

DIN EN ISO 21676



ICS 13.060.50

Einsprüche bis 2021-07-14
Vorgesehen als Ersatz für
DIN 38407-47:2017-07

Entwurf

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe,
Transformationsprodukte und weiterer organischer Stoffe gelöst in
Wasser und gereinigtem Abwasser –
Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und
massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS oder -HRMS) nach
Direktinjektion (ISO 21676:2018);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 21676:2021**

Water quality –

Determination of the dissolved fraction of selected active pharmaceutical ingredients, transformation products and other organic substances in water and treated waste water – Method using high performance liquid chromatography and mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS or -HRMS) after direct injection (ISO 21676:2018);

German and English version prEN ISO 21676:2021

Qualité de l'eau –

Détermination de la fraction dissoute des ingrédients pharmaceutiques actifs sélectionnés, des produits de la transformation et d'autres substances organiques dans l'eau et dans l'eau résiduaire –

Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance et détection par spectrométrie de masse (CLHP-MS/MS ou -HRSM) après l'injection directe (ISO 21676:2018); Version allemande et anglaise prEN ISO 21676:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-05-14 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an 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 Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

Gesamtumfang 84 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 21676:2018 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 21676:2021 durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist Arbeitskreis NA 119-01-03-02-16 AK „LC-MS/MS-Verfahren“ des Unterausschusses NA 119-01-03-02 UA „Organische Verbindungen“ 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.

Das Verfahren beruht auf DIN 38407-47:2017-07, das in diesem Arbeitskreis erarbeitet wurde.

Bezeichnung des Verfahrens:

Bestimmung ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe, Transformationsprodukte und weiterer organischer Stoffe gelöst in Wasser und gereinigtem Abwasser - Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS oder –HRMS) nach Direktinjektion:

Verfahren DIN EN ISO 21676—F 47

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

ISO 1042	siehe	DIN EN ISO 1042
ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 4796-2	siehe	DIN EN ISO 4796-2
ISO 5667-5	siehe	DIN ISO 5667-5
ISO 5667-6	siehe	DIN EN ISO 5667-6
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 11352	siehe	DIN ISO 11352

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

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

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

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

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

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

Änderungen

Gegenüber DIN 38407-47:2017-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Titel wurde geändert;
- b) für den Ansatz der Stammlösungen darf neben Acetonitril auch Methanol verwendet werden;
- c) die Zwischenverdünnungen der internen Standards (z. B. mit einer Konzentration von jeweils etwa 1 µg/ml je markiertem Stoff) dürfen bei -15 °C ein Jahr gelagert werden;
- d) Lagerzeiten der Proben von mehr als 3 Wochen sind durch geeignete Maßnahmen (z. B. Einfrieren) erlaubt;
- e) für die Datenregistrierung eines Peaks 8 Punkte erforderlich;
- f) für den Routinebetrieb ist eine Mehrpunktekalibrierung mit mindestens drei Konzentrationsniveaus erforderlich;
- g) die Norm wurde redaktionell überarbeitet.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

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

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

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

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

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

DIN ISO 11352, *Wasserbeschaffenheit — Abschätzung der Messunsicherheit beruhend auf Validierungs- und Kontrolldaten*

<i>Titel de:</i>	Wasserbeschaffenheit — Bestimmung ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe, Transformationsprodukte und weiterer organischer Stoffe gelöst in Wasser und gereinigtem Abwasser — Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS oder -HRMS) nach Direktinjektion (ISO 21676:2018)
<i>Titel en:</i>	Water quality — Determination of the dissolved fraction of selected active pharmaceutical ingredients, transformation products and other organic substances in water and treated waste water — Method using high performance liquid chromatography and mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS or -HRMS) after direct injection (ISO 21676:2018)
<i>Titel fr:</i>	Qualité de l'eau — Détermination de la fraction dissoute des ingrédients pharmaceutiques actifs sélectionnés, des produits de la transformation et d'autres substances organiques dans l'eau et dans l'eau résiduaire — Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance et détection par spectrométrie de masse (CLHP-MS/MS ou -HRSM) après l'injection directe (ISO 21676:2018)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	10
3 Begriffe	10
4 Grundlage des Verfahrens	10
5 Störungen	10
5.1 Störungen bei der Probenvorbereitung	10
5.2 Störungen bei der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie	11
6 Reagenzien	11
7 Geräte	13
8 Probenahme	14
9 Durchführung	15
9.1 Allgemeines	15
9.2 Probenvorbereitung	15
9.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	15
9.4 Detektion	16
9.4.1 Allgemeines	16
9.4.2 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)	16
9.4.3 Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)	17
9.5 Blindwertmessungen	17
10 Kalibrierung	17
10.1 Allgemeines	17
10.2 Kalibrierung mit externem Standard	19
10.3 Kalibrierung mit internem Standard	19
11 Bestimmung von Wiederfindungsraten	20
11.1 Allgemeines	20
11.2 Berechnung der Analyt-Wiederfindungsraten anhand von Proben	21
11.3 Wiederfindungsraten von internen Standards	21
12 Auswertung	21
12.1 Bestätigung einzelner Substanzen	21
12.2 Berechnung der Einzelergebnisse durch Kalibrierung mit externem Standard	22
12.3 Berechnung der Einzelergebnisse durch Kalibrierung mit internem Standard	23
13 Angabe der Ergebnisse	23
14 Analysenbericht	23
Anhang A (informativ) Verfahrenskenndaten	24
Anhang B (informativ) Beispiele für Wiederfindungsraten	29

Anhang C (informativ) Beispiele für HPLC-Säulen und Chromatogramme	31
C.1 Chromatographische Bedingungen für das Chromatogramm in Bild C.1.....	31
C.2 Chromatographische Bedingungen für die Chromatogramme in Bild C.2	32
C.3 Chromatographische Bedingungen für das Chromatogramm in Bild C.3.....	33
C.4 Chromatographische Bedingungen für das Chromatogramm in Bild C.4.....	35
Anhang D (informativ) Beispiele für Detektion	37
Anhang E (informativ) Beispiele für Erweiterung des Verfahrens	40
Literaturhinweise.....	41

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 21676:2018 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ als prEN ISO 21676:2021 übernommen, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 21676:2018 wurde von CEN als prEN ISO 21676:2021 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-Direktiven, 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-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

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

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

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 dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung des gelösten Anteils ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe und Transformationsprodukte sowie weiterer organischer Substanzen (siehe Tabelle 1) in Trink-, Grund-, Oberflächen- und behandeltem Abwasser fest.

Der untere Anwendungsbereich des Verfahrens kann abhängig von der Empfindlichkeit der verwendeten Geräte und von der Matrix der Probe variieren. Für die meisten Verbindungen, für die dieses Dokument Anwendung findet, ist der Bereich $\geq 0,025 \mu\text{g/l}$ in Trink-, Grund- und Oberflächenwasser und $\geq 0,050 \mu\text{g/l}$ in behandeltem Abwasser.

Das Verfahren kann zur Bestimmung weiterer organischer Stoffe oder in anderen Wasserarten angewandt werden (z. B.: Brauchwasser), wenn die Richtigkeit im Einzelfall geprüft und nachgewiesen wurde und die Lagerbedingungen von Proben und Referenzlösungen validiert wurden. Tabelle 1 zeigt die Substanzen, für die eine Bestimmung nach der Methode getestet wurde. Tabelle E.1 enthält Beispiele für die Bestimmung anderer organischer Substanzen.

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

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

Trivialname Chemische Bezeichnung (IUPAC ^a)	Summen- formel	Molare Masse g/mol	CAS-RN ^b
Clofibrinsäure 2-(4-Chlorphenoxy)-2-methylpropionsäure	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	214,70	882-09-7
Dehydrato-Erythromycin (Anhydroerythromycin) (2R,3R,4S,5S,8R,9S,10S,11R,12R)-11-[[4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy]-5-ethyl-3-hydroxy-9-[(5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl)oxy]-2,4,8,10,12,14-hexamethyl-6,15,16-trioxatricyclo[10.2.1.1{1,4}]hexadecan-7-on	C ₃₇ H ₆₅ NO ₁₂	715,91	23893-13-2
Diazepam (RS)-7-Chlor-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284,74	439-14-5
Diclofenac 2-[2-[(2,6-Dichlorphenyl)amino]phenyl]essigsäure	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,15	15307-86-5
10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin (5S,6S)-5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrobenzo[b] [1]benzazepin-11-carboxamid	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃	270,29	58955-93-4
Erythromycin 6-(4-Dimethylamino-3-hydroxy-6-methyl-oxan-2-yl)oxy-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-4-(5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyl-oxan-2-yl)-oxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-1-oxacyclotetradecan-2,10-dion	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733,93	114-07-8
4-Formylaminoantipyrin N-(2,3-Dihydro-1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)formamid	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂	231,25	1672-58-8
Gemfibrozil 5-(2,5-Dimethylphenoxy)-2,2-dimethylpentansäure	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250,34	25812-30-0
Ibuprofen (RS)-2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propansäure	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,28	15687-27-1
Iomeprol (±)-N,N'-Bis-(2,3-dihydroxypropyl)-5-[(2-hydroxy-acetyl)methylamino]-2,4,6-triiodisophthalamid	C ₁₇ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₈	777,09	78649-41-9
Iopamidol (S)-N,N'-Bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-[(2-hydroxypropanoyl)amino]-2,4,6-triiodbenzol-1,3-dicarbamid	C ₁₇ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₃	777,08	60166-93-0
Iopromid (±)-N,N'-Bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-triiod-5-(2-methoxyacetamido)-N-methylisophthalamid	C ₁₈ H ₂₄ I ₃ N ₃ O ₈	791,12	73334-07-3

Trivialname Chemische Bezeichnung (IUPAC ^a)	Summen- formel	Molare Masse g/mol	CAS-RN ^b
Metoprolol (RS)-1-(Isopropylamino)-3-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]propan-2-ol	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	267,36	37350-58-6
Naproxen (S)-2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propionsäure	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230,26	22204-53-1
Oxazepam (RS)-7-Chlor-3-hydroxy-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	286,71	604-75-1
Phenazon 1,5-Dimethyl-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-3-on	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	188,23	60-80-0
Primidon 5-Ethyl-5-phenylhexahydropyrimidin-4,6-dion	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	218,25	125-33-7
Propyphenazon 1,5-Dimethyl-4-(1-methylethyl)-2-phenyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-on	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O	230,31	479-92-5
Roxithromycin (3R,4S,5S,6R,7R,9R,11S,12R,13S,14R)-6-[[[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy]-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-4-[[[(2R,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy]-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-10-(2,4,7-trioxa-1-azaocan-1-ylidene)-1-oxacyclotetradecan-2-on	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	837,05	80214-83-1
Sotalol (RS)-4'-(1-Hydroxy-2-isopropylaminoethyl)methansulfonanilid	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	272,36	3930-20-9
Sulfamethoxazol 4-Amino-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)benzen-sulfonamid	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,28	723-46-6
Temazepam (RS)-7-Chlor-3-hydroxy-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	300,74	846-50-4
Trimethoprim 2,4-Diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)pyrimidin	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,32	738-70-5
^a IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry ^b CAS-RN: Chemical Abstracts System Registration Number			

2 Normative Verweisungen

Auf die folgenden Dokumente wird im Text in solcher Weise so verwiesen, 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 1042, *Laboratory glassware — One-mark volumetric flasks*

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

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

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 5667-10, *Water quality — Sampling — Part 10: Guidance on sampling of waste waters*

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: Statistical evaluation of the linear calibration function*

3 Begriffe

Es werden keine Begriffe in diesem Dokument angegeben.

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 <http://www.electropedia.org/>

4 Grundlage des Verfahrens

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

5 Störungen

5.1 Störungen bei der Probenvorbereitung

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

5.2 Störungen bei der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

Peaktailing, Peakfronting und/oder verbreiterte Peaks sind Hinweise auf eine Fehlfunktion der HPLC und/oder Störungen, die während der Chromatographie auftreten. Einige Verbindungen neigen jedoch dazu, abhängig von den chromatographischen Bedingungen, mehr Signal-Tailing zu zeigen als andere.

Störungen durch Begleitsubstanzen (Matrix) können abhängig von der gemessenen Verbindung sowohl im positiven als auch im negativen Ionisationsmodus auftreten (z. B. Detektion von Diclofenac im negativen ESI-Modus).

Begleitstoffe (Matrix) können die Ionisation der Zielsubstanzen beeinträchtigen (z. B. Ionensuppression oder Signalverstärkung). Hierdurch können sich Unterbefunde oder Überbefunde bei der Quantifizierung ergeben. Diese Störungen können anhand von Wiederfindungsraten der Analyten (11.2 und Anhang B) oder interner Standards (10.3 und Tabelle D.3) erkannt und gegebenenfalls korrigiert werden.

6 Reagenzien

6.1 Allgemeines

Als Reagenzien werden, soweit erhältlich, solche des Reinheitsgrades „zur Analyse“ oder „zur Rückstandsanalyse“ verwendet. Der Gehalt an Verunreinigungen, die zum Blindwert beitragen bzw. zu Signalstörungen führen, muss vernachlässigbar gering sein. Dies muss regelmäßig geprüft werden (9.5).

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

ANMERKUNG Für die Anwendung geeignete Qualitäten hochreiner Lösemittel sind im Handel erhältlich.

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

6.1.2 Methanol, CH_3OH .

6.1.3 Acetonitril, CH_3CN .

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

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

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

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

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

6.1.9 Betriebsgase für das Massenspektrometer, nach Angaben des Geräteherstellers.

6.1.10 Referenzsubstanzen, Stoffe nach Tabelle 1, mit bekanntem Massenanteil.

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

Die internen Standards dürfen zu keiner Störung der Analyten führen (siehe 9.5).

6.2 Herstellung der Lösungen

6.2.1 Allgemeines

Die Lösungen interner Standardsubstanzen werden nur dann benötigt, wenn die Kalibrierung und Auswertung nach (10.3) bzw. (12.3) erfolgt.

Die Richtigkeit der Lösungen der Referenzsubstanzen mit einem Kontrollstandard (6.2.9) prüfen, z. B. bei der Durchführung der Kalibrierung (10.1).

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

6.2.2 Stammlösungen (Referenzsubstanzen/interne Standardsubstanzen)

Lösungen mit einer Massenkonzentration von z. B. 0,1 mg/ml der jeweiligen Substanz ansetzen.

Hierfür z. B. je 5 mg einer Substanz (6.1.10) in jeweils einem 50-ml-Messkolben (7.2) vorlegen, mit Acetonitril (6.1.3) oder Methanol (6.1.2) lösen und die Lösung mit dem Lösemittel bis zur Marke auffüllen.

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

Die Lösungen unter -15°C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie sind unter diesen Bedingungen ein Jahr haltbar.

6.2.3 Zwischenverdünnung-A (Referenzsubstanzen)

Zwischenverdünnung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von jeweils z. B. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ herstellen.

Hierfür z. B. je 0,5 ml der jeweiligen Stammlösung (6.2.2) der Referenzsubstanzen in einem 50-ml-Messkolben (7.2) vorlegen und die Lösung mit Acetonitril (6.1.3) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung unter -15°C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie ist unter diesen Bedingungen ein Jahr haltbar.

6.2.4 Zwischenverdünnung-B (Referenzsubstanzen)

Zwischenverdünnung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von jeweils z. B. 50 ng/ml herstellen.

Hierfür z. B. 0,5 ml der Zwischenverdünnung-A (6.2.3) in einem 10-ml-Messkolben (7.2) vorlegen und die Lösung mit Wasser (6.1.1) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung bei 2°C bis 8°C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie ist unter diesen Bedingungen einen Monat haltbar.

Die Lösung für die Aufstockung von Proben mit den Analyten zur Bestimmung der Wiederfindungsraten (11.2) verwenden.

6.2.5 Zwischenverdünnung-C (Referenzsubstanzen)

Zwischenverdünnung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von jeweils z. B. 5 ng/ml herstellen.

Hierfür z. B. 0,25 ml der Zwischenverdünnung-A (6.2.3) in einem 50-ml-Messkolben (7.2) vorlegen und die Lösung mit Wasser (6.1.1) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung bei 2°C bis 8°C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie ist unter diesen Bedingungen einen Monat haltbar.

6.2.6 Zwischenverdünnung-D (interne Standards)

Zwischenverdünnung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von jeweils 1 µg/ml herstellen.

Hierfür z. B. je 0,5 ml der jeweiligen Stammlösung (6.2.2) der internen Standardsubstanzen in einem 50-ml-Messkolben (7.2) vorlegen und die Lösung mit Acetonitril (6.1.3) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung bei unter –15 °C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie ist unter diesen Bedingungen ein Jahr haltbar.

6.2.7 Zwischenverdünnung-E (interne Standards)

Zwischenverdünnung mit einer Massenkonzentration der Substanzen von jeweils z. B. 50 ng/ml herstellen.

Hierfür z. B. 0,5 ml der Zwischenverdünnung-D (6.2.6) in einem 10-ml-Messkolben (7.2) vorlegen und die Lösung mit Wasser (6.1.1) bis zur Marke auffüllen.

Die Lösung bei 2 °C bis 8 °C vor Licht und Verdunstung geschützt aufbewahren; sie ist unter diesen Bedingungen einen Monat haltbar.

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

6.2.8 Kalibrierproben

Die Kalibrierproben durch entsprechende Verdünnungen der Zwischenverdünnung-C (6.2.5) herstellen. Bei Kalibrierung mit internem Standard (siehe 10.3) jeder Kalibrierprobe die gleiche Menge an internen Standards zusetzen.

Kalibrierproben ansetzen, z. B. Lösungen in der die Massenkonzentration der zu bestimmenden Stoffe jeweils 0,025 µg/l und die der internen Standardsubstanzen jeweils 0,250 µg/l entspricht (siehe 10.1).

Hierfür z. B. 50 µl der Zwischenverdünnung-C (6.2.5) in einem 10-ml-Messkolben vorlegen, 50 µl der Zwischenverdünnung-E (6.2.7) zufügen und die Lösung bis zur Marke auffüllen, z. B. mit Wasser (6.1.1).

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

ANMERKUNG Bei Kalibrierlösungen, die in Reinstwasser angesetzt werden, können sich Unterbefunde bei den Makroliden einstellen. In einem solchen Fall wird einer matrixangepassten Kalibrierung anstelle der Verwendung von Reinstwasser der Vorzug gegeben.

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

6.2.9 Kontrollstandard

Der Kontrollstandard ist eine von den Stammlösungen unabhängig hergestellte Lösung der Referenzsubstanzen, z. B. eine Lösung einer anderen Charge oder eines anderen Herstellers. Die Lösung sollte alle zu bestimmenden Substanzen enthalten.

7 Geräte

Geräte oder Geräteteile, die mit der Wasserprobe in Berührung kommen, dürfen keine Blindwerte für die nach dieser Methode gemessenen Verbindungen aufweisen. Alle verwendeten Geräte sollten vorzugsweise aus Glas, nicht rostendem Stahl oder Polytetrafluorethen (PTFE) bestehen.

7.1 Enghals-Standflaschen, vorzugsweise aus braunem Glas mit NS-Glasstopfen, z. B. Laborflasche, Volumen 250 ml, nach ISO 4796-2 — NS 250.

7.2 Messkolben, Nennvolumen 10 ml, 25 ml und 50 ml, z. B. Messkolben ISO 1042 — A50-C.

7.3 Mikroliterspritzen

7.4 Spritzenvorsatzfilter, mit geringem Totvolumen, z. B. Durchmesser 13 mm mit Membran aus regenerierter Cellulose.

Die Filtration sollte nicht zu wesentlichen Verlusten einzelner Substanzen führen. Der verwendete Filtertyp muss durch Prüfung ausgewählt werden. Sicherstellen, dass durch die Filtration keine Kontamination oder kein wesentlicher Substanzverlust auftritt. Hierzu Blindproben und Referenzsubstanzlösungen durch die gleichen Filter filtrieren.

7.5 Probenvials, passend zum Probenaufgabesystem, z. B. Rollrandflasche, Nennvolumen 1,5 ml mit Bördelkappe und Septum aus Gummi/PTFE.

ANMERKUNG Um Verluste bei den Makroliden gering zu halten, können in einem zusätzlichen Lauf Probenvials aus Polyethylen (PE) verwendet werden.

7.6 HPLC-Säule, vorzugsweise mit Vorsäule, geeignet für die Chromatographie der ausgewählten Stoffe, Beispiele siehe Anhang C.

7.7 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph, gekoppelt mit Massenspektrometer, bestehend im Einzelnen aus:

7.7.1 Entgasungseinrichtung, z. B. Vakuum-Entgaser.

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

7.7.3 Manuelles oder automatisches Probenaufgabesystem.

7.7.4 Vorrichtung zur Thermostatisierung der Trennsäule, z. B. Säulenthermostat.

7.7.5 Massenspektrometrischer Detektor (MS/MS, HRMS), vorzugsweise mit Electrospray Ionisation (ESI).

8 Probenahme

Proben unter Berücksichtigung der Festlegungen nach ISO 5667-4, ISO 5667-5, ISO 5667-6, ISO 5667-10 und ISO 5667-11 nehmen.

Zur Probenahme Standflaschen (7.1) verwenden und die Flaschen vollständig mit dem zu untersuchenden Wasser füllen.

Bei der Entnahme von Trinkwasser, das Oxidationsmittel enthalten kann, etwa 50 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat (6.1.8) je Liter zufügen.

Wasserprobe so bald wie möglich nach der Probenahme analysieren.

Proben bei Temperaturen von $(3 \pm 2)^\circ\text{C}$ vor Licht geschützt aufbewahren, jedoch nicht länger als drei Wochen.

ANMERKUNG Wenn längere Lagerzeiten erforderlich sind und/oder bei vermuteter oder bestätigter Instabilität einzelner Substanzen können geeignete Maßnahmen getroffen werden (z. B. Konservierung durch Einfrieren von Proben).

9 Durchführung

9.1 Allgemeines

Die Durchführung des Verfahrens ist abhängig von der Art der Kalibrierung und den Maßnahmen, die zur Erkennung und gegebenenfalls zur Korrektur von Matrixeinflüssen vorgesehen werden.

9.2 Probenvorbereitung

Wenn die Probe erkennbar nicht frei von Partikeln ist, die Probe über ein Spritzenvorsatzfilter (7.4) filtrieren.

Durch Filtration der Probe können durch Sorption Verluste bei den Analyten, besonders bei hydrophoben Stoffen (z. B. Makrolide) auftreten. In diesem Fall die Probe vor der Chromatographie nicht filtrieren, sondern zum Schutz der Trennsäule vor Partikeln ein Inline-Filter verwenden.

Bei Kalibrierung mit externem Standard (10.2) gegebenenfalls ein Aliquot der Probe für die Bestimmung der Wiederfindungsraten entnehmen (11.2).

Bei interner Standardisierung (10.3) der Probe interne Standards zusetzen. Die zugesetzte Menge so wählen, dass die Massenkonzentrationen der internen Standards in der Probe denen in den Kalibrierproben (6.2.8) entsprechen.

Die durch Zugabe von Reagenzien verursachte Verdünnung der Probe bei der Berechnung der Einzelergebnisse (12.2) berücksichtigen, soweit sie mehr als 1 % beträgt.

Früh eluierende Analyten, z. B. Metformin (siehe Tabelle E.1) hinsichtlich Retentionszeit und Peakform kontrollieren. Der Anteil an organischen Lösemitteln in einer vorbereiteten Probe darf zu keiner zusätzlichen Peakverbreiterung führen.

9.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC-Gerät nach den Anleitungen des Geräteherstellers betreiben.

Zur chromatographischen Trennung eine geeignete HPLC-Säule (7.6) verwenden und die Trennung der Analyten durch Gradientenelution optimieren.

Die chromatographischen Bedingungen so wählen, dass eine optimale Empfindlichkeit bei der massenspektrometrischen Detektion erzielt wird (siehe Anhang C für Beispiele).

ANMERKUNG 1 Hinsichtlich der Empfindlichkeit ist bei den meisten Substanzen die Verwendung von Gradienten mit Acetonitril/Wasser/Essigsäure vorteilhaft.

ANMERKUNG 2 Bei gleicher linearer Fließgeschwindigkeit des Eluenten ergeben Säulen mit geringem Innendurchmesser bessere Empfindlichkeiten, als solche mit weiterem Querschnitt.

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

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

Substanzen, die massenspektrometrisch nicht vollständig voneinander aufgelöst werden können, chromatographisch trennen. In diesen Fällen sollte die chromatographische Auflösung R mindestens $R = 1,2$ betragen.

Das Injektionsvolumen so bemessen, dass sich keine störende Peakverbreiterung oder Störungen der quantitativen Bestimmung ergeben.

ANMERKUNG 3 Für größere Injektionsvolumen, z.B. 1 ml, ist die Verwendung von Säulenschalttechniken mit geeigneten Anreicherungssäulen möglich. Dies liegt jedoch außerhalb des Anwendungsbereichs dieser Methode.

Die Standardabweichung der Retentionszeit während der Erstbewertung des Verfahrens einmal prüfen. Sie darf den Wert von 0,03 min bei sechs aufeinanderfolgenden Chromatogrammen nicht überschreiten.

9.4 Detektion

9.4.1 Allgemeines

Massenspektrometer nach den Anleitungen des Geräteherstellers betreiben und richtige Einstellungen für das Gerät wählen.

Für die Ionisierung der Stoffe wird üblicherweise der ESI-Modus bevorzugt. Dabei werden meistens Quasi-Molekül-Ionen von Typ $[M+H]^+$ bzw. $[M-H]^-$ gebildet. In Einzelfällen ist unter bestimmten chromatographischen Bedingungen auch die Bildung von Addukten, z. B. $[M+NH_4]^+$ oder $[M+Na]^+$, möglich.

Die meisten Substanzen der Tabelle 1 können im positiven ESI-Modus detektiert werden. Die im negativen ESI-Modus nachzuweisenden Substanzen können in einem Lauf durch Polaritätswechsel oder in einem getrennten Lauf analysiert werden (Tabelle D.1).

Bei simultaner Detektion negativer und positiver Ionen, die Schaltzeiten für den Polaritätswechsel so kurz wählen, dass eine ausreichende Anzahl an Datenpunkten erhalten wird.

Jeder Peak muss mit mindestens acht Datenpunkten registriert werden.

Die verfahrensspezifischen Einstellungen für die Quellenparameter und MS-Parameter unter Beachtung der weniger empfindlichen Substanzen, z. B. Ibuprofen, ermitteln und festlegen.

ANMERKUNG Üblicherweise wird das Messsignal vor der Peakintegration geglättet. Hierbei kann, je nach Rechenverfahren, eine zu geringe Anzahl an Datenpunkten zu einem unverhältnismäßig hohen Verlust an Signalintensität führen. Besonders bei niedrigen Flächen- bzw. Höhenwerten kann außerdem die Reproduzierbarkeit der Peakintegration bei wenigen Datenpunkten beeinträchtigt werden.

Substanzen, die massenspektrometrisch nicht vollständig voneinander getrennt werden können, chromatographisch voneinander trennen (9.3).

9.4.2 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Für jede Substanz im positiven oder negativen Modus, je nach den chemischen Eigenschaften der Substanz, die jeweils optimalen Einstellungen für die Ionisierung unter den festgelegten chromatographischen Bedingungen ermitteln.

Substanzspezifische Einstellungen so wählen, dass nach Möglichkeit für jede Substanz zwei Produkt-Ionen erhalten werden. Bei Substanzen, die nur zu einem detektierbaren Produkt-Ion fragmentieren, wenn möglich, einen zweiten Massenübergang bezogen auf die Isotopenmasse von z. B. ^{37}Cl optimieren (Tabelle D.1). Um Störungen in diesen Fällen bei der Quantifizierung zu vermeiden, nur interne Standards verwenden, deren relative molare Massen mindestens um vier Masseneinheiten höher liegen, als die der Zielsubstanzen. Beispiele sind in Tabelle D.3 angegeben.

9.4.3 Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)

Bei Verwendung eines Massenspektrometers mit Hochauflösung im Fullscan-Modus liegt zu jedem Zeitpunkt der Chromatographie ein vollständiges Massenspektrum vor.

Die Einhaltung der Massengenauigkeit (12.1) und der Auflösung über den Massenbereich und über das gesamte Chromatogramm sicherstellen und kontrollieren.

Das Auflösungsvermögen so wählen, dass eine ausreichende Abtrennung der Untergrundsignale bzw. Matrixsignale erfolgt.

Wenn möglich, die Messmethode so einrichten, dass für jeden Analyten mindestens ein Produkt-Ion für die Bestätigung (12.1) erhalten wird.

Bei der Wahl isotoopenmarkierter Standards darauf achten, dass der Massenunterschied zum nichtmarkierten Analyten mindestens drei Masseneinheiten beträgt, um Interferenzen mit den Isotopensignalen des Analyten zu vermeiden. Beispiele sind in Tabelle D.3 angegeben.

9.5 Blindwertmessungen

Regelmäßig Blindwertmessungen über das Gesamtverfahren durchführen, um sicherzustellen, dass weder das Gerät noch die Reagenzien Störungen verursachen.

Zur Durchführung der Blindwertmessungen, z. B. Wasser (6.1.1), injizieren.

Treten störende Blindwerte auf (über 50% der niedrigsten in Analysenberichten anzugebenden Konzentration), die Ursache hierfür durch systematische Untersuchungen klären und Kontaminationsquellen beseitigen.

10 Kalibrierung

10.1 Allgemeines

Die Kalibrierung des Bestimmungsverfahrens ist unter festgelegten chromatographischen Bedingungen durchzuführen. Die Retentionszeiten der einzelnen Analyten und gegebenenfalls der internen Standardsubstanzen müssen bekannt sein. Sie können bei Injektion von Mehrkomponentengemischen oder Lösungen einzelner Stoffe anhand der Masse der Produkt-Ionen bzw. Quasimolekül-Ionen unter den vorgegebenen chromatographischen Bedingungen ermittelt werden.

Wie folgt vorgehen:

- Das gesamte Bestimmungsverfahren so gestalten, dass sich für jede zu bestimmende Substanz eine lineare Abhängigkeit des Messsignals von der Konzentration ergibt.
- Hierzu den linearen Arbeitsbereich des Messgerätes durch Injektion von mindestens fünf Kalibrierproben (6.2.8) unterschiedlicher Konzentration für jede zu bestimmende Substanz ermitteln (siehe ISO 8466-1).
- Einen linearen Kalibrierbereich wählen, der die realen Konzentrationen abdeckt, z. B. für die Untersuchung von Trink-, Grund- und Oberflächenwasser einen Kalibrierbereich von 0,025 µg/l bis 1 µg/l.

Das niedrigste Konzentrationsniveau des Kalibrierbereiches muss größer oder gleich der Bestimmungsgrenze sein. Die Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze erfolgt nach dokumentierten Verfahren, z. B. nach ISO 8466-1.

- Für den Routinebetrieb ist es ausreichend, eine Mehrpunktekalibrierung mit mindestens drei Konzentrationsniveaus durchzuführen.
- Für eine Mehrpunktekalibrierung die Konzentrationsniveaus gleichmäßig über den Kalibrierbereich verteilen und die Kalibrierung nach ISO 8466-1 durchführen.
- Das Injektionsvolumen bei der Kalibrierung und bei der Probenmessung gleich halten.

Die für eine Substanz ermittelte Kalibrierfunktion gilt nur für den abgedeckten Konzentrationsbereich. Sie ist außerdem abhängig vom Betriebszustand des Messsystems und muss in jeder Untersuchungsserie geprüft werden.

Für die Aufstellung der Kalibrierfunktionen werden zwei Arbeitsweisen beschrieben:

- a) Kalibrierung mit externem Standard;
- b) Kalibrierung mit internem Standard.

Die Kalibrierung mit internem Standard wird bevorzugt und dringend empfohlen, wenn isoto­penmarkierte Standards verfügbar sind.

Bei der Untersuchung von Trink-, Grund- und Oberflächenwasser führt die Kalibrierung mit externem Standard (10.2) ohne Korrektur durch Wiederfindungsraten zu Ergebnissen, die bei den meisten Substanzen der Tabelle 1 nicht mehr als 25 % vom wahren Wert abweichen. Ausnahmen können sich besonders bei polaren Substanzen geringer Retention ergeben, z. B. bei einigen Röntgenkontrastmitteln, bei denen durch Matrixeinfluss höhere systematische Abweichungen auftreten können. Hier kann die Verwendung interner Standards (10.3) bzw. die Korrektur mit probenspezifischen Wiederfindungsraten (11.2) erforderlich sein.

Matrixeffekte können insbesondere in Proben von gereinigtem Abwasser auftreten und sich hier über einen weiteren Bereich der Chromatographie störend auf die quantitative Bestimmung infolge von Ionensuppression oder -verstärkung auswirken. Durch Verdünnung der Probe kann der Einfluss von Matrix verringert werden.

ANMERKUNG 1 Durch Korrektur mit probenspezifischen Wiederfindungsraten (11.2) und auch durch interne Standardisierung (10.3) wird der Beitrag der Abweichung zur Messunsicherheit erhöht. Weiterhin kann die Korrektur zu überhöhten Werten führen. Zur Bestätigung quantitativer Ergebnisse kann das Verfahren der Standardaddition mit mehreren Aufstockungen angewandt werden.

Matrixeffekte können von den Arbeitsbedingungen oder vom Typ und Zustand des Gerätes abhängig sein und müssen bei der Anwendung des Verfahrens für die zu untersuchenden Probentypen ermittelt werden, z. B. durch die Bestimmung von Wiederfindungsraten. Die Zusammensetzung der Kalibrierproben (6.2.8) sollte, wenn möglich, der Zusammensetzung der zu untersuchenden Proben ähnlich sein.

ANMERKUNG 2 Matrixeffekte können auch mittels Nachsäuleninfusion von Analyten oder internen Standards über die gesamte Zeit der Chromatographie realer Proben an einer Abnahme der Intensität erkannt werden.

Tabelle 2 erläutert die im nachfolgenden Text und Formeln verwendeten Indizes.

Tabelle 2 — Bedeutung der Indizes

Index	Bedeutung
<i>i</i>	Identität der Substanz
<i>j</i>	Fortlaufende Zahl bei Wertepaaren
<i>e</i>	Messgrößen bei der Kalibrierung

Index	Bedeutung
a	Messgrößen bei Aufstockung
I	Interner Standard
M	Messlösung
P	Probe
A	Aufstockung

10.2 Kalibrierung mit externem Standard

Zur Erstellung der Kalibrierung Kalibrierproben (6.2.8) injizieren.

Die Kalibrierfunktionen graphisch darstellen. Hierzu die Messwerte y_{ie} für jede Substanz i auf der Ordinate und die zugehörige Massenkonzentration ρ_{ie} auf der Abszisse auftragen.

Aus den Wertepaaren y_{iej} und ρ_{iej} durch lineare Regression die Bezugsgerade entsprechend Gleichung (1) ermitteln:

$$y_{ie} = b_i \cdot \rho_{ie} + a_i \quad (1)$$

Dabei ist

- y_{ie} der Messwert (abhängige Variable) der Substanz i bei der Kalibrierung als Fuktion von ρ_{ie} , z. B. Flächenwert;
- b_i die Steigung der Bezugsgeraden der Substanz i (entsprechend dem stoffspezifischen Responsefaktor), z. B. Flächenwert $\times$ Liter je Mikrogramm (l/ μ g);
- ρ_{ie} die Massenkonzentration (unabhängige Variable) der Substanz i in der Kalibrierprobe, in Mikrogramm je Liter (μ g/l);
- a_i der Achsenabschnitt der Bezugsgeraden der Substanz i auf der Ordinate, z. B. Flächenwert.

10.3 Kalibrierung mit internem Standard

Die Nutzung interner Standards für die quantitative Analyse kann Störungen, die bei der massenspektrometrischen Messung auftreten können, kompensieren (siehe Abschnitt 5).

Der interne Standard darf nicht in der zu untersuchenden Wasserprobe enthalten sein. Er sollte der zu bestimmenden Substanz chemisch ähnlich sein und sollte sich bei der Filtration, der Chromatographie und der massenspektrometrischen Messung so verhalten, wie die zu bestimmende Substanz.

Verbindungen als interne Standards verwenden, die den zu untersuchenden Stoffen gleichen, aber mit unterschiedlichen Isotopen strukturiert sind, z. B. deuterierte oder ^{13}C -markierte Verbindungen (siehe Tabelle D.3).

Analyten, für die keine isotoopenmarkierten Verbindungen verfügbar sind, dürfen über andere interne Standards ausgewertet werden, wenn sichergestellt und dokumentiert wurde, dass die durch Aufstockung ermittelte Wiederfindungsrate des Analyten bei den untersuchten Probenotypen im gleichen Bereich liegt, wie die Wiederfindungsrate des ausgewählten internen Standards.

Für die Erstellung der Kalibrierung Kalibrierproben (6.2.8) injizieren, die alle zu bestimmenden Substanzen und die internen Standards (6.1.11) enthalten.

Zur graphischen Darstellung der Kalibrierfunktionen für jede Substanz i die Verhältnisse der Messwerte y_{ie}/y_{Iie} auf der Ordinate und die zugehörigen Verhältnisse der Massenkonzentrationen ρ_{ie}/ρ_{Iie} auf der Abszisse auftragen.

Aus den Wertepaaren y_{iej}/y_{Iiej} und ρ_{iej}/ρ_{Iiej} durch lineare Regression die Bezugsgeraden nach Gleichung (2) ermitteln:

$$\frac{y_{ie}}{y_{Iie}} = b_{Ii} \cdot \frac{\rho_{ie}}{\rho_{Iie}} + a_{Ii} \quad (2)$$

Dabei ist

- y_{ie} siehe Gleichung (1);
- y_{Iie} der Messwert des internen Standards I der Substanz i bei der Kalibrierung, z. B. Flächenwert;
- ρ_{ie} siehe Gleichung (1);
- ρ_{Iie} die Massenkonzentration des internen Standards I der Substanz i in der Kalibrierprobe, in Mikrogramm je Liter ($\mu\text{g/l}$);
- b_{Ii} die Steigung der Bezugsgeraden y_{ie}/y_{Iie} abhängig vom Verhältnis ρ_{ie}/ρ_{Iie} der Substanz i , dimensionslos;
- a_{Ii} der Achsenabschnitt der Bezugsgeraden auf der Ordinate der Substanz i ; z. B. Flächenwert, dimensionslos.

11 Bestimmung von Wiederfindungsraten

11.1 Allgemeines

Wiederfindungsraten der Analyten können Hinweise auf Matrixeinflüsse geben. Sie sind z. B. durch Aufstockung der Probe nach 11.2 zu ermitteln.

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

Bei Kalibrierung und Berechnung mit internem Standard (10.3, 12.3) sind die Wiederfindungsraten der internen Standards ein Maß für die Beurteilung der Gültigkeit der instrumentellen Analytik. Sie sind nach 11.3 zu ermitteln.

Die probenspezifischen Wiederfindungsraten des Analyten bzw. eines internen Standards für den Analyten müssen in einem Bereich von 50 % bis 150 % liegen.

ANMERKUNG 2 Eine geringe Wiederfindungsrate führt zu einer größeren Bestimmungsgrenze und Messunsicherheit.

11.2 Berechnung der Analyt-Wiederfindungsraten anhand von Proben

Zur Ermittlung der Wiederfindungsraten die Probe mit den Analyten aufstocken, z. B. durch Zugabe von 50 µl Zwischenverdünnung-B (6.2.4) zu 5 ml Probe. Die Probe ohne und mit der Aufstockung über das gesamte Verfahren analysieren.

Die Aufstockung sollte im mittleren Arbeitsbereich, z. B. 0,5 µg/l, liegen. Die Massenkonzentrationen der Analyten in der aufgestockten Probe dürfen den Kalibrierbereich dabei nicht überschreiten, gegebenenfalls muss die Probe vor der Aufstockung verdünnt werden.

Wiederfindungsrate A_{iP} für die Substanz i in der Probe nach Gleichung (3) berechnen:

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

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, berechnet nach Gleichung (1), in Mikrogramm je Liter (µg/l);
- ρ_i die ermittelte Massenkonzentration für die Substanz i in der nicht aufgestockten Probe, berechnet nach Gleichung (1), in Mikrogramm je Liter (µg/l);
- ρ_{iA} die zugesetzte Massenkonzentration für die Substanz i in der mit Analyt aufgestockten Probe, in Mikrogramm je Liter (µg/l);
- f der Umrechnungsfaktor, hier: $f = 100$, in Prozent (%).

11.3 Wiederfindungsraten von internen Standards

Wiederfindungsraten von internen Standards nach Gleichung (4) berechnen:

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

Dabei ist

- A_{iIP} die Wiederfindungsrate des internen Standards I der Substanz i , in Prozent (%);
- ρ_{iIM} die bestimmte Massenkonzentration des internen Standards I der Substanz i in der Messlösung, in Mikrogramm je Liter (µg/l);
- ρ_{iIE} siehe Gleichung (2);
- f siehe Gleichung (3).

12 Auswertung

12.1 Bestätigung einzelner Substanzen

Bei Verwendung einer HPLC-MS/MS-Methode gilt eine Substanz in einer Probe als nachgewiesen, wenn

- a) im MS/MS-Chromatogramm der Massenspur eines Produkt-Ions dieser Substanz ein Signal registriert wird, dessen Retentionszeit mit der unter Standardbedingungen ermittelten Retentionszeit der entsprechenden Referenzsubstanz innerhalb einer Grenzabweichung von $\pm 0,15$ min übereinstimmt und
- b) auf einer weiteren Massenspur ein zweites Produkt-Ion aus dem gleichen Vorläufer-Ion oder aus einem anderen Vorläufer-Ion dieser Substanz zur gleichen Retentionszeit erkannt wird und

- c) die Intensitäten der Produkt-Ionen in einem Verhältnis zu einander stehen, das dem unter Standardbedingungen für die Referenzsubstanz ermittelten Verhältnis für diese Ionen innerhalb einer Grenzabweichung von $\pm 30\%$ entspricht. An der unteren Anwendungsgrenze und insbesondere an der Bestimmungsgrenze des Analysenverfahrens darf die Grenzabweichung bis zu 50% betragen.

Bei Verwendung einer HPLC-HRMS-Methode darf eine Massenabweichung von 5 ppm^1 zwischen der gemessenen (akkuraten) Masse und der theoretischen (exakten) Masse der Substanz bzw. des Ions dieser Substanz nicht überschritten werden. Unter diesen Bedingungen gilt eine Substanz in einer Probe als nachgewiesen, wenn

- im HRMS-Chromatogramm der Massenspur eines Quasi-Molekül-Ions (oder Addukt-Ions) dieser Substanz ein Signal registriert wird, dessen Retentionszeit mit der unter gleichen Bedingungen ermittelten Retentionszeit der entsprechenden Referenzsubstanz innerhalb einer Grenzabweichung von $\pm 0,15 \text{ min}$ übereinstimmt und
- zur gleichen Retentionszeit ein Signal mindestens eines Produkt-Ions dieser Substanz erkannt wird.

ANMERKUNG Üblicherweise wird bei Anwendung von HRMS/MS ein Produkt-Ionenspektrum mit exakter Masse erhalten.

Die Substanz gilt auch dann als nachgewiesen, wenn anstelle eines Produkt-Ions dieser Substanz im HRMS-Chromatogramm die Massenspur eines Isotops des Quasi-Molekül-Ions, z. B. ^{37}Cl , ^{81}Br , zur gleichen Retentionszeit erkannt wird und dessen Intensitätsverhältnis innerhalb einer Grenzabweichung von $\pm 30\%$ liegt. An der unteren Anwendungsgrenze und insbesondere an der Bestimmungsgrenze des Analysenverfahrens darf die Grenzabweichung bis zu 50% betragen.

Für Analyten mit gleicher Retentionszeit und identischer Elementzusammensetzung muss die Bestätigung durch ein Produkt-Ion erfolgen. Sind auch diese Massen identisch, ist eine chromatographische Trennung der Analyten zwingend erforderlich.

Werden die Anforderungen für eine Bestätigung nur zum Teil erfüllt, z. B. bei nur einem Produkt-Ion ausreichender Intensität in einer HPLC-MS/MS-Methode, kann ein positiver Befund, wenn nach fachlichem Bemessen notwendig, abgesichert werden durch

- die Anwendung einer anderen Ionisierungstechnik, die zu anderen Ionen führt, z. B. ESI neg. oder APCI;
- die Retentionszeit mit einer HPLC-Säule anderer Selektivität.

12.2 Berechnung der Einzelergebnisse durch Kalibrierung mit externem Standard

Massenkonzentration ρ_{iP} der Substanz i in der Wasserprobe nach Gleichung (5) berechnen:

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

Dabei ist

- ρ_{iP} die Massenkonzentration der Substanz i in der Wasserprobe, in Mikrogramm je Liter ($\mu\text{g/l}$);
 y_{iM} der Messwert der Substanz i in der Messlösung, z. B. Flächenwert;
 f siehe Gleichung (3) (nur bei Verwendung von Wiederfindungsraten zur Berechnung);
 a_i, b_i siehe Gleichung (1);
 A_{iP} siehe Gleichung (3) und 10.1 (nur bei Verwendung von Wiederfindungsraten zur Berechnung).

1 Parts per million (ppm) ist eine veraltete Einheit, die vom International System of Units, SI, nicht akzeptiert wird.