

DIN 38407-35



ICS 13.060.50

**Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und
Schlammuntersuchung –
Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F) –
Teil 35: Bestimmung ausgewählter Phenoxyalkancarbonsäuren und
weiterer acider Pflanzenschutzmittelwirkstoffe – Verfahren mittels
Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und
massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) (F 35)**

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge –
Jointly determinable substances (group F) –

Part 35: Determination of selected phenoxyalkyl carbonic acids and further acid plant
treatment agents – Method using high performance liquid chromatography and mass
spectrometric detection (HPLC-MS/MS) (F 35)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des
boues –

Substances déterminables ensemble (groupe F) –

Partie 35: Détermination des acides phénoxyalcaniques sélectionnés et d'autres produits
acide de traitement pour la protection des plantes – Méthode par chromatographie en
phase liquide à haute performance et spectrométrie de masse (CLHP-MS/MS) (F 35)

Gesamtumfang 46 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Grundlage des Verfahrens	8
5 Störungen	9
5.1 Störungen durch die Probenahme	9
5.2 Störungen bei der Extraktion	9
5.3 Störungen bei der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie	9
6 Bezeichnung.....	9
7 Reagenzien	9
8 Geräte.....	11
9 Probenahme	12
10 Durchführung.....	13
10.1 Probenvorbereitung.....	13
10.2 Extraktion	13
10.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	14
10.4 Detektion.....	14
10.5 Blindwertmessungen	15
11 Kalibrierung.....	16
11.1 Grundlagen.....	16
11.2 Kalibrierung mit externem Standard.....	17
11.3 Kalibrierung mit internem Standard	18
11.4 Kalibrierung nach dem Verfahren der Standardaddition	19
11.5 Prüfung der Kalibrierung	20
12 Bestimmung der Wiederfindungsraten	20
12.1 Wiederfindungsraten des Verfahrens.....	20
12.2 Wiederfindungsraten aus Proben	21
12.3 Wiederfindungsraten von internen Standards	22
13 Auswertung	23
13.1 Bestätigung einzelner Substanzen	23
13.2 Berechnung des Einzelergebnisses bei Kalibrierung mit externem Standard	23
13.3 Berechnung des Einzelergebnisses bei Kalibrierung mit internem Standard	24
13.4 Berechnung des Einzelergebnisses bei Standardaddition	25
14 Angabe der Ergebnisse.....	25
15 Analysenbericht.....	25
16 Verfahrenskenndaten	26

Anhang A (informativ) Beispiele für Sorbentien, Arbeitsbedingungen und Wiederfindungsraten	30
Anhang B (informativ) Beispiele für HPLC-Säulen und Chromatogramme	35
Anhang C (informativ) Beispiele für Detektion	42
Anhang D (informativ) Beispiele für Erweiterung des Verfahrens	44
Anhang E (informativ) Erläuterungen	45
Literaturhinweise	46

Bilder

Bild B.1 — Chromatographische Trennung, Beispiel 1.....	36
Bild B.2 — Chromatographische Trennung, Beispiel 2.....	37
Bild B.3 — Chromatographische Trennung, Beispiel 3.....	38
Bild B.4 — Chromatographische Trennung und Nachsäulenzugabe von TRIS-Puffer.....	39
Bild B.5 — Chromatographische Trennung für anreicherungsfree Bestimmung	41

Tabellen

Tabelle 1 — Pflanzenschutzmittelwirkstoffe, deren Bestimmung nach diesem Verfahren erprobt wurde	6
Tabelle 2 — Bedeutung der Indizes	17
Tabelle 3 — Verfahrenskennndaten nach DIN 38402-42 zur Bestimmung ausgewählter Pflanzenbehandlungsmittel – Verfahren mittels HPLC/MS-MS; Probe 1 Standardlösung	26
Tabelle 4 — Verfahrenskennndaten nach DIN 38402-42 zur Bestimmung ausgewählter Pflanzenbehandlungsmittel – Verfahren mittels HPLC/MS-MS; Probe 2 Trinkwasser, aufgestockt	27
Tabelle 5 — Verfahrenskennndaten nach DIN 38402-42 zur Bestimmung ausgewählter Pflanzenbehandlungsmittel – Verfahren mittels HPLC/MS-MS; Grundwasser, aufgestockt	28
Tabelle 6 — Verfahrenskennndaten nach DIN 38402-42 zur Bestimmung ausgewählter Pflanzenbehandlungsmittel – Verfahren mittels HPLC/MS-MS; Oberflächenwasser, aufgestockt	29
Tabelle A.1 — Beispiele für Wiederfindungsraten mit Bakerbond SDB-2, 30 mg (Arbeitsbedingungen siehe A.1.1)	32
Tabelle A.2 — Beispiele für Wiederfindungsraten mit Oasis HLB (Arbeitsbedingungen siehe A.1.2 und A.1.3).....	33
Tabelle A.3 — Beispiele für Wiederfindungsraten mit Focus und Isolute ENV◆ (Arbeitsbedingungen siehe A.1.4 und A.1.5)	34
Tabelle B.1 — Änderung der gemessenen Signal-zu-Rauschen-Verhältnisse durch Nachsäulenzugabe von TRIS-Puffer.....	40
Tabelle C.1 — Massenübergänge der zu bestimmenden Substanzen.....	42
Tabelle C.2 — Massenübergänge von geeigneten internen Standardsubstanzen.....	43

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitskreis NA 119-01-03-02-16 AK „LC-MS/MS-Verfahren“ des NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im Normenausschuss Wasserwesen (NAW) erarbeitet.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. Das DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Diese Norm ist Bestandteil der Reihe

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Bestimmung ausgewählter Phenoxyalkancarbonsäuren und weiterer acider Pflanzenschutzmittelwirkstoffe — Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) (F 35)

Diese Norm wurde gemeinsam mit der Wasserchemischen Gesellschaft — eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker — aufgestellt (siehe Anhang E).

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung zusätzlicher 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 E.

WARNUNG — Anwender dieser Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Norm gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

Einleitung

Zur Bestimmung von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung (vergleiche Literaturhinweise). In dieser Norm wird ein flüssigkeitschromatographisches Verfahren nach Festphasenextraktion zur Bestimmung ausgewählter Phenoxyalkancarbonsäuren und weiterer acider Pflanzenschutzmittelwirkstoffe beschrieben (siehe Tabelle 1).

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung ausgewählter Pflanzenschutzmittelwirkstoffe (siehe Tabelle 1) in Trink-, Grund- und Oberflächenwasser in Massenkonzentrationen $\geq 0,025 \mu\text{g/l}$ fest.

Die Anwendbarkeit des Verfahrens auf weitere, in Tabelle 1 nicht genannte Verbindungen oder andere Wasserarten, ist nicht ausgeschlossen; sie muss jedoch im Einzelfall geprüft werden (siehe Anhang D).

**Tabelle 1 — Pflanzenschutzmittelwirkstoffe,
deren Bestimmung nach diesem Verfahren erprobt wurde**

Trivialname Chemische Bezeichnung (IUPAC) ^a	Summenformel	Relative molare Masse g/mol	CAS-RN ^b
Clopyralid 3,6-Dichlorpyridin-2-carbonsäure	$\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2\text{NO}_2$	192,0	1702–17–6
DNOC 4,6-Dinitro-o-kresol	$\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_5$	198,1	534–52–1
MCPA 4-Chlor-o-tolyloxyessigsäure	$\text{C}_9\text{H}_9\text{ClO}_3$	200,6	94–74–6
Mecoprop (RS)-2-(4-Chlor-o-tolyloxy)propionsäure	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}_3$	214,6	7085–19–0 ^c
Mecoprop-P (R)-2-(4-Chlor-o-tolyloxy)propionsäure			16484–77–8 ^d
2,4-D (2,4-Dichlorphenoxy)essigsäure	$\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$	221,0	94–75–7
Dicamba 3,6-Dichlor-o-anissäure	$\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$	221,0	1918–00–9
Quinmerac 7-Chlor-3-methyl-chinolin-8-carbonsäure	$\text{C}_{11}\text{H}_8\text{ClNO}_2$	221,6	90717–03–6
MCPB 4-(4-Chlor-2-methylphenoxy)buttersäure	$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ClO}_3$	228,7	94–81–5
Dichlorprop (RS)-2-(2,4-Dichlorphenoxy)propionsäure	$\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$	235,1	120–36–5 ^c
Dichlorprop-P (R)-2-(2,4-Dichlorphenoxy)propionsäure			15165–67–0 ^d
Dinoterb 2-tert-Butyl-4,6-dinitrophenol	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$	240,2	1420–07–1
Bentazon 3-Isopropyl-(1H)-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-on-2,2-dioxid	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	240,2	25057–89–0
2,4-DB 4-(2,4-Dichlorphenoxy)buttersäure	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}_3$	249,1	94–82–6

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Trivialname Chemische Bezeichnung (IUPAC) ^a	Summenformel	Relative molare Masse g/mol	CAS-RN ^b
Fluroxypyr 4-Amino-3,5-dichlor-6-fluor-2-pyridyloxy- essigsäure	C ₇ H ₅ Cl ₂ FN ₂ O ₃	255,0	69377-81-7
2,4,5-T 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure	C ₈ H ₅ Cl ₃ O ₃	255,5	93-76-5
Bromoxynil 3,5-Dibrom-4-hydroxy-benzonitril	C ₇ H ₃ Br ₂ NO	276,9	1689-84-5
Fluazifop (RS)-2-[4-(5-trifluormethyl-2- pyridyloxy)phenoxy]propionsäure	C ₁₅ H ₁₂ F ₃ NO ₄	327,3	69335-91-7 ^c
Fluazifop-P (R)-2-[4-(5-trifluormethyl-2- pyridyloxy)phenoxy]propionsäure			83066-88-0 ^d
Sulcotrion 2-(2-Chlor-4-mesylbenzoyl)cyclohexan-1,3-dion	C ₁₄ H ₁₃ ClO ₅ S	328,8	99105-77-8
Fenoxaprop (RS)-2-(4-(6-Chlor-1,3-benzoxazol-2- yloxy)phenoxy)propionsäure	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₅	333,7	95617-09-7 ^c
Fenoxaprop-P (R)-2-(4-(6-Chlor-1,3-benzoxazol-2- yloxy)phenoxy)propionsäure			113158-40-0 ^d
Mesotrion 2-(4-Mesyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexan-1,3-dion	C ₁₄ H ₁₃ NO ₇ S	339,3	104206-82-8
Haloxypop (RS)-2-[4-(3-Chlor-5-trifluormethyl-2- pyridyloxy)phenoxy]propionsäure	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	361,7	69806-34-4 ^c
Haloxypop-P (R)-2-[4-(3-Chlor-5-trifluormethyl-2- pyridyloxy)phenoxy]propionsäure			95977-29-0 ^d
Ioxynil 4-Hydroxy-3,5-diiod-benzonitril	C ₇ H ₃ I ₂ NO	370,9	1689-83-4
Nicosulfuron 2-(4,6-Dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoyl- sulfamoyl)-N,N-dimethylnicotinamid	C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O ₆ S	410,4	111991-09-4
ANMERKUNG Optische Isomere werden mit diesem Verfahren chromatographisch nicht von einander getrennt, so dass bei der Quantifizierung ggf. die Summe beider Enantiomere ermittelt wird.			
^a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) ^b CAS-RN Chemical Abstracts Services Registrier-Nummer ^c Racemat ^d reines Isomer			

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

DIN 12242-1, *Laborgeräte aus Glas — Kegelschliffe für austauschbare Verbindungen — Maße, Toleranzen*

DIN 32645, *Chemische Analytik — Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen — Begriffe, Verfahren, Auswertung*

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 Analysenverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen (A 51)*

DIN EN ISO 1042, *Laborgeräte aus Glas — Messkolben*

DIN EN ISO 4788, *Laborgeräte aus Glas — Messzylinder und Mischzylinder*

DIN EN ISO 4796-2, *Laborgeräte aus Glas — Flaschen — Teil 2: Flaschen mit konischem Hals*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach DIN 32645 und DIN 38402-51.

4 Grundlage des Verfahrens

Die Pflanzenschutzmittelwirkstoffe werden mittels Festphasenextraktion aus der unfiltrierten, angesäuerten Wasserprobe angereichert und isoliert. Die Identifizierung und quantitative Bestimmung erfolgt durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS).

Bei entsprechender Empfindlichkeit des Massenspektrometers kann auf die Festphasenextraktion der Wasserprobe verzichtet werden.

5 Störungen

5.1 Störungen durch die Probenahme

Um Störungen zu vermeiden, die Probe, wie in Abschnitt 9 angegeben, nehmen.

5.2 Störungen bei der Extraktion

Die im Handel erhältlichen Festphasenmaterialien sind oft von unterschiedlicher Beschaffenheit. Von Charge zu Charge können Schwankungen in der Qualität und Selektivität auftreten. Die Wiederfindungsraten einzelner Verbindungen können in Abhängigkeit von der Konzentration und der Beschaffenheit der Probe schwanken. Sie sind daher regelmäßig zu bestimmen.

5.3 Störungen bei der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie

Peaktailing, Peakfronting und/oder verbreiterte Peaks weisen auf Störungen der Chromatographie hin. Diese Störungen können besonders bei den Stoffen Mesotrion und Sulcotrion auftreten (siehe 10.3).

Partikel in der Messlösung, z. B. Feinkornanteile des Festphasenmaterials, können die Eingangssiebe bzw. Fritten der HPLC-Säule verstopfen und infolge des Druckanstiegs zu Störungen führen; in diesem Fall die Extrakte vor der Analyse über ein Spritzenvorsatzfilter (8.11) filtrieren.

Begleitstoffe (Matrix) können die Ionisation der Zielsubstanzen beeinträchtigen. Hierdurch können sich Unterbefunde/Überbefunde bei der Quantifizierung ergeben. Diese Störungen können durch Anwendung der Kalibrierung mit internen Standards (siehe 11.3) oder durch Standardadditionsverfahren (siehe 11.4) erkannt und korrigiert werden.

6 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung ausgewählter Phenoxyalkancarbonsäuren und weiterer acider Pflanzenschutzmittelwirkstoffe mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (F 35):

Verfahren DIN 38407 — F 35

7 Reagenzien

7.1 Allgemeines

Als Reagenzien, soweit erhältlich, solche des Reinheitsgrades „zur Analyse“ oder „zur Rückstandsanalyse“ verwenden. Der Gehalt an Verunreinigungen, die zum Blindwert beitragen bzw. zu Störsignalen führen, muss vernachlässigbar gering sein. Dies muss regelmäßig geprüft werden (siehe 10.5).

Lösemittel und Wasser, die als Elutionsmittel Verwendung finden, müssen für die HPLC und Massenspektrometrie geeignet sein.

ANMERKUNG Spezielle Qualitäten sind kommerziell erhältlich.

7.2 Wasser, blindwertfrei, z. B. Wasser der Qualität 2 nach DIN ISO 3696. Die Blindwertfreiheit des Wassers muss geprüft werden.

7.3 Natriumthiosulfat-Pentahydrat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.

7.4 Festphasenmaterial, bevorzugt Materialien auf Basis von Polystyrol-Divinylbenzol.

7.5 Methanol, CH_3OH .

7.6 Acetonitril, CH_3CN .

7.7 Essigsäure, $w(\text{CH}_3\text{COOH}) = 100\%$.

7.8 Ameisensäure, $w(\text{HCOOH})$ mindestens 98 %.

7.9 Ethylacetat, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$.

7.10 Aceton, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$.

7.11 Ammoniaklösung, $w(\text{NH}_3)$ mindestens 25 %.

7.12 Stickstoff, zum Einengen von Extrakten.

7.13 Betriebsgase für das Massenspektrometer, nach Angaben des Geräteherstellers.

7.14 Referenzsubstanzen, Pflanzenschutzmittelwirkstoffe nach Tabelle 1, Massenanteil mindestens 95 %.

7.15 Interne Standardsubstanzen, vorzugsweise isotopenmarkierte Verbindungen der Referenzsubstanzen, Massenanteil mindestens 95 % (siehe Tabelle C.2).

7.16 Herstellung der Lösungen

Lösungen in Acetonitril ansetzen. Nicosulfuron und Fenoxaprop sind in Methanol nicht stabil. Werden diese Wirkstoffe nicht bestimmt, dürfen die Lösungen auch in Methanol angesetzt werden.

ANMERKUNG Handelsübliche Lösungen der Referenzsubstanzen, interne Standardsubstanzen und Stammlösungen können verwendet werden.

7.16.1 Lösungen der Referenzsubstanzen und interner Standardsubstanzen

- Lösungen mit einer Massenkonzentration von z. B. 0,1 mg/ml der jeweiligen Substanz ansetzen.
- Hierfür z. B. je 5 mg einer Referenzsubstanz (7.14) bzw. einer internen Standardsubstanz (7.15) in einem 50-ml-Messkolben (8.4) vorlegen, mit Acetonitril (7.6) lösen und die Lösung mit Acetonitril bis zur Marke auffüllen.

Die Lösungen bei etwa -18 °C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie sind unter diesen Bedingungen mindestens ein Jahr haltbar.

7.16.2 Stammlösung (Referenzsubstanzen)

- Stammlösung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von jeweils z. B. 1 $\mu\text{g/ml}$ herstellen.
- Hierfür z. B. je 0,5 ml der Lösungen der Referenzsubstanzen (7.16.1) in einem 50-ml-Messkolben (8.4) vorlegen und die Lösung mit Acetonitril (7.6) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung bei etwa -18 °C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie ist unter diesen Bedingungen mindestens ein Jahr haltbar.

Die Massenkonzentrationen der Substanzen in der Lösung regelmäßig durch einen unabhängig hergestellten Kontrollstandard (7.16.5) prüfen (siehe 11.5).

7.16.3 Dotierlösung (interne Standardsubstanzen)

- Dotierlösung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von z. B. jeweils 2 µg/ml ansetzen.
- Hierfür z. B. je 0,5 ml der Lösungen der internen Standardsubstanzen (7.16.1) in einem 25-ml-Messkolben (8.4) vorlegen und die Lösung mit Acetonitril (7.6) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung für die Herstellung von Bezugslösungen (7.16.4) und zur Dotierung von Wasserproben verwenden (siehe 10.1); sie ist bei etwa –18 °C vor Licht und Verdunstung geschützt aufzubewahren und unter diesen Bedingungen mindestens ein Jahr haltbar.

7.16.4 Bezugslösungen

Die Bezugslösungen durch entsprechende Verdünnungen der Stammlösung (7.16.2) herstellen. Bei Kalibrierung mit internem Standard (siehe 11.3) jeder Bezugslösung die gleiche Menge an internen Standards zusetzen. Die Konzentrationen der internen Standards in den Bezugslösungen sollten an der oberen Kalibriergrenze liegen.

- Bezugslösungen ansetzen, z. B. Lösung, in der die Massenkonzentration der zu bestimmenden Stoffe jeweils 10 ng/ml und die der internen Standardsubstanzen jeweils 20 ng/ml entspricht.
- Hierfür z. B. 100 µl der Stammlösung 7.16.2 in einem 10-ml-Messkolben vorlegen, 100 µl der Dotierlösung (7.16.3) zufügen und die Lösung mit einer Mischung von Methanol (7.5) bzw. Acetonitril (7.6) mit Wasser, passend zu den Anfangsbedingungen der Gradientenelution (siehe 10.3), bis zur Marke auffüllen.

Die Bezugslösungen bei etwa 4 °C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren, sie sind mindestens einen Monat haltbar.

7.16.5 Kontrollstandard

Von der Stammlösung unabhängig hergestellte Lösung der zu bestimmenden Substanzen zur Prüfung der Kalibrierung nach 11.5, z. B. zertifizierte Standardlösung in Acetonitril (7.6), Massenkonzentration jeweils 0,1 mg/ml.

ANMERKUNG Lösungen sind im Handel erhältlich.

8 Geräte

8.1 Allgemeines

Geräte oder Geräteteile, die mit der Wasserprobe oder dem Extrakt in Berührung kommen, müssen frei von Rückständen sein, die Blindwerte verursachen können. Vorzugsweise werden Geräte aus Glas, nichtrostendem Stahl und PTFE (Polytetrafluorethylen) verwendet.

8.2 Enghals-Standflaschen, Nennvolumen 1 000 ml, vorzugsweise aus braunem Glas mit NS-Glasstopfen, z. B. Laborflasche ISO 4796-2 — 1 000 NS.

8.3 Messzylinder, Nennvolumen 100 ml, z. B. Messzylinder nach ISO 4788.

8.4 Messkolben, Nennvolumen 10 ml, 25 ml, 50 ml, z. B. Messkolben ISO 1042 — A 50 — C.

8.5 Mikroliterspritzen

8.6 Kartuschen, aus Polypropylen oder Glas, gepackt mit Festphasenmaterial (7.4).

ANMERKUNG Gebrauchsfertige Kartuschen sind im Handel erhältlich.

8.7 pH-Messgerät mit Elektrode.

8.8 Vakuum- oder Druckvorrichtung, zur Durchführung der Extraktion.

8.9 Glasgefäß, zum Sammeln und Einengen des Eluates, z. B. Reagenzglas, Nennvolumen 10 ml, mit Glasstopfen NS 14/23 nach DIN 12242-1.

8.10 Vorrichtung zum Einengen von Extrakten, z. B. Rotationsverdampfer oder Vorrichtung zum Einengen mit Stickstoff.

8.11 Spritzenvorsatzfilter, mit geringem Totvolumen, z. B. Durchmesser 4 mm mit Membran aus regenerierter Cellulose.

8.12 Probengläser, passend zum Probenaufgabesystem, z. B. Rollrandflasche, Nennvolumen 1,5 ml mit Bördekkappe und Septum aus Gummi oder PTFE.

8.13 HPLC-Säule, geeignet für die Chromatographie der ausgewählten Pflanzenschutzmittelwirkstoffe, Beispiele siehe Anhang B.

8.14 Hochleistungsflüssigkeits-Chromatograph, gekoppelt mit Massenspektrometer, bestehend im Einzelnen aus:

8.14.1 Entgasungseinrichtung, z. B. Vakuum-Entgaser.

8.14.2 Analytisches Pumpensystem, pulsationsarm, geeignet für die binäre Gradientenelution.

8.14.3 Probenaufgabesystem.

8.14.4 Vorrichtung zur Thermostatisierung der Trennsäule, z. B. Säulenthmostat.

8.14.5 Massenspektrometrischer Detektor (MS), z. B. Tandem-Massen-Spektrometer mit Elektro-Spray-Ionisation (ESI).

Für die Durchführung des Verfahrens nach dieser Norm dürfen auch andere MS-Techniken als MS/MS, z. B. Time-of-Flight-Massenspektrometrie (TOF/MS), eingesetzt werden, soweit die Identifizierung der Analyten für die jeweiligen Anwendungsbereiche gesichert und dokumentiert wurde.

9 Probenahme

— Proben unter Berücksichtigung der Festlegungen nach DIN 38402-12, DIN 38402-13, DIN 38402-14 und DIN 38402-15 nehmen.

— Zur Probenahme gereinigte Enghals-Standflaschen (8.2) verwenden und die Flaschen vollständig mit dem zu untersuchenden Wasser füllen.

— Bei der Entnahme von Trinkwasser, das Oxidationsmittel enthalten kann, etwa 50 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat (7.3) je Liter zufügen.

ANMERKUNG 1 In Gegenwart von Oxidationsmittel (z. B. Chlor, Chlordioxid, Ozon) werden die Wirkstoffe Mesotrion und Sulcotrion rasch abgebaut.

— Wasserprobe so bald wie möglich nach der Probenahme aufarbeiten.

— Zur Lagerung Probe ggf. neutralisieren und bei etwa 4 °C vor Licht geschützt aufbewahren, jedoch nicht länger als 14 Tage.

ANMERKUNG 2 Die Wirkstoffe Nicosulfuron und Fenoxaprop sind unter sauren Bedingungen nicht stabil.

10 Durchführung

10.1 Probenvorbereitung

- Wasserprobe abmessen, z. B. 100 ml, und die Probe auf einen pH-Wert von etwa 2,5 einstellen, z. B. mit Ameisensäure (7.8).
- Bei Kalibrierung mit internem Standard (siehe 11.3), Probe mit Dotierlösung (7.16.3), z. B. 100 µl, versetzen.
- Probe unmittelbar nach 10.2 aufarbeiten.

Bei direkter Injektion der Wasserprobe kann eine Filtration notwendig sein. Bei Filtration sicherstellen, dass keine Verluste auftreten.

10.2 Extraktion

- Für ein Probenvolumen von 100 ml mindestens 60 mg Festphasenmaterial (7.4) verwenden.

Bei größerem Phasenverhältnis (Sorbensmasse/Probenvolumen) darf die Extraktion auch bei höheren pH-Werten (bis etwa pH-Wert 3,5) durchgeführt werden, wenn sichergestellt ist, dass keine Verluste (Durchbruch) auftreten.

- Zur Konditionierung nacheinander Methanol (7.5) und angesäuertes Wasser (pH-Wert 2,5; z. B. mit Ameisensäure) über das Festphasenmaterial geben.

Für 60 mg Festphasenmaterial jeweils mindestens 2 ml Methanol und 2 ml Wasser (pH-Wert 2,5) verwenden.

Darauf achten, dass das Festphasenmaterial nicht trocken läuft.

ANMERKUNG 1 Antrocknen des Festphasenmaterials bei der Konditionierung kann zu Verlusten bei der Anreicherung führen. Bei modifizierten Polymermaterialien treten diese Störungen üblicherweise nicht auf.

In Abhängigkeit vom Festphasenmaterial kann es für die Konditionierung und bei der Elution erforderlich sein, das Lösemittel eine Zeit lang auf das Festphasenmaterial einwirken zu lassen.

- Die nach 10.1 vorbereitete Probe mit einem Durchfluss von höchstens 10 ml/min über das konditionierte Festphasenmaterial geben; den Durchfluss durch Änderung des Vakuums bzw. des Druckes regulieren (8.8).
- Festphasenmaterial mit mindestens 2 ml Wasser (pH-Wert 2,5; z. B. mit Ameisensäure) waschen und anschließend, falls erforderlich, im Luft- oder Stickstoffstrom (7.12) trocknen.

ANMERKUNG 2 Die Trocknung kann sich nachteilig auf die Reproduzierbarkeit der Elution auswirken.

- Zur Elution der adsorbierten Stoffe, je nach Beschaffenheit des Festphasenmaterials, Mischungen von Ethylacetat (7.9) mit Aceton (7.10), Methanol (7.5) und/oder Acetonitril (7.6) gegebenenfalls in Gegenwart von einem Massenanteil (0,5 bis 2) % Ammoniaklösung (7.11) mit einem Durchfluss von höchstens 2 ml/min über das Festphasenmaterial geben.
- Eluat in einem Glasgefäß (8.9) sammeln.

Je nach Beschaffenheit des Festphasenmaterials kann es erforderlich sein, die Elution in zwei Schritten und ggf. mit verschiedenen Lösemitteln durchzuführen (Beispiele siehe Anhang A).

Restliches Elutionsmittel mit Hilfe von Über- oder Unterdruck vollständig aus der Kartusche verdrängen und dem Eluat zufügen.

- Eluat zur Trockene einengen, z. B. im Stickstoffstrom (7.12, 8.10) bei 40 °C.
- Rückstand lösen, z. B. in 1 ml eines Gemisches von Lösemittel mit Wasser. Dieses ist passend zu den Bedingungen der chromatographischen Trennung zu verwenden.
- Falls notwendig, den Extrakt durch ein Spritzenvorsatzfilter (8.11) filtrieren und ein Teilvolumen für die Analyse verwenden.

10.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

- HPLC-Gerät nach den Anleitungen des Geräteherstellers in Betrieb nehmen.
- Zur chromatographischen Trennung eine geeignete HPLC-Säule (8.13) verwenden und die Trennung der Analyten durch Gradientenelution optimieren.

Die chromatographischen Bedingungen so wählen, dass eine optimale Empfindlichkeit bei der massenspektrometrischen Detektion erzielt wird.

Eine vollständige Trennung der Substanzen ist nicht notwendig, sofern sichergestellt ist, dass bei Peaküberlappung keine Störungen der quantitativen Bestimmung auftreten (siehe 10.4).

Das Injektionsvolumen so bemessen, dass sich keine störende Peakverbreiterung ergibt.

Die Retentionszeiten sollten bei 6 aufeinanderfolgenden Läufen eine Standardabweichung von 0,05 min nicht überschreiten.

ANMERKUNG 1 Üblicherweise wird mit Methanol-Wasser in Gegenwart von Essigsäure (7.7) eine optimale Empfindlichkeit für die in Tabelle 1 genannten Stoffe erhalten. Je nach Beschaffenheit der verwendeten HPLC-Säule können unter diesen Bedingungen die Peaks für Mesotrion und Sulcotrion mehr oder weniger starkes Tailing aufweisen. Für diese Stoffe kann die Peakform verbessert werden, wenn bei höheren Ameisensäurekonzentrationen, z. B. 0,1 %, chromatographiert wird, wodurch sich jedoch bei einigen Stoffen, z. B. Clopyralid, deutlich geringere Empfindlichkeiten ergeben. Der Einfluss der Säure auf die negative Ionisation kann durch die Nachsäulenzugabe von TRIS¹⁾ teilweise kompensiert werden (siehe Bild B.4 und Tabelle B.1).

ANMERKUNG 2 Das höchstens zu injizierende Volumen ist abhängig von der Zusammensetzung des Lösemittels der Messlösung und von dem Innendurchmesser der Trennsäule. Bei der Verwendung einer Lösemittelzusammensetzung, die den Anfangsbedingungen der Chromatographie entspricht, sollte das Injektionsvolumen, z. B. bei einer Trennsäule von 2 mm Innendurchmesser, nicht größer als 20 µl sein.

Bei direkter Injektion der Wasserprobe können größere Probenvolumina injiziert werden. Um Peakverbreiterung zu vermeiden, sollte der Wasseranteil des Eluenten bei den Anfangsbedingungen der Chromatographie möglichst hoch gewählt werden (Beispiele siehe Anhang B).

10.4 Detektion

- Massenspektrometer nach den Anleitungen des Geräteherstellers in Betrieb nehmen und gerätetypische Einstellungen wählen.
- Für jede Substanz (Tabelle 1) im negativen oder positiven Modus, je nach den chemischen Eigenschaften der Substanz, die jeweils optimalen Einstellungen für die Ionisierung unter den festgelegten chromatographischen Bedingungen ermitteln.

1) TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; auch: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol