

DIN ISO 20179



ICS 13.060.50

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung von Mikrozystinen –
Verfahren mittels Festphasenextraktion (SPE) und
Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit ultravioletter
(UV) Detektion (ISO 20179:2005)**

Water quality –

Determination of microcystins –

Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection (ISO 20179:2005)

Qualité de l'eau –

Dosage des microcystines –

Méthode utilisant l'extraction en phase solide (SPE) et la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec détection dans l'ultraviolet (UV)
(ISO 20179:2005)

Gesamtumfang 24 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Inhalt

	Seite
Nationales Vorwort	3
Nationaler Anhang NA (informativ) Literaturhinweise.....	5
Einleitung.....	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen.....	7
3 Abkürzungen	7
4 Grundlage des Verfahrens	7
5 Reagenzien	8
6 Geräte.....	11
7 Durchführung	12
8 Verfahrenskenndaten	16
9 Analysenbericht.....	17
Anhang A (informativ) Massenspektrometrie (MS) als alternatives Detektionsverfahren.....	18
Anhang B (informativ) Typisches Chromatogramm und typische Absorptionsspektren	21
Anhang C (informativ) Verfahrenskenndaten	23
Literaturhinweise	24

Diese Norm ist Bestandteil der Reihe

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

und beschreibt das Verfahren

Bestimmung von Mikrocytinen — Verfahren mittels Festphasenextraktion (SPE) und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit ultravioletter (UV) Detektion (F 29).

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (ISO 20179:2005) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Wasserbeschaffenheit“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der NA 119-01-03-02-12 AK „Mikrocystine“ des NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im Normenausschusses Wasserwesen (NAW).

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

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung von Mikrocytinen — Verfahren mittels Festphasenextraktion (SPE) und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit ultravioletter (UV) Detektion (F 29):

Verfahren DIN ISO 20179 — F 29.

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

Alle für die Abwasserverordnung (AbwV) — nach § 7a des Gesetzes zur Ordnung des Wasserhaushaltes (Wasserhaushaltsgesetz — WHG) über „Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer“ relevanten Einheitsverfahren sind zusammen mit der AbwV und dem WHG als Loseblattsammlung „Analyseverfahren in der Abwasserverordnung — Rechtsvorschriften und Normen“ (Ergänzungsbände) von der Beuth Verlag GmbH herausgegeben worden.

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

Allgemeine Angaben (Gruppe A)	(DIN 38402)
Sensorische Verfahren (Gruppe B)	(DIN 38403)
Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)	(DIN 38404)
Anionen (Gruppe D)	(DIN 38405)
Kationen (Gruppe E)	(DIN 38406)
Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)	(DIN 38407)
Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)	(DIN 38408)
Summarische Wirkungs- und Stoffkenngößen (Gruppe H)	(DIN 38409)
Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)	(DIN 38410)
Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)	(DIN 38411)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)	(DIN 38412)
Einzelkomponenten (Gruppe P)	(DIN 38413)
Schlamm und Sedimente (Gruppe S)	(DIN 38414)
Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)	(DIN 38415).

Außer den in der Reihe DIN 38402 bis DIN 38415 genormten Untersuchungsverfahren liegen eine Reihe Europäischer und Internationaler Normen als DIN-EN-, DIN-EN-ISO- und DIN-ISO-Normen vor, die ebenfalls Bestandteil der „Deutschen Einheitsverfahren“ sind.

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: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

Diese Norm enthält neben den gesetzlichen Einheiten auch die Einheit „psi“, die im Deutschen Normenwerk nicht zugelassen ist. Es wird daraufhin gewiesen, dass die Anwendung dieser Einheit im nationalen amtlichen und geschäftlichen Verkehr aufgrund des Gesetzes über Einheiten im Messwesen nicht zulässig ist. Die Angabe dient lediglich als Hilfe im amtlichen und geschäftlichen Verkehr (z. B. bei Einfuhr und Ausfuhr) mit solchen Staaten, die diese Einheiten verwenden.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 3696	siehe DIN ISO 3696
ISO 5667-3	siehe DIN EN ISO 5667-3
ISO 5667-4	siehe DIN 38402-12
ISO 5667-5	siehe DIN 38402-14
ISO 5667-6	siehe DIN 38402-15
ISO 5725-1	siehe DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe DIN ISO 5725-2

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN 38402-12, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Allgemeine Angaben (Gruppe A) — Probenahme aus stehenden Gewässern (A 12)*

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 EN ISO 5667-3, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 3: Anleitung zur Konservierung und Handhabung von Wasserproben*

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

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

Wasserbeschaffenheit —

**Bestimmung von Mikrozystinen —
Verfahren mittels Festphasenextraktion (SPE) und Hochleistungs-
Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit ultravioletter (UV) Detektion**

Einleitung

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

WARNUNG — Nach diesem Verfahren werden mikrozystinhaltige Lösungen eingesetzt. Mikrozystine sind für den Menschen hochgradig hepatotoxisch. Mikrozystinhaltiger Laborabfall muss separat gesammelt und als hochgiftiger Chemieabfall entsorgt werden. Auch eine Langzeit-Dekontamination mit hochkonzentrierter Natriumhypochlorit-Lösung (NaClO-Lösung) ist möglich.

Anwender dieser Internationalen 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.

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

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung und Quantifizierung von Mikrocystinen in Rohwasser (das Biomasse enthält) und in behandeltem Wasser, z. B. Leitungswasser, fest. Das beschriebene Verfahren ist für MCYST-RR, MCYST-YR und MCYST-LR validiert. Es lässt sich auch zur Bestimmung von mehreren Strukturvarianten [1] dieser Mikrocystine anwenden, aber eine zweifelsfreie Identifizierung ist wegen des Fehlens handelsüblicher Standardlösungen und wegen der Ko-Elution nicht möglich.

Der von der Weltgesundheitsorganisation vorgeschlagene Schwellenwert von 1 µg/l MCYST-LR in Wasser kann nach Mikrocystinanreicherung und Einsatz der Festphasenextraktion überwacht werden.

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).

ISO 3696:1987, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

ISO 5667-4, *Water quality — Sampling — Part 4: Guidance on sampling from lakes, natural and man-made*

ISO 5667-5, *Water quality — Sampling — Part 5: Guidance on sampling of drinking water from treatment works and piped distribution systems*

3 Abkürzungen

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Abkürzungen.

APCI	(en: Atmospheric Pressure Chemical Ionization) chemische Ionization unter Atmosphärendruck
MCYST	Mikrocystin
MCYST-LR	Mikrocystin mit Leucin (L) und Arginin (R)
MCYST-RR	Mikrocystin, das zwei Arginin (R)-Einheiten enthält
MCYST-YR	Mikrocystin mit Tyrosin (Y) und Arginin (R)
SIM	(en: Selected Ion Monitoring) massenspektrometrisches Verfahren, bei dem nur eine Ionenspur gemessen wird
SEC	(en: Size Exclusion Chromatographie) Größenausschlusschromatographie

4 Grundlage des Verfahrens

Wasserproben, die cyanobakterielles Material (Biomasse) enthalten, filtrieren und aus der Biomasse mit einem Lösemittel (Methanol/Wasser) extrahieren. Den Extrakt filtrieren, verdünnen und zur Reinigung der Probe eine Festphasenextraktion (SPE) vornehmen. Das Filtrat wie eine Reinwasserprobe behandeln (siehe unten).

Reinwasserproben, wie z. B. Leitungswasser, unter Verwendung der SPE anreichern. Die Mikrocystine aus den SPE-Kartuschen mit Methanol/Wasser [Volumenverhältnis 90/10], das 0,1 % Volumenanteil an Trifluoressigsäure (TFA) enthält, eluieren.

Die Mikrocystine quantitativ mit Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) mit UV-/Diodenfelddetektion bei 238 nm nachweisen.

5 Reagenzien

Wenn nicht anders festgelegt, nur Chemikalien anerkannter Analysenreinheit und Wasser der Qualität 3 nach ISO 3696:1987 verwenden.

5.1 Methanol, CH_3OH , für die HPLC.

5.2 Acetonitril, CH_3CN , für die HPLC.

5.3 Trifluoressigsäure, TFA, CF_3COOH .

5.4 Standardverdünnungslösung, SPE-Spüllösemittel und Lösemittel zur Wiederauflösung.

Methanol/Wasser [Volumenverhältnis 20/80].

5.5 Extraktionslösung

Methanol/Wasser [Volumenverhältnis 75/25].

5.6 SPE-Elutionslösung

Methanol/Wasser [Volumenverhältnis 90/10] mit 0,1 % (Volumenanteil) TFA.

5.7 Natriumthiosulfat-Lösung

1 g Natriumthiosulfat $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (wasserfrei oder mit 5 H_2O) in 100 ml Wasser lösen. Die Endkonzentration beträgt $\rho = 10 \text{ g/l}$ (63 mmolar im Falle von wasserfreiem Na_2SO_3).

5.8 Ammoniumhydroxid-Lösung

Handelsübliche $\approx 1 \text{ mol/l}$ Ammoniumhydroxid-Lösung, NH_4OH .

5.9 Festphasenextraktionskartuschen für die Mikrocystinanreicherung

Die Mindestkapazität der Säule (Menge des Analyts, der in der Säule zurückgehalten werden soll) muss mindestens 100 μg für jedes Mikrocystin betragen, und sie muss eine Ausbeute von mindestens 80 % für MCYST-LR und von mindestens 70 % für MCYST-RR und MCYST-YR erlauben, wenn es als Standardlösung in Wasser, die 0,05 μg der einzelnen Mikrocystine enthält, zugeführt wird.

ANMERKUNG Die Ausbeute hängt in hohem Maße von dem Material/dem Hersteller der SPE-Kartusche, von Materialanforderungen wie der Kohlenstoffbeladung, der Teilchengröße usw. ab. Die Angaben zur Ausbeute werden auf der Grundlage von C18-Kartuschen mit einer einzigen Messung bestimmt. Das Material sollte den folgenden Materialanforderungen genügen: Kohlenstoffbeladung (16,9 %), Teilchendurchmesser (54 μm), Oberflächenbedeckung (333 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, auf Grundlage von % C), Volumen der Kartusche (3 ml), Material je Kartusche (500 mg). Wenn die oben geforderten Werte für die Ausbeute nicht erreicht werden können, wird empfohlen, die SPE-Kartusche eines anderen Herstellers zu verwenden.