere Anwendungsgrenze des Verfahrens abhängig von der Matrix der Probe und liegt je nach extrahiertem Probenvolumen zwischen 0,1 µg/l und 1 µg/l.

Untersucht wird jeweils die Originalprobe, da die PAK bevorzugt an partikulärem Material adsorbiert vorliegen.

ANMERKUNG 1: Die Anwendbarkeit des Verfahrens auf Abwasserproben ist im Einzelfall zu prüfen.

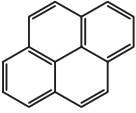
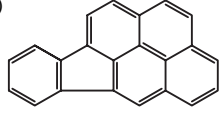
ANMERKUNG 2: Für Trinkwasser sieht die Trinkwasserverordnung [2] den Summengrenzwert von $(0,20 \pm 0,04)$ µg/l vor, der auf Kohlenstoff (C) bezogen ist.

Tabelle 1: Benennung und Struktur der zu bestimmenden polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK)

Benennung Summenformel Molare Masse M	Strukturformel	Benennung Summenformel Molare Masse M	Strukturformel
Naphthalin $C_{10}H_8$ $M = 128,18$ g/mol		Chrysen $C_{18}H_{12}$ $M = 228,30$ g/mol	
Acenaphthen $C_{12}H_{10}$ $M = 154,21$ g/mol		Benzo(b)fluoranthen ¹⁾ $C_{20}H_{12}$ $M = 252,32$ g/mol	
Fluoren $C_{13}H_{10}$ $M = 166,22$ g/mol		Benzo(k)fluoranthen ¹⁾ $C_{20}H_{12}$ $M = 252,32$ g/mol	
Phenanthren $C_{14}H_{10}$ $M = 178,24$ g/mol		Benzo(a)pyren ¹⁾ $C_{20}H_{12}$ $M = 252,32$ g/mol	
Anthracen $C_{14}H_{10}$ $M = 178,24$ g/mol		Dibenz(ah)anthracen $C_{22}H_{14}$ $M = 278,35$ g/mol	
Fluoranthen ¹⁾ $C_{16}H_{10}$ $M = 202,26$ g/mol		Benzo(ghi)perylene ¹⁾ $C_{22}H_{12}$ $M = 276,34$ g/mol	

(fortgesetzt)

Tabelle 1 (abgeschlossen)

Benennung Summenformel Molare Masse M	Strukturformel	Benennung Summenformel Molare Masse M	Strukturformel
Pyren $C_{16}H_{10}$ $M = 202,26 \text{ g/mol}$		Indeno(1,2,3cd)pyren ¹⁾ $C_{22}H_{12}$ $M = 276,34 \text{ g/mol}$	
Benzo(a)anthracen $C_{18}H_{12}$ $M = 228,30 \text{ g/mol}$			
¹⁾ PAK nach [2]			

ANMERKUNG: Die Stoffauswahl der PAK entspricht der US-EPA-Liste mit Ausnahme von Acenaphthen. Acenaphthen ist mit diesem Verfahren nicht bestimmbar, da die Substanz nicht fluoreszenzaktiv ist.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN 12036

Laborgeräte aus Glas — Enghals-Standflaschen mit Kegelschliff und Stopfen

DIN 12216

Laborgeräte aus Glas — Glasrohren mit Rundgewinde

DIN 12242-1

Laborgeräte aus Glas — Kegelschliffe für austauschbare Verbindungen — Maße, Toleranzen

DIN 12387

Laborgeräte aus Glas — Erlenmeyerkolben mit Kegelhülse, Kegel 1 : 10

DIN 12664-1

Laborgeräte aus Glas — Meßkolben mit einer Marke — Meßkolben mit Bördeleand, Kegelhülse und Kegelschliffverbindung

DIN 12680-2

Laborgeräte aus Glas — Meßzylinder — Mit Hauptpunkte-Ringteilung

DIN 12691

Laborgeräte aus Glas — Vollpipetten mit einer Marke, schnellablaufend, Wartezeit 15 Sekunden, Klasse AS

DIN 38402-11

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Teil 11: Probenahme von Abwasser (A 11)

DIN 38402-12

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Probenahme aus stehenden Gewässern (A 12)

DIN 38402-13

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Probenahme aus Grundwasserleitern (A 13)

DIN 38402-14

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Probenahme von Rohwasser und Trinkwasser (A 14)

DIN 38402-15

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Probenahme aus Fließgewässern (A 15)

DIN 38402-51

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Kalibrierung von Analyseverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen (A 51)

DIN 38407-8

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Gemeinsam erfaßbare Stoffgruppen (Gruppe F) — Teil 8: Bestimmung von 6 polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Wasser mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion (F 8)

DIN 38409-13

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H) — Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Trinkwasser (H 13-1 bis 3)

[1] IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans; Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemicals, Environmental and Experimental Data: International Agency for Research on Cancer, Volume 32, 1983

[2] Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung vom 5.12.1990), BGBl I, Nr. 66, S. 2613-2629 (1990)

- [3] Engelhardt, H.: Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2. Auflage 1977
- [4] Meyer, V.: Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, Verlag Diesterweg Salle, Verlag Sauerländer, Frankfurt am Main, 4. Auflage 1986
- [5] Unger, K. K.: Handbuch der HPLC, Teil 1: Leitfaden für Anfänger und Praktiker, GIT Verlag, Darmstadt, 2. Auflage 1995

3 Grundlage des Verfahrens

Die PAK werden mit n-Hexan aus der Wasserprobe extrahiert. Der Extrakt wird in Gegenwart von Dimethylformamid eingeeengt und mit Lösemittel auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Extrakte von Oberflächenwasser, Abwasser und anderen belasteten Wasserproben werden zur Abtrennung von Begleitstoffen chromatographisch zuvor an Silicagel gereinigt. Die PAK werden durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mittels Gradientenelution aufgetrennt und die Einzelsubstanzen unter Anwendung der Fluoreszenzdetektion (Wellenlängenprogramm) identifiziert und quantifiziert.

4 Störungen

4.1 Störungen bei der Probenahme und der Probenvorbereitung

Probenahmegeräte müssen aus Werkstoffen bestehen, welche die Probe während der auftretenden Kontaktzeiten nicht verändern. Vorzugsweise sind nichtrostender Stahl und Glas einzusetzen. Materialien aus Kunststoff sollten bei der Probenahme möglichst nicht verwendet werden, da durch Adsorption an die Wandung Verluste entstehen können¹⁾. Bei Einsatz automatischer Probenahmegeräte ist die Verwendung von Schläuchen in der Regel unumgänglich. Diese dürfen wegen Adsorptionseffekten nicht aus Gummi oder Silicon bestehen, müssen möglichst kurz sein und vor der Probenahme durchgespült werden.

Bei der Extraktion der Probe (siehe 9.1.2 und 9.1.3) dürfen Materialien aus Kunststoff nicht verwendet werden. Bei allen Verfahrensschritten ist darauf zu achten, daß die Probe vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt ist. Durch länger anhaltende Lichteinstrahlung können PAK abgebaut werden.

Die Extrakte dürfen nicht zur Trockne eingeeengt werden, da sich hierdurch Verluste bei den 2- und 3-Ringsystemen ergeben.

4.2 Störungen bei der HPLC

Substanzen, die fluoreszieren oder die Fluoreszenz unterdrücken und ähnliche chromatographische Eigenschaften wie die zu bestimmenden PAK haben, stören die Bestimmung und können je nach Ausmaß die Richtigkeit des Ergebnisses beeinträchtigen. Diese Störungen treten besonders im Elutionsbereich von Naphthalin bis Phenanthren auf und können z. B. durch Gegenwart von Alkylnaphthalinen verursacht werden. Ferner können je nach Selektivität des Phasensystems auch bei den Substanzen Benzo(a)anthracen, Chrysen, Dibenz(ah)anthracen und Indeno(1,2,3-cd)pyren Störungen auftreten. In den Chromatogrammen von Proben

¹⁾ Das Ausmaß der Verluste ist abhängig von der Kontaktzeit (siehe Abschnitt 8).

sind diese PAK meist nicht vollständig von den Begleitstoffen getrennt. Besonders in diesen Bereichen der Chromatogramme ist die Richtigkeit der Peakintegration zu prüfen und gegebenenfalls zu korrigieren. Bei den üblichen Phasensystemen wird Benzo(b)fluoranthren häufig von Perylen überlagert. Der Einfluß der Überlagerung auf das quantitative Ergebnis für Benzo(b)fluoranthren ist bei entsprechender Wahl der Wellenlängenkombination jedoch vernachlässigbar (siehe Tabelle 2). Unsymmetrische und gegenüber den Referenzsubstanzen verbreiterte Peaks weisen auf Peaküberlagerungen hin. Eine Auswertung des Signals ist in diesen Fällen nicht möglich. Durch Aufnahme der Anregungs- und Emissionsspektren kann die Identität und die Peakreinheit geprüft werden.

Lösemittelreste von n-Hexan, Aceton oder Dichlormethan in der Meßlösung beeinträchtigen die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und führen zu einer zusätzlichen Bandenverbreiterung bei den 2- und 3-Ringsystemen. Der Einfluß ist abhängig von der Konzentration der Lösemittel und von der Beschaffenheit des Phasensystems. Sie sind deshalb vollständig aus der Meßlösung zu entfernen (siehe 9.1.5).

Tabelle 2: Beispiele für Detektionsbedingungen und Peakidentifizierung

Detektion:	Fluoreszenz-Wellenlängenprogramm ¹⁾ Spalte: Anregung 12,5 nm; Emission 25 nm	
Peakidentifizierung	Wellenlängenprogramm Anregung nm Emission nm	
1 = Naphthalin 2 = Acenaphthen 3 = Fluoren 4 = Phenanthren	275	350
5 = Anthracen	260	420
6 = Fluoranthren 7 = Pyren	270	440
8 = Benzo(a)anthracen 9 = Chrysen 10 = 6-Methylchrysen ²⁾	260	420
11 = Benzo(b)fluoranthren 12 = Benzo(k)fluoranthren 13 = Benzo(a)pyren 14 = Dibenz(a)anthracen 15 = Benzo(ghi)perylene	290	430
16 = Indeno(1,2,3-cd)pyren	250	500
¹⁾ Beispiel für ein optimiertes Wellenlängenprogramm		
²⁾ Zusätzlich in den Chromatogrammen		

5 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung von 15 PAK durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion (F 18):

Verfahren DIN 38407 – F 18

6 Geräte

Die verwendeten Geräte müssen frei von PAK sein. Bei Glasgeräten ist hierzu eine Behandlung mit Wasser unter Zusatz eines Tensids und anschließendes Spülen mit Aceton nach der Trocknung üblicherweise ausreichend. Glasgeräte, die für die Untersuchung von Abwasserproben eingesetzt wurden und solche, die mit höheren PAK-Konzentrationen in Kontakt gekommen sind, dürfen zur Untersuchung von Trink-, Grund- und Oberflächenwasser nicht verwendet werden.

a) Enghals-Standflasche aus braunem Glas, Nennvolumen 1 000 ml, mit Vollglasstopfen NS 29/32 nach DIN 12242-1, z. B. Standflasche DIN 12036 — E 1000-G;

b) Meßzylinder, Nennvolumen 5 ml und 25 ml, z. B. Meßzylinder DIN 12680 — MH 25;

ANMERKUNG 1: Anstelle von Meßzylindern können auch Flaschenaufsatz-Dosiergeräte aus Glas und PTFE verwendet werden (PTFE Polytetrafluorethen);

c) Magnetrührstab, Länge etwa 40 mm, PTFE-ummantelt, aufbewahrt unter n-Hexan;

d) Mikroseparator, z. B. nach Bild 1;

e) Vollpipette, Nennvolumen 10 ml und 100 ml, z. B. Pipette DIN 12691 — VPAS 10;

f) Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 100 ml und 250 ml, z. B. Kolben DIN 12387 — E 250 ANS 29;

g) Magnetrührer;

h) Pasteurpipetten;

i) Zentrifugenglas mit Spitzboden und Schraubkappe mit PTFE-beschichteter Dichtung, Nennvolumen etwa 50 ml, z. B. nach Bild 2;

j) Zentrifuge mit Rotor zur Aufnahme von Zentrifugengläsern mit einem Nennvolumen von etwa 50 ml;

k) Trichter aus Glas, Rand z. B. $d = 60$ mm;

l) Reduzierkolben, Nennvolumen etwa 100 ml, mit zylindrischem Ansatz (graduiert), Skalenteil 0,1 ml, Grenzabweichung $\pm 2\%$ Volumenanteil, z. B. nach Bild 3;

m) Vorrichtung zum Einengen der Extrakte, z. B. Rotationsverdampfer mit Vakuumkonstanthalter und thermostatisierbarem Wasserbad;

n) Schüttelgerät, geeignet zur Aufnahme von Reagenzgläsern;

o) Mikroliterspritzen, Nennvolumen 500 μ l und 1 000 μ l.

ANMERKUNG 2: Zum Ansetzen der Bezugslösungen (siehe 7.9.4) sind Präzisionspipetten mit Spitzen aus Glas ebenfalls geeignet.

Maße in mm
Grenzabmaße $\pm 0,5$ mm

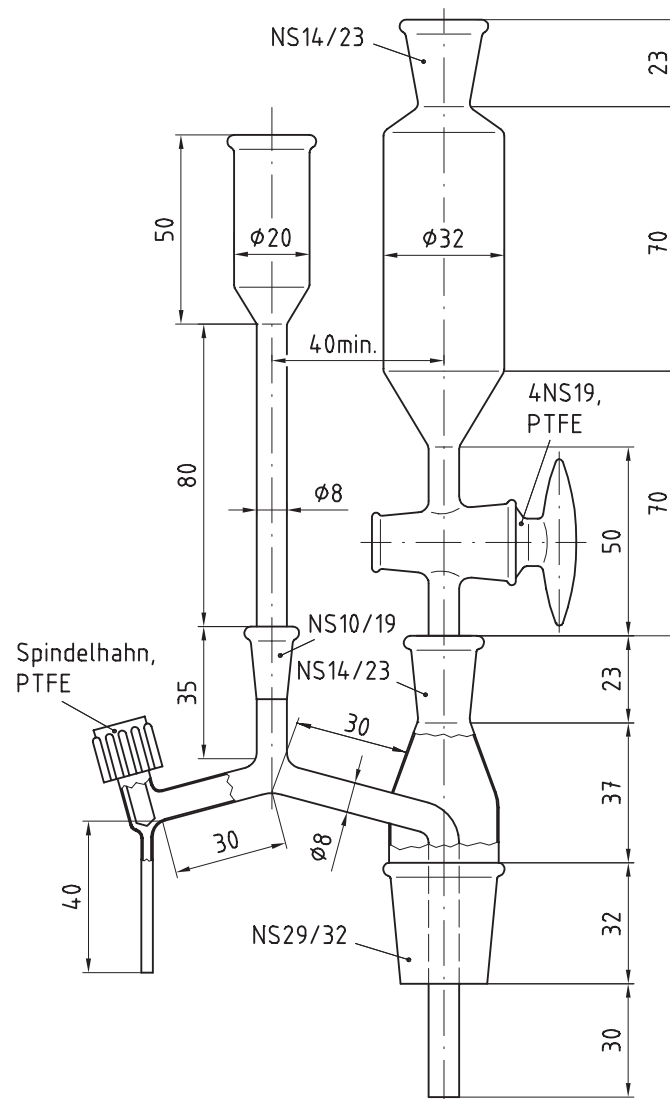


Bild 1: Mikroseparator mit Kegelkern NS 29/32 nach DIN 12242-1 zum Aufsetzen auf die Enghals-Standflasche

Maße in mm
Grenzabmaße $\pm 0,5$ mm

Schraubkappe,
Gewindegröße GL32 nach DIN 12216
mit PTFE-beschichteter Dichtung

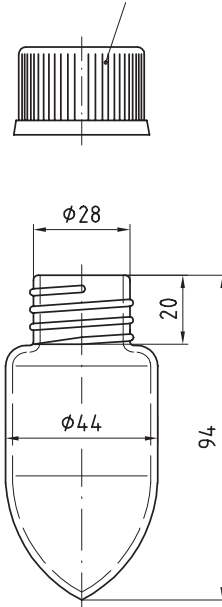


**Bild 2: Zentrifugenglas mit Schraubkappe GL 32 nach DIN 12216,
Nennvolumen etwa 50 ml**

- p) Mikrofilter, mit lösemittelbeständiger, hydrophiler Membran, Porenweite $0,45\ \mu\text{m}$, zur Klarfiltration der HPLC-Extrakte;
- q) Probenflaschen aus Glas, Volumen etwa 2 ml, mit inertem Verschuß, z. B. mit PTFE-beschichtetem Septum, zum Aufbewahren der Extrakte;
- r) Kartuschen aus Polypropylen oder Glas, gefüllt mit 0,5 g Silicagel (nach 7.6).
ANMERKUNG 3: Fertigkartuschen sind im Handel erhältlich.
Die Kartuschen vor ihrer Verwendung über aktiviertem Blaugel im Exsikkator lagern, um eine gleichbleibende Aktivität sicherzustellen.
- s) Glasgefäße zum Auffangen und Einengen der Eluate, z. B. Zentrifugengläser mit Spitzboden, Nennvolumen 10 ml (graduiert), Skalenteilung 0,1 ml, Grenzabweichung $\pm 2\%$ Volumenanteil und Glasstopfen NS 14/23 nach DIN 12242-1;
- t) Meßkolben, Nennvolumen 5 ml und 10 ml, z. B. Meßkolben DIN 12664 — MSA 10;
- u) Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph mit Fluoreszenzdetektor und Datenauswertesystem, ausgelegt für den vorgesehenen Arbeitsbereich mit

Maße in mm
Grenzabmaße $\pm 0,5$ mm

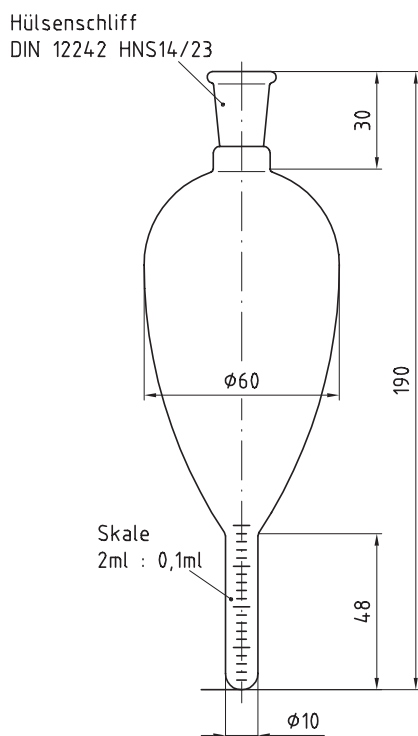


**Bild 3: Reduzierkolben mit zylindrischem Ansatz (graduiert),
Nennvolumen etwa 100 ml**

- Entgasungseinrichtung, z. B. Entgasung mit Helium oder Vakuum-Entgaser;
 - pulsationsarmem analytischem Pumpensystem, geeignet für die binäre Gradientenelution;
 - manuellem oder automatischem Probenaufgabesystem;
 - Säulenthermostat, geeignet zur Thermostatisierung der Trennsäule bei Raumtemperatur;
 - Fluoreszenzdetektor, mit Monochromator auf der Anregungs- und Emissionsseite, geeignet für die Programmierung der Wellenlängen und der Abschwächung (für mindestens 6 Wellenlängenpaarungen);
- v) Analytische Trennsäule, gepackt mit einem Material, das eine Trennung der PAK entsprechend den Anforderungen (siehe 9.2.1) ermöglicht (siehe Beispiele in Bild 4 bzw. Tabelle 3).

ANMERKUNG 4: Spezielle HPLC-Säulen zur Trennung von PAK sind im Handel erhältlich.