

DIN 38407-47



ICS 13.060.50

**Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung –
Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F) –
Teil 47: Bestimmung ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe und weiterer organischer Stoffe in Wasser und Abwasser – Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS oder -HRMS) nach Direktinjektion (F 47)**

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

Part 47: Determination of selected active pharmaceutical ingredients and other organic substances in water and waste water – Method using high performance liquid chromatography and mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS or -HRMS) after direct injection (F 47)

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

Substances déterminables ensemble (groupe F) –

Partie 47: Détermination des ingrédients pharmaceutiques actifs sélectionnés et d'autres substances organiques dans l'eau et des déchets – Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance et détection par spectrométrie de masse (CLHP-MS/MS ou -HRSM) après l'injection directe (F 47)

Gesamtumfang 42 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	10
3 Begriffe	10
4 Grundlage des Verfahrens	10
5 Störungen	11
5.1 Störungen bei der Probenvorbereitung	11
5.2 Störungen bei der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie	11
6 Bezeichnung	11
7 Reagenzien	11
8 Geräte	14
9 Probenahme	14
10 Durchführung	15
10.1 Allgemeines	15
10.2 Probenvorbereitung	15
10.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	15
10.4 Detektion	16
10.4.1 Allgemeines	16
10.4.2 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)	16
10.4.3 Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)	16
10.5 Blindwertmessungen	17
11 Kalibrierung	17
11.1 Allgemeines	17
11.2 Kalibrierung mit externem Standard	19
11.3 Kalibrierung mit internem Standard	19
11.4 Prüfung der Kalibrierung	20
12 Bestimmung von Wiederfindungsraten	21
12.1 Allgemeines	21
12.2 Wiederfindungsraten aus Proben	21
12.3 Wiederfindungsraten von internen Standards	22
13 Auswertung	22
13.1 Bestätigung einzelner Substanzen	22
13.2 Berechnung des Einzelergebnisses bei Kalibrierung mit externem Standard	23
13.3 Berechnung des Einzelergebnisses bei Kalibrierung mit internem Standard	23
14 Angabe der Ergebnisse	24
15 Analysenbericht	24
16 Verfahrenskenndaten	24

Anhang A (informativ) Verfahrenskennndaten.....	25
Anhang B (informativ) Beispiele für Wiederfindungsraten.....	31
Anhang C (informativ) Beispiele für HPLC-Säulen und Chromatogramme	33
C.1 Chromatographische Bedingungen für das Chromatogramm in Bild C.1.....	33
C.2 Chromatographische Bedingungen für die Chromatogramme in Bild C.2	34
C.3 Chromatographische Bedingungen für das Chromatogramm in Bild C.3.....	35
C.4 Chromatographische Bedingungen für das Chromatogramm in Bild C.4.....	36
Anhang D (informativ) Beispiele für Detektion	38
Anhang E (informativ) Beispiele für Erweiterung des Verfahrens	41
Literaturhinweise.....	42

Vorwort

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

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

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 von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft – eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Bestimmung ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe und weiterer organischer Stoffe
in Wasser und Abwasser — Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und
massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS oder -HRMS) nach Direktinjektion (F 47).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Telefon 030 2601-2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

Einleitung

Arzneimittel sind für die menschliche und tierische Gesundheit unverzichtbar. Durch Applikation oder unsachgemäße Entsorgung gelangen Arzneimittelwirkstoffe unverändert oder transformiert in den Wasserkreislauf. Dies geschieht zum einen über kommunale Abwässer, welche in Klärwerken aufbereitet werden. Dabei werden die Arzneimittelwirkstoffe und deren Transformationsprodukte nicht vollständig aus dem Wasser entfernt. Zum anderen gelangen Arzneimittelwirkstoffe und deren Transformationsprodukte über die Ausbringung von Gülle auf Böden und gelangen je nach Beschaffenheit des Bodens und der Wirkstoffe in den Wasserkörper. Es finden sich daher Arzneimittelwirkstoffe und deren Transformationsprodukte in Oberflächen- und Grundwässern, sowie in gereinigten Abwässern. In dieser Norm wird ein flüssigkeitschromatographisches Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion zur Bestimmung ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe beschrieben.

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 Arbeitgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe und Transformationsprodukte sowie weiterer organischer Substanzen (siehe Tabelle 1) in Trink-, Grund- und Oberflächenwasser in Massenkonzentrationen $\geq 0,025 \mu\text{g/l}$ bzw. in behandeltem Abwasser in Massenkonzentrationen $\geq 0,050 \mu\text{g/l}$ fest.

Die unteren Anwendungsgrenzen des Verfahrens können abhängig von der Empfindlichkeit der verwendeten Geräte und von der Matrix der Probe variieren.

Das Verfahren kann zur Bestimmung weiterer organischer Stoffe oder in anderen Wasserarten angewandt werden, wenn die Richtigkeit im Einzelfall geprüft und nachgewiesen wurde. Beispiele für die Bestimmung weitere organischer Stoffe siehe Tabelle E.1.

Tabelle 1 — Substanzen, deren Bestimmung nach diesem Verfahren erprobt wurde

Trivialname Chemische Bezeichnung (IUPAC) ^a	Summen- formel	Relative molare Masse g/mol	CAS-RN ^b
4-Acetylaminoantipyrin N-(2,3-Dimethyl-5-oxo-1-phenyl-3-pyrazolin-4-yl)acetamid	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$	245,28	83-15-8
N4-Acetylsulfamethoxazol N-{4-[(5-Methyl-1,2-oxazol-3-yl)sulfamoyl]phenyl}-acetamid	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	295,32	21312-10-7
Amidotrizoesäure 3,5-Bis(acetamido)-2,4,6-triiodbenzoesäure	$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{I}_3\text{N}_2\text{O}_4$	613,91	117-96-4
Atenolol (RS)-2-[4-[2-Hydroxy-3-(1-methylethylamino)propoxy]phenyl]ethanamid	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$	266,34	29122-68-7
Bezafibrat 2-{4-[2-(4-Chlorbenzamido)ethyl]phenoxy}-2-methylpropionsäure	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{ClNO}_4$	361,80	41859-67-0
Bisoprolol (RS)-1-[4-(2-Isopropoxyethoxymethyl)phenoxy]-3-isopropylamino-2-propanol	$\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_4$	325,45	66722-44-9
Carbamazepin 5H-Dibenz[b,f]azepin-5-carbamid	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$	236,27	298-46-4
Clarithromycin (2R,3R,4S,5R,8R,9S,10S,11R,12R,14R)-11-[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-5-ethyl-3,4-dihydroxy-9-[(2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyl-oxan-2-yl]oxy-12-methoxy-2,4,8,10,12,14-hexamethyl-6-oxacyclotetradecan-1,7-dion	$\text{C}_{38}\text{H}_{69}\text{NO}_{13}$	747,95	81103-11-9
Clofibrinsäure 2-(4-Chlorophenoxy)-2-methylpropionsäure	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}_3$	214,70	882-09-7

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Trivialname Chemische Bezeichnung (IUPAC) ^a	Summen- formel	Relative molare Masse g/mol	CAS-RN ^b
Dehydrato-Erythromycin (2R,3R,4S,5S,8R,9S,10S,11R,12R)-11-[[4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy]-5-ethyl-3-hydroxy-9-[(5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl)oxy]-2,4,8,10,12,14-hexamethyl-6,15,16-trioxatricyclo[10.2.1.1{1,4}]hexadecan-7-on	C ₃₇ H ₆₅ NO ₁₂	715,91	23893-13-2
Diazepam (RS)-7-Chlor-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284,74	439-14-5
Diclofenac 2-[2-[(2,6-Dichlorphenyl)amino]phenyl]essigsäure	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,15	15307-86-5
10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin (5S,6S)-5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrobenzo[b][1]benzazepin-11-carboxamid	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃	270,29	58955-93-4
Erythromycin 6-(4-Dimethylamino-3-hydroxy-6-methyl-oxan-2-yl)oxy-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-4-(5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyl-oxan-2-yl)-oxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-1-oxacyclotetradecan-2,10-dion	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733,93	114-07-8
4-Formylaminoantipyrin N-(2,3-Dihydro-1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)formamid	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂	231,25	1672-58-8
Gemfibrozil 5-(2,5-Dimethylphenoxy)-2,2-dimethylpentansäure	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250,34	25812-30-0
Ibuprofen (RS)-2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propansäure	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,28	15687-27-1
Iopamidol (S)-N,N'-Bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-[(2-hydroxypropanoyl)amino]-2,4,6-triiodbenzol-1,3-dicarbamid	C ₁₇ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₃	777,08	60166-93-0
Iomeprol (+/-)-N,N'-Bis-(2,3-dihydroxypropyl)-5-[(2-hydroxyacetyl)methylamino]-2,4,6-triiodisophthalamid	C ₁₇ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₈	777,09	78649-41-9
Iopromid (+/-)-N,N'-Bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-triiod-5-(2-methoxyacetamido)-N-methylisophthalamid	C ₁₈ H ₂₄ I ₃ N ₃ O ₈	791,12	73334-07-3
Metoprolol (RS)-1-(Isopropylamino)-3-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]propan-2-ol	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	267,36	37350-58-6

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Trivialname Chemische Bezeichnung (IUPAC) ^a	Summen- formel	Relative molare Masse g/mol	CAS-RN ^b
Naproxen (S)-2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propionsäure	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230,26	22204-53-1
Oxazepam (RS)-7-Chlor-3-hydroxy-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	286,71	604-75-1
Phenazon 1,5-Dimethyl-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-3-on	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	188,23	60-80-0
Primidon 5-Ethyl-5-phenylhexahydropyrimidin-4,6-dion	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	218,25	125-33-7
Propyphenazon 1,5-Dimethyl-4-(1-methylethyl)-2-phenyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-on	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O	230,31	479-92-5
Roxithromycin (3R,4S,5S,6R,7R,9R,11S,12R,13S,14R)-6-[[[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy]-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-4-[[[(2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy]-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-10-(2,4,7-trioxa-1-azaocan-1-ylidene)-1-oxacyclotetradecan-2-on	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	837,05	80214-83-1
Sotalol (RS)-4'-(1-Hydroxy-2-isopropylaminoethyl)methansulfonanilid	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	272,36	3930-20-9
Sulfamethoxazol 4-Amino-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)benzen-sulfonamid	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,28	723-46-6
Temazepam (RS)-7-Chlor-3-hydroxy-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	300,74	846-50-4
Trimethoprim 2,4-Diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)pyrimidin	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,32	738-70-5
^a IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry ^b CAS-RN: Chemical Abstracts System Registration Number			

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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 32633, *Chemische Analytik — Verfahren der Standardaddition — Verfahren, Auswertung, mit CD-ROM*

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 38402-15, *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) — Teil 51: Kalibrierung von Analysenverfahren — Lineare Kalibrierfunktion (A 51)*

DIN 38407-36, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F) — Teil 36: Bestimmung ausgewählter Pflanzenschutzmittelwirkstoffe und anderer organischer Stoffe in Wasser — Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS bzw. -HRMS) nach Direktinjektion (F 36)*

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

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*

DIN ISO 5667-5, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 5: Anleitung zur Probenahme von Trinkwasser aus Aufbereitungsanlagen und Rohrnetzsystemen*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach DIN 38407-36, DIN 38402-51, DIN 32645.

4 Grundlage des Verfahrens

Die Wasserprobe wird direkt in das Analysensystem injiziert. Die Identifizierung und quantitative Bestimmung erfolgt durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS, HPLC-HRMS).

5 Störungen

5.1 Störungen bei der Probenvorbereitung

Bei Filtration der Probe können Verluste der Analyten durch Sorption auftreten.

5.2 Störungen bei der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

Peaktailing, Peakfronting und/oder verbreiterte Peaks weisen auf Störungen der Chromatographie hin.

Bei Detektion von Diclofenac im negativen ESI-Modus können Störungen durch Begleitstoffe auftreten.

Begleitstoffe (Matrix) können die Ionisation der Zielsubstanzen beeinträchtigen. Hierdurch können sich Unterbefunde oder Überbefunde bei der Quantifizierung ergeben. Diese Störungen können anhand von Wiederfindungsraten der Analyten oder interner Standards (siehe Tabelle D.3) erkannt und gegebenenfalls korrigiert werden (siehe Abschnitt 12).

6 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe und weiterer organischer Stoffe durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS oder –HRMS) nach Direktinjektion (F 47):

Verfahren DIN 38407 — F 47

7 Reagenzien

7.1 Allgemeines

Als Reagenzien werden, soweit erhältlich, solche des Reinheitsgrades „zur Analyse“ oder „zur Rückstandsanalyse“ verwendet. Der Gehalt an Verunreinigungen, die zum Blindwert beitragen bzw. zu Störsignalen führen, muss vernachlässigbar gering sein. Dies muss regelmäßig geprüft werden (10.4).

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

ANMERKUNG Spezielle Qualitäten sind im Handel erhältlich.

7.2 Wasser, blindwertfrei, z. B. Wasser der Qualität 1 nach DIN ISO 3696.

7.3 Methanol, CH_3OH .

7.4 Acetonitril, CH_3CN .

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

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

7.7 Ammoniumacetat, $w(\text{CH}_3\text{COONH}_4)$ mindestens 99 %.

7.8 Ammoniumformiat, $w(\text{HCOONH}_4)$ mindestens 99 %.

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

7.10 Betriebsgase für das Massenspektrometer, nach Angaben des Geräteherstellers.

7.11 Referenzsubstanzen, Stoffe nach Tabelle 1, mit bekanntem Massenanteil

7.12 Interne Standardsubstanzen, vorzugsweise isotopenmarkierte Verbindungen der Referenzsubstanzen (siehe Tabelle D.3).

Die internen Standards dürfen zu keiner Störung der Analyten führen (10.4).

7.13 Herstellung der Lösungen

7.13.1 Allgemeines

Die Lösungen interner Standardsubstanzen werden nur dann benötigt, wenn die Kalibrierung und Auswertung nach (11.3) bzw. (13.3) erfolgt.

Die Richtigkeit der Lösungen der Referenzsubstanzen mit einem Kontrollstandard (7.13.9) prüfen, z. B. bei der Durchführung der Kalibrierung (11.4).

ANMERKUNG 1 Lösungen der Referenzsubstanzen und interne Standardsubstanzen sind im Handel erhältlich.

ANMERKUNG 2 Bei Kalibrierlösungen, die in Reinstwasser angesetzt werden, können sich Unterbefunde bei den Makroliden einstellen (siehe 7.13.8).

7.13.2 Stammlösungen (Referenzsubstanzen/interne Standardsubstanzen)

- Lösungen mit einer Massenkonzentration von z. B. 0,1 mg/ml der jeweiligen Substanz ansetzen.
- Hierfür z. B. je 5 mg einer Substanz (7.11) in jeweils einem 50-ml-Messkolben (8.3) vorlegen, mit Acetonitril (7.4) lösen und die Lösung mit dem Lösemittel bis zur Marke auffüllen.

ANMERKUNG Alternativ können im Handel erhältliche (oder nach Kundenwunsch hergestellte) Stammlösungen der individuellen Referenzsubstanzen (oder interne Standardsubstanzen) in Acetonitril verwendet werden, um weitere Verdünnungslösungen herzustellen.

Die Lösungen unter $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie sind unter diesen Bedingungen mindestens ein Jahr haltbar.

7.13.3 Zwischenverdünnung-A (Referenzsubstanzen)

- Zwischenverdünnung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von jeweils z. B. $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ herstellen.
- Hierfür z. B. je 0,5 ml der Stammlösungen (7.13.2) der Referenzsubstanzen in einem 50-ml-Messkolben (8.3) vorlegen und die Lösung mit Acetonitril (7.4) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung unter $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie ist unter diesen Bedingungen mindestens ein Jahr haltbar.

7.13.4 Zwischenverdünnung-B (Referenzsubstanzen)

- Zwischenverdünnung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von jeweils z. B. 50 ng/ml herstellen.
- Hierfür z. B. 0,5 ml der Zwischenverdünnung-A (7.12.3) in einem 10-ml-Messkolben (8.3) vorlegen und die Lösung mit Wasser (7.2) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung bei $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie ist unter diesen Bedingungen mindestens einen Monat haltbar.

Die Lösung für die Aufstockung von Proben mit den Analyten zur Bestimmung der Wiederfindungsraten (12.2) verwenden.

7.13.5 Zwischenverdünnung-C (Referenzsubstanzen)

- Zwischenverdünnung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von jeweils z. B. 5 ng/ml herstellen.
- Hierfür z. B. 0,25 ml der Zwischenverdünnung-A (7.13.3) in einem 50-ml-Messkolben (8.3) vorlegen und die Lösung mit Wasser (7.2) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung bei 3 °C bis 8 °C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie ist unter diesen Bedingungen mindestens einen Monat haltbar.

7.13.6 Zwischenverdünnung-D (interne Standards)

- Zwischenverdünnung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von jeweils 1 µg/ml herstellen.
- Hierfür z. B. je 0,5 ml der jeweiligen Stammlösung (7.13.2) der internen Standardsubstanzen in einem 50-ml-Messkolben (8.3) vorlegen und die Lösung mit Acetonitril (7.4) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung bei 3 °C bis 8 °C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie ist unter diesen Bedingungen mindestens einen Monat haltbar.

7.13.7 Zwischenverdünnung-E (interne Standards)

- Zwischenverdünnung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von jeweils z. B. 50 ng/ml herstellen.
- Hierfür z. B. 0,5 ml der Zwischenverdünnung-D (7.13.6) in einem 10-ml-Messkolben (8.3) vorlegen und die Lösung mit Wasser (7.2) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung bei 3 °C bis 8 °C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie ist unter diesen Bedingungen mindestens einen Monat haltbar.

Die Lösung für die Herstellung von Kalibrierproben und Dotierung von Proben verwenden.

7.13.8 Kalibrierproben

- Die Kalibrierproben durch entsprechende Verdünnungen der Zwischenverdünnung-C (7.13.5) herstellen. Bei Kalibrierung mit internem Standard (11.3) jeder Kalibrierprobe die gleiche Menge an internen Standards zusetzen.
- Kalibrierproben ansetzen, z. B. Lösung in der die Massenkonzentration der zu bestimmenden Stoffe jeweils 0,025 µg/l und die der internen Standardsubstanzen jeweils 0,250 µg/l entspricht.
- Hierfür z. B. 50 µl der Zwischenverdünnung-C (7.13.5) in einem 10-ml-Messkolben vorlegen, 50 µl der Zwischenverdünnung-E (7.13.7) zufügen und die Lösung bis zur Marke auffüllen, z. B. mit Wasser (7.2).

Die Zusammensetzung der Kalibrierproben sollte, wenn möglich, den zu untersuchenden Proben ähnlich sein und darf zu keiner störenden Peakverbreiterung führen. Beim Ansatz der Kalibrierproben in Trink-, Grund- oder Oberflächenwasser sicherstellen, dass die zu bestimmenden Substanzen nicht enthalten sind.

Die Kalibrierproben sind für jede Messsequenz neu anzusetzen, soweit deren Stabilität nicht nachgewiesen wurde.

7.13.9 Kontrollstandard

Von den Stammlösungen unabhängig hergestellte Lösung der Referenzsubstanzen, z. B. Lösung einer anderen Bezugsquelle. Die Lösung sollte alle zu bestimmenden Substanzen enthalten.