

DIN EN ISO 13646



ICS 13.060.50

Einsprüche bis 2024-03-19

Entwurf

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung ausgewählter Estrogene in Gesamtwasserproben –
Verfahren mittels Festphasenextraktion (SPE) und anschließender
Flüssigkeitschromatographie (LC) oder Gaschromatographie (GC)
gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion (MS)
(ISO/DIS 13646:2024);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 13646:2024**

Water quality –

Determination of selected estrogens in whole water samples –
Method using solid phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography (LC) or gas
chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS) detection (ISO/DIS 13646:2024);
German and English version prEN ISO 13646:2024

Qualité des eaux –

Dosage d'estrogènes sélectionnés dans des échantillons d'eau totale –
Méthode par extraction en phase solide (SPE), avec analyse par couplage
chromatographie-spectrométrie de masse (SM) (ISO/DIS 13646:2024);
Version allemande et anglaise prEN ISO 13646:2024

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-01-19 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument 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 naw@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 Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Gesamtumfang 146 Seiten

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 13646:2024) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 119-01-03-02-16 AK "LC-MS/MS-Verfahren" des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung (CEN/TC 230, ISO/TC 147)“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

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

Bezeichnung des Verfahrens:

Bestimmung ausgewählter Estrogene in Gesamtwasserproben – Verfahren mittels Festphasenextraktion (SPE) und anschließender Flüssigkeitschromatographie (LC) oder Gaschromatographie (GC) gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion (MS) (F 52):

Verfahren DIN EN ISO 13646 — F 52

Die in diesem Dokument verwendete, sprachspezifische Abkürzung „ppm“ (en: parts per million) steht für die Zahl 10^{-6} bzw. 0,000 001.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 4796-2	siehe	DIN EN ISO 4796-2
ISO 5667-3	siehe	DIN EN ISO 5667-3
ISO 5667-5	siehe	DIN ISO 5667-5
ISO 5667-6	siehe	DIN EN ISO 5667-6
ISO 11352:2012	siehe	DIN ISO 11352:2013-03
ISO 21253-1	siehe	DIN EN ISO 21253-1
ISO 21253-2	siehe	DIN EN ISO 21253-2

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 – Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Bestimmung ausgewählter Estrogene in Gesamtwasserproben – Verfahren mittels Festphasenextraktion (SPE) und anschließender Flüssigkeitschromatographie (LC) oder Gaschromatographie (GC) gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion (MS) (F 52).

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)

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

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

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

DIN EN ISO 5667-6, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Probenahme aus Fließgewässern*

DIN EN ISO 21253-1, *Wasserbeschaffenheit — Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen — Teil 1: Kriterien für die Identifizierung von Zielverbindungen mittels Gaschromatographie und Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie*

DIN EN ISO 21253-2, *Wasserbeschaffenheit — Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen — Teil 2: Kriterien für die quantitative Bestimmung organischer Stoffe mit einem Multianalyt-Verfahren*

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

DIN ISO 11352:2013-03, *Wasserbeschaffenheit — Abschätzung der Messunsicherheit beruhend auf Validierungs- und Kontrolldaten (ISO 11352:2012)*

**Wasserbeschaffenheit – Bestimmung ausgewählter Estrogene in
Gesamtwasserproben – Verfahren mittels Festphasenextraktion (SPE) und
anschließender Flüssigkeitschromatographie (LC) oder Gaschromatographie (GC)
gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion (MS) (ISO/DIS 13646:2024)**

Water quality – Determination of selected estrogens in whole water samples – Method using solid phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS) detection (ISO/DIS 13646:2024)

Qualité des eaux – Dosage d'estrogènes sélectionnés dans des échantillons d'eau totale – Méthode par extraction en phase solide (SPE), avec analyse par couplage chromatographie-spectrométrie de masse (SM) (ISO/DIS 13646:2024)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Vorwort	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	9
3 Begriffe	10
4 Grundlage des Verfahrens	12
5 Störungen	12
5.1 Allgemeines	12
5.2 Störungen bei Probenahme, Extraktion und Konzentration	12
5.3 Störungen während Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie	13
5.4 Störungen während Gasphasen-Chromatographie und Massenspektrometrie	14
5.5 Störungen durch interne Standards	15
6 Reagenzien	15
7 Geräte	22
8 Probenahme	23
9 Durchführung	24
9.1 Allgemeines	24
9.2 Probenvorbereitung und Extraktion	26
9.2.1 Allgemeines	26
9.2.2 Probenvorbereitung	26
9.2.3 SPE-Kartuschen-Extraktion	27
9.2.4 SPE-Disk-Extraktion	28
9.3 (Auf-)Reinigung der Probe	29
9.3.1 Allgemeines	29
9.3.2 Grundlage des Verfahrens	29
9.3.3 Durchführung	29
9.4 Rekonzentration	30
9.5 Flüssigkeitschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie	30
9.5.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (LC)	30
9.5.2 Detektion	31
9.5.3 Derivatisierung	31
9.6 Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie	33
9.6.1 Derivatisierung	33
9.6.2 Gaschromatographie (GC)	33
9.6.3 Detektion	34
10 Kalibrierung	35
10.1 Allgemeines	35
10.2 Kalibrierung durch Isotopenverdünnung	36
10.3 Prüfung der Kalibrierung	36
11 QA/QC	36
11.1 Bestimmung der Substanzen	36
11.2 Blindproben	37
12 Bestimmungsgrenze (LOQ)	37
13 Berechnung der Wiederfindung	37
13.1 Allgemeines	37
13.2 Berechnung der Wiederfindung des Analyten anhand von Proben	38
13.3 Wiederfindungsraten von internen Standards	38
14 Berechnung der Konzentration in der Probe	39
15 Angabe der Ergebnisse	39

16	Analysenbericht	40
17	Verfahrenskenndaten	40
	Anhang A (informativ) Leistungsdaten	41
A.1	Ringversuch 1	41
A.2	Ringversuch 2	43
	Anhang B (informativ) Beispiele für SPE-Extraktionsprotokolle	45
B.1	Beispiel Protokoll 1	45
B.2	Beispiel Protokoll 2	45
B.3	Beispiel Protokoll 3	45
B.4	Beispiel Protokoll 4	45
B.5	Beispiel Protokoll 5	46
	Anhang C (informativ) Beispiele für SPE-Disk-Extraktionsprotokolle	47
C.1	Beispiel Protokoll 1	47
C.2	Beispiel Protokoll 2	47
C.3	Beispiel Protokoll 3	47
C.4	Beispiel Arbeitsvorschrift 4	47
	Anhang D (informativ) Beispiele für Reinigungsprotokolle	49
D.1	Beispiel Protokoll 1	49
D.2	Beispiel Protokoll 2	49
D.3	Beispiel Protokoll 3	49
D.4	Beispiel Protokoll 4	49
D.5	Beispiel Protokoll 5	50
	Anhang E (informativ) Beispiele für LC-MS/MS-Protokolle	51
E.1	Beispiel Protokoll 1	51
E.2	Beispiel Protokoll 2	52
E.3	Beispiel Protokoll 3	54
E.4	Beispiel Protokoll 4	55
E.5	Beispiel Protokoll 5	57
E.6	Beispiel Protokoll 6	60
	Anhang F (informativ) Beispiel für ein LC-HRMS-Protokoll	63
F.1	Protokoll 1	63
F.2	Protokoll 2	64
	Anhang G (informativ) Beispiele für GC-MS/MS-Protokolle	68
G.1	Beispiel Protokoll 1	68
G.2	Beispiel Protokoll 2	69
G.3	Beispiel Protokoll 3	71
	Anhang H (informativ) Beispiele für GC-HRMS-Protokolle	73
H.1	Beispiel Protokoll 1	73
	Literaturhinweise	75

Bilder

Bild 1	Auflösung von chromatographischen Peaks	14
Bild 2	Flussdiagramm einer möglichen Messstrategie	25
Bild E.1	Chromatographische Trennung	55
Bild E.2	Chromatographische Trennung	57
Bild E.3	Chromatographische Trennung	59
Bild E.4	Chromatographische Trennung	62
Bild F.1	Chromatographische Trennung, Beispiel G2 (XIC von LC-HRMS)	65
Bild G.1	Chromatographische Trennung	71

Tabellen

Tabelle 1 — Die Tabelle fasst die Namen, Abkürzungen, Strukturen, CAS-Nummern, Formeln, Molekulargewichte und log Kow der 5 ausgewählten Estrogene zusammen	8
Tabelle 2 — Die Tabelle fasst die Namen, Akronyme und CAS-Nummern der isotopenmarkierten Estrogene zusammen	18
Tabelle 2 — Definition von Indizes	35
Tabelle A.1 — Beschreibung der Ringversuchsproben	41
Tabelle A.2 — Verfahrenskennndaten für Probe 1 — Grundwasser (Langenau)	41
Tabelle A.3 — Verfahrenskennndaten für Probe 2 — Oberflächenwasser (Rhein, Düsseldorf)	42
Tabelle A.4 — Verfahrenskennndaten für Probe 3 — Oberflächenwasser (Lubenbach)	42
Tabelle A.5 — Verfahrenskennndaten für Probe 4 — Oberflächenwasser (Saale)	43
Tabelle A.6 — Verfahrenskennndaten für Probe 5 — Behandeltes Abwasser(Kläranlage Duisburg-Vierlinden)	43
Tabelle A.7 — Beschreibung der Ringversuchsproben	43
Tabelle A.8 — Verfahrenskennndaten für Probe 1 — Oberflächenwasser (hohe Komplexität)	44
Tabelle A.9 — Verfahrenskennndaten für Probe 2 — Oberflächenwasser (hohe Komplexität)	44
Tabelle E.1 — Optimale Parameter für die LC-MS/MS-Analyse der nativen und markierten interessierenden Estrogene	52
Tabelle E.2 — Optimale Parameter für die LC-MS/MS-Analyse der nativen und markierten interessierenden Estrogene	53
Tabelle E.3 — Optimale Parameter für die LC-MS/MS-Analyse des nativen und markierten 17-alpha-Ethinylestradiols	54
Tabelle E.4 — Optimale Parameter für die LC-MS/MS-Analyse der nativen und markierten ausgewählten Estrogene	54
Tabelle E.5 — Optimale Parameter für die LC-MS/MS-Analyse der nativen und markierten ausgewählten Estrogene	56
Tabelle E.5 — Optimale Parameter für die LC-MS/MS-Analyse der nativen und markierten ausgewählten Estrogene	58
Tabelle E.6 — Optimale Parameter für die LC-MS/MS-Analyse der nativen und markierten interessierenden Estrogene	61
Tabelle F.1 — Optimale Parameter für die LC-HRMS-Analyse der nativen und markierten ausgewählten Estrogene	64
Tabelle F.1 — Massenübergänge (HRMS) von Substanzen	66
Tabelle F.2 — Optimale Parameter für die LC-HRMS-Analyse der nativen und markierten ausgewählten Estrogene	67
Tabelle G.1 — Optimale Parameter für die GC-MS/MS-Analyse der nativen und markierten interessierenden Estrogene Vorläufer- und Produkt-Ionen	68
Tabelle G.2 — Optimale Parameter für die GC-MS/MS-Analyse der nativen und markierten interessierenden Estrogene	70
Tabelle G.3 — Optimale Parameter für die GC-MS/MS-Analyse	72
Tabelle H.1 — Optimale Parameter für GC-HRMS	73

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 13646:2024) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 13646:2024 wurde von CEN als prEN ISO 13646:2024 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC Directives, Teil 1, beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC Directives, Teil 2, erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

ISO weist auf die Möglichkeit hin, dass die Anwendung dieses Dokuments mit der Verwendung eines oder mehrerer Patente verbunden sein kann. ISO bezieht jedoch in dieser Hinsicht keinerlei Stellung bezüglich Nachweis, Gültigkeit oder Anwendbarkeit jeglicher beanspruchten Patentrechte. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments lag ISO [eine/keine] Mitteilung über ein Patent bzw. mehrere Patente vor, welche/s zur Umsetzung dieses Dokuments erforderlich sein könnte/n. Anwender werden jedoch darauf hingewiesen, dass dies möglicherweise nicht der aktuelle Informationsstand ist. Dieser kann jedoch der Patentdatenbank unter www.iso.org/patents entnommen werden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147, *Water quality*, Unterkomitee SC 2, *Physical, chemical and biochemical methods*, erarbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Natürliche und synthetische Estrogene werden weltweit in großem Umfang verwendet, z. B. zur Empfängnisverhütung. Durch Anwendung oder unsachgemäße Entsorgung können diese Estrogene unverändert oder umgewandelt in den Wasserkreislauf gelangen. Sie können daher in Oberflächen- und Grundwasser sowie in behandelten Abwässern nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass Estrogene über Abwässer in Oberflächengewässer gelangen können, und aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften können sie sich in den verschiedenen Wasserkammern (Wasser und Schwebstoffe [SPM, en: suspended particulate matter]) von Wassersystemen verteilen. Aufgrund ihrer hohen estrogenen Aktivität selbst in den gemessenen Ultraspurenbereichen (weit unter ng/l) geben sie zunehmend Anlass zur Sorge. Neben der Verweiblichung von Fischen und weiteren endokrinen Störeinflüssen in Wasserökosystemen können sie auch ein Faktor für den Verlust von Biodiversität sein. [1] Daher sind geeignete Messverfahren erforderlich, die es ermöglichen, Estrogenkonzentrationen unterhalb ihrer ökotoxikologischen Schwelle (z. B. die vorhergesagte nichtwirksame Konzentration [PNEC, en: predicted no effect concentration] oder die Umweltqualitätsnorm [UQN]) zu überwachen und nachzuweisen, ob ein Wasserkörper gefährdet ist.

Diese Internationale Norm legt validierte Verfahren zur Analyse ganzer Wasserproben fest, die den zukünftigen Anforderungen zur Unterstützung der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie WRRL und anderer weltweiter Regelungen zur Bestimmung der Gewässerqualität in Bezug auf die ausgewählten Estrogene entsprechen.

Die Internationale Organisation für Normung (ISO) weist darauf hin, dass für die Übereinstimmung mit diesem Dokument die Nutzung eines Patents nötig werden kann.

ISO nimmt keine Stellung zum Nachweis, zur Gültigkeit und zum Anwendungsbereich dieses Patentrechts.

Der Halter dieses Patentrechts hat ISO zugesichert, dass er bereit ist, über Lizenzen zu vernünftigen und nicht diskriminierenden Geschäftsbedingungen mit Antragstellern auf der ganzen Welt zu verhandeln. Die Erklärung des Halters dieses Patentrechts wurde entsprechend bei ISO registriert. Informationen können der Patentdatenbank entnommen werden, die unter www.iso.org/patents verfügbar ist.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können, ohne dass diese in der Patentdatenbank aufgeführt sind. ISO ist nicht dafür verantwortlich, die diesbezüglichen Patentrechte kenntlich zu machen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Verfahren für die Bestimmung von fünf ausgewählten Estrogenen in den in Tabelle 1 aufgeführten Vollwasserproben fest. Die Verfahren basieren auf der Festphasenextraktion (SPE-Disk und/oder -Kartusche) und anschließendem Nachweis mittels Flüssigkeits- oder Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (Tandem-Massenspektrometrie und/oder Hochauflösungsmassenspektrometrie). Je nach gewählter Probenvorbereitung ist er für die Analyse ausgewählter Estrogene in Trinkwasser, Grundwasser und Oberflächenwasser mit Schwebstoffen (SPM) bis zu 500 mg/l, DOC-Gehalt bis zu 14 mg/l (Gesamtwasserproben) geeignet.

Der untere Anwendungsbereich, der als nachgewiesene Bestimmungsgrenze definiert ist, kann je nach Verfahren, Empfindlichkeit der verwendeten Geräte und Matrix der Probe variieren. Der Bereich liegt bei 0,006 ng/l bis 1 ng/l für EE2 und 0,038 ng/l bis 1 ng/l für die anderen Estrogene in Trinkwasser, Grundwasser und Oberflächenwasser. Die Obergrenze des Arbeitsbereichs liegt bei etwa 10 ng/l.

Für Anwendungen, die auf die Messung sehr niedriger Konzentrationen abzielen (zwischen der niedrigsten LOQ und 0,1 ng/l), ist jeder einzelne Schritt des Verfahrens entscheidend und erfordert die Festlegung einiger zusätzlicher Anforderungen.

Das Verfahren kann zur Bestimmung weiterer Estrogene oder Hormone in anderen Wasserarten, z. B. in behandeltem Abwasser, verwendet werden, wenn die Genauigkeit in jedem Fall geprüft und verifiziert wurde und die Lagerungsbedingungen sowohl der Proben als auch der Referenzlösungen validiert wurden.

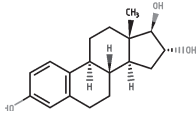
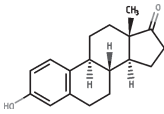
WARNUNG — Anwender dieses Dokuments sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach diesem Dokument Fachleute oder Fach-einrichtungen einzuschalten.

Tabelle 1 — Die Tabelle fasst die Namen, Abkürzungen, Strukturen, CAS-Nummern, Formeln, Molekulargewichte und log Kow der 5 ausgewählten Estrogene zusammen

Namen	Struktur	CAS-RN ^a	Formel ^a	Molekular-gewicht g/mol	Log K _{ow}
17-alpha-Ethinylestradiol (17αEE2) IUPAC-Name: (13R,17S)-17-Ethinyl-13-Methyl-7,8,9,11,12,14,15,16-Octahydro-6H-Cyclopenta[a]phenanthren-3,17-Diol		57-63-6	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,40	4,52
17-alpha-Estradiol (17αE2) IUPAC-Name: (8R,9S,13S,14S,17R)-13-Methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-Decahydrocyclopenta[a]phenanthren-3,17-Diol		57-91-0	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,38	4,13
17-beta-Estradiol (17βE2) IUPAC-Name: (8R,9S,13S,14S,17S)-13-Methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-Decahydrocyclopenta[a]phenanthren-3,17-Diol		50-28-2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,38	4,13

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Namen	Struktur	CAS-RN ^a	Formel ^a	Molekulargewicht g/mol	Log K _{ow}
<p align="center">Estriol (E3)</p> <p>IUPAC-Name: (8R,9S,13S,14S,16R,17R)-13-Methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-Decahydrocyclopenta[a]phenanthren-3,16,17-Triol</p>		50-27-1	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,38	2,94
<p align="center">Estron (E1)</p> <p>IUPAC-Name: (8R,9S,13S,14S)-3-Hydroxy-13-Methyl-7,8,9,11,12,14,15,16-Octahydro-6H-Cyclopenta[a]phenanthren-17-on</p>		53-16-7	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,37	3,69
^a CAS-RN: Chemical Abstracts System Registration Number.					

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).

ISO 4796-2, *Laboratory glassware — Bottles — Part 2: Conical neck bottles*

ISO 5667-3, *Water quality — Sampling — Part 3: Preservation and handling of water samples*

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*

ISO 5667-6, *Water quality — Sampling — Part 6: Guidance on sampling of rivers and streams*

ISO 5667-11, *Water quality — Sampling — Part 11: Guidance on sampling of groundwaters*

ISO 8466-1, *Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics — Part 1: Linear calibration function*

ISO 21253-1, *Water quality — Multi-compound class methods — Part 1: Criteria for the identification of target compounds by gas and liquid chromatography and mass spectrometry*

ISO 21253-2, *Water quality — Multi-compound class methods — Part 2: Criteria for the quantitative determination of organic substances using a multi-compound class analytical method*

ISO/TS 13530:2009, *Water quality — Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis*

ISO 11352:2012, *Water quality — Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten 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

Genauigkeit

Ausmaß der Annäherung eines Messwertes an einen wahren Wert einer Messgröße

Anmerkung 1 zum Begriff: „Messgenauigkeit“ ist keine Größe und wird nicht quantitativ ausgedrückt. Man sagt, dass eine Messung genauer ist, wenn sie eine kleinere Messabweichung hat.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Benennung „Messgenauigkeit“ sollte nicht für die Richtigkeit der Messung und die Benennung „Messpräzision“ nicht für die Messgenauigkeit verwendet werden, die sich jedoch auf diese beiden Konzepte bezieht.

Anmerkung 3 zum Begriff: „Messgenauigkeit“ wird manchmal als Ausmaß der Übereinstimmung zwischen Messwerten verstanden, die der Messgröße zugewiesen werden.

[QUELLE: ISO/IEC Guide 99:2007, 2.13]

3.2

Analyt

zu bestimmender Stoff

[QUELLE: ISO 21253-2:2019, 3.1]

3.3

Blindprobe

Aliquot des Reagenzwassers (Reagenzienblindprobe) oder einer Matrix, in der der *Analyt* (3.2) fehlt (Matrix-blindprobe), das während des gesamten analytischen Verfahrens – einschließlich Extraktion, Aufreinigung, Identifizierung und Quantifizierung – auf genau dieselbe Art und Weise behandelt wird wie eine Probe, einschließlich aller relevanten Reagenzien und Materialien

Anmerkung 1 zum Begriff: Es ist von entscheidender Bedeutung, dass das Labor festlegt, welche Blindprobe berücksichtigt wird.

[QUELLE: ISO 21253-1:2019, 3.2]

3.4

Kalibrierung

Tätigkeit, die unter festgelegten Bedingungen in einem ersten Schritt eine Beziehung zwischen den durch Normale zur Verfügung gestellte Größenwerten mit ihren Messunsicherheiten und den entsprechenden Anzeigen mit ihren beigeordneten Messunsicherheiten herstellt und in einem zweiten Schritt diese Information verwendet, um eine Beziehung herzustellen, mit deren Hilfe ein Messergebnis aus einer Anzeige erhalten wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Ergebnis einer Kalibrierung kann in Form einer Angabe, einer Kalibrierfunktion, eines Kalibrierdiagramms, einer Kalibrierkurve oder einer Kalibriertabelle ausgedrückt werden. In einigen Fällen kann sie aus einer additiven oder multiplikativen Korrektur der Anzeige mit der beigeordneten Messunsicherheit bestehen.

Anmerkung 2 zum Begriff: Kalibrierung sollte nicht mit der Justierung eines Messsystems, oftmals irrtümlicherweise als „Selbst-Kalibrierung“ bezeichnet, oder mit der Verifizierung einer Kalibrierung verwechselt werden.

[QUELLE: ISO/IEC Guide 99:2007, 2.39]

3.5

zertifiziertes Referenzmaterial

CRM, en: certified reference material

Referenzmaterial mit Unterlagen, die von einer autorisierten Stelle herausgegeben wurden, und das einen oder mehrere spezifizierte Merkmalswerte mit beigeordneten Unsicherheiten und Rückverfolgbarkeiten liefert, unter Anwendung gültiger Verfahren

[QUELLE: ISO/IEC Guide 99:2007, 5.14]

3.6

Integrität

Eigenschaft, dass der/die interessierende(n) Parameter, Informationen oder Inhalt des Probenbehälters nicht verändert wurde, unbefugt verloren ging oder nicht dem Verlust seiner Repräsentativität ausgesetzt wurde

[QUELLE: ISO 5667-3, 3.1]

3.7

Quantifizierung der Isotopenverdünnung

Prozess, bei dem isotoopenmarkierte (z. B. mit Deuterium oder Kohlenstoff-13) Standards, chemisch ähnliche isotopische Analoga der Zielanalyte, allen Umwelt-, Qualitätskontroll- und Qualitätssicherungsproben vor der Extraktion zugesetzt werden und das gesamte Analyseverfahren durchlaufen. Es verbessert die quantitative Genauigkeit, indem es probenspezifische verfahrensbedingte Verluste in der ermittelten Analytkonzentration berücksichtigt.

3.8

Bestimmungsgrenze

LOQ, en: limit of quantification

niedrigster Wert einer Bestimmungsgröße, der mit einem geeigneten Genauigkeitsgrad bestimmt werden kann, der auf unterschiedliche Weise geschätzt werden kann und in der vorgesehenen Matrix verifiziert werden muss

[QUELLE: ISO 21253-2:2019, 3.4]

3.9

Wiederfindung

relative Wiederfindung

Ausmaß, bis zu dem eine bekannte Menge eines Analyten, die einer Probe hinzugefügt wurde, durch ein analytisches Verfahren gemessen werden kann

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Wiederfindung wird aus der Differenz zwischen den Ergebnissen aus einem dotierten und einem nicht dotierten Aliquoten der Probe berechnet und üblicherweise in Prozent angegeben.

[QUELLE: ISO 5667-14:2014, 3.8]

3.10

Rückverfolgbarkeit

Eigenschaft eines Messergebnisses, durch die das Ergebnis durch eine dokumentierte, ununterbrochene Kette von Kalibrierschritten mit einer Bezugsgröße in Beziehung gesetzt werden kann, wobei jeder Kalibrierschritt zur Messunsicherheit beiträgt

[QUELLE: ISO/IEC Guide 99:2007, 2.41]

3.11

Ausbeute

absolute Wiederfindung

Menge des der Prüfprobe zugegebenen *Analyten* (3.2), korrigiert um die relative Wiederfindung des internen Standards (Verhältnis zwischen Analyten und internem Standard)

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Ausbeute ist ein Wert, der sowohl den Proben-Matrixeffekt als auch die Wiederfindung der Verbindung berücksichtigt.

[QUELLE: ISO 21253-2:2019, 3.11]

4 Grundlage des Verfahrens

Die Wasserprobe wird mit einer geeigneten Menge eines isotoopenmarkierten Standards analog zu den einzelnen Zielestrogenen aufgestockt, bevor die Probe mit einer Festphasenextraktionskartusche oder -disk extrahiert und anschließend mittels SPE gereinigt wird. Die Trennung der Substanzen erfolgt durch Flüssigkeitschromatographie (LC, en: liquid chromatography) oder Gaschromatographie (GC) mit einer Identifizierung und Quantifizierung durch Massenspektrometrie (Tandem-Massenspektrometrie [MS/MS] oder Hochauflösungs-Massenspektrometrie [HRMS, en: high resolution mass spectrometry]). Das Ergebnis wird anhand der Isotoopenverdünnungs-Kalibrierung berechnet.

5 Störungen

5.1 Allgemeines

Lösemittel, Reagenzien, Glasgeräte und andere Geräte zur Probenverarbeitung können zu Artefakten, erhöhten Basislinien und/oder Lock-Mass-Suppression führen, was zu einer Fehlinterpretation der Chromatogramme führt.

Eine ordnungsgemäße Reinigung von Glasgeräten ist äußerst wichtig, da Glasgeräte nicht nur die Proben verunreinigen, sondern auch die interessierenden Analyten durch Adsorption an der Glasoberfläche entfernen können.

Die Glasgeräte sollten so bald wie möglich nach Gebrauch mit Lösemittel gespült und mit einer Reinigungslösung gewaschen werden. Die Reinigung kann unterstützt werden, indem die Glasgeräte mit Reinigungslösung gefüllt und etwa 30 s lang mit Ultraschall behandelt werden. Nach dem Waschen mit Reinigungsmittel sollten die Glasgeräte zunächst mit Lösemittel (z. B. Methanol) und dann mit Reinstwasser (6.1) gespült werden. Das Erhitzen von Glasgeräten in einem programmierbaren Ofen, der 2 h lang auf mindestens 450 °C erhitzt werden kann, kann angezeigt sein.

Die Verunreinigung der Proben ist ein Problem, da estrogene Substanzen biogen sind und auf der menschlichen Haut vorhanden sein können oder möglicherweise als Arzneimittel oder Körperpflegeprodukte verwendet werden. Es ist wichtig, dass das Feld- und Laborpersonal darauf achtet, eine Verunreinigung der Proben zu vermeiden, indem es die Verwendung oder den Kontakt mit solchen Materialien unmittelbar vor und während der Probenahme und -verarbeitung vermeidet. Sowohl bei der Probengewinnung als auch bei der anschließenden Handhabung von Proben und Probenextrakten ist Sorgfalt geboten, um Verunreinigungen zu vermeiden.

5.2 Störungen bei Probenahme, Extraktion und Konzentration

Zu verwenden sind Probenbehälter aus Materialien (7.1), die den Analytgehalt während der Kontaktzeit nicht beeinflussen, vorzugsweise Glas. Kunststoffe und organische Materialien sind bei der Probenahme, der Probenlagerung bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ bzw. der Extraktion zu vermeiden, insbesondere wenn sehr niedrige Konzentrationen bestimmt werden sollen. Polyethylen hoher Dichte (HDPE) oder Polytetrafluorethylen (PTFE) dürfen verwendet werden, werden aber nicht empfohlen, wenn sehr niedrige Konzentrationen ($< 0,1 \text{ ng/l}$) zu messen sind.

Werden automatische Probenehmer verwendet, so ist die Verwendung von Silikon- oder Gummimaterial für die Schläuche zu vermeiden. Falls diese Materialien vorhanden sind, ist darauf zu achten, dass die Kontaktzeit

so kurz wie möglich ist. Die Probenahmeleitung ist vor der Entnahme der Prüfprobe mit dem zu beprobenden Wasser zu spülen. ISO 5667-1 und ISO 5667-3 stellen Leitlinien zur Verfügung.

Die Lagertemperatur liegt bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Zur Probenahme und Probenkonservierung siehe Abschnitt 8.

Während der Lagerung der Prüfproben kann es zu Verlusten von Bestandteilen infolge einer Adsorption an die Behälterwände kommen. Der Umfang der Verluste kann von der Lagerungszeit abhängen.

Die im Handel erhältliche Festphasenextraktion (SPE-Kartusche oder -Disk) weist häufig Qualitätsunterschiede auf. Auch von Charge zu Charge können Schwankungen in der Selektivität der Materialien auftreten, sodass unter Umständen signifikant abweichende Extraktionsausbeuten erhalten werden. Dies beeinträchtigt nicht prinzipiell deren Eignung, abgesehen von einer daraus resultierenden höheren Quantifizierungsgrenze für einzelne Stoffe.

Bei der Analyse der Proben sind bei den Extraktionszeiten und Elutionsverfahren innerhalb einer Probenserie größere Schwankungen zu vermeiden.

Wasserproben mit hohem SPM- oder DOC-Gehalt können bei SPE-Kartuschen (siehe 9.2.2) zu Verstopfungen führen, die die Extraktionsausbeute beeinträchtigen können. Um dies zu umgehen, darf das Probenvolumen reduziert oder auf eine SPE-Disk-Extraktion (siehe 9.2.3) umgestellt werden. Eine weitere Lösung ist das Einbringen von Glaswolle oder Sand in die Kartusche (Füllhöhe 1 cm bis 2 cm), um höhere Probenvolumina zu erreichen.

Die wiederholte Verwendung und Reinigung von Glasgeräten kann zu aktiven Zentren auf der Glasoberfläche führen, die die ausgewählten Estrogene irreversibel adsorbieren und auch für die Verschleppung von Verunreinigungen verantwortlich sein können.

Um eine Verschleppung von Verunreinigungen zwischen Reihen zu vermeiden, müssen SPE-Geräte, -Schläuche und -Teile, die mit den Proben in Berührung kommen, zerlegt und nacheinander z. B. mit (heißem) Wasser mit Reinigungsmitteln, Lösemitteln (z. B. Methanol, Aceton, Ethanol) gereinigt, mit Wasser gespült und getrocknet werden.

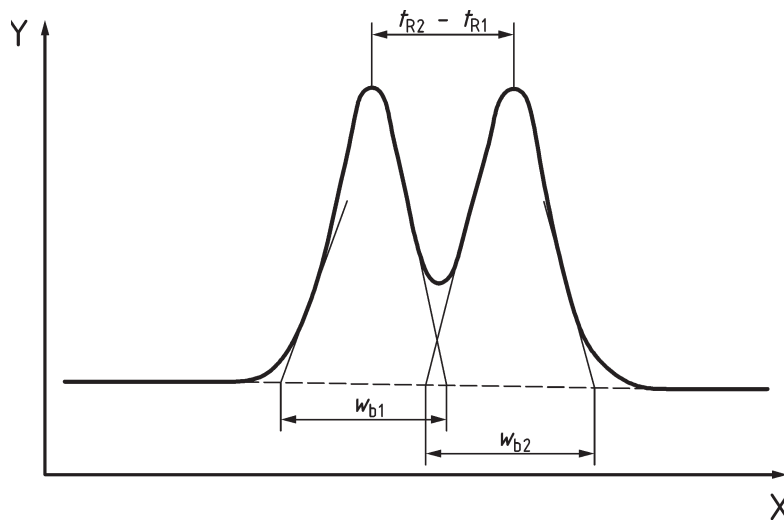
Die aus den Proben mitextrahierten Störsubstanzen variieren erheblich von Quelle zu Quelle, je nach Diversität des beprobten Standorts. Störsubstanzen können in Konzentrationen vorhanden sein, die um mehrere Größenordnungen höher sind als die der ausgewählten Estrogene. Die am häufigsten anzutreffenden Störungen sind Huminsäuren und andere Säuren. Da mit diesem Verfahren sehr niedrige Mengen an Estrogenen gemessen werden müssen, ist die Beseitigung von Störungen von wesentlicher Bedeutung (Durchführung der Reinigung, siehe 9.3).

5.3 Störungen während Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

Substanzen mit ähnlichen Retentionszeiten und Massen wie die Zielestrogene können zu Störungen und überlappenden oder unvollständig aufgelösten Peaks im Chromatogramm führen. Je nach ihrer Intensität können diese Co-Eluenten die Richtigkeit der Analyse beeinträchtigen.

17 α E2 und 17 β E2 sind Epi-Isomere und haben folglich die gleichen Übergänge in der MS. Es ist von entscheidender Bedeutung, beide Substanzen zu trennen. Eine minimale chromatographische Auflösung (R) $\geq 1,2$ ist geeignet. Kann dieses Kriterium nicht erreicht werden, so ist eine geeignete Säule zu wählen, die die erforderliche Auflösung erreicht (Beispiele siehe Anhang E und Anhang F).

Die chromatographische Auflösung wird nach Bild 1 und Gleichung (1) berechnet.



Legende

X	Zeit
Y	Intensität
t_{R1}, t_{R2}	Retentionszeit der eluierenden Substanzen 1 und 2, in Sekunden (s)
w_{b1}, w_{b2}	Peakbreite an der Basis eines jeden Peaks, in Sekunden (s)

Bild 1 — Auflösung von chromatographischen Peaks

$$R = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (1)$$

Dabei ist

- R die Auflösung;
- t_{R1}, t_{R2} die Retentionszeit der eluierenden Substanzen 1 und 2, in Sekunden (s);
- w_{b1}, w_{b2} die Peakbreite an der Basis eines jeden Peaks, in Sekunden (s).

Bei einigen Zielestrogenen haben einige empfindliche Übergänge einen Mangel an Selektivität/Spezifität gezeigt, was möglicherweise zu falsch positiven und überbewerteten Ergebnissen führt.

Begleitsubstanzen (Matrix) können die Ionisierung der Zielsubstanzen beeinflussen (z. B. Ionenunterdrückung oder Signalverstärkung). Dies kann dazu führen, dass die Konzentration bei der Quantifizierung unter- oder überschätzt wird und die Empfindlichkeit des Verfahrens erheblich beeinträchtigt wird. Diese Störungen können durch einen Reinigungsschritt (siehe 9.3) und eine Quantifizierung der Isotopenverdünnung (3.7) erkannt und korrigiert werden.

5.4 Störungen während Gasphasen-Chromatographie und Massenspektrometrie

Substanzen mit ähnlichen Retentionszeiten und Massen wie die Zielestrogene können zu Störungen und überlappenden oder unvollständig aufgelösten Peaks im Chromatogramm führen. Je nach ihrer Intensität können diese Co-Eluenten die Richtigkeit der Analyse beeinträchtigen.

17 α E2 und 17 β E2 sind Epi-Isomere und haben folglich die gleichen Übergänge in der MS. Es ist von entscheidender Bedeutung, beide Substanzen zu trennen. Eine minimale chromatographische Auflösung ($R \geq 1,2$) ist geeignet. Kann dieses Kriterium nicht erreicht werden, so ist eine geeignete Säule zu wählen, die die erforderliche Auflösung erreicht (Beispiele siehe Anhang E und Anhang D).

Je nach den angewandten Verfahren können Störungen durch Begleitsubstanzen (Matrix) auftreten.

5.5 Störungen durch interne Standards

Für die massenspektrometrische Detektion wird empfohlen, ein stabiles isotoopenmarkiertes Analogon als internen Standard zu verwenden; ^{13}C - oder ^{15}N -markierte Verbindungen sind deuterierten Verbindungen vorzuziehen. Bei der Arbeit mit isotoopenmarkierten Standards ist in der Regel eine Drift der Retentionszeit gegenüber der natürlichen Verbindung zu beobachten (Isotopeneffekt).

Es darf nur ein stabiler Teil des Moleküls markiert werden, und der Grad der Markierung darf sich im Verlauf der Analyse nicht ändern. Es kann zu Austauschvorgängen kommen, z. B. durch Tautomerisierung, so dass diese Art von Mechanismus experimentell überprüft werden muss, wenn die Abundanz des internen Standards nachweislich variiert.

Spektrale Überschneidungen zwischen markierten Analoga und nativen Substanzen müssen vermieden werden. Folglich sollte das markierte Analogon für die meisten niedermolekularen Anwendungen vorzugsweise eine monoisotopische Masse von mindestens 3 Da haben. Die Isotopenreinheit der internen Standards muss überprüft werden. Sie ist kein kritischer Faktor, sofern die Verunreinigungen, einschließlich des nicht markierten Analogons, vorzugsweise keinerlei Beitrag zu den Zielverbindungen des analytischen Verfahrens liefern. Ist dies nicht möglich, sollte der Beitrag des markierten Analogons zum unmarkierten Analogon auf LOQ-Niveau vernachlässigbar sein.

Werden interne Standards mit weniger als 3 Da verwendet, sind die oben genannten Kriterien zu überprüfen und zu dokumentieren, um falsch-positive Ergebnisse und Fehlquantifizierungen zu vermeiden.

6 Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien müssen, soweit erhältlich, den Reinheitsgrad „zur Analyse“ oder „zur Rückstandsanalyse“ aufweisen. Der Gehalt an Verunreinigungen, die zum Blindwert beitragen bzw. zu Störsignalen führen, muss vernachlässigbar sein (unter $1/3$ LOQ). Dies muss regelmäßig geprüft werden.

Reagenzien, Lösemittel und Wasser, die als Eluent verwendet werden, müssen für LC bzw. GC und Massenspektrometrie geeignet sein.

Wenn sehr niedrige Estrogenkonzentrationen gemessen zu messen sind (unter $0,1 \text{ ng/l}$) und die niedrigste LOQ erreicht werden muss, ist die Qualität der Reagenzien und Materialien ganz entscheidend und muss routinemäßig überwacht werden, um eine Verschleppung von Verunreinigungen und falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

6.1 Wasser, H_2O .

Reinstwasser ohne störende Blindwerte. Die Qualität des Wassers wird nach demselben Verfahren geprüft wie die zu messende Probe.

Im Handel erhältliches Mineralwasser in Glasflaschen kann ebenfalls zur Bestimmung der Verfahrensblindprobe verwendet werden, wenn Reinstwasser einen signifikanten Hintergrund aufweist.

6.2 Natriumthiosulfat-Pentahydrat, $w(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$, mindestens 99 %.

6.3 Dinatriumsalz von Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA ($\rho \approx 0,025 \text{ g/ml}$), ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), mindestens 99 %.

25 g EDTA werden in 1 000 ml Wasser aufgelöst.

6.4 Methanol, MeOH , (CH_3OH), zur Extraktion, Aufreinigung, mobilen Phase und Herstellung von Referenzlösungen.

- 6.5 Acetonitril, ACN, (CH_3CN), zur Extraktion, Aufreinigung, mobilen Phase und Herstellung von Referenzlösungen.**
- 6.6 Essigsäureethylester, EA, ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), zur Extraktion und Aufreinigung.**
- 6.7 Aceton, ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), zur Extraktion und Aufreinigung sowie zur Derivatisierung (GC).**
- 6.8 *n*-Hexan, (C_6H_{14}), zur Extraktion und Aufreinigung.**
- 6.9 Methyl-tert-butylether, MTBE, ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$), zur Extraktion und Aufreinigung.**
- 6.10 Aceton extra trocken, ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), zur Derivatisierung.**
- 6.11 Essigsäure, *w* (CH_3COOH), mindestens 99 %, für die mobile Phase (LC).**
- 6.12 Ameisensäure, *w* (HCOOH), mindestens 98 %, für die mobile Phase (LC).**
- 6.13 Salzsäure, *w* HCl, mindestens 36 %, zur pH-Einstellung der Wasserprobe.**
- 6.14 Schwefelsäure, *w* H_2SO_4 , mindestens 98 %, zur pH-Einstellung der Wasserprobe.**
- 6.15 Natriumchlorid, *w* NaCl, mindestens 98 %, zur Konservierung von Analyten in der Wasserprobe.**
- 6.16 Ascorbinsäure, *w* $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, mindestens 98 %, zur Konservierung von Analyten in der Wasserprobe.**
- 6.17 Ammoniumfluorid, NH_4F , mindestens 98 %, für die mobile Phase (LC).**
- 6.18 Pyridin, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, zur Derivatisierung (GC).**
- 6.19 N-Trimethylsilylimidazol, TMSI, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Si}$, zur Derivatisierung (GC).**
- 6.20 5-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonylchlorid, Dansylchlorid, DNSCl, ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2\text{S}$), LC-Reinheitsgrad zur Dansylierung (LC).**
- 6.21 Pyridin-3-sulfonylchlorid, Pyridin-3-sulfonylchlorid, PS-Cl, ($\text{C}_5\text{H}_4\text{ClNO}_2\text{S}$), HPLC-Reinheitsgrad zur Derivatisierung (LC).**
- 6.22 Natriumcarbonat-Konzentrat (0,1 M, pH = 10,5), Na_2CO_3 in Wasser, zur Derivatisierung (LC).**
- 6.23 Natriumbicarbonat-Konzentrat, 0,1 mol/l, zur Derivatisierung (LC).**
- 6.24 Natriumhydroxidlösung, 10 mol/l, zur Derivatisierung (LC) und zur pH-Einstellung der Wasserprobe.**
- 6.25 Dansyl-Reagenzlösung, für die Dansylierung (LC).**

Das Volumen der anzufertigenden Dansyl-Reagenzlösung muss vorher berechnet werden, da es von der Anzahl der zu dansylierenden Proben abhängt. Dazu werden 0,783 mg Dansylchlorid (6.20) abgewogen und mit 1 ml extra trockenem Aceton (6.10) in eine Braunglasflasche mit geeignetem Volumen gegeben und gut gemischt. Die so hergestellte Dansyl-Reagenzlösung ist nicht länger als 24 h haltbar. Das Fläschchen mit Dansylchlorid kann nach dem Öffnen eine Woche lang bei einer kontrollierten Temperatur von $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ gelagert werden.

6.26 Pyridin-3-sulfonylchlorid-Lösung, zur Derivatisierung (LC).

Es werden 10 mg bis 40 mg Pyridin-3-sulfonylchlorid (PS-Cl) (6.21) abgewogen und mit 10 ml bis 40 ml Aceton (6.7) in ein Glasfläschchen gegeben, so dass eine Lösung von ca. 1 mg/ml entsteht. Das PS-Cl wird mit einer Glaspipette überführt. Die Lösung wird gut durchmischt. Bei PS-Cl handelt es sich um eine reaktive, feuch-

tigkeitsempfindliche, trübe Flüssigkeit. Es wird empfohlen, dem PS-Cl-Reagenzfläschchen nach Gebrauch und dem PS-Cl-Lösungsfläschchen nach Herstellung und Gebrauch etwas Stickstoff zuzusetzen. Wenn dies beachtet wird, kann ein geöffnetes PS-Cl-Reagenzfläschchen mindestens vier Monate lang verwendet werden. Das PS-Cl-Reagenz ist zu verwerfen, wenn es deutlich fester wird. Beides bei (2 bis 8) °C lagern.

6.27 Bicarbonatpuffer 100 mmol/ml, pH = 10,5, zur Dansylierung.

Etwa 1,68 g Natriumbicarbonat werden in einen 200-ml-Messkolben eingewogen, dann wird das Volumen mit Wasser in Laborqualität (6.1) eingestellt. Die erhaltene Lösung wird in eine 250-ml-Glasflasche überführt. Mit einem pH-Meter wird der pH-Wert der Lösung mit einer 10 mol/l Natriumhydroxidlösung (6.24) (z. B. etwa 1 ml) auf $10,5 \pm 0,1$ eingestellt und die Lösung homogenisiert. Der so hergestellte Puffer kann dann einen Monat lang bei einer kontrollierten Temperatur von (5 ± 3) °C gelagert werden.

6.28 Bicarbonatpuffer 100 mmol/l, pH = 10,5, zur Derivatisierung.

Es werden etwa 80 ml Natriumcarbonatkonzentrat (6.20) und etwa 20 ml Natriumbicarbonatkonzentrat (6.21) vermischt. Mit einem pH-Meter wird der pH-Wert der Lösung, wenn nötig, auf $10,5 \pm 0,1$ eingestellt, indem entweder Natriumcarbonatkonzentrat (wenn der pH-Wert unter 10,5 liegt) oder Natriumbicarbonatkonzentrat (wenn der pH-Wert über 10,5 liegt) hinzugefügt werden, und die Lösung homogenisiert. Der so hergestellte Puffer kann einen Monat lang bei einer kontrollierten Temperatur von (5 ± 3) °C gelagert werden.

6.29 Betriebsgase für die Gas- oder Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie, von hoher Reinheit und entsprechend den Angaben des Geräteherstellers.

6.30 Standards

6.30.1 Referenzsubstanzen, siehe Tabelle 1 für die Liste der Substanzen.

Es müssen hochreine Standards verwendet werden.

Es ist sicherzustellen, dass die Referenzsubstanzstandards keine nachweisbaren Konzentrationen der zu bestimmenden Substanzen (Tabelle 1) enthalten. Dies muss überprüft werden.

ANMERKUNG 1 Lösungen von einzelnen Referenzsubstanzen oder gemischte Lösungen verschiedener Kombinationen sind im Handel erhältlich.

ANMERKUNG 2 Es sind zertifizierte Referenzmaterialien erhältlich, um auf das SI rückführbare Messungen durchführen zu können.

6.30.2 Interne Standards, wie in Tabelle 2.

Es ist sicherzustellen, dass die isotonenmarkierten Estrogene (deutertiert oder C13) keine nachweisbaren Konzentrationen der zu bestimmenden Substanzen (Tabelle 1) enthalten. Dies muss überprüft werden.

ANMERKUNG 1 Lösungen sind im Handel erhältlich.

Der Grad der Markierung darf sich im Verlauf der Analyse nicht ändern. Es kann zu Austauschvorgängen kommen, z. B. durch Tautomerisierung, so dass diese Art von Mechanismus experimentell überprüft werden muss, wenn die Abundanz des internen Standards nachweislich variiert.

Tabelle 2 — Die Tabelle fasst die Namen, Akronyme und CAS-Nummern der isotopenmarkierten Estrogene zusammen

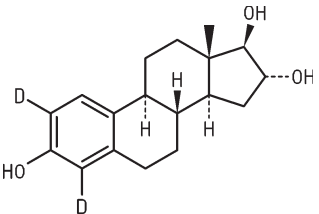
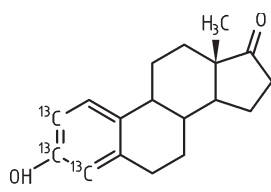
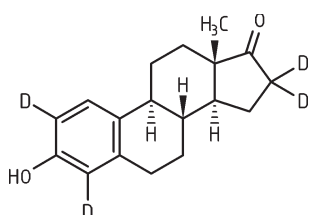
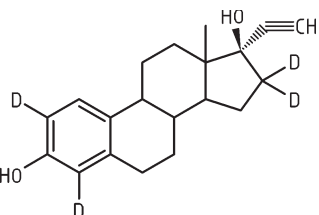
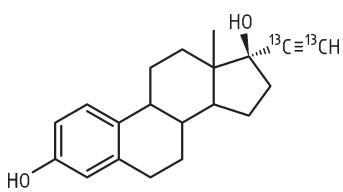
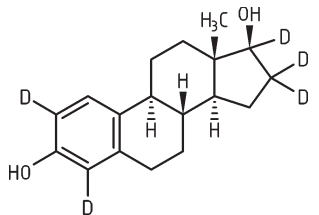
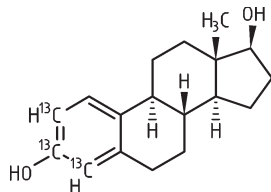
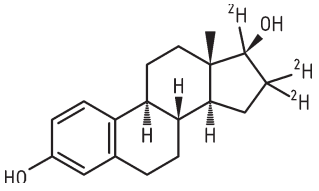
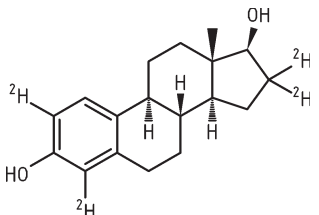
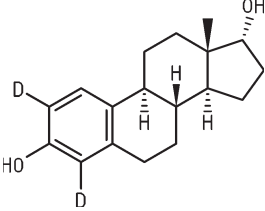
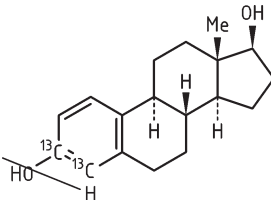
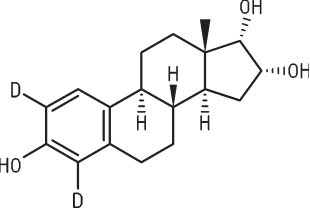
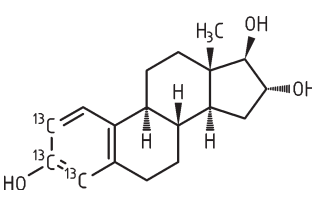
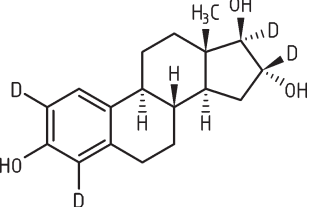
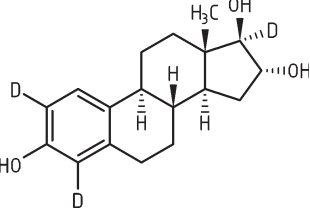
Substanz	CAS-RN ^a	Substanz	CAS-RN ^a
Estron 2,4 D2 (E1-D2) 	56588-58-0	Estron 2,3,4-13C3 (E1-13C3) 	1241684-29-6
Estron 2,4,16,16-D4 (E1-D4) 	53866-34-5	—	—
17-Alpha-Ethinylestradiol 2,4,16,16-D4 (EE2-D4) 	350820-06-3	17-Alpha-Ethinylestradiol 20,21-13C2 (EE2-13C2) 	2483735-63-1
17-Beta-Estradiol 2,4,16,16,17-D5 (17βE2-D5) 	221093-45-4	17-Beta-Estradiol 2,3,4-13C3 (17βE2-13C3) 	1261254-48-1
17-Beta-Estradiol-16,16,17-D3 (17βE2-D3) 	79037-37-9	—	—
17β-Estradiol-2,4,16,16-D4 (17βE2-D4) 	66789-03-5	—	—

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Substanz	CAS-RN ^a	Substanz	CAS-RN ^a
17-Alpha-Estradiol 2,4-D2 (17αE2-D2) 	81586-94-9	17-Alpha-Estradiol 3,4-13C2 (17αE2-13C2) 	82938-05-4
Estriol 2,4-D2 (E3-D2) 	53866-32-3	Estriol- 2,3,4-13C3 (E3-13C3) 	1255639-56-5
Estriol 2,4,16,17-D4 (E3-D4) 	2111805-38-8	/	/
Estriol 2,4,17-D3 (E3-D3) 	79037-36-8	/	/
^a CAS-RN: Chemical Abstracts System Registration Number.			

Einige der markierten Standards können als Injektionsstandard verwendet werden.

6.31 Herstellung von Lösungen

6.31.1 Allgemeines

Lösungen der Referenzsubstanzen (6.30.1) und der internen Standards (6.30.2) werden für die Kalibrierung nach Abschnitt 10 und für die Überprüfung des Verfahrens nach Abschnitt 11 benötigt.

Die Lösungen sind im Handel erhältlich und können mit einer Vielzahl von Massenkonzentrationen individuell hergestellt werden. Für im Handel erworbene Lösungen gelten die Anweisungen des Herstellers zur Lagerung und Haltbarkeit.

Zur genauen Bestimmung der verschiedenen Stamm- und Zwischenlösungen wird eine gravimetrische Kontrolle empfohlen.

Beim Einwiegen in ein Fläschchen muss das Lösemittel gravimetrisch zugegeben werden.

Die Stammlösungen und die daraus hergestellten Zwischenverdünnungen sollten möglichst in demselben Lösemittel vorliegen.

Für eigene Zubereitungen sind die folgenden Hinweise zu Lagerung und Haltbarkeit zu beachten:

- Standardlösungen in Lösemitteln (Stammlösungen, Zwischenverdünnungen, Kalibrierlösungen) sind mindestens ein Jahr haltbar, wenn sie bei maximal -15 °C im Gefrierschrank gelagert werden.
- Standardlösungen in Reinwasser (Zwischenverdünnungen und Kalibrierlösungen) sind an jedem Messtag frisch anzusetzen und können gekühlt im Kühlschrank oder Autosampler bei maximal $(5 \pm 3)\text{ °C}$ bis zur Messung gelagert werden.

Die Genauigkeit der Lösungen von Referenzsubstanzen muss mit einem unabhängigen Kontrollstandard (6.31.10) überprüft werden, z. B. bei der Durchführung der Kalibrierung (siehe 10.3).

6.31.2 Herstellung von Stammlösungen (Referenzsubstanzen/interne Standards)

Von jeder Substanz werden Lösungen mit einer Massenkonzentration von z. B. $0,1\text{ mg/ml}$ hergestellt. Dazu wird z. B. eine 5-mg-Menge einer Substanz (6.30.1) in separaten 50-ml-Messkolben (7.3) verwendet, in Acetonitril (6.5) oder Methanol (6.4) gelöst, und dann wird das Lösemittel bis zum Erreichen der Markierung zu der Lösung zugegeben.

Die Lösungen werden bei Temperaturen unter -15 °C und vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen sind sie ein Jahr lang stabil.

Alternativ können für die Herstellung weiterer Verdünnungen handelsübliche (oder individuell hergestellte) Stammlösungen einzelner Referenzsubstanzen (oder interner Standardsubstanzen) in organischen Lösemitteln verwendet werden.

6.31.3 Zwischenverdünnung A (Referenzsubstanzen)

Es wird eine Zwischenlösung mit Massenkonzentrationen der Substanzen von z. B. je 1 µg/ml hergestellt. Dazu werden z. B. $0,5\text{ ml}$ jeder Referenzsubstanz-Stammlösung (siehe 6.31.2) in einen 50-ml-Messkolben (7.3) überführt und anschließend mit Methanol (6.4) oder Acetonitril (6.5) bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösung wird bei Temperaturen unter -15 °C und vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist sie ein Jahr lang stabil.

6.31.4 Zwischenverdünnung B (Referenzsubstanzen)

Es wird eine Zwischenlösung mit Massenkonzentrationen der Substanzen von z. B. je 50 ng/ml hergestellt. Dazu werden z. B. $0,5\text{ ml}$ der Zwischenverdünnung A (siehe 6.31.3) in einen 10-ml-Messkolben (7.3) überführt und anschließend mit Methanol (6.4) oder Acetonitril (6.5) bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösung wird bei Temperaturen unter -15 °C und vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist sie ein Jahr lang stabil.

6.31.5 Zwischenverdünnung C (Referenzsubstanzen)

Es wird eine Zwischenlösung mit Massenkonzentrationen der Substanzen von z. B. je 5 ng/ml hergestellt. Dazu werden z. B. $0,25\text{ ml}$ der Zwischenverdünnung A (siehe 6.31.3) in einen 50-ml-Messkolben (7.3) überführt und anschließend mit Methanol (6.4) oder Acetonitril (6.5) bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösung wird bei Temperaturen unter -15 °C und vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist sie ein Jahr lang stabil.

6.31.6 Zwischenverdünnung D (Referenzsubstanzen)

Es wird eine Zwischenlösung mit Massenkonzentrationen der Substanzen von z. B. je 0,5 ng/ml hergestellt. Dazu werden z. B. 0,25 ml der Zwischenverdünnung A (siehe 6.31.3) in einen 50-ml-Messkolben (7.3) überführt und anschließend mit Methanol (6.4) oder Acetonitril (6.5) bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösung wird bei Temperaturen unter -15°C und vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist sie einen Monat lang stabil.

6.31.7 Zwischenverdünnung E (interne Standards)

Es wird eine Zwischenlösung mit Massenkonzentrationen der Substanzen von z. B. je 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hergestellt. Dazu werden z. B. 0,5 ml jeder Stammlösung der internen Standardsubstanz (6.31.2) in einen 50-ml-Messkolben (7.3) überführt und anschließend mit Methanol (6.4) oder Acetonitril (6.5) bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Lösung wird bei Temperaturen unter -15°C und vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist sie ein Jahr lang stabil.

6.31.8 Zwischenverdünnung F (interne Standards)

Es wird eine Zwischenlösung mit Massenkonzentrationen der Substanzen von z. B. je 50 ng/ml hergestellt. Dazu werden z. B. 0,5 ml jeder Stammlösung der internen Standardsubstanz (6.31.7) in einen 10-ml-Messkolben (7.3) überführt und anschließend mit Methanol (6.4) oder Acetonitril (6.5) bis zur Markierung aufgefüllt. Die Lösung wird bei Temperaturen unter -15°C und vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ist sie ein Jahr lang stabil.

6.31.9 Kalibrierlösungen

Die Kalibrierlösungen werden durch entsprechende Verdünnungen der Zwischenverdünnung B (Referenzsubstanzen, 6.31.4) und der Zwischenverdünnung F (interne Standards, 6.31.8) hergestellt.

Die Kalibrierlösungen sind so zu verwenden, dass

- die Massenkonzentration der zu bestimmenden Substanzen einen Kalibrierbereich von z. B. 0,001 ng/ml bis 1 ng/ml (0,001 ng/l bis 1 ng/l mit Anreicherung um den Faktor 1 000) abdeckt;
- die Massenkonzentration der internen Standards in jeder Lösung gleich ist und im unteren Kalibrierbereich, z. B. 0,1 ng/ml, liegt.

Der Lösemittelanteil in den Kalibrierlösungen sollte den Anfangsbedingungen der Chromatographie für die LC-basierte Verfahrensanalyse ähnlich sein.

Er sollte in den zu analysierenden Proben gleich sein und darf nicht zu einer störenden Peakverbreiterung führen.

6.31.10 Kontrollstandard

Der Kontrollstandard ist eine unabhängig von den Stammlösungen hergestellte Lösung von Referenzsubstanzen; die Abweichung vom Sollwert sollte weniger als 15 % betragen.

Die Lösung sollte alle zu bestimmenden Substanzen enthalten.

Es muss eine Lösung aus einer anderen Charge oder von einem anderen Hersteller verwendet werden.

7 Geräte

Die Ausrüstung oder Teile davon, die mit der Wasserprobe in Berührung kommen, dürfen keine Blindwerte für die im Rahmen dieses Verfahrens zu messenden Substanzen aufweisen. Jegliche verwendete Ausrüstung sollte vorzugsweise aus Glas hergestellt sein. PTFE/HDPE darf verwendet werden, wird aber nicht empfohlen, wenn sehr niedrige Konzentrationen ($< 0,1$ ng/l) zu messen sind.

Wegen der möglichen Instabilität einiger Estrogene aufgrund von Photodegradation ist bei der Auswahl der Behälter besondere Vorsicht geboten. Es wird empfohlen, farbige Glasgeräte zu verwenden und diese dunkel zu lagern und zu versenden.

7.1 Glasflaschen, braun/grünes Glas, enghalsig, mit flachem Boden, 250 ml bis 1 000 ml, mit PTFE-Deckelauskleidung.

Alle Gefäße sollten vorzugsweise aus Borosilikatglas hergestellt sein.

Blindwerte von Gefäßen können durch Spülen mit Methanol und anschließendes Trocknen minimiert werden. Glasgeräte können zu Reinigungszwecken 2 h lang auf mindestens 450 °C erhitzt werden.

7.2 Messzylinder, Nennvolumen 500 ml bis 1 000 ml, z. B. graduierter Messzylinder nach ISO 4788.

7.3 Messkolben, Nennvolumina 10 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 000 ml, z. B. ISO 1042 – A 50 – C, Messkolben mit einer Marke.

7.4 Probenfläschchen, Braunglas, geeignet für die Aufnahme von Extrakten (z. B. Nennvolumen 4 ml, 8 ml, 16 ml, 40 ml), die an den automatischen Probeninjektor angepasst sind (z. B. Crimp-Top-Fläschchen, Nennvolumen 1,5 ml mit Bördelverschluss und Septum aus Gummi/PTFE).

7.5 Ausrüstung zur Aufkonzentrierung der Eluate durch Verdampfung, z. B. Strippgeräte mit Stickstoffgas, vakuumbeheizte Konzentratoren.

7.6 Mikroliterspritzen oder gasdichte Glasspritzen mit Stößel auf PTFE-Basis, z. B. 10 µl, 100 µl und 1 000 µl, mit Polypropylenspitzen.

7.7 Kolbenhubpipetten.

7.8 Pasteurpipetten.

7.9 Vakuumvorrichtung oder Verteiler für die Festphasenextraktion, Extraktionsbox oder automatisierte Arbeitsstation für die Extraktion mit SPE-Kartuschen und SPE-Disks.

7.10 Ofen, programmierbar und geeignet zum Aufheizen auf mindestens 450 °C für 2 h.

7.11 Trockenblock-Heizgerät oder Trockenofen mit thermischer Steuerung für Derivatisierungsreaktionen.

7.12 Beheiztes Bad mit thermischer Steuerung für Derivatisierungsreaktionen.

7.13 Analytische und semianalytische Waagen.

7.14 pH-Meter.

7.15 Festphasenmaterial für die Extraktion als Kartusche oder Disk (C₁₈, polymere Phase [HLB, DVB, polymere Umkehrphase]).

Die Auswahl des Extraktionsmaterials (z. B. Art des Sorptionsmittels, Menge des Materials) sollte an die Art der Probenmatrix und die erforderliche Empfindlichkeit angepasst werden. (Siehe Anhang B und Anhang C für Beispiele).

ANMERKUNG Bei SPE-Kartuschen sollte die Granulometrie des Extraktionsmaterials berücksichtigt werden. Eine größere Granulometrie kann ein hohes Perkulationsvolumen ermöglichen und ein Verstopfen mit komplexer Probenmatrix verhindern.

7.16 Sorptionsmittel-Festphasenmaterial für die Aufreinigung als Kartusche (Aminopropyl [LC-NH₂], Florisil [SiOH] oder selektive SPE-Kartusche für Estrogene).

Die Auswahl des Extraktionsmaterials (z. B. Art des Sorptionsmittels, Menge des Materials) sollte an die Art der Probenmatrix und die erforderliche Empfindlichkeit angepasst werden. (Siehe Anhang B und Anhang C für Beispiele.)

7.17 LC-Säule, vorzugsweise mit Vorsäule, geeignet für die Chromatographie der ausgewählten Estrogene (siehe 5.3 und 9.5.1 für Anforderungen sowie Anhang E und Anhang F für Beispiele).

7.18 Kapillarsäule, hochauflösend, gering blutend, geeignet für die Chromatographie der ausgewählten Estrogene für die Gaschromatographie (siehe 5.4 und 9.6.2 für Anforderungen sowie Anhang G für Beispiele).

7.19 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph, gekoppelt mit einem Massenspektrometer (MS/MS, HRMS) mit beheizter Elektrospray-Ionisation (ESI) (ESI).

7.20 Gaschromatograph mit Massenspektrometer-Detektor (MS/MS oder HRMS), mit Elektronenstoßionisierung (EI).

7.21 Sieb (Maschenweite 1 mm).

8 Probenahme

Für allgemeine Anforderungen an die Probenahme siehe ISO 5667-1, ISO 5667-3 und ISO 5667-5.

Für die Probenahme sind gründlich gereinigte Probenbehälter (7.1) mit flachem Boden zu verwenden. Die Probe ist bis zur Durchführung der Extraktion lichtgeschützt bei $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ zu lagern.

Um eine Verunreinigung oder den Verlust ausgewählter Estrogene zu vermeiden, sind Zwischenbehälter zu vermeiden. Um diese Risiken zu minimieren, werden Glasgeräte verwendet.

Es gibt Hinweise darauf, dass einige Estrogene in wässrigen Proben aufgrund von biologischen Abbauphänomenen (17 β E2) oder Photodegradation (EE2) schnell abgebaut werden können. Daher ist die Gewährleistung der Integrität der ausgewählten Substanzen von entscheidender Bedeutung.

Es wird empfohlen, die Extraktion so bald wie möglich durchzuführen, um eine mögliche Adsorption an der Glaswand zu minimieren, die eine mögliche Störung bei der Wiederverwendung von Glasgeräten darstellen könnte. Es wird dringend empfohlen, innerhalb von 48 h mit der Probenextraktion zu beginnen.

Der interne Standard sollte so bald wie möglich nach der Probenahme hinzugefügt werden, mindestens jedoch 48 h nach der Probenahme.

Wird die Probe nicht innerhalb von 48 h nach der Entnahme extrahiert, sollte das Labor z. B. 1 % Methanol zugeben, um den biologischen Abbauprozess und die Sorption zu verhindern.

Wird die Probe nicht innerhalb von 48 h nach der Entnahme extrahiert oder handelt es sich um komplexe Wasserproben, so können interne Standards in die erste Probenahmeflasche (7.1) gegeben werden, um den biologischen Abbauprozess und die Sorption zu kompensieren und eine Mindest-Gleichgewichtszeit von 12 h

für die internen Standards vorzusehen. Dies muss im Labor nach demselben Verfahren wie vor der Extraktion erfolgen.

Die Konservierung bis zu 14 Tagen sollte mit 9 g Natriumchlorid und 20 mg Ascorbinsäure, bezogen auf 1 l Probe, durchgeführt werden. Die Zugabe kann als Feststoff oder Lösung erfolgen (z. B. 2 ml einer 10 g/l wässrigen Ascorbinsäurelösung). Die Konservierungsmittel können auch vor der Probenahme in die Probenflasche gegeben werden.

Andere Arten von Stabilisierungsmitteln haben sich als stabilisierend für die ausgewählten Substanzen erwiesen, können aber zu einer Erhöhung der Präzision des Verfahrens führen. Dies sollte vom Labor verifiziert werden.

Wenn die Proben nicht innerhalb von 48 h extrahiert werden können, ist das Einfrieren von wässrigen Proben bei < 15 °C möglich, um den Abbau zu minimieren. Es kann jedoch zu Veränderungen in der Matrix führen (z. B. Bildung von Kolloiden), die bei der SPE-Extraktion zu Verstopfungen führen können. Dies muss vom Labor verifiziert werden.

EDTA (6.3) darf der Wasserprobe zugesetzt werden, um eine Sorption zu verhindern.

Bei Vorhandensein von Oxidationsmitteln sind 50 mg bis 80 mg Natriumthiosulfat (6.2) je Liter Wasser zuzusetzen.

9 Durchführung

9.1 Allgemeines

Die Durchführung des Verfahrens hängt von der Art der durchzuführenden Messung ab: Art der Probenmatrix, Höhe der zu messenden Konzentrationen und zu erreichende Leistungen. Bild 2 zeigt die möglichen Kombinationen von Probenvorbereitung und instrumentellen Verfahren, die durchgeführt werden können und von der vorliegenden Norm abgedeckt werden.

Das SPE-Disk-Verfahren sollte für die Analyse komplexer Wasserprobenmatrizes bevorzugt werden, da es mit der Extraktion von Schwebstoffen mit hohem Gehalt (bis zu 500 mg/l) und organischen Bestandteilen (DOC bis zu 14 mg/l) in der Probe kompatibel ist; es ermöglicht die Betrachtung der Substanzen in der gesamten Probe und nicht nur in der wässrigen Fraktion (gelöste Substanzen).

Um bei der SPE-Disk-Extraktion einer komplexen Matrix das niedrigste Konzentrationsniveau zu erreichen, sollte vorzugsweise eine SPE-Aufreinigung und anschließende LCMS/MS-Detektion durchgeführt werden.

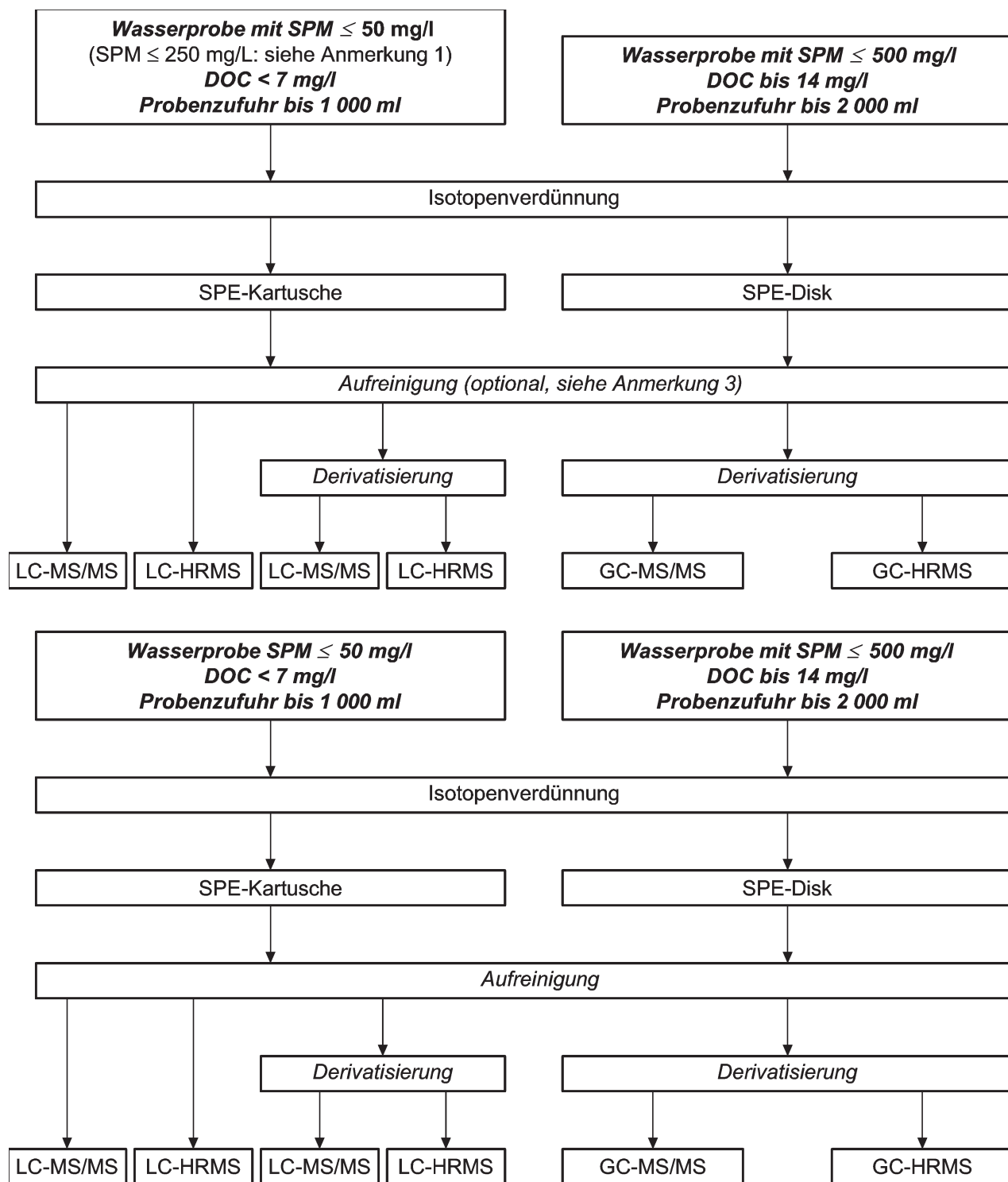


Bild 2 — Flussdiagramm einer möglichen Messstrategie

ANMERKUNG 1 Die SPE-Kartusche kann als Extraktionstechnik für Wasserproben mit SPM < 250 mg/l gewählt werden, wenn das Laboratorium Vorkehrungen zur Vermeidung von Verstopfungen (z. B. Sand oder Glaswolle) trifft und nachweist, dass die Genauigkeit, die Matrixeffekte und die Empfindlichkeit der Verfahren zufriedenstellend sind.

ANMERKUNG 2 Der Nachweis muss sich auf die Analyse einer repräsentativen Probe (natürlich oder synthetisch) stützen. Es muss nachgewiesen werden, dass die an SPM sorbierten Estrogene durch das SPE-Kartuschenverfahren extrahiert werden, wie es für die Messung von Gesamtwasser erforderlich ist.

ANMERKUNG 3 Kann nur dann fakultativ sein, wenn das Labor nachgewiesen hat, dass die routinemäßig analysierte Matrix/Probe keinen Aufreinigungsschritt erfordert.

9.2 Probenvorbereitung und Extraktion

9.2.1 Allgemeines

In 9.2, 9.3 und 9.4 und den Anhängen, auf die sie sich beziehen, werden validierte Messverfahren beschrieben, die nachweislich die beabsichtigten Ziele dieser Norm erfüllen.

Andere Ansätze dürfen in Betracht gezogen werden, aber das Labor muss nachweisen, dass damit absolute Wiederfindungsraten zwischen 70 % und 120 % mit einer maximalen Präzision von 20 % in repräsentativer Matrix erzielt werden. Je nach Probenmatrix sind auch absolute Wiederfindungsraten zwischen 50 % und 140 % akzeptabel, wenn das Labor für diese Probenart nachweisen kann, dass die Genauigkeit und die Empfindlichkeit zufriedenstellend sind.

Niedrigere absolute Wiederfindungsraten können nur dann akzeptabel sein, wenn die relative Wiederfindungsrate, die Genauigkeit und die Empfindlichkeit für die Ergebnisauswertung zufriedenstellend sind. Niedrigere Wiederfindungsraten sind ein Hinweis darauf, dass das Verfahren verbessert werden muss. Niedrigere absolute Wiederfindungen können zu einer Erhöhung der LOQ führen.

9.2.2 Probenvorbereitung

Die Probe darf nicht filtriert werden.

Die Probe wird durch Schütteln der Flasche homogenisiert. Das entsprechende Volumen (z. B. 500 ml bis 1 000 ml) der Wasserprobe wird abgemessen, indem das genaue Volumen der Wasserprobe vorzugsweise anhand ihrer durch Wägung ermittelten Masse oder alternativ mit Hilfe eines Messzylinders berechnet wird.

Eine genau definierte Menge der isotopenmarkierten Standards (6.31.7) wird zugegeben. Es muss eine Gleichgewichtszeit von mindestens 12 h eingehalten werden (die Lagerung über Nacht ist zweckmäßig). Nach der Aufstockung muss die Probe bis zum Beginn der Extraktion bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Probe muss vor Beginn des Extraktionsschritts auf Raumtemperatur gebracht werden.

Größere Partikel (z. B. Blätter, kleine Äste) sollten mit einem Sieb (1 mm Sieböffnungsweite) entfernt werden.

Eine Überführung oder die Verwendung von Zwischenbehältern und -geräten muss begrenzt werden, um den Verlust von Estrogenen durch Sorption und mögliche Verschleppung von Verunreinigungen zu minimieren. Wird die Probe überführt, ist jedes Zwischenbehältnis mit dem Lösemittel oder Wasser zu spülen, um die an den Wänden sorbierten Substanzen zurückzugewinnen.

Es müssen entweder Glasbehälter oder vorzugsweise PTFE-/HDPE-Material verwendet werden.

Wird die Probe überführt, ist jedes Zwischenbehältnis mit dem Lösemittel oder Wasser zu spülen, um die an den Wänden sorbierten Substanzen zurückzugewinnen.

Um die Genauigkeit des Verfahrens zu bestätigen, ist es notwendig, das richtige Verhältnis zwischen markierten analogen und nativen Substanzen zu finden. Es kann notwendig sein, im Vorfeld Untersuchungen durchzuführen, um zu prüfen, ob:

- der interne Standard vollständig extrahiert wurde;
- der interne Standard mit der Probe im Gleichgewicht ist und Schwebstoffe (SPM) in gleicher Weise wie die native Substanz suspendiert (ISO 21253-2, 7.2).

Bei einer Probenmatrix mit sehr geringer Komplexität in Bezug auf SPM, DOC, kann die Gleichgewichtszeit für die Zugabe des internen Standards verkürzt oder vermieden werden, wenn das Labor nachweist, dass die Genauigkeit der Verfahren zufriedenstellend ist. Der Nachweis muss sich auf die Analyse einer repräsentativen Probe (natürlich oder synthetisch) stützen.

Die Zugabemenge ist so zu wählen, dass die Massenkonzentration der internen Standards nach Anreicherung der Probe gleich derjenigen in den Kalibrierlösungen (6.31.9) ist.

9.2.3 SPE-Kartuschen-Extraktion

9.2.3.1 Allgemeines

Dieses Extraktionsverfahren muss auf die Analyse von Wasser mit geringer Komplexität (Schwebstoffe bis zu 50 mg/l) und geringem organischen Gehalt (DOC bis zu 7 mg/l) in der Probe beschränkt werden.

Für einen Analysedurchlauf sind die gleichen Bedingungen (Menge des Adsorptionsmittels, Kartuschentyp und -charge, Verpackung, Probenvolumen und Durchflussrate, Elutionsschritte und -volumen) zu verwenden.

Eine schwache absolute Ausbeute kann durch eine unzureichende Menge an Adsorptionsmittel oder ein unzureichendes Volumen an Lösemittel bei der Verpackung oder den Elutionsschritten der Kartuschen verursacht werden. Vor der Analyse sind diese Bedingungen vom Labor zu überprüfen und zu optimieren.

9.2.3.2 Grundlage des Verfahrens

Die Substanzen werden mit einer Einweg-Extraktionskartusche mit einem spezifischen Adsorptionsmittel aus der Probenmatrix extrahiert und konzentriert und anschließend mit einem geeigneten Lösemittel eluiert.

Anhang B enthält detaillierte Beispiele für Protokolle auf der Grundlage von SPE-Kartuschen.

9.2.3.3 Durchführung der Extraktion

Falls erforderlich, wird der pH-Wert der Probe mit einer Säurelösung (z. B. Salzsäure 6.13, Schwefelsäure 6.14) oder Natriumhydroxidlösung (6.24) eingestellt. Die Extraktionskartusche (7.15) wird durch Spülen mit einem Volumen geeigneter Lösemittel (z. B. 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9) konditioniert. Dann wird das Material mit demselben Volumen an Reinstwasser (6.1) gewaschen. Das Adsorptionsmittel muss feucht bleiben. Am Ende der Konditionierungsschritte für die Kartusche sollten die Bedingungen (pH-Wert) mit denen der durchgesickerten Probe vergleichbar sein.

Die Probe wird unmittelbar nach der Konditionierung des Adsorptionsträgers zugeführt.

Die maximale Probenzufuhr sollte entsprechend der Komplexität der Probe und unter Berücksichtigung der Kapazität des Sorptionsmittels festgelegt werden.

Bei der Konditionierung des Festphasenmaterials ist darauf zu achten, dass das Sorptionsmittel nicht trockenläuft.

ANMERKUNG 1 Eine pH-Einstellung auf pH 8 könnte die Wiederfindung optimieren.

ANMERKUNG 2 Das Trocknen des Festphasenmaterials während der Konditionierung kann zu Verlusten bei der Anreicherung führen. Normalerweise treten diese Störungen bei modifizierten Polymermaterialien nicht auf.

Für Wasser mit einem SPM-Gehalt nahe 50 mg/l und einem DOC-Gehalt nahe 7 mg/l wird eine maximale Probenzufuhr von 200 ml empfohlen, um Verstopfungen zu vermeiden.

In einigen Fällen kann es zu einer Verstopfung kommen. Um dies zu beheben, kann es erforderlich sein, den SPE-Ladeschritt mit einer zweiten Kartusche abzuschließen. Die Extrakte müssen vor der Rekonzentration kombiniert werden. Alternativ dürfen Glaswolle oder Sand in die Kartusche eingebracht werden.

Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen im Adsorptionsträger eingeschlossen werden und dieser während des gesamten Vorgangs feucht gehalten wird.

Die Wasserprobe wird mit kontrollierter Geschwindigkeit durch die Kartusche perkoliert. Der Durchfluss muss an die Kapazität der Adsorptionsmittelkartusche angepasst sein.

Die Patrone wird unter Vakuum oder in einem Luft- oder Stickstoffstrom getrocknet, um Restwasser zu entfernen, das die Elution und anschließend die Konzentration vor der Analyse stören könnte.

Die zu analysierenden Substanzen werden mit den entsprechenden Lösemitteln (z. B. 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9) oder Gemischen eluiert.

Aufgrund der Verteilungskoeffizienten zwischen Adsorptionsphase und Elutionslösemittel ist eine fraktionierte Elution mehrerer kleiner Volumina im Allgemeinen effizienter als eine einzelne Elution desselben Gesamtvolumens.

Anhang B enthält detaillierte Beispiele für SPE-Extraktionsprotokolle.

Falls erforderlich, wird die Rekonzentration nach 9.4 durchgeführt.

9.2.4 SPE-Disk-Extraktion

9.2.4.1 Allgemeines

Dieses Verfahren eignet sich für die Analyse komplexer Wasserprobenmatrizes, da es mit der Extraktion eines hohen Gehalts an Schwebstoffen (bis zu 500 mg/l) und organischem Kohlenstoff (DOC bis zu 14 mg/l) in der Probe kompatibel ist. Damit ist es möglich, die in der gesamten Probe vorhandenen Substanzen zu berücksichtigen.

9.2.4.2 Grundlage des Verfahrens

Die Substanzen werden mit einer Einweg-Extraktions-Disk mit einem spezifischen Adsorptionsmittel aus der Probenmatrix extrahiert und konzentriert und anschließend mit einem geeigneten Lösemittel eluiert.

Anhang C enthält detaillierte Beispiele für Protokolle auf der Grundlage von SPE-Disks.

9.2.4.3 Durchführung der Extraktion

Falls erforderlich, wird der pH-Wert der Probe mit einer Säurelösung (z. B. Salzsäure 6.13, Schwefelsäure 6.14) oder Natriumhydroxidlösung (6.24) eingestellt. Die Extraktions-Disk (7.15) wird durch Spülen mit einem Volumen eines geeigneten Lösemittels (z. B. 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9) konditioniert. Dann wird das Material mit demselben Volumen an Reinstwasser (6.1) gewaschen. Das Adsorptionsmittel muss feucht bleiben. Am Ende der Konditionierungsschritte der Disk sollten die Bedingungen (pH-Wert) mit denen der durchgesickerten Probe vergleichbar sein.

Die Probe wird unmittelbar nach der Konditionierung des Adsorptionsträgers zugeführt.

Die Wasserprobe wird mit kontrollierter Geschwindigkeit durch die Disk perkoliert. Der Durchfluss muss an die Kapazität der SPE-Disk angepasst werden (in der Regel dauert es 20 min, um 1 000 ml Wasserprobe zu perkolieren). Das maximale Volumen, das perkoliert werden kann, hängt vom Adsorptionsträger und der Matrix ab. Die maximale Probenzufuhr sollte entsprechend der Komplexität der Probe festgelegt werden. In der Regel dürfen selbst bei komplexer Matrix Probenvolumina zwischen 1 000 ml und 2 000 ml verwendet werden.

Die Disk wird unter Vakuum oder in einem Luft- oder Stickstoffstrom bei kontrollierter Temperatur (z. B. unter einem Stickstoffstrom oder unter Vakuum) z. B. für etwa 20 min getrocknet, um Restwasser zu entfernen, das die Elution und anschließend die Konzentration vor der Analyse stören könnte.

Die zu analysierenden Substanzen werden mit dem entsprechenden Lösemittel (z. B. 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9) oder Gemisch eluiert.

Anhang C enthält detaillierte Beispiele für SPE-Disk-Extraktionsprotokolle.

Falls erforderlich, wird die Konzentration nach 9.4 durchgeführt.

ANMERKUNG Restwasser stört das Reinigungsverfahren wie unter 9.2.2.3 oder 9.2.3.3 beschrieben.

9.3 (Auf-)Reinigung der Probe

9.3.1 Allgemeines

Aufgrund der sehr niedrigen Konzentrationen, die erreicht werden müssen, ist eine effiziente Probenvorbereitung erforderlich. Dementsprechend ist eine Aufreinigung erforderlich, wenn die niedrigste LOQ auch in einer wenig komplexen Matrix erreicht werden muss.

Der Aufreinigungsschritt kann nur dann fakultativ sein, wenn das Labor nachgewiesen hat, dass die routinemäßig analysierte Matrix/Probe keinen Aufreinigungsschritt erfordert.

9.3.2 Grundlage des Verfahrens

Die Extrakte werden mit einer Adsorptionsmittel-Festphasenkartusche mit einem geeigneten Lösemittel oder Lösemittelgemisch gereinigt. Die störende Matrix/störenden Substanzen werden auf dem Sorptionsmittel zurückgehalten, während die Zielsubstanzen hindurchgehen und in einem Fläschchen zurückgewonnen werden.

9.3.3 Durchführung

9.3.3.1 Durchführung auf Florisil-, Silika- oder Aminopropyl-Sorptionsmittel

Die Aufreinigungskartusche (7.16) wird durch Spülen mit einem Volumen eines geeigneten Lösemittels (z. B. 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9) oder Gemischen konditioniert. Das Adsorptionsmittel muss feucht bleiben. Am Ende der Konditionierungsschritte der Kartusche sollten die Bedingungen mit den Extrakten vergleichbar sein.

Das Probenextrakt wird unmittelbar nach der Konditionierung des Adsorptionsträgers zugeführt.

Die Extrakte werden mit kontrollierter Geschwindigkeit durch die Kartusche perkoliert. Der Durchfluss muss an die Kapazität der Adsorptionsmittelkartusche angepasst sein. Die Substanzen werden mit dem entsprechenden Lösemittel (z. B. 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9) oder Gemisch eluiert.

Wenn Estriol bestimmt werden soll, muss Methanol eingesetzt werden, um die Substanz zurückzugewinnen.

ANMERKUNG Restfeuchte auf dem Sorptionsmittel kann den Reinigungsprozess stören.

Anhang D enthält detaillierte Beispiele für Reinigungsverfahren.

9.3.3.2 Durchführung auf selektiven SPE-Kartuschen für Estrogene

Die Aufreinigungskartusche (7.16) wird durch Spülen mit einem Volumen eines geeigneten Lösemittels (6.5) konditioniert. Dann wird das Material mit demselben Volumen an Reinstwasser (6.1) gewaschen. Das Adsorptionsmittel muss feucht bleiben. Am Ende der Konditionierungsschritte der Kartusche sollten die Bedingungen mit dem Extrakt vergleichbar sein.

Die Probe wird unmittelbar nach der Konditionierung des Adsorptionsträgers zugeführt.

Die Extrakte werden mit kontrollierter Geschwindigkeit durch die Kartusche perkoliert. Der Durchfluss muss an die Kapazität der Adsorptionsmittelkartusche angepasst sein.

Das Material wird mit Reinstwasser (6.1) oder einem Gemisch mit Lösemittel (6.5) gewaschen.

Die zu analysierenden Substanzen werden mit dem geeigneten Lösemittel (6.4) eluiert.

Anhang D enthält ein detailliertes Beispiel für ein Reinigungsverfahren.

Falls erforderlich, wird die Rekonzentration nach 9.4 durchgeführt.

9.4 Rekonzentration

Die Rekonzentration der Extrakte kann in verschiedenen Phasen des Verfahrens erforderlich sein (z. B. zwischen Extraktion/Reinigung, Derivatisierung, vor der Injektion in die Chromatographie).

Wenn eine Rekonzentration erforderlich ist, muss der erhaltene Extrakt unter Anwendung von 7.5 sorgfältig konzentriert werden.

ANMERKUNG Die Rekonzentration bis zur Trocknung ist möglich, da für die ausgewählten Substanzen keine signifikanten Verluste festgestellt wurden.

Um signifikante Verluste von Substanzen durch Sorption während der Verdampfung des Lösemittels zu vermeiden, ist bei der Wiedergewinnung der Proben und der Überführung in Zwischenfläschchen vorsichtig vorzugehen.

Vor der Chromatographie ist der Extrakt in dem Lösemittel fertigzustellen, das dem verwendeten analytischen Verfahren entspricht, d. h. LC (z. B. Acetonitril, Methanol, Wasser-Lösemittelgemisch) oder GC (z. B. Aceton). Im Falle einer Simultananalyse kann der Extrakt vorher geteilt werden.

Konzentrationsfaktoren von 10 000 sind geeignet, um den niedrigsten LOQ zu erreichen, was zu einem Endvolumen von nahezu 0,1 ml führt.

Wenn ein Injektions-Tracer verwendet wird, sollte er in diesem Schritt zugegeben werden. Dies ist nützlich, um das ordnungsgemäße Funktionieren der instrumentellen Stufe und die Effizienz der Probenvorbereitung zu überprüfen (Wiederfindung der internen Standards).

9.5 Flüssigkeitschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie

9.5.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (LC)

Das LC-Gerät wird nach den Angaben des Herstellers betrieben.

Es wird eine geeignete LC-Säule (siehe 5.3) für die chromatographische Trennung verwendet, und die Trennung der Analyten wird durch eine Gradientenelution optimiert.

Die chromatographischen Bedingungen sind so zu wählen, dass eine optimale Empfindlichkeit für die massenspektrometrische Detektion erreicht wird (Beispiele siehe Anhang E und Anhang F).

Für eine zuverlässige quantitative Bestimmung der Zielsubstanzen ist eine gute Trennung von Störungen erforderlich.

Zur Trennung von Zielsubstanzen, die mit der Spektrometrie nicht vollständig voneinander getrennt werden können (17αE2 und 17βE2) ist die Chromatographie zu verwenden. In diesen Fällen sollte die chromatographische Auflösung mindestens $R = 1,2$ betragen.

Das Injektionsvolumen ist so zu wählen, dass keine störenden Peakverbreiterungen oder Störungen bei der quantitativen Bestimmung auftreten.

Die kürzeste Retentionszeit muss mindestens dem Dreifachen der Totvolumenzeit der LC-Säule entsprechen.

9.5.2 Detektion

9.5.2.1 Allgemeines

Das Massenspektrometer wird nach den Anweisungen des Herstellers bedient, und es sind die richtigen Einstellungen für das Gerät zu wählen.

Estrogene werden üblicherweise durch Elektrospray-Ionisierung (ESI) analysiert. Im ESI-Modus werden üblicherweise quasi-molekulare Ionen des Typs $[M+H]^+$ oder $[M-H]^-$ erzeugt.

Bei der Analyse von Estrogenen im negativen Modus muss das LC-System wegen möglicher Säurereste, die zu einem erheblichen Empfindlichkeitsverlust und Hintergrund führen können, ausgiebig gespült werden.

9.5.2.2 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Die optimalen Einstellungen für die Ionisierung unter den angegebenen chromatographischen Bedingungen für jede Substanz im negativen Modus oder im positiven Modus (nach Derivatisierung) werden je nach ihren chemischen Eigenschaften und der gewünschten Empfindlichkeit ermittelt.

Die substanzspezifischen Einstellungen werden so gewählt, dass für jede Substanz möglichst zwei Produkt-Ionen erhalten werden können.

ISO 21253-1 legt die Mindestanforderungen an die Erfassung für die Massenspektrometrie mit niedriger Auflösung fest.

Um die niedrigste LOQ zu erreichen, ist die Optimierung jedes einzelnen Instrumentenparameters sehr wichtig, insbesondere die Verweildauer, und sie sind mit Umsicht auszuwählen.

Beispiele für LC-MS/MS-Protokolle sind in Anhang E angegeben.

9.5.2.3 Hochauflösungs-Massenspektrometrie (HRMS)

ISO 21253-1 legt die Mindestanforderungen an die Erfassung für HRMS fest:

Bei Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers im Full-Scan-Modus ist das vollständige Massenspektrum zu jedem Zeitpunkt der Chromatographie verfügbar.

Um die niedrigste LOQ zu erreichen, ist die Optimierung jedes einzelnen Instrumentenparameters sehr wichtig; diese sind mit Umsicht auszuwählen.

Es ist sicherzustellen und zu überprüfen, dass Massengenauigkeit und Auflösung über den Massenbereich und das gesamte Chromatogramm erhalten bleiben.

Die Auflösung wird so gewählt, dass eine ausreichende Differenzierung der Matrixsignale erreicht wird. Eine Massenabweichung von 5 ppm zwischen der gemessenen (genauen) Masse und der theoretischen (exakten) Masse der Substanz oder des Ions dieser Substanz darf nicht überschritten werden.

Das Messverfahren ist so einzustellen, dass für jeden Analyten nach Möglichkeit mindestens ein Produkt-Ion zur Bestätigung erhalten bleibt.

Beispiele für LC-HRMS-Bedingungen sind in Anhang F angegeben.

9.5.3 Derivatisierung

9.5.3.1 Allgemeines

Die Derivatisierung verbessert die Empfindlichkeit, indem sie den Analyten mit einer aufladbaren oder permanent geladenen Gruppe für die MS-Analyse ausstattet und die Effizienz der Ionisierung, Fragmentierung und

Retention verändert. Das Haupthindernis bei der Analyse von Estrogenen mittels LC-MS/MS oder HRMS ist ihre schwache Ionisierbarkeit im negativen Modus der Elektrospray-Ionisierung, was zu einer geringen inhärenten Empfindlichkeit führt. Um dies zu überwinden, sollte eine Derivatisierung durchgeführt werden, auch wenn diese zeitaufwendig ist. Verschiedene Derivatisierungsstrategien haben sich als zufriedenstellend erwiesen.

9.5.3.2 Derivatisierung mit Pyridin-3-sulfonylchlorid PS-Cl

Der Stickstoffverdampfer oder das Trockenblock-Heizgerät (7.11) wird auf 60 °C eingestellt.

Der Carbonatpuffer (6.22) wird in die Fläschchen mit der getrockneten Probe gegeben und verwirbelt. Die PS-Cl-Lösung (6.21) wird hinzugegeben und verwirbelt. Die Probenfläschchen werden mit Kappen versehen und für vier Minuten in das erwärmte Gerät gestellt.

Die Lösung wird unverzüglich verdunstet, z. B. mit einem Stickstoffverdampfer (7.5), der auf 60 °C eingestellt ist.

Die Probe wird bei Raumtemperatur abgekühlt.

Ausfällung des Puffers: Acetonitril (6.5) wird in die Fläschchen gegeben und verwirbelt.

ANMERKUNG Ein Teil des ausgefällten Puffers kann sich vom Boden des Fläschchens lösen, insbesondere wenn das Fläschchen groß ist.

Die Lösung wird z. B. in ein 4-ml-Fläschchen überführt. Eine Überführung des ausgefallenen Puffers ist zu vermeiden.

Die Lösung wird bis zur Trocknung verdunstet, z. B. mit einem Stickstoffverdampfer (7.5), der auf 40 °C eingestellt ist.

Die Probe wird in einem für die LC-Chromatographie geeigneten Lösemittel rekonstituiert.

9.5.3.3 Derivatisierung mit Dansylchlorid (Dansylierung)

Das Verfahren besteht aus zwei Schritten: Der erste ist die Dansylierung, der zweite die Entfernung der unlöslichen Salze.

Der Extrakt wird unter Anwendung von 7.5 bis zur Trocknung verdunstet.

Ein bestimmtes Volumen (z. B. 200 µl) trockenen Acetons (6.10) und ein bestimmtes Volumen (z. B. 500 µl) Natriumbicarbonatpuffer (6.27) werden hinzugefügt.

Etwa 1 min lang verwirbeln.

Ein bestimmtes Volumen (z. B. 500 µl) Dansyl-Reagenzlösung (6.25) wird hinzugefügt und erneut etwa 1 min lang verwirbelt.

Die Proben werden im thermostatisch geregelten Bad (7.12) für mindestens 6 min auf 60 °C erwärmt. Das Fläschchen muss vollständig in das Wasserbad eingetaucht sein.

Das thermostatische Wasserbad muss auf die gewünschte Temperatur (60 °C) vorgeheizt und vor dem Einbringen der Proben mit einem Thermometer überprüft werden.

Die Zeit für die Dansylierung sollte überprüft werden, um die Effizienz der Reaktion zu maximieren.

Das jeweilige Verhältnis der Reagenzien muss beachtet werden.

Die Probe wird unter Anwendung von 7.5 bis zur Trocknung verdunstet.

Unlösliche Salze werden entfernt:

- die Probe wird in einem bestimmten Volumen (z. B. 600 µl) Acetonitril (6.5) oder Methanol (6.4) aufgenommen;
- die Wände des z. B. 4-ml-Braunglasfläschchens werden mit z. B. 600 µl Acetonitril (6.5) oder Methanol (6.4) gespült;
- verwirbeln und dann z. B. mit einer Pasteurpipette in z. B. ein 2-ml-Braunglasfläschchen überführen;
- der Vorgang wird ein zweites Mal wiederholt;
- es folgt die Überführung in ein neues Fläschchen.

Die Probe wird unter Anwendung von 7.5 bis zur Trocknung verdunstet.

Die Probe wird in einem für die LC-Chromatographie geeigneten Lösemittel rekonstituiert.

9.6 Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie

9.6.1 Derivatisierung

9.6.1.1 Allgemeines

Die Derivatisierung erhöht das Molekulargewicht und die Flüchtigkeit der Zielsubstanzen und schützt gleichzeitig die polaren funktionellen Gruppen, so dass sie sich besser mit der Kapillarsäulen-GC trennen lassen. Verschiedene Derivatisierungsstrategien haben sich als zufriedenstellend erwiesen.

In 9.6.1.2 und Anhang G werden validierte Messverfahren beschrieben, die nachweislich die beabsichtigten Ziele dieser Norm erfüllen.

Andere Ansätze dürfen in Betracht gezogen werden, aber das Labor muss nachweisen, dass sie eine vergleichbare Selektivität und Empfindlichkeit in einer repräsentativen Matrix ermöglichen.

9.6.1.2 Derivatisierung

Der Extrakt wird unter Anwendung von 7.5 bis zur Trocknung verdunstet.

Mit z. B. 50 µl Aceton (6.7) oder Pyridin (6.18) und z. B. 50 µl TMSI (6.19) rekonstituieren.

ANMERKUNG Das Verhältnis zwischen TMSI und Lösemittel muss 1 : 1 (Volumenanteil) betragen.

Die Proben werden erhitzt (7.11). Die Temperatur und die Reaktionszeit müssen optimiert werden, um die maximale Effizienz zu erreichen.

Anhang G beschreibt optimierte Bedingungen.

9.6.2 Gaschromatographie (GC)

Eine polare oder leicht polare Kapillar-Analysesäule wird verwendet, die in der Lage ist, die Substanzen zu trennen (siehe 5.4). Beispiele für geeignete Säulen sind in Anhang G angegeben.

Für eine zuverlässige quantitative Bestimmung der Zielsubstanzen ist eine gute Trennung von Störungen erforderlich.

Der Gasphasenchromatograph wird so eingestellt, dass eine ausreichende Trennung der Substanzen durch Anpassung der Temperaturprogrammierung erreicht wird.

Das Injektionssystem wird üblicherweise mit PTV im Split/Splitless-Modus betrieben.

Mit der Large Volume Injection (LVI) können Volumina von bis zu 1 000 µl injiziert werden. Mit dieser Injektionstechnik lassen sich niedrigere Nachweisgrenzen erzielen. Um sicherzustellen, dass der GC-Liner oder die Säule durch das hohe Injektionsvolumen nicht überlastet wird, wird das LVI im Lösemittel-Entlüftungsmodus eingestellt.

ANMERKUNG Es sollte auf die Reaktivität mit Oberflächen (Liner, Septum, Injektorboden) geachtet werden, um eine Sorption zu vermeiden.

Anhang G enthält Beispiele von Bedingungen für die Gaschromatographie.

9.6.3 Detektion

9.6.3.1 Allgemeines

Das Massenspektrometer wird nach den Anweisungen des Herstellers bedient, und es sind die richtigen Einstellungen für das Gerät zu wählen.

9.6.3.2 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Für jede Substanz werden die optimalen Einstellungen für die Ionisierung unter den angegebenen chromatographischen Bedingungen bestimmt.

Die Elektronenstoßionisierung (EI) wird mit 70 eV als Standard-Elektronenkinetikenergie durchgeführt.

Die substanzspezifischen Einstellungen werden so gewählt, dass für jede Substanz möglichst zwei Produkt-Ionen erhalten werden können.

Um die niedrigste LOQ zu erreichen, ist die Optimierung jedes einzelnen Instrumentenparameters sehr wichtig, insbesondere die Verweildauer, und sie sind mit Umsicht auszuwählen.

ISO 21253-1 legt die Mindestanforderungen an die Erfassung für die Massenspektrometrie mit niedriger Auflösung fest.

Beispiele für GC-MS/MS-Bedingungen sind in Anhang G angegeben.

9.6.3.3 Hochauflösungs-Massenspektrometrie (HRMS)

ISO 21253-1 legt die Mindestanforderungen an die Erfassung für HRMS fest:

Bei Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers im Full-Scan-Modus ist das vollständige Massenspektrum zu jedem Zeitpunkt der Chromatographie verfügbar.

Es ist sicherzustellen und zu überprüfen, dass Massengenauigkeit und Auflösung über den Massenbereich und das gesamte Chromatogramm erhalten bleiben.

Die Auflösung wird so gewählt, dass eine ausreichende Differenzierung der Matrixsignale erreicht wird. Die Auflösung muss in der Regel größer als 10 000 FWHM für den gesamten Massenbereich sein. Das Messverfahren ist so einzustellen, dass für jeden Analyten nach Möglichkeit mindestens ein Produkt-Ion zur Bestätigung erhalten bleibt.

Um die niedrigste LOQ zu erreichen, ist die Optimierung jedes einzelnen Instrumentenparameters sehr wichtig; diese sind mit Umsicht auszuwählen.

Beispiele für GC-HRMS-Bedingungen sind in Anhang H angegeben.

10 Kalibrierung

10.1 Allgemeines

Die Kalibrierung des Bestimmungsverfahrens wird mit internen Standards (6.30.2) unter festgelegten chromatographischen Bedingungen durchgeführt.

Zur Bestimmung des linearen Kalibrierbereichs bei der Verifizierung des Verfahrens ist wie folgt vorzugehen:

- Das gesamte Messverfahren wird so gestaltet, dass sich für jede Substanz ein linearer Zusammenhang zwischen dem Messsignal und der Konzentration ergibt. Es wird empfohlen, die Kalibrierung und Quantifizierung im linearen Bereich vorzunehmen, obwohl auch nichtlineare Beziehungen zwischen Konzentration und Reaktion verwendet werden dürfen.
- Der lineare Arbeitsbereich des Systems wird bestimmt, indem für jede zu bestimmende Substanz nach ISO 8466-1 mindestens fünf Kalibrierpunkte (6.31.9) mit unterschiedlichen Konzentrationen injiziert werden.
- Wenn möglich wird ein Kalibrierbereich für das Messverfahren festgelegt, der die realen Konzentrationen und die untersuchten Matrices abdeckt.

Für den Routinebetrieb sind folgende Optionen für den Arbeitsbereich und die Anzahl der Kalibrierstufen nach ISO 8466-1 zulässig:

- Bei der Ein-Punkt-Kalibrierung ist eine Konzentrationsstufe im oberen Arbeitsbereich zu wählen. Es dürfen keine Blindwerte vorhanden sein. Können Blindwerte nicht vernachlässigt werden, so ist mindestens ein weiteres Konzentrationsniveau in der Nähe des unteren Anwendungsbereichs zu messen und der Nullpunkt bei der Berechnung der Kalibrierfunktionen auszuschließen.
- Bei der Ein- und Zweipunktkalibrierung sind mindestens drei Messungen auf jeder Konzentrationsstufe vorzunehmen.
- Bei der Mehrpunktkalibrierung sind die Konzentrationsstufen über den Kalibrierbereich zu verteilen.
- Das Injektionsvolumen ist während der Kalibrierung und der Probenmessung konstant zu halten.

Die für eine Substanz ermittelte Kalibrierfunktion ist nur für den erfassten Konzentrationsbereich gültig. Sie ist auch vom Betriebszustand des Messsystems abhängig und muss bei jeder Untersuchungsreihe überprüft werden. Sie ist gültig, solange die Anforderungen an die Genauigkeit (10.3) erfüllt sind.

Siehe Tabelle 2 zur Erläuterung der in der folgenden Gleichung und im Text verwendeten Indizes:

Tabelle 2 — Definition von Indizes

Index	Bedeutung
<i>i</i>	Identität der Substanz
<i>j</i>	fortlaufende Nummer für Wertepaare
<i>e</i>	Messwerte für die Kalibrierung
<i>a</i>	Messwerte für die Zugabe
<i>g</i>	festgestellter Wert
<i>v</i>	Standardwert
<i>I</i>	interner Standard
<i>M</i>	Messlösung

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Index	Bedeutung
P	Probe
R	Referenz
A	Zugabe

10.2 Kalibrierung durch Isotopenverdünnung

- Zur Durchführung der Kalibrierung werden Kalibrierlösungen (6.31.9) mit allen zu bestimmenden Substanzen und den internen Standards (6.31.8) injiziert.
- Zur grafischen Darstellung der Kalibrierfunktionen für jede Substanz i wird das Verhältnis der Messwerte y_{ie}/y_{lie} auf der Ordinate und das entsprechende Verhältnis der Massenkonzentrationen ρ_{ie}/ρ_{lie} auf der Abszisse aufgetragen.
- Die Referenzfunktion wird aus den Wertepaaren y_{ie}/y_{lie} und ρ_{ie}/ρ_{lie} durch lineare Regression nach Gleichung (1) bestimmt:

$$\frac{y_{ie}}{y_{lie}} = b_i \cdot \frac{\rho_{ie}}{\rho_{lie}} + a_i \quad (2)$$

Dabei ist

y_{ie} der Messwert (abhängige Variable) der Substanz i bei der Kalibrierung in Abhängigkeit von ρ_{ie} , z. B. Flächeneinheit;

y_{lie} der Messwert des internen Standards I der Substanz i bei der Kalibrierung, z. B. Flächeneinheit;

ρ_{ie} die Massenkonzentration (unabhängige Variable) der Substanz i in der Kalibrierprobe, in Nanogramm je Milliliter (ng/ml);

ρ_{lie} die Massenkonzentration des internen Standards I der Substanz i in der Kalibrierprobe, in Nanogramm je Milliliter (ng/ml);

b_i die Steigung der linearen Regression y_{ie}/y_{lie} in Abhängigkeit vom Verhältnis ρ_{ie}/ρ_{lie} , dimensionslos;

a_i der Achsenabschnitt der linearen Regression auf der Ordinate; entfällt bei Ein-Punkt-Kalibrierung, dimensionslos.

10.3 Prüfung der Kalibrierung

Es wird ein unabhängiger Kontrollstandard (6.31.10) verwendet, um die Gültigkeit der Kalibrierung zu überprüfen.

- Der Kontrollstandard mit einer Massenkonzentration von z. B. 0,1 ng/ml wird an jedem Arbeitstag in einer Messreihe analysiert und die Massenkonzentrationen der Analyten bestimmt. Die Abweichung vom Zielwert sollte weniger als 15 % betragen.

11 QA/QC

11.1 Bestimmung der Substanzen

Für alle Probenarten: Kalibrierungspunkte, QA/QC, Wasserproben, muss die Bestimmung der Substanzen nach ISO 21253-1 erfolgen.

Bei chromatographischen Störungen und generell wegen der sehr niedrigen Konzentrationen der Zielestrogene sollte eine manuelle Integration vorgenommen werden.

ANMERKUNG Die Anwendung der Isotopenverdünnung ermöglicht ein höheres Vertrauensniveau bei der Bestimmung der ausgewählten Substanzen.

11.2 Blindproben

Vor und während der Analysenreihen sind Blindprobenbestimmungen mit Wasser (6.1) durchzuführen, mindestens eine je Reihe. Dieses Wasser sollte frei von nachweisbaren Estrogenen sein. Die Blindprobenmessungen müssen alle Schritte des Analyseverfahrens vom Eintreffen der Probe im Labor bis zur endgültigen Analyse im Gerät umfassen. Treten ungewöhnlich hohe Blindwerte auf, ist jeder einzelne Schritt des Verfahrens zu prüfen und die Ursache durch systematische Überprüfungen zu ermitteln, um die Quelle der Verunreinigung beseitigen zu können. Durch verschiedene Maßnahmen muss versucht werden, die Blindwerte so weit wie möglich zu reduzieren, z. B. Vermeidung von Verunreinigungen durch Vermeidung von wiederverwendetem Material, Verwendung geeigneter Reagenzien (Abschnitt 6) sowie Prüfung der analytischen Ausrüstung.

Wird in der Blindprobe ein Estrogen (Tabelle 1) in einer Konzentration von mehr als 50 % der LOQ oder einem Drittel der gesetzlichen Konformitätsgrenze gefunden, je nachdem, welcher Wert höher ist, oder wird in der Blindprobe eine potenziell störende Verbindung in der Mindestkonzentration für jeden nativen Analyten in Tabelle 1 gefunden (unter der Annahme eines Ansprechfaktors von 1 in Bezug auf die Quantifizierungsreferenz in Tabelle 1 für eine potenziell störende Verbindung, d. h. eine in diesem Verfahren nicht aufgeführte Verbindung), so ist die Analyse der Proben so lange zu unterbrechen, bis die Probencharge erneut extrahiert und die Extrakte erneut analysiert wurden und die zur Probencharge gehörende Blindprobe keine Anzeichen für eine Verunreinigung in diesen Mengen aufweist.

Alle Proben muss eine nicht kontaminierte Verfahrensblindprobe zugeordnet sein, bevor die Ergebnisse für diese Proben gemeldet oder für Genehmigungszwecke oder zur Einhaltung von Vorschriften verwendet werden dürfen.

12 Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die LOQ muss durch matrixangepasste Messung und für jede Substanz bestimmt werden, die im Anwendungsbereich des Verfahrens angegeben ist. Die Bestimmung der LOQ erstreckt sich auf das gesamte Protokoll des Verfahrens.

Falls keine sonstigen Anforderungen oder nationalen Vorschriften vorhanden sind, kann die LOQ wie in ISO/TS 13530:2009, 3.1.7, oder CEN/TS 16800:2016, 6.4.5, erläutert ermittelt werden.

Die LOQ ist für den MS-Quantifizierungsübergang oder das MS-Ion zu verifizieren, sofern Qualifizierungsübergänge oder -Ionen vorhanden sind (siehe ISO 21253-1). Bei der Untersuchung der LOQ muss mindestens eine Matrixblindprobe auf genau dieselbe Weise verarbeitet werden wie die Proben (einschließlich aller Vorverarbeitungsschritte).

13 Berechnung der Wiederfindung

13.1 Allgemeines

Die Wiederfindungsraten der Analyten können Hinweise auf Matrixeinflüsse geben. Matrixeffekte können in verunreinigten Wasserproben, insbesondere in Abwasserproben, auftreten und sich störend auf die Quantifizierung auswirken.

Die Wiederfindungsraten der Analyten sind durch Aufstockung der Probe nach 13.2 zu bestimmen.

ANMERKUNG 1 Die Korrektur mit der probenspezifischen Wiederfindungsrate kann zu einer höheren Messunsicherheit führen.

ANMERKUNG 2 Durch Verdünnung der Probe kann der Einfluss der Matrix verringert werden.

Matrixeffekte können auch durch Nachsäuleninfusion von Analyten oder internen Standards über die gesamte Dauer der Chromatographie von realen Proben durch eine Veränderung (Abnahme oder Zunahme) der Intensität nachgewiesen werden [1].

Die Wiederfindungsraten der internen Standards sind ein Maß für die Wiederfindung der Analyten über den gesamten analytischen Prozess jeder einzelnen Probe. Sie müssen nach 13.3 bestimmt werden.

ANMERKUNG 3 Eine niedrige Wiederfindungsrate kann zu einer höheren Bestimmungsgrenze und höheren Messunsicherheiten führen.

ANMERKUNG 4 Eine sehr hohe Wiederfindungsrate kann auf eine Störung zurückzuführen sein.

13.2 Berechnung der Wiederfindung des Analyten anhand von Proben

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wird die Probe mit den Analyten aufgestockt, z. B. durch Zugabe von 100 µl Zwischenverdünnung C (6.31.5) zu 1 000 ml Probenwasser, und die Probe mit und ohne Zugabe während des gesamten Verfahrens analysiert.

Die Zugabemenge sollte im unteren Arbeitsbereich liegen, z. B. 0,1 ng/l, oder an die Befunde in der Probe angepasst sein. Die Massenkonzentrationen der Analyten in der aufgestockten Probe dürfen den Kalibrierungsbereich nicht überschreiten; erforderlichenfalls sollte die Probe vor der Aufstockung verdünnt werden.

— Die Wiederfindungsrate A_{iP} für die Substanz i in der Probe wird nach Gleichung (3) berechnet:

$$A_{iP} = \frac{\rho_{iaP} - \rho_i}{\rho_{iA}} \cdot f \quad (3)$$

Dabei ist

A_{iP} die Wiederfindungsrate der Substanz i in der Probe, in Prozent (%);

ρ_{iaP} die ermittelte Massenkonzentration für die Substanz i in der aufgestockten Probe, in Nanogramm je Liter (ng/l);

ρ_i die ermittelte Massenkonzentration für die Substanz i in der nicht aufgestockten Probe, in Nanogramm je Liter (ng/l);

ρ_{iA} die zugesetzte Massenkonzentration für die Substanz i in der aufgestockten Probe, in Nanogramm je Liter (ng/l);

f der Umrechnungsfaktor, hier: $f = 100$, in Prozent (%).

13.3 Wiederfindungsraten von internen Standards

Die Wiederfindungsraten von internen Standards werden nach Gleichung (4) berechnet:

$$A_{iIP} = \frac{\rho_{iIM}}{\rho_{iIE}} \cdot f \quad (4)$$

Dabei ist

A_{iIP} die Wiederfindungsrate des internen Standards I der Substanz i , in Prozent (%);

ρ_{iIM} die Massenkonzentration des internen Standards I der Substanz i in der Prüfprobe, in Nanogramm je Liter (ng/l);

ρ_{lie} die Massenkonzentration des internen Standards I der Substanz i in der Kalibrierprobe, in Nanogramm je Milliliter (ng/ml);

F der Umrechnungsfaktor, hier: $f = 100$, in Prozent (%).

ANMERKUNG 1 Die Wiederfindungsraten der internen Standards können im Analysenbericht aufgeführt werden, wenn die Massenkonzentration des internen Standards ρ_{lie} in der Kalibrierlösung auf einen Wert von 1 gesetzt wird.

ANMERKUNG 2 Die Wiederfindungsraten der internen Standards können durch Anwendung des Injektionsstandards geschätzt werden.

14 Berechnung der Konzentration in der Probe

Die Massenkonzentration ρ_{iP} der Substanz i in der Wasserprobe wird nach Gleichung (5) oder Gleichung (6) berechnet:

$$\rho_{iP} = \frac{\frac{y_{iM}}{y_{liM}} - a_i}{b_i} \cdot \rho_{liP} \quad (5)$$

$$\rho_{iP} = \rho_{iM} \cdot \frac{\rho_{lie}}{\rho_{liM}} \quad (6)$$

Dabei ist

ρ_{iP} die Massenkonzentration von Substanz i in der Wasserprobe, in Nanogramm je Liter (ng/l);

y_{iM} der Messwert der Substanz i in der Messlösung, Einheit auswertungsabhängig, z. B. Flächenwert;

y_{liM} der Messwert für den internen Standard I der Substanz i in der Messlösung, Einheit auswertungsabhängig, z. B. Flächenwert;

ρ_{liP} die vorgegebene Massenkonzentration des internen Standards I der Substanz i in der Probe, in Nanogramm je Liter (ng/l);

ρ_{iM} die Massenkonzentration von Substanz i in der Messlösung, in Nanogramm je Liter (ng/l);

ρ_{lie} die Massenkonzentration des internen Standards I der Substanz i in der Kalibrierprobe, in Nanogramm je Liter (ng/l);

ρ_{liM} die Massenkonzentration des internen Standards I der Substanz i in der Messlösung, in Nanogramm je Liter (ng/l);

a_i, b_i siehe Gleichung (2).

Eine Korrektur der Ergebnisse durch Blindproben ist nicht zulässig.

15 Angabe der Ergebnisse

Die bei der Anwendung dieses Dokuments erzielten Analyseergebnisse unterliegen einer Messunsicherheit. Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen. Die Massenkonzentrationen der Substanzen nach Tabelle 1 werden vorzugsweise in Nanogramm je Liter mit zwei signifikanten Stellen angegeben.

BEISPIEL Estron 11 ng/l

17-beta-Estradiol 1,2 ng/l

17-alpha-Ethinylestradiol 0,14 ng/l

16 Analysenbericht

Der Analysenbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) Angabe des verwendeten Verfahrens mit einer Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 13646:2024;
- b) Identität der Probe;
- c) Probenvorbereitung, Extraktion, Aufreinigung;
- d) Geräteanalyse;
- e) Angabe der Ergebnisse nach Abschnitt 15;
- f) Prüfdatum;
- g) Messunsicherheit nach ISO 11352 ($k = 2$);
- h) Angabe aller Umstände, die für die Interpretation der Ergebnisse relevant sind.

17 Verfahrenskennndaten

Die Verfahrenskennndaten werden anhand von zwei Ringversuchen für die Substanzen nach Tabelle 1 ermittelt, siehe Anhang A.