

DIN EN 17845

ICS 91.100.01

Einsprüche bis 2022-07-06

Entwurf**Bauprodukte: Bewertung der Freisetzung von gefährlichen Stoffen –
Bestimmung von Biozid-Rückständen mittels LC-MS/MS;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17845:2022**

Construction products: Assessment of release of dangerous substances –
Determination of biocide residues using LC-MS/MS;
German and English version prEN 17845:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-05-06 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nabau@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Bauwesen (NABau), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 65 Seiten

DIN-Normenausschuss Bauwesen (NABau)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17845:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 351 „Bauprodukte — Bewertung der Freisetzung gefährlicher Stoffe“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Gemeinschaftsausschuss NA 005-53-01 GA „Gemeinschaftsarbeitsausschuss NABau/NAW, Boden und Grundwasser (SpA zu CEN/TC 351/WG 1 und CEN/TC 351/WG 1/AHG)“ im DIN-Normenausschuss Bauwesen (NABau).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigefügt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Titel de: Bauprodukte: Bewertung der Freisetzung von gefährlichen Stoffen —
Bestimmung von Biozid-Rückständen mittels LC-MS/MS

Titel en: Construction products: Assessment of release of dangerous substances —
Determination of biocide residues using LC-MS/MS

Titel fr:

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Abkürzungen	9
5 Kurzbeschreibung	9
6 Probenvorbereitung	9
7 Reagenzien	9
8 Geräte und Ausrüstung	12
9 Verfahren	12
9.1 Vorbereitung und Lagerung von Proben	12
9.2 Vorbereitung der Eluate	12
9.3 Probenvorbereitung für die Gehaltsanalyse	13
9.3.1 Extraktion	13
9.3.2 Reinigung	13
9.4 Bestimmung	13
9.5 Störungs- und Wiederfindungsprüfungen	14
10 Auswertung der Ergebnisse	14
10.1 Identifizierung	14
10.2 Quantifizierung	14
10.3 Qualitätssicherung	15
11 Berechnung der Ergebnisse	15
11.1 Berechnung der Biozidkonzentrationen ohne Standardergänzung	15
11.1.1 Gehaltsanalyse	15
11.1.2 Eluat-Analyse	16
11.2 Berechnung der Biozidkonzentrationen mit Standardergänzung	17
11.2.1 Gehaltsanalyse	17
11.2.2 Eluat-Analyse	19
12 Genauigkeit	19
13 Prüfbericht	20
Anhang A (normativ) LC-UV-Verfahren zur Gehaltsanalyse	21
A.1 Extraktion und Reinigung	21
A.2 HPLC-Analyse	21
A.3 Beispiel für chromatographische Bedingungen	21
A.4 Kalibrierung	22
A.4.1 Allgemeines	22
A.4.2 Kalibrierkurve	22
A.5 Berechnung des Biozidgehalts im Bauprodukt	23
Anhang B (informativ) Festphasenextraktion von Eluaten (Beispiel)	24

Anhang C (informativ) Beispielbedingungen für geeignete LC-MS/MS-Systeme.....	25
C.1 Beispielhafte LC-MS/MS-Betriebsbedingungen	25
C.2 HPLC-System 1	25
C.3 HPLC-System 2	26
C.4 HPLC-System 3	26
C.5 HPLC-System 4	27
C.6 UHPLC-System	28
C.7 MS/MS-System 1	28
C.8 MS/MS-System 2	29
Anhang D (informativ) Präzisionsdaten	30
Literaturhinweise.....	32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17845:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 351 „Bauprodukte – Bewertung der Freisetzung gefährlicher Stoffe“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

Einleitung

Dieses Dokument behandelt die Bestimmung des Gehalts an Bioziden in Bauprodukten und Eluaten mittels Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

Nach einer ausführlichen Bewertung der verfügbaren Verfahren für die Analyse des Gehalts und des Eluats von Bauprodukten (CEN/TR 16045 [1]) und der anschließenden Bewertung der Verfahren im Rahmen der Validierung der Belastbarkeit [2] wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Eluatanalyse und die Analyse des Gehalts von Bioziden nach einigen Anpassungen auf EN 15637 [3] basieren können.

Dieses Dokument ist Teil eines modularen horizontalen Ansatzes und gehört zum analytischen Schritt. Eine Übersicht der Module, die zu einer Messkette gehören sowie das Verfahren für die Auswahl der Module steht in CEN/TR 16220 [4] zur Verfügung.

Bei der wachsenden Zahl von produkt- und sektororientierten Prüfverfahren wurde festgestellt, dass viele Schritte der Prüfverfahren für die Prüfverfahren für viele Produkte, Werkstoffe oder Sektoren verwendet werden oder verwendet werden könnten. Es wurde durch eine sorgfältige Bestimmung dieser Schritte und Auswahl spezifischer Fragen innerhalb dieser Schritte angenommen, dass die Elemente des Prüfverfahrens auf eine Art und Weise beschrieben werden könnten, die für alle Werkstoffe und Produkte oder für alle Werkstoffe und Produkte mit bestimmten Spezifikationen verwendet werden kann.

In diesem Zusammenhang wird ein horizontaler modularer Ansatz in CEN/TC 351 gewählt. „Horizontal“ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Verfahren für eine weite Bandbreite von Werkstoffen und Produkten mit bestimmten Eigenschaften verwendet werden können. „Modular“ heißt dabei, dass sich eine im Rahmen dieses Ansatzes entwickelte Prüfnorm bei der Beurteilung einer Eigenschaft auf einen bestimmten Schritt und nicht auf die gesamte Messkette (von der Probenahme bis zur Analyse) bezieht. Aus diesem Ansatz ergibt sich der Vorteil, dass die „Module“ besser ersetzt werden können, ohne die genormte „Messkette“ zu gefährden.

Die Nutzung modularer horizontaler Normen impliziert auch die Erstellung von Prüfschemata. Vor der Durchführung einer Prüfung zu einem bestimmten Werkstoff und der Bestimmung einzelner Merkmale dieses Produkts muss zunächst ein Protokoll entwickelt werden, in dem die anforderungsgerechten Module ausgewählt und als Grundlage für das gesamte Prüfverfahren zusammengestellt werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren für die Bestimmung des Gehalts an Bioziden in Bauprodukten (entweder im fertigen (getrockneten) oder im gebrauchsfertigen Zustand) und in deren Eluaten mittels Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

Für die Analyse des Gehalts kann auch Flüssigchromatographie mit UV-Detektion verwendet werden, wenn eine ausreichende Empfindlichkeit und Selektivität sichergestellt ist (siehe Anhang A).

Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren ist für die in Anhang D aufgeführten Produkttypen validiert. Bei der Analyse von Eluaten können Quantifizierungsgrenzen von 0,1 µg/l erreicht werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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).

prEN 16637-2, *Bauprodukte — Bewertung der Freisetzung von gefährlichen Stoffen — Teil 2: Horizontale dynamische Oberflächenauslaugprüfung*

prEN 16637-3, *Bauprodukte — Bewertung der Freisetzung von gefährlichen Stoffen — Teil 3: Horizontale Perkulationsprüfung im Aufwärtsstrom*

EN 16687:2015, *Bauprodukte — Bewertung der Freisetzung von gefährlichen Stoffen — Terminologie*

EN 17087, *Bauprodukte — Bewertung der Freisetzung von gefährlichen Stoffen — Herstellung von Prüfmengen aus der Laborprobe zur Prüfung der Freisetzung und zur Gehaltsanalyse*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 16687:2015 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

Blindwert

Prüfergebnis, das bei Durchführung der Prüfung ohne ein Prüfstück erhalten wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Blindwert wird in denselben Einheiten wie denen für die Darstellung der für diese Prüfung üblichen Prüfergebnisse ausgedrückt.

[QUELLE: EN 16687:2015, 4.1.10]

3.2

Fortluft

Lösung, die sich aus der Extraktion einer Probe mit einem Lösemittel ergibt

[QUELLE: CEN/TR 16045:2010, 2.2.4]

3.3

Extraktion

Auflösung von Stoffen in einem Lösemittel zur anschließenden chemischen Analyse

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Extraktion wird üblicherweise mit einem organischen Lösemittel durchgeführt, um organische Stoffe zur chemischen Analyse oder für spezielle Analysen von anorganischen Stoffen zu extrahieren.

[QUELLE: CEN/TR 16045:2010, 2.2.5]

3.4

Laborprobe

Probe oder Teilprobe(n), die dem Labor zugesandt oder von diesem erhalten wird

[QUELLE: EN 16687:2015, 3.2.1]

3.5

Nachweisgrenze der Methode

MDL

niedrigste Konzentration eines Analyten, die mit einem konkreten analytischen Verfahren einschließlich Probenzubereitung mit einer definierten statistischen Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann

[QUELLE: EN ISO 17294-1:2006, 3.12, modifiziert: – „einschließlich Probenzubereitung“ hinzugefügt, Symbol durch Abkürzung ersetzt]

3.6

Produktmatrix

Hauptzusammensetzung des Produkts, durch die die Methode zur Vorbereitung der Probe und die Art des Aufschlusses oder der Extraktion zur späteren chemischen Analyse definiert wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei Bauprodukten können beispielsweise die folgenden Produktmatrizen unterschieden werden:

- bitumenhaltige Produkte;
- Metalle;
- Kunststoffe/Gummi;
- silikabasierte Produkte;
- Holzprodukte.

[QUELLE: CEN/TR 16045:2010, 2.2.6; bearbeitet]

3.7

Probe, en: sample

Teilmenge eines Materials, die aus einer größeren Materialmenge ausgewählt wird

[QUELLE: EN 16687:2015, 3.1.5]

3.8

Prüfmenge

Untersuchungsmenge

Untersuchungsmenge aus der Prüfprobe zur Prüfung/Analyse entnommenen Menge, üblicherweise von bekannter Masse oder bekanntem Volumen

[QUELLE: EN 16687:2015, 3.2.3]

3.9

Prüfprobe

aus der Laborprobe hergestellte Probe, aus der die Messproben zur Prüfung oder Analyse entnommen werden

[QUELLE: EN 16687:2015, 3.2.2]

3.10

Bitumen

hochviskose Flüssigkeit oder fester Stoff, die/der im Wesentlichen aus Kohlenwasserstoffen und deren Abkömmlingen besteht und nahezu vollständig lösbar in Kohlenstoffdisulfid ist

3.11

Asphalt

natürliche oder künstliche Mischung aus Bitumen und mineralischen Stoffen

3.12

Soxhlet-Extraktion

chemische Vorbehandlung einer festen Teilprobe, wobei die zu bestimmenden organischen Verbindungen durch die Soxhlet-Technik gelöst werden

3.13

endgültiger Extrakt

Lösung, die nach der Aufbereitung des Soxhlet-Extrakts durch eine Reinigungsphase erhalten wird

3.14

externer Standard

bekannte Menge der Zielanalyten, die in derselben Reihe wie die zu messende Lösung gemessen wird und zur Identifizierung und Quantifizierung dient

3.15

interner Standard

bekannte Menge eines (ggf. deuterierten) nicht in der Probe vorhandenen Stoffes, der der Analyseprobe zugesetzt wird, um die Wiederfindungsrate zu bestimmen

4 Abkürzungen

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Abkürzungen:

EOTA	Europäische Organisation für Technische Bewertung (en: European Organisation for Technical Assessment)
LC	Flüssigchromatographie (en: liquid chromatography)
MS	Massenspektrometrie (en: Mass spectrometry); Massenspektrometrische Detektion
TR	Technischer Bericht (en: Technical Report) (ISO, CEN oder EOTA)
TS	Technische Spezifikation (en: Technical Specification) (ISO, CEN oder EOTA)

5 Kurzbeschreibung

Die Quantifizierung der Biozide erfolgt durch Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) unter Verwendung der Elektrospray-Ionisation. Die Eluate werden direkt in das LC-MS-System injiziert.

Feste und pastöse Proben werden mit Methanol oder einem Methanol-Wasser-Gemisch extrahiert. Die Reinigung kann bei Bedarf durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Festphasenunterstützung erfolgen.

Um die erforderliche Selektivität zu erreichen, wird das Massenspektrometer im Modus der mehrfachen Reaktionsüberwachung (MRM) betrieben.

6 Probenvorbereitung

Um Prüfproben für die Extraktion (und Analyse) zu erhalten, muss der in EN 17087 aufgeführte Leitfaden zur Probenvorbereitung angewendet werden.

Vor und während des Transports von Laborproben sowie in der Zeit, während der die Proben vor der Analyse im Labor aufbewahrt werden, müssen Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, um eine Veränderung der Probe zu vermeiden (siehe CEN/TR 16220).

Extrakte sind anfällig für Veränderungen durch physiche oder chemische Reaktionen, die in der Zeit zwischen der Extraktion und der Analyse auftreten können.

Daher ist es wichtig, die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen zu ergreifen, um diese Reaktionen zu minimieren und im Falle von vielen Parametern das Extrakt mit minimaler Verzögerung zu analysieren. Die maximale Verzögerung ist in den entsprechenden Analysenormen angegeben.

7 Reagenzien

Sofern nicht anders festgelegt, sind Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit zu verwenden. Jede Vorsichtsmaßnahme muss ergriffen werden, um mögliche Kontamination von Wasser, Lösemittel oder anorganischen Salzen zu vermeiden.

7.1 Zusatz für LC-Eluent je nach verwendetem Verfahren, z. B. Ammoniumformiat, Ameisensäure, Essigsäure.

7.2 Wasser, HPLC-Qualität.

7.3 Dichlormethan, für die Analyse von Bioziden.

7.4 Methanol, HPLC-Qualität.

7.5 Interne Standardlösungen (ISTD) in Methanol, Massenkonzentration $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$ bis $50 \mu\text{g/ml}^1$.

Es müssen so häufig wie möglich isotopenmarkierte interne Standards verwendet werden, sofern diese verfügbar und zu einem vernünftigen Preis erhältlich sind. Die interne Standardlösung sollte während des Extraktionsschritts und zu den Standardlösungen hinzugefügt werden.

7.6 Biozid-Stammlösungen.

Es werden einzelne Stammlösungen von Analysestandards in Konzentrationen hergestellt, die ausreichend hoch sind, um die Herstellung komplexer Biozidgemische zu ermöglichen. Das verwendete Lösungsmittel darf die Stabilität der verwendeten Biozide nicht negativ beeinflussen.

Üblicherweise werden die Stammlösungen bei etwa -18°C gelagert. Die Stabilität der Stammlösungen während der Lagerung muss regelmäßig überprüft werden. In manchen Fällen ist der Zusatz von Säuren oder Basen hilfreich, um die Stabilität zu erhöhen und die zulässige Lagerzeit zu verlängern.

7.7 Biozidgemische.

Aufgrund der umfassenden Anwendbarkeit dieses Verfahrens und der teilweise abweichenden pH-Stabilität von Bioziden werden möglicherweise Gemische unterschiedlicher Zusammensetzung benötigt. Diese werden hergestellt, indem definierte Volumina der benötigten Biozid-Stammlösungen (7.6) vermischt und in geeigneter Weise mit Methanol verdünnt werden. Die Analytkonzentrationen in diesem Gemisch sollten ausreichend sein, um die Herstellung der erforderlichen matrixangepassten Standards (siehe 7.8.3) mit mäßiger Verdünnung des Blindwertprobenextrakts (z. B. weniger als 20 %) zu ermöglichen.

Üblicherweise werden Biozidgemische bei etwa -18°C gelagert. Da die Stabilität der Biozide in dem Gemisch geringer sein kann als in den Stammlösungen, muss die Stabilität regelmäßig überprüft werden. In manchen Fällen ist der Zusatz von Säuren oder Basen hilfreich, um die Stabilität zu erhöhen und die zulässige Lagerzeit zu verlängern.

7.8 Standardlösungen.

7.8.1 In reinem Lösungsmittel hergestellte Standardlösungen (lösungsmittelbasierte Standards).

Lösungsmittelbasierte Standards werden durch Mischen eines bestimmten Volumens Methanol mit bekannten Mengen von Biozidgemischen (7.7) hergestellt. Die Herstellung mehrerer Standards mit unterschiedlicher Biozidkonzentration ist nützlich, um einen breiten Konzentrationsbereich abzudecken.

ANMERKUNG Der lineare Bereich der Kalibrierung hängt von der Empfindlichkeit des Messgeräts und der MS-Signalantwort des Biozids ab. Ein Kalibrierungsbereich von $0,1 \mu\text{g/l}$ bis $100 \mu\text{g/l}$ entspricht einem Biozidgehalt von $0,3 \text{ mg/kg}$ bis 300 mg/kg , wenn eine Probe von 10 g verwendet wird (siehe 9.3.1).

7.8.2 Standardlösungen mit internem Standard, hergestellt in reinem Lösungsmittel.

Lösungsmittelbasierte Standards mit ISDT werden durch Mischen eines bestimmten Volumens Methanol mit bekannten Mengen von Biozidgemischen (7.7) und einem festen Volumen der internen Standardlösung (7.5) hergestellt.

Das verwendete Volumen muss der ISTD-Konzentration entsprechen, die in den endgültigen Extrakten nach der Probenextraktion und -reinigung (siehe 9.2 und 9.3) gewonnen wird. Die Konzentration des internen Standards im endgültigen Extrakt ($c_{\text{ISTD}}^{\text{sample}}$) wird mit Gleichung (1) berechnet. Die Herstellung mehrerer Standards mit unterschiedlicher Biozidkonzentration, aber konstanter ISTD-Konzentration, ist nützlich, um einen breiten Konzentrationsbereich abzudecken.

$$c_{\text{ISTD}}^{\text{sample}} = \frac{V_{\text{ISTD}} \times c_{\text{ISTD}} \times V_1}{V_{\text{ex}} \times V_{\text{end}}} \quad (1)$$

Dabei ist

$c_{\text{ISTD}}^{\text{sample}}$	die Konzentration des internen Standards im endgültigen Extrakt, in µg/ml;
V_{ISTD}	das Volumen der internen Standardlösung (7.5), die der Prüfmenge zugegeben wurde, in ml;
c_{ISTD}	die Konzentration der internen Standardlösung (7.5) in µg/ml;
V_1	das Volumen, das für die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Festphasenunterstützung verwendet wird, in ml (hier: 5 ml);
V_{ex}	das Gesamtvolumen der Extraktionslösungsmittel in ml (hier: 30 ml);
V_{end}	das endgültige Volumen des nach der Reinigung gewonnenen Extrakts, in ml (hier: 0,5 ml).

Falls keine Reinigung durchgeführt wird, vereinfacht sich Gleichung (1) folgendermaßen:

$$c_{\text{ISTD}}^{\text{sample}} = \frac{V_{\text{ISTD}} \times c_{\text{ISTD}}}{V_{\text{ex}}} \quad (1')$$

7.8.3 Standardlösungen, die in Blindmatrixextrakten hergestellt wurden (matrixangepasste Standards).

Es werden matrixangepasste Standards auf die gleiche Weise hergestellt wie die lösungsmittelbasierten Standards, jedoch werden anstelle von reinem Methanol Extrakte von Blindwertproben verwendet (hergestellt wie in 9.2 beschrieben, jedoch ohne ISTD-Zusatz). Um Fehler durch matrixbedingte Effekte während der Chromatographie zu minimieren, wird empfohlen, ähnliche Produkte zu wählen (z. B. Dichtstoff für Dichtstoffproben, Putz für Putzproben, Holz für behandelte Holzproben, Isolierschaum für Isolierschaumproben, usw.).

Die Stabilität von Bioziden in matrixangepassten Standards kann niedriger sein als die von Standards in reinem Acetonitril und muss gründlicher überprüft werden.

7.9 Kartusche für die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Festphasenunterstützung und entsprechendem Probenvolumen (z. B. 5 ml oder 20 ml), Diatomeenerde, z. B. ChemElut CE 1005¹.

7.10 Festphasenextraktionskartuschen (SPE), z. B. OASIS HLB 6 ml, 200 mg³.

1 ChemElut und OASIS HLB sind Handelsnamen von Produkten. Diese Information soll einen Nutzen für die Anwender dieser Europäischen Norm darstellen und stellt keine Empfehlung durch CEN für dieses Produkt dar. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

8 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborgeräte und insbesondere Folgendes:

8.1 Geeignete Geräte zum Zerkleinern und Schleifen von Proben.

8.2 Laborwaage, Fehlergrenze: 0,01g.

8.3 Messkolben, 10 ml und 20 ml.

8.4 Ultraschallbad.

8.5 Zentrifugenröhrchen, geeignet, um der Beschleunigung standzuhalten.

8.6 Zentrifuge, die in der Lage ist, eine relative Zentrifugalkraft (RCF) von mindestens 3 000 *g* (am Boden des Röhrchens) zu erzeugen.

8.7 Rundkolben, Fassungsvermögen 50 ml und 250 ml.

8.8 Glasspritze, Mindestvolumen 2 ml.

8.9 Mikroliterspritzen zur Anreicherung der Proben.

8.10 Rotationsverdampfer mit temperaturgeregeltem Wasserbad.

8.11 Spritzenfilter, 0,45 µm Porengröße, Polytetrafluorethylen (PTFE)-Membran.

8.12 Glasfläschchen und Kappen, 1,8 ml Volumen, geeignet für einen Autosampler.

8.13 LC-MS/MS-System, Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray-Schnittstelle.

ANMERKUNG Je nach Bauprodukt, Matrix, Systemstörungen, Biozid und LOQ-Anforderung ist es möglich, dass mit einem weniger selektiven Nachweissystem, z. B. LC/UV, zuverlässige Ergebnisse erzielt werden können.

8.14 SPE-Einrichtung, z. B. Vakuumverteiler.

9 Verfahren

9.1 Vorbereitung und Lagerung von Proben

Probenverarbeitungs- und -lagerungsverfahren sollten nachweislich keinen signifikanten Einfluss auf die in den Prüfproben vorhandenen Biozide haben. Die Verarbeitung sollte auch sicherstellen, dass die Prüfprobe ausreichend homogen ist, damit die Subprobenahme akzeptabel ist. Wenn es unwahrscheinlich ist, dass eine einzelne Einwaage (Analysenportion) die Prüfprobe repräsentiert, müssen größere Mengen oder mehrere einzelne Einheiten analysiert werden, um den wahren Wert besser beurteilen zu können. Für die Analyse des Gehalts unterstützt der Zerkleinerungsgrad der festen Proben eine quantitative Biozidextraktion.

9.2 Vorbereitung der Eluate

Es werden Eluate entsprechend EN 16637-2 und EN 16637-3 hergestellt; die Eluate werden zentrifugiert, eine Prüfmenge wird entnommen, der interne Standard zugegeben und mit 9.4 fortgefahren.

Je nach Empfindlichkeit des Messgeräts und der gewünschten Bestimmungsgrenze kann es erforderlich sein, die Eluate durch Festphasenextraktion (SPE) zu konzentrieren. Ein Beispiel für ein SPE-Verfahren ist in Anhang B aufgeführt.

9.3 Probenvorbereitung für die Gehaltsanalyse

9.3.1 Extraktion

Die Zerkleinerung der Probe wird so durchgeführt, dass repräsentative Anteile gewonnen werden (siehe EN 17087). Für alle anderen Aspekte der Probenvorbehandlung muss der Leitfaden in dieser Norm berücksichtigt werden. Das Ergebnis ist die Prüfprobe. Die Berechnung des Biozids muss sich auf die Masse der ursprünglichen Prüfprobe beziehen.

Bei trockenen Probenmaterialien wird ein homogenisierter Anteil von 5 g (m_A) in das Zentrifugenröhrchen (8.5) eingewogen. Es werden 10 ml Wasser und 20 ml Methanol (7.4) hinzugegeben. Das Ganze wird etwa 2 min lang homogenisiert (z. B. mit einem Hochgeschwindigkeitsmischer). Es werden mindestens 10 ml des so erhaltenen Extrakts von 30 ml ($= V_{ex}$) entnommen und bei mindestens 3 000 g für mindestens 10 min zentrifugiert.

Bei pastösen Produkten wird eine repräsentative Prüfmenge von $m_a = 10$ g in ein Zentrifugenröhrchen (8.5) umgefüllt. Es werden 10 ml Wasser und 20 ml Methanol (7.4) hinzugegeben. Das Ganze wird etwa 2 min lang homogenisiert (z. B. mit einem Hochgeschwindigkeitsmischer). Es werden mindestens 10 ml des so erhaltenen Extrakts (V_{ex}) entnommen und bei mindestens 3 000 g für mindestens 10 min zentrifugiert. Wenn das Produkt teilweise oder vollständig in dem Extraktionslösungsmittel gelöst ist, muss das Volumen V_{ex} unter Berücksichtigung des Probenvolumens korrigiert werden.

Optional darf zusätzlich ein interner Standard verwendet werden. In diesem Fall wird der Prüfmenge nach Zugabe von 20 ml Methanol ein kleines Volumen (<1 % von V_{ex}) der internen Standardlösung ($= V_{STD}$) zugesetzt.

9.3.2 Reinigung

Falls erforderlich, werden 5 ml des verdünnten Zentrifugats ($= V_3$) aus 9.3.2 auf eine 5-ml-Kartusche (7.9) aufgetragen. Nach etwa 5 min wird mit 12,5 ml Dichlormethan (7.3) in einen 50 ml Rundkolben (8.7) eluiert. Die Elution wird mit weiteren 12,5 ml Dichlormethan wiederholt. Die kombinierten Eluate werden mit dem Rotationsverdampfer (8.10) fast bis zur Trockenheit reduziert. Verbleibendes Dichlormethan muss mit einem sanften Stickstoffstrom entfernt werden. Es werden 500 µl Methanol (7.4) in den Rundkolben gegeben und mit Stopfen eingewogen. Das Biozid wird vorsichtig durch Schwenken des Kolbens im Ultraschallbad gelöst (8.4), wobei Verluste von Methanol vermieden werden müssen. Bei Verlusten von Methanol (erneutes Wiegen) wird Methanol hinzugegeben, um das vorherige Gesamtgewicht zu erhalten. Die erhaltene Probenlösung von 0,5 ml ($= V_{end}$) wird durch einen PTFE-Filter (8.11) in ein Probengefäß (8.12) zur Injektion filtriert.

Um eine größere Menge an Probenlösung für die Herstellung von matrixangepassten Standards (7.8.3) zu erhalten, darf eine 20-ml-Kartusche verwendet werden. In diesem Fall müssen 400 % aller oben genannten Volumen verwendet werden.

ANMERKUNG Die Probenprüflösung enthält die extrahierbaren Bestandteile von 3,33 g Probe je ml endgültigem Extrakt (oder 1,67 g/0,5 ml).

9.4 Bestimmung

Für die Eluatanalyse werden die Probenprüflösungen (9.2) und Standardlösungen (7.8.1, 7.8.2 oder 7.8.3) in geeigneter Reihenfolge in das LC-MS/MS-Messgerät injiziert. Dies erfordert möglicherweise ein Bracketing der Probenextrakte mit den Kalibrierlösungen. Das LC-MS/MS-Messgerät muss im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring) mit Übergängen betrieben werden, die für die untersuchten Biozide selektiv sind. Beispiele für MRM-Übergänge vieler Biozide sind in CEN/TR 15641 [6] enthalten. Die Messungen dürfen mit verschiedenen Geräten, gerätespezifischen Parametern und Trennsäulen durchgeführt werden. Einige beispielhafte Geräteparameter und Säulen sind in Anhang C aufgeführt. Es hat sich gezeigt, dass diese Bedingungen zufriedenstellende Ergebnisse liefern. Trotzdem bieten die individuellen Einstellungen der Verbindungen am Messgerät grundsätzlich bessere Genauigkeiten.

Für die Gehaltsanalyse können die gleichen chromatographischen Bedingungen und Nachweisverfahren verwendet werden. Es muss sichergestellt werden, dass die Konzentration der Biozide in der Probenlösung innerhalb des Kalibrierungsbereichs des Messgeräts liegt. Andernfalls muss die Probenlösung verdünnt werden.

Darüber hinaus kann das in Anhang A beschriebene LC-UV-Verfahren zur Bestimmung des Gehalts verwendet werden, sofern sichergestellt ist, dass das Gerät über eine ausreichende Empfindlichkeit und Selektivität verfügt.

9.5 Störungs- und Wiederfindungsprüfungen

Es werden Reagenzien-Blindproben vorbereitet und dotierte Wiederfindungsprüfungen bei geeigneten Konzentrationen durchgeführt. Das Chromatogramm der Reagenzien-Blindprobe darf keinen signifikanten Peak (z. B. 10 % der relevanten MRL) bei der Retentionszeit der Analyten aufweisen.

10 Auswertung der Ergebnisse

10.1 Identifizierung

Zur Identifizierung der Analyten werden die aus der Probenprüflösung erhaltenen Retentionszeiten mit denen der Kalibrierlösungen verglichen. Positive Ergebnisse werden durch den Vergleich der Peak-Intensitätsverhältnisse des ersten und zweiten verbindungsspezifischen m/z-Übergangs mit den Peak-Intensitätsverhältnissen in den Standards bestätigt. Eine andere LC-Säule, ein anderer Eluent oder ein zusätzlicher m/z-Übergang dürfen verwendet werden, wenn zusätzliche Maßnahmen erforderlich sind.

10.2 Quantifizierung

Es werden Standardlösungen (7.8.1 oder 7.8.2) oder matrixangepasste Standards (7.8.3) verwendet, um die Kalibrierfunktionen für jeden aktiven Stoff zu bestimmen, indem die Peakflächen (wenn keine ISTD verwendet werden) oder Peakverhältnisse (wenn ISTD verwendet werden) eines MRM-Übergangs gegen die Analytkonzentration (µg/ml) der Standardlösung aufgetragen werden.

Anschließend wird eine lineare Regression durchgeführt, um die Steigung der Kurve b und den Schnittpunkt a zu bestimmen. Die Funktion für die lineare Regression ist durch Gleichung (2) angegeben.

$$\Delta\left(\frac{A_i}{A_{\text{ISTD}}}\right) = b \times \Delta\left(\frac{c_i}{c_{\text{ISTD}}^{\text{sample}}}\right) + a \quad (2)$$

Dabei ist

- A_i die Peakfläche der Verbindung i in willkürlichen Einheiten (a.u.);
- A_{ISTD} die Peakfläche des internen Standards in willkürlichen Einheiten (a.u.) ($A_{\text{IS}} = 1$, wenn kein interner Standard verwendet wird);
- b die Steigung der entsprechenden Kalibrierungskurve in a.u. (ohne ISTD) oder ohne Dimension (mit ISTD);
- c_i die Konzentration der Verbindung i in der Kalibrierlösung in µg/ml;
- $c_{\text{ISTD}}^{\text{sample}}$ die Konzentration des internen Standards in der Kalibrierlösung in µg/ml ($c_{\text{ISTD}}^{\text{sample}} = 1$, wenn kein interner Standard verwendet wird);
- a der Schnittpunkt der entsprechenden Kalibrierungskurve in a.u. (ohne ISTD) oder ohne Dimension (mit ISTD);

Für bestimmte Biozide ist eine quadratische Kalibrierungsgleichung besser geeignet.

Für eine erste Schätzung des Gehalts an Bioziden in Bauprodukten oder zum Nachweis ihres Nichtvorhandenseins können die Standardlösungen (7.8.1 oder 7.8.2) in reinem Methanol verwendet werden. Standardlösungen in reinem Lösemittel können auch für die Quantifizierung verwendet werden, wenn Vorversuche zeigen, dass beobachtete Unterdrückungs- oder Verstärkungseffekte das Ergebnis nicht signifikant beeinflussen. Sobald relevante Biozidgehalte detektiert werden (z. B. vermutete MRL-Überschreitungen), sollte eine genauere Bestimmung mit matrixangepassten (7.8.3) Standardlösungen durchgeführt oder die Standard-Additionsmethode bevorzugt werden.

ANMERKUNG Matrixeffekte beeinflussen den Response der Zielanalyten im Probenextrakt verglichen mit dem Response der Standardlösungen in reinem Lösemittel.

Der Kalibrierbereich muss dem zu quantifizierenden Biozidgehalt entsprechen. Daher kann es erforderlich sein, mehr als eine Kalibriergerade aus den Ergebnissen der Kalibriermessungen zu erstellen.

10.3 Qualitätssicherung

Bei der Verwendung von ISTD ist die Tatsache entscheidend, dass jede Verschiebung des ISTD-Signals einen direkten Einfluss auf die berechnete Konzentration der Analyten hat. Im Idealfall sollte sich das ISTD-Signal nur aufgrund von Volumenunterschieden verschieben und so die Genauigkeit der Messung verbessern. Es gibt jedoch auch andere, nicht erwünschte Faktoren, die die Signale des ISTD beeinflussen und somit Fehler bei der Quantifizierung der Analyten verursachen können. Verluste des ISTD während der Reinigung führen zu einer zu hohen Schätzung der Analytenkonzentration. Diese Verluste sollten daher minimal sein. Eine spezifische Unterdrückung des ISTD-Signals, die bei LC-MS-Anwendungen aufgrund von co-eluierenden Matrixkomponenten auftreten kann, führt ebenfalls zu einer zu hohen Schätzung der Analyten. Matrixeffekte hängen davon ab, ob der Extrakt bestimmte Komponenten enthält, die mit dem ISTD co-eluiert und seinen Ionisationsprozess beeinflussen.

In jedem Fall ist es von entscheidender Bedeutung, Maßnahmen zur Qualitätskontrolle einzuführen, um sicherzustellen, dass ein durch den ISTD verursachter Fehler unerheblich bleibt. Zu den Qualitätskontrollmaßnahmen kann die Verwendung von Ersatz-ISTD und Qualitätskontrollstandards gehören, die in anderen Phasen des Analyseverfahrens (z. B. dem endgültigen Extrakt) hinzugefügt werden können und die dazu beitragen können, jegliche nicht volumenbezogene Verschiebung des ISTD-Signals zu erkennen. Sehr hilfreich für die Qualitätskontrolle ist die Beobachtung der Signalintensität des ISTD in jeder Probe innerhalb einer Abfolge. Wenn eine signifikante Signalverschiebung auftritt, wird die Quantifizierung mit einem Ersatz-ISTD oder ohne ISTD durchgeführt. Im letzteren Fall sind exakte Flüssigkeitsumfüllungen und ein Ausgleich der Volumen der Standardlösungen und der Probenextrakte zwingend erforderlich.

11 Berechnung der Ergebnisse

11.1 Berechnung der Biozidkonzentrationen ohne Standardergänzung

11.1.1 Gehaltsanalyse

Wenn das Verfahren der Standardergänzung nicht verwendet wird, wird der Gehalt w_R in (mg/kg) eines Biozids in einem Bauprodukt anhand der erhaltenen Peakflächen unter Verwendung der Gleichung (3) berechnet:

$$w_R = \frac{\frac{A_i}{A_{ISTD}} - a}{b} \times \frac{V_{ex}}{m_a} \times \frac{V_{end}}{V_1} \times c_{ISTD}^{sample} \quad (3)$$

Dabei ist

w_R der Gehalt eines Biozids in einem Bauprodukt in mg/kg;

A_i die Peakfläche für einen gemessenen MRM-Übergang in willkürlichen Einheiten (a.u.);

A_{ISTD}	die Peakfläche des internen Standards ($A_{is} = 1$, wenn kein interner Standard verwendet wird);
a	der Schnittpunkt der entsprechenden Kalibrierungskurve in a.u. (ohne ISTD) oder ohne Dimension (mit ISTD);
b	die Steigung der entsprechenden Kalibrierungskurve in a.u. (ohne ISTD) oder ohne Dimension (mit ISTD);
V_{ex}	das Gesamtvolumen der Extraktionslösungsmittel (hier: 30 ml);
m_a	die Ausgangsmasse der Probe in g;
V_1	das Volumen, das für die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Festphasenunterstützung verwendet wird (hier: 5 ml);
V_{end}	das endgültige Volumen des nach der Reinigung gewonnenen Extrakts (0,5 ml);
c_{ISTD}^{sample}	die Konzentration des internen Standards im endgültigen Extrakt in µg/ml ($c_{ISTD}^{sample} = 1$, wenn kein interner Standard verwendet wird).

Falls keine Reinigung durchgeführt wird, vereinfacht sich Gleichung (3) folgendermaßen:

$$w_R = \frac{\frac{A_i}{A_{ISTD}} - a}{b} \times \frac{V_{ex}}{m_a} \times c_{ISTD}^{sample} \quad (3')$$

11.1.2 Eluat-Analyse

Für Eluate wird die Biozidkonzentration c_R (in µg/ml) aus Gleichung (4) abgeleitet:

$$c_R = \frac{\frac{A_i}{A_{ISTD}} - a}{b} \times c_{ISTD}^{sample} \quad (4)$$

Dabei ist

c_R	die Biozidkonzentration in den Eluaten in µg/ml;
A_i	die Peakfläche für einen gemessenen MRM-Übergang in willkürlichen Einheiten (a.u.);
A_{ISTD}	die Peakfläche des internen Standards in willkürlichen Einheiten (a.u.) ($A_{is} = 1$, wenn kein interner Standard verwendet wird);
a	der Schnittpunkt der entsprechenden Kalibrierungskurve in a.u. (ohne ISTD) oder ohne Dimension (mit ISTD);
b	die Steigung der entsprechenden Kalibrierungskurve in a.u. (ohne ISTD) oder ohne Dimension (mit ISTD);
c_{ISTD}^{sample}	die Konzentration des internen Standards im endgültigen Extrakt in µg/ml ($c_{ISTD}^{sample} = 1$, wenn kein interner Standard verwendet wird).

Wenn kein interner Standard verwendet wird, sind c_{ISTD}^{sample} und A_{ISTD} gleich 1 und Gleichung (4) vereinfacht sich zu:

$$c_R = \frac{A - a}{b} \quad (4')$$

Wenn die Ergebnisse darauf hindeuten, dass sich die Menge an Rückständen dem Höchstgehalt an Rückständen annähert oder diesen überschreitet, muss mindestens eine weitere Prüfmenge analysiert werden.

11.2 Berechnung der Biozidkonzentrationen mit Standardergänzung

11.2.1 Gehaltsanalyse

Im Falle von Verbindungen, die bekanntermaßen stark von matrixbedingten Verstärkungs- oder Unterdrückungsphänomenen beeinflusst werden, wird das Verfahren der Standardergänzung empfohlen, vorausgesetzt, die Funktion zwischen Reaktion und Konzentrationen in dem betreffenden Konzentrationsbereich ist linear. In diesem Fall werden mehrere Aliquoten des endgültigen Probenextrakts mit steigenden bekannten Mengen des untersuchten Analyten angereichert. Dieses Verfahren erfordert die Kenntnis des ungefähren Biozidgehalts w_R aus einer ersten Analyse. In Tabelle 1 ist das Pipettierschema für den Ansatz der Standardergänzung angegeben.

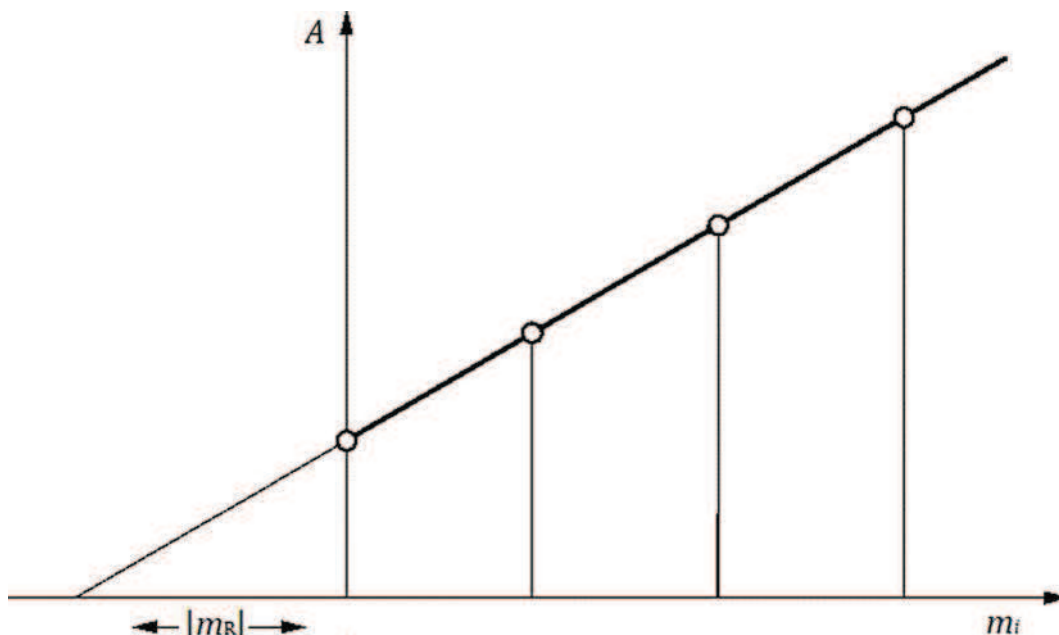
Die für die Standardergänzung verwendeten Standardlösungen müssen im Vergleich zur Probenprüflösung eine nahezu identische Lösungsmittelzusammensetzung aufweisen. Unter der Annahme einer Probe (verwendete Probenmenge 10 g) mit einem geschätzten Biozidgehalt $w_R = 0,8 \text{ mg/kg}$, kann das folgende Pipettierschema geeignet sein.

ANMERKUNG Im Falle eines abweichenden Biozidgehalts w_R ist eine angepasste Konzentration der Standardlösung des Analyten und/oder ein angemesseneres Volumen der Standardlösung des Analyten und des Lösungsmittels erforderlich.

Die Menge des Analyten in der Probe wird anhand einer grafischen Darstellung der sich ergebenden Reaktionsdaten, wie in Bild 1 abgebildet, durch lineare Regression berechnet.

Tabelle 1 — Pipettierschema für die Standardergänzung

Ergänzungen	Fläschchen 1	Fläschchen 2	Fläschchen 3	Fläschchen 4
Volumen des Probenextrakts V_{aliquot}	100 µl (= 0,25 g Probe)	100 µl (= 0,25 g Probe)	100 µl (= 0,25 g Probe)	100 µl (= 0,25 g Probe)
Volumen der Standardlösung des Analyten (20 µg/ml)	0 µl	5 µl	10 µl	15 µl
Sich ergebende Masse des zugegebenen Analyten	0 µg	0,1 µg	0,2 µg	0,3 µg
Volumen des Lösungsmittels	15 µl	10 µl	5 µl	0 µl
Endvolumen	115 µl	115 µl	115 µl	115 µl



Legende

- A Peakfläche des Analyten;
 m_i Zugegebene absolute Menge des Analyten, in μg ;
 $|m_R|$ Absolute Menge des Analyten im Probenextrakt vor der Standardergänzung in μg .

Bild 1 — Interne Kalibrierung nach dem Verfahren der Standardergänzungen, schematisch

Die Peakfläche A des Analyten wird anhand einer grafischen Darstellung der sich ergebenden Reaktionsdaten, wie in Bild 1 abgebildet, über eine lineare Regression (Gleichung 5) berechnet.

$$A = b \times m_i + a \quad (5)$$

Dabei ist

- A die Peakfläche des Analyten in willkürlichen Einheiten (a.u.);
 b die Steigung der Kalibrierkurve des untersuchten Analyten in a.u./ μg ;
 m_i die zugegebene absolute Menge des Analyten, in μg ;
 a der y-Schnittpunkt der Kalibrierungskurve für den untersuchten Analyten in a.u.

Im Falle von $A = 0$ wird Gleichung (5) zu:

$$|m_R| = -\frac{a}{b} \quad (5')$$

Wenn das Verfahren der Standardergänzung verwendet wird, wird der Gehalt w_R im Biozid in einem Bauprodukt anhand der erhaltenen Peakfläche unter Verwendung der Gleichung (6) berechnet:

$$w_R = \frac{|m_R|}{m_a} \times \frac{V_{\text{ex}} \times V_{\text{end}}}{V_1 \times V_{\text{aliq}}} \quad (6)$$

Dabei ist

- w_R der Gehalt eines Biozids in einem Bauprodukt in mg/kg;