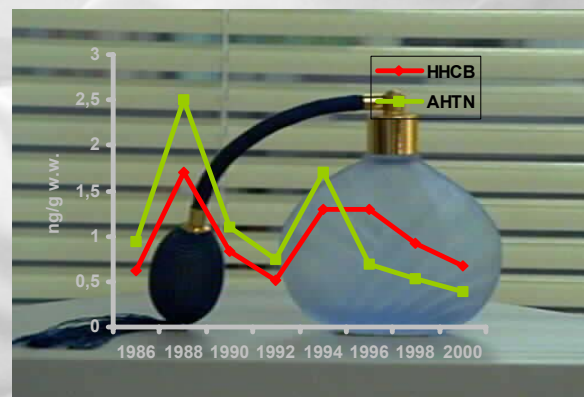


Verfolgung von Umweltbelastungen durch Moschusverbindungen in repräsentativen Umweltproben - Teil I

Fraunhofer IME
im Auftrag des
Umweltbundesamtes

Februar 2005



Fraunhofer
Institut
Molekularbiologie und
Angewandte Oekologie

Umwelt
Bundes
Amt 
Für Mensch und Umwelt

Abschlussbericht

Verfolgung von Umweltbelastungen durch Moschusverbindungen in repräsentativen Umweltproben

Methodische Entwicklung und aktuelles sowie retrospektives Monitoring

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und
Angewandte Oekologie
57392 Schmallenberg

Institutsleitung

Prof. Dr. Rainer Fischer

Stellvertretung und Bereichsleitung

Angewandte Oekologie

Prof. Dr. Andreas Schäffer

Prüfleitung

Dr. Andrea Wenzel

Walter Böhmer

Auftraggeber

Umweltbundesamt

Fachgebiet IV 2.2

Februar 2005



Verfolgung von Umweltbelastungen durch Moschusverbindungen in repräsentativen Umweltproben

Methodische Entwicklung und aktuelles sowie retrospektives Monitoring

Der Bericht besteht aus 2 Teilen:

Teil I: Analytische Bestimmung von Nitro- und polycyclischen Moschusverbindungen in Umweltproben

Prüfauftrag-Codes: K-UBA-005/7-61 und K-UBA-013/7-61 (gelten nur für Teil I)

Dipl.-Ing. (FH) Walter Böhmer, Dr. Josef Müller, Thorsten Bernhardt

Teil II: Bewertung der Analysen von Nitro- und polycyclischen Moschusverbindungen in Umweltproben

Dr. Andrea Wenzel, Dr. Peter Lepper



Abschlussbericht

Verfolgung von Umweltbelastungen durch Moschusverbindungen in repräsentativen Umweltproben

**Teil I: Analytische Bestimmung von Nitro- und polycyclischen Moschusverbindungen in
Umweltproben**

Prüfauftrag-Code: K-UBA-005/7-61 und K-UBA-013/7-61

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und
Angewandte Oekologie
57392 Schmallenberg

Institutsleitung
Prof. Dr. Rainer Fischer

**Stellvertretung und Bereichsleitung
Angewandte Oekologie**
Prof. Dr. Andreas Schäffer

Prüfleiter
Walter Böhmer
Dr. Josef Müller

Bearbeitung
Thorsten Bernhardt

Auftraggeber
Umweltbundesamt
Fachgebiet IV 2.2
Seecktstraße 6 – 10
13581 Berlin

22. Februar 2005



Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Überblick und Vorwort	3
2. Abkürzungen	4
3. Zusammenfassung	6
4. Aufgabenstellung	10
5. Probenkennzeichnung und SOP-Liste	10
6. Methode und Qualitätssicherung	11
6.1. Analytische Methode	11
6.2. Grund-Kalibrierung des Mess-Systems und Analytische Standards	12
6.3. Matrix-Kalibrierung	13
6.4. Verfahrens-Leerwerte und Bestimmungsgrenze	17
6.5. Methoden-Präzision	18
6.5.1. Ermittlung der Mess- und Ergebnisunsicherheit nach dem EURACHEM-Konzept	18
6.5.2. Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit an UPB-Proben	20
6.5.3. Routine-Qualitätssicherung im Jahr 2004	22
6.5.4. Beurteilung der analytischen Methode	22
7. Ergebnisse und Ergebnisberechnung	24
8. Literatur	30
Anhang I Analytisches Verfahrens	31
Anhang II Kopie der Akkreditierungsurkunde	43

1. Überblick und Vorwort

Dieser Forschungsbericht basiert auf zwei separaten analytischen Einzel-Berichten, die unter Akkreditierungsbedingungen nach DIN EN ISO 17025 [1] im IME angefertigt wurden. Diese Berichte mit den Prüfauftrags-Codes K-UBA-005/7-61 und K-UBA-013/7-61 enthalten jeweils Erklärungen zur Qualitätssicherung und wurden von der Qualitätssicherungseinheit (QAU) des Fraunhofer IME geprüft (siehe Akkreditierungsurkunde der DACH in Anhang II). Sie sind von der jeweiligen Prüfleitung sowie der Bereichsleitung 'Angewandte Oekologie' des Fraunhofer IME unterschrieben und im Original archiviert.

Im ersten Prüfauftrag (Bearbeitungszeitraum Februar bis August 2001) wurde zunächst die analytische Methode entwickelt und validiert. Die erstellte Verfahrens-SOP „Bestimmung von Polycyclischen- und Nitro-Moschusduftstoffen (PNMF) in organischen Matrices mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS/MS)“ ist in Anhang I wiedergegeben.

Anschließend wurden die Nitro-Moschusverbindungen Moschus-Keton und Moschus-Xylol sowie die polycyclischen Moschusverbindungen Galaxolide[®] (HHCB), Tonalide[®] (AHTN), Phantolide[®] (AHDI), Celestolide[®] (ADBI), Traseolide[®] (ATII) und Versalide[®] (ATTN) entsprechend der erarbeiteten SOP in Biotaprobe aus den Beständen der Umweltprobenbank des Bundes (UPB) analytisch bestimmt. Es handelte sich um 74 marine und limnische Proben-Homogenate der Matrices Aalmuttermuskulatur, Blasantang, Miesmuschel, Silbermöwenei, Brassenmuskulatur und Dreikantmuschel.

Im zweiten Prüfauftrag (Bearbeitungszeitraum Februar bis Juli 2004) wurden weitere 119 Homogenate von Biota-Proben (ausschließlich der Matrix Brassenmuskulatur) auf Galaxolide[®] und Tonalide[®] untersucht. Durch diese Messungen wurden die Zeitreihen des ersten Prüfauftrags weitergeführt und ergänzt.

Die Maßnahmen zur Qualitätssicherung unterscheiden sich in den beiden Prüfaufträgen. Im ersten Auftrag wurde das analytische Verfahren durch umfangreiche Experimente zur Matrix-Kalibrierung validiert und die Mess- und Ergebnisunsicherheit nach dem EURACHEM-Konzept ermittelt [2].

Die Wiederholbarkeit der analytischen Methode und die Vergleichbarkeit der UPB-Teilproben untereinander (Methoden-Präzision) wurden im zweiten Messzeitraum näher untersucht. Zudem wurde die Routinephase durch die fortlaufende Analyse einer Referenzprobe überwacht. Für die Matrix Brassenmuskulatur und die Zielsubstanzen Galaxolide[®] und Tonalide[®] wurden die Matrix-Kalibrierungen wiederholt.

Im Unterschied zum ersten Prüfauftrag wurde im zweiten Prüfauftrag die Probeneinwaage von 5 auf 2 g reduziert. Dies war möglich, da hier nur die Analyten mit höheren Gehalten analysiert werden sollten. Hieraus ergaben sich aber Unterschiede in den Bestimmungsgrenzen und für Galaxolide[®] auch in der Wiederfindungsrate (Weiteres im Kapitel 'Qualitätssicherung').

2. Abkürzungen

ADBI	Celestolide [®] , 1-[6-(1,1-dimethylethyl)-2,3-dihydro-1,1-dimethyl-1H-inden-4-yl]-ethanone
AGC	Automatic gain control (in der IonTrap MS-Messtechnik)
AHDI	Phantolide [®] , 1-(2,3-dihydro-1,1,2,3,3,6-hexamethyl-1H-inden-5-yl)-ethanone (AHMI)
AHTN	Tonalide [®] , Ethanone, 1-(5,6,7,8-tetrahydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naphthalenyl)-
AKK	Akkreditierung
ATII	Traseolide [®] , 1-[2,3-dihydro-1,1,2,6-tetramethyl-3-(1-methyl-ethyl)-1H-inden-5-yl]-ethanone
ATTN	Versalide [®] , 1-(3-ethyl-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-ethanone
amu	Atom mass unit
ASE	Accelerated solvent extraction (beschleunigte Lösungsmittel-Extraktion)
BG	Bestimmungsgrenze
CAS RN	Chemical Abstracts Registration Number
DEP	Diethylphthalat
EFC	Electronic flow control
ESB	(German) Environmental Specimen Bank
FG	Frischgewicht
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Massenspektrometrie, gekoppelt mit der Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HHCB	Galaxolide [®] , 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethyl-cyclopenta[g]-2-benzopyrane
IS	Interner Standard
k. A.	keine Angabe
mmu	milli mass units
MS	Massenspektrum / Massenspektrometrie
MS/MS	Messtechnik in der Massenspektrometrie, Tandem- Massenspektrometrie (weiterer MS-Zyklus nach Kollisionsaktivierung selektiver Vorläufer-Ionen)
MK	Moschus-Keton, 4- <i>tert.</i> -Butyl-2,6-dimethyl-3,5-dinitro-acetophenon
MX	Moschus-Xylol, 2,4,6,-Trinitro-1,3-dimethyl-5- <i>tert.</i> -butylbenzol
NWG	Nachweisgrenze
P	Signifikanzniveau, statistische Wahrscheinlichkeit
PFV	Peakflächenverhältnis (= Peakfläche Analyt / Peakfläche IS)
PNF	Probenahmefläche
PNMF	Polycyclic and nitro musk fragrances (Polycyclische und Nitro-Moschusduftstoffe)
QAU	Quality assurance unit
r	Korrelationskoeffizient
RIC	Reconstructed ion current
s _L	laborinterne Wiederholstandardabweichung



S/N-Verhältnis	Signal/Rausch-Verhältnis (signal to noise ratio)
SOP	Standardarbeitsanweisung (standard operating procedure)
TIC	Total ion current
U	erweiterte Ergebnisunsicherheit
UPB	Umweltprobenbank des Bundes
$u(R_w)$	laborinterne Reproduzierbarkeit (reproducibility within-laboratory)
V_L [%]	relative (laborinterne) Wiederholstandardabweichung
V_{x0}	relative Verfahrensstandardabweichung oder Verfahrensvariationskoeffizient
WFF	Wiederfindungsfunktion
WFR	Wiederfindungsrate

3. Zusammenfassung

Der hier vorliegende Bericht gibt die Ergebnisse von Untersuchungen wieder, die im Rahmen der Umweltprobenbank des Bundes (UPB) gewonnen wurden. Es wurde zunächst eine analytische Methode zur quantitativen Bestimmung von Nitro- und polycyclischen Moschusverbindungen in Biota-Proben entwickelt und validiert (siehe Anhang I). Die anschließend durchgeführten Analysen wurden als Prüfauftrag entsprechend der SOPs des Fraunhofer IME unter Akkreditierungsbedingungen nach DIN EN ISO 17025 [1] durchgeführt.

Das Verfahren beruht auf einer Extraktion der Analyten mittels „Beschleunigter Lösemittlextraktion“ (accelerated solvent extraction, ASE), einer zweistufigen Aufreinigung der gewonnenen Extrakte und einer abschließenden Messung mittels GC/MS/MS.

Tabelle 1: *Im Rahmen des 1. Prüfauftrages untersuchte Biota-Proben verschiedener Marices*

Probennahme-Fläche und Matrix	Probennahme-Jahr
<u>Matrix Aalmuttermuskulatur</u>	
Eckwarderhörne	1994, 1996, 1998, 2000
Darßer Ort	1994, 1996, 1998, 2000
<u>Matrix Blasentang</u>	
Eckwarderhörne	1996, 1998, 2000
<u>Matrix Brassenmuskulatur</u>	
Elbe, Prossen (km 13)	1993, 1995, 1997, 1999
Elbe, Zehren (km 93)	1999
Elbe, Barby (km 296)	1993, 1995, 1997, 1999
Elbe, Cumlosen(km 470)	1999
Elbe, Blankenese (km 632,5)	1993, 1995, 1997, 1999
Saale, Wettin	1997, 1999
Mulde, Dessau	1997, 1999
Saar, Staustufe Güdingen	1995, 1997, 1999
Saar, Staustufe Rehlingen	1995, 1997, 1999
Rhein, Weil (km 174)	1995, 1997, 1999
Rhein, Iffezheim (km 334)	1995, 1997, 1999
Rhein, Koblenz (km 590,3)	1995, 1997, 1999
Rhein, Bimmen (km 865)	1995, 1997, 1999
Belauer See, Bornhöved	1992, 1997, 1999
<u>Matrix Dreikantmuschel</u>	
Belauer See, Bornhöved	1992, 1997
Elbe, Blankenese (km 632,5)	1995, 1997, 1999
<u>Matrix Miesmuschel</u>	
Eckwarderhörne	1986, 1988, 1990, 1992, 1994, 1996, 1998, 2000
Darßer Ort	1992, 1994, 1996, 1998, 2000

Matrix Silbermöwenei

Mellum	1996, 1998
Trischen	1996, 1998
Heuwiese	1996, 1998

Im ersten Prüfzeitraum von Februar bis August 2001 wurden 74 marine (Homogenate von Aalmuttermuskulatur, Blasentang, Miesmuschel und Silbermöwenei) und limnische (Homogenate von Brassenmuskulatur und Dreikantmuschel) Biotaprobenn aus dem Archiv der UPB untersucht (Tabelle 1).

Im zweiten Prüfzeitraum von Februar bis Juli 2004 wurden 85 Proben der Matrix Brassenmuskulatur auf die polycyclischen Moschusverbindungen HHCB und AHTN untersucht. Zusätzlich wurden 34 Proben gleicher Matrix zur analytischen Qualitätssicherung in das Messprogramm aufgenommen (Tabelle 2).

Tabelle 2: *Im Rahmen des 2. Prüfauftrages untersuchte Proben der Matrix Brassenmuskulatur (nur HHCB und AHTN)*

Probennahme-Fläche	Probennahme-Jahr
<u>Matrix Brassenmuskulatur</u>	
Saar, Staustufe Güdingen	1994, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Saar, Staustufe Rehlingen	1994, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhein, Weil (km 174)	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhein, Iffezheim (km 334)	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhein, Koblenz (km 590,3)	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhein Bimmen (km 865)	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Prossen (km 13)	1994, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Zehren (km 93)	2001, 2003
Elbe, Barby (km 296)	1994, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Cumlosen (km 470)	2001, 2003
Elbe, Blankenese (km 632,5)	1994, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Saale, Wettin	1995, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Mulde, Dessau	1995, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Donau, Ulm	2002, 2003
Donau, Kelheim	2002, 2003
Donau, Jochenstein	2002, 2003
Belauer See, Bornhöved	2001, 2003

Die Untersuchungsergebnisse des Prüfzeitraums 2001 sind in den Tabellen 13a bis 13f und die des Prüfzeitraums 2004 in Tabelle 14 zusammengefasst.

Die Präzision der analytischen Methode liegt bei ca. 10 %, ausgedrückt durch die nach dem EURACHEM-Konzept [2] ermittelte erweiterte Ergebnisunsicherheit U für HHCB.

Summary

This report describes the results of investigations carried out in the context of the German Environmental Specimen Bank. An analytical method was developed and validated for the quantitative determination of nitro- (musk-ketone, musk-xylene) and polycyclic musk (HHCB, AHTN, ADBI, AHDI, ATII, ATTN) compounds in biota. The analyses were performed in compliance with DIN EN ISO 17025 (General requirements for the competence of testing and calibration laboratories).

The method is based on the extraction of the analytes using 'accelerated solvent extraction' (ASE) followed by a two-step clean-up of the extracts; the measuring was performed by means of GC/MS/MS.

Table 1: *In the 1st study analyzed samples of different matrices*

sampling site and matrix	sampling year
<u>matrix eel pout muscle</u>	
Eckwarderhörne	1994, 1996, 1998, 2000
Darßer Ort	1994, 1996, 1998, 2000
<u>matrix bladder wrack</u>	
Eckwarderhörne	1996, 1998, 2000
<u>matrix bream muscle</u>	
Elbe, Prossen (km 13)	1993, 1995, 1997, 1999
Elbe, Zehren (km 93)	1999
Elbe, Barby (km 296)	1993, 1995, 1997, 1999
Elbe, Cumlosen(km 470)	1999
Elbe, Blankenese (km 632,5)	1993, 1995, 1997, 1999
Saale, Wettin	1997, 1999
Mulde, Dessau	1997, 1999
Saar, barrage Gündingen	1995, 1997, 1999
Saar, barrage Rehlingen	1995, 1997, 1999
Rhine, Weil (km 174)	1995, 1997, 1999
Rhine, Iffezheim (km 334)	1995, 1997, 1999
Rhine, Koblenz (km 590,3)	1995, 1997, 1999
Rhine, Bimmen (km 865)	1995, 1997, 1999
Bornhoeved Lake District, Lake Belau	1992, 1997, 1999
<u>matrix zebra mussels</u>	
Bornhoeved Lake District, Lake Belau	1992, 1997
Elbe, Blankenese (km 632,5)	1995, 1997, 1999
<u>matrix blue mussel</u>	
Eckwarderhörne	1986, 1988, 1990, 1992, 1994, 1996, 1998, 2000
Darßer Ort	1992, 1994, 1996, 1998, 2000

matrix herring gull egg

Mellum	1996, 1998
Trischen	1996, 1998
Heuwiese	1996, 1998

In the 1st study between February and August 2001 74 samples of marine and limnic biota archived in the German Environmental Specimen Bank (ESB) were analyzed (table 1). The matrices from marine ecosystems were homogenates of eel pout muscle, bladder wrack, blue mussel and herring gull egg as well as from freshwater systems bream muscle and zebra mussel.

In the 2nd study between February and July 2004 85 samples of the matrix bream muscle were analyzed for the presence of the polycyclic musk fragrances HHCB and AHTN. Additionally 34 samples of the same matrix were included in the measuring program for analytical quality control, altogether 119 samples were analyzed. An overview of the analyzed samples is given in table 2.

Table 2: *In the 2nd study analyzed samples of bream muscle (only HHCB and AHTN)*

sampling site	sampling year
<u>matrix bream muscle</u>	
Saar, barrage Güdingen	1994, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Saar, barrage Rehlingen	1994, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhine, Weil (km 174)	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhine, Iffezheim (km 334)	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhine, Koblenz (km 590.3)	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhine Bimmen (km 865)	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Prossen (km 13)	1994, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Zehren (km 93)	2001, 2003
Elbe, Barby (km 296)	1994, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Cumlosen (km 470)	2001, 2003
Elbe, Blankenese (km 632.5)	1994, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Saale, Wettin	1995, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Mulde, Dessau	1995, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Danube, Ulm	2002, 2003
Danube, Kelheim	2002, 2003
Danube, Jochenstein	2002, 2003
Bornhoeved Lake District, Lake Belau	2001, 2003

The results of the 1st study are summarized in tables 13a to 13f and of the 2nd study in table 14.

The precision of the analytical method was approx. 10 %, expressed by the expanded uncertainty which was calculated by the EURACHEM / CITAC Guide [2].

4. Aufgabenstellung

Die Durchführung des ersten Prüfauftrags beinhaltete im ersten Schritt die Entwicklung und Validierung der Methodik und Erstellung einer Standardarbeitsanweisung (SOP). Im zweiten Schritt erfolgte dann die Analyse der in Tabelle 1 aufgelisteten Biota-Proben entsprechend der erarbeiteten SOP unter Akkreditierungsbedingungen nach DIN EN ISO 17025 [1]. Die analytischen Zielsubstanzen sind in Tabelle 3 mit Handelsnamen und den verwendeten Akronymen angegeben.

Tabelle 3: Zielsubstanzen

Nitro-Moschusverbindungen:	Moschus-Xylol	MX
	Moschus-Keton	MK
Polycyclische Moschusverbindungen:	Galaxolide [®]	HHCB
	Tonalide [®]	AHTN
	Phantolide [®]	AHDI
	Celestolide [®]	ADBI
	Traseolide [®]	ATII
	Versalide [®]	ATTN

Weitere Informationen zu den Zielsubstanzen sind in der Beschreibung des analytischen Verfahrens angegeben (Tabelle AI, 1a und Tabelle AI, 1b).

Im zweiten Prüfauftrag wurden 85 Proben der Matrix Brassenmuskulatur aus den Beständen der UPB auf HHCB und AHTN entsprechend der IME Verfahrens-SOP V7 – 561/02 analysiert. Zusätzlich wurden 34 Proben gleicher Matrix zur analytischen Qualitätssicherung in das Messprogramm aufgenommen, so dass insgesamt 119 Proben untersucht wurden. Einen Überblick über die untersuchten Proben verschafft Tabelle 2.

Die Problematik der Vergleichbarkeit von UPB-Proben untereinander wurde an 34 Proben speziell untersucht, und zwar die:

- Vergleichbarkeit der aktuellen Messungen mit Messungen aus dem Jahr 2002,
- Vergleichbarkeit (in der Serie) von gleichen Proben aus unterschiedlichen Gefäßen,
- Vergleichbarkeit (in der Serie) von Teil-Proben aus einem Probengefäß.

5. Probenkennzeichnung und SOP-Liste

Die Umweltprobenbank-Proben wurden von der Arbeitsgruppe „Umweltprobenbank und Elementanalytik“ des Fraunhofer-IME in tiefgefrorenem Zustand zur Analytik an das Labor Umwelt- und Rückstandsanalytik übergeben. Sie wurden dort nach der Arbeitsanweisung SOP 0-042 mit einem laborspezifischen Code versehen. Die UPB-Proben wurden im tiefgefrorenen Zustand in die

analytischen Teilproben aliquotiert; anschließend wurde sofort mit der Probenaufarbeitung entsprechend den Fraunhofer-IME-Arbeitsanweisungen (siehe Tabelle 4) begonnen.

Tabelle 4: *Relevante Standard-Arbeitsanweisungen (SOPs), Kurztitel*

V7 - 561/02	PNMF in organischen Matrices mittels GC/MS/MS
V7 - 208/02	Massenspektrometrie
G3 - 004/02	Waagen, Überprüfung
G3 - 005/02	Volumen-Messgeräte ohne Hubkolben, Überprüfung
G3 - 006/03	Pipetten und andere Volumen-Messgeräte mit Hubkolben
G7 - 170/02	Reinstwasseranlage ELGASTAT UHQ-PS
G7 - 204/02	Abimed/Gilson-System Clean-Up XL
G7 - 225/02	Extraktionsgerät ASE 200, DIONEX
G7 - 245/02	TurboVap II Concentration Workstation
G7 - 270/01	IonTrap GC/MS/MS-System VARIAN SATURN 2000

Außerdem gelten die für die Akkreditierung relevanten allgemeinen Arbeitsanweisungen der 0-Serie des Qualitätssicherungssystems des IME.

6. Methode und Qualitätssicherung

6.1. Analytische Methode

Die analytische Methode wurde im Vorfeld der Arbeiten unter Akkreditierungsbedingungen entwickelt. Die erstellte Verfahrens-SOP SOP V7 – 561/01 'Bestimmung von Polycyclischen- und Nitro-Moschusduftstoffen (PNMF) in organischen Matrices mittels Gaschromatographie /Massenspektrometrie (GC/MS/MS)' ist in Anhang I detailliert wiedergegeben¹.

Die Biota-Proben wurden mit Natriumsulfat verrieben und anschließend mittels „Beschleunigter Lösungsmittel-Extraktion“ (accelerated solvent extraction, ASE) extrahiert. Nach der Extraktion mit n-Hexan wurden die Extrakte in Messkolben auf exakte Volumina eingestellt. Aliquote Anteile der Extrakte wurden dann mit dem Internen Standard (IS) versetzt, durch Abblasen mit Stickstoff eingeeengt und anschließend einer zweistufigen Reinigung unterworfen:

- Gelpermeationschromatographie (GPC) an Bio-Beads S-X3
- Adsorptionschromatographie / Fraktionierung an aktiviertem Kieselgel.

Die Identifizierung und Quantifizierung der Moschusduftstoffe erfolgte mittels GC/MS/MS nach der Methode mit Internem Standard unter Verwendung von deuteriertem Moschus-Xylol (MX-D₁₅).

¹ Die SOP V7 – 561/01 wurde 2003 novelliert, neuer Code V7 – 561/02. Die Modifizierungen betrafen in erster Linie formale Änderungen bedingt durch den Wechsel des Institutsnamens, inhaltliche Änderungen wurden nur am Rande vorgenommen.

6.2. Grund-Kalibrierung des Mess-Systems und Analytische Standards

Die zur Kalibrierung des Analysensystems verwendeten Referenzsubstanzen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Eingesetzte Referenzsubstanzen

Substanz, Akronym [CAS RN]	Reinheit/Gehalt und Charge	Hersteller/Bezugsquelle
HHCB [1222-05-5]	52,05 % (GC, Galaxolide DEP50), Product Code: 13008010, Batch Nr.: 302309	Jules Chiquet S.A., CH-4142 Münchenstein, Schweiz
AHTN [21145-77-7] ²	97,7 % (GC), Product Code: 13008017, Batch Nr.: 302312	Jules Chiquet S.A., CH-4142 Münchenstein, Schweiz
ADBI [13171-00-1]	99,16 %, Product Code: 13008030, Batch Nr.: 302319	Jules Chiquet S.A., CH-4142 Münchenstein, Schweiz
AHDI [15323-35-0]	rein (100 %), Serie No. 1.1/00	SAL, Service für Analytik und Labor D-72488, Sigmaringen
ATII [68140-48-7]	rein (82,0%), Serie No. 1.1/00	SAL, Service für Analytik und Labor D-72488, Sigmaringen
ATTN [88-29-9]	> 97,7 %, Product Code: 13008023, Batch Nr.: 302315	Jules Chiquet S.A., CH-4142 Münchenstein, Schweiz
MK, Keton-Moschus [81-14-1]	Fluka, Nr. 60720, puriss. ca. 99 % (N) Lot&Filling Code: 242779/1 13600	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82024, Taufkirchen
MX Moschus Xylol [81-15-2]	Product Number S342971, Lot Number 0100525177	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82024, Taufkirchen
MX-D15 (IS) [-]	97,5 %, Lot.-No. 01024AC (2001), 97,5 %, Lot.-No. 30716AC (2004),	Dr. Ehrenstorfer GmbH, D-86199, Augsburg

Zur Bezug-Kalibrierung (Grund-Kalibrierung) des GC/MS/MS-Systems wurden zunächst Stammlösungen der Referenzsubstanzen in Cyclohexan hergestellt. Durch Verdünnungsschritte wurden dann die Bezugslösungen der Analyten und die Additions-Lösung des IS jeweils in n-Hexan hergestellt. Diese Bezugslösungen enthielten die Analyten in variablen und den Internen Standard (IS) in konstanter Konzentration von 40 ng/0,1 mL³.

² In der IME-Verfahrens-SOP ist für Tonalide® die CAS Registry Number 1506-02-1 angegeben. Sie wurde aus einem Zertifikat (Product Identification / Gravimetric Certificate) der Firma Dr. Ehrenstorfer GmbH übernommen. Der Hersteller der hier verwendeten Referenzsubstanz (Jules Chiquet S.A.) gibt die CAS Registry Number mit 21145-77-7 an. Überprüfungen dieses Widerspruchs ergaben, dass die CAS Registry Number 21145-77-7 der Raumstruktur des Duftstoffes, dem Akronym AHTN und den Handelsnamen Tonalide®, Fixolide® etc. zugeordnet ist. Die CAS Registry Number 1506-02-1 wird parallel hierzu für die nicht näher spezifizierte Verbindung mit gleichem chemischen Namen verwendet.

³ Das Endvolumen der Probenaufarbeitung nach Verfahrens-SOP V7 – 561/02 beträgt 0,1 mL.

Der kalibrierte Arbeitsbereich betrug während des ersten Prüfauftrags für alle Analyten 0,5 – 50 ng/0,1 mL. Im zweiten Prüfauftrag wurde der Arbeitsbereich für AHTN auf 0,25 – 25 ng/0,1 mL gesenkt. Dies entsprach bei einer Einwaage von 2 g Biotahomogenat einem Konzentrationsbereich von 0,25 – 25 ng/g für die HHCB bzw. 0,125 – 12,5 ng/g für AHTN.

Die Bezugslösungen wurden direkt per GC/MS/MS gemessen. Aus den Messdaten wurden anschließend die Kalibrierfunktionen erstellt, indem die Peakflächenverhältnisse (PFV = Peakfläche Analyt / Peakfläche IS) gegen die eingesetzten Konzentrationen des jeweiligen Analyten aufgetragen wurden. Die Grund-Kalibrierungen für HHCB und AHTN aus dem Jahr 2004 sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt. Mit dem EDV-Programm SQS 2000 [3] wurden aus den Messwerten weiterhin die Verfahrenskenngrößen Linearität, der Korrelationskoeffizient r und die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} berechnet. Die Verfahrenskenndaten (2004) sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Verfahrenskenngrößen, berechnet aus Grund- und Matrix-Kalibrierung

Kenngröße		HHCB	AHTN
Linearität *)	F-Test	linear	linear
	R	0,9994	0,9991
V_{x0} (Arbeitsbereich)		2,8 %	3,5 %

*) F-Test auf Linearität (Mandel-Anpassungstest) durchgeführt mit SQS 2000

6.3. Matrix-Kalibrierung

Als grundlegendes Experiment zur Validierung des analytischen Verfahrens wurde 2001 für die Matrices Brassenmuskulatur (Einwaage ca. 5 g) und Silbermöwenei (Einwaage ca. 1 g) die Wiederfindungsfunktionen (WFF) der Analyten aufgestellt und auf systematische Fehler geprüft. Dieses Experiment wurde 2004 für die Matrix Brassenmuskulatur und die Analyten HHCB und AHTN mit auf ca. 2 g reduzierter Einwaage wiederholt.⁴

Hierzu wurde jeweils möglichst unbelastetes Probenmaterial (z. B. Brassenmuskulatur, Belauer See, Bornhöved) mit Natriumsulfat homogenisiert, in gleiche Teilproben geteilt und dann in ASE-Zellen eingefüllt. Vier dieser Teilproben wurden dann mit ansteigenden Mengen der Analyten dotiert. Alle Proben wurden dann mit der Additions-Lösung des Internen Standards versetzt und die ASE-Zellen mit Natriumsulfat totvolumenfrei aufgefüllt.

Anschließend wurden die Matrix-Proben entsprechend der Verfahrens-SOP aufgearbeitet und gemessen. Die gemessenen Peakflächenverhältnisse (PFV) wurden gegen die aufgestockten Analyt-Mengen aufgetragen und so die Matrix-Kalibrierungen erstellt. In Abbildung 1 sind Grund- und Matrix-Kalibrierung für HHCB und in Abbildung 2 für AHTN vergleichend dargestellt (Prüfauftrag 2004).

⁴ Durch die Extraktion von 5 g Probe wurde auch sehr viel Fett-Matrix extrahiert. Diese Matrix belastete die GPC-Säule des anschließend durchgeführten Cleanup-Schrittes (siehe SOP im Anhang) in so hohem Maße, dass die Säule häufig neu gefüllt werden musste. Diese Reduktion der Einwaage war möglich, da im zweiten Prüfauftrag nur die höher konzentrierten PMF analysiert werden sollten.

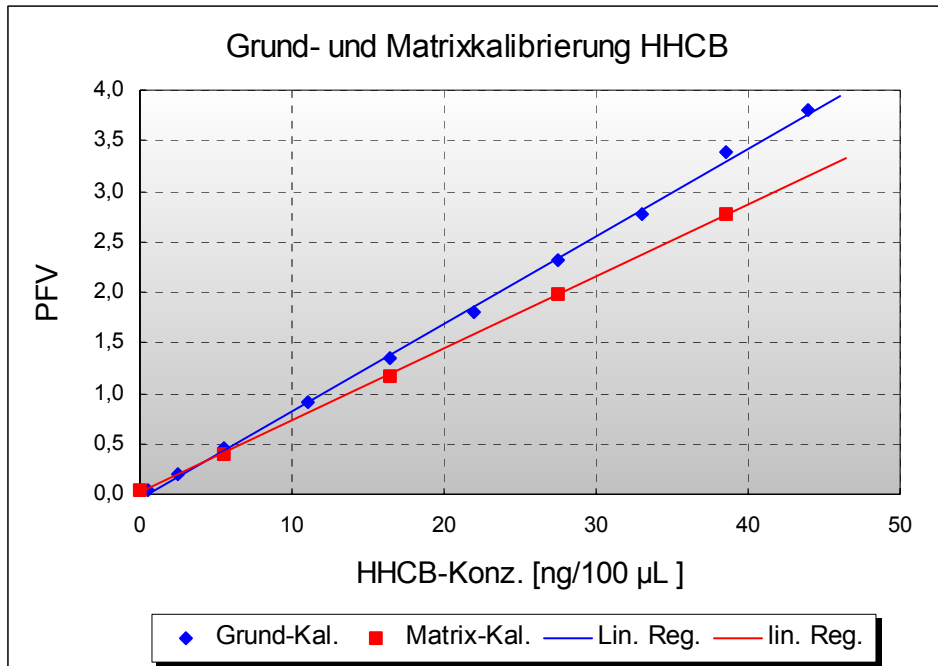


Abbildung 1: Grund- und Matrix-Kalibrierung für Galaxolide® (HHCB)

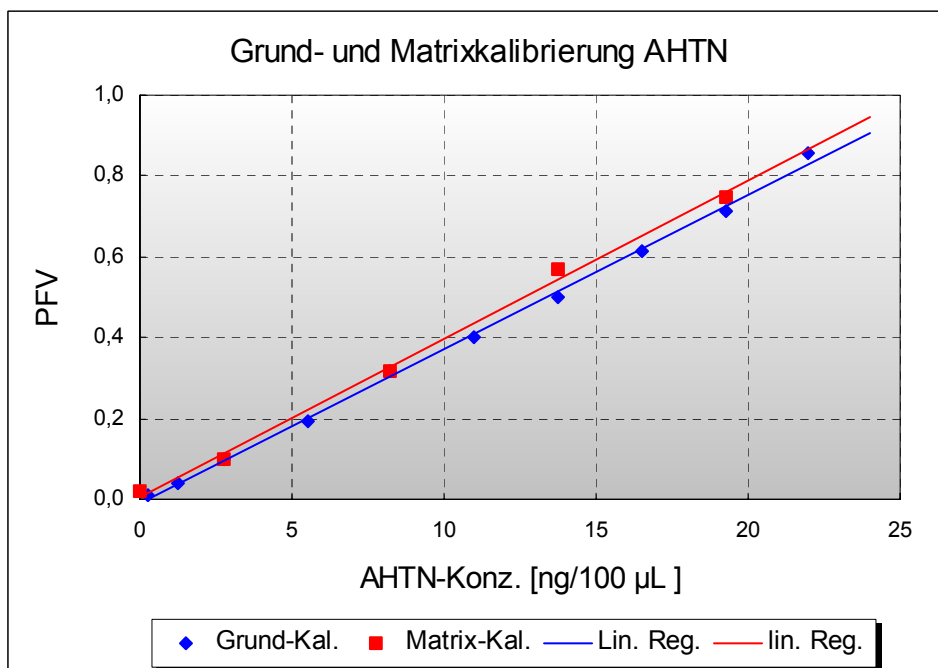


Abbildung 2: Grund- und Matrix-Kalibrierung für Tonalide® (AHTN)

Basierend auf den Grund-Kalibrierungen wurden dann zunächst die Analyt-Gehalte der Matrix-Proben ermittelt. Zur Berechnung der Wiederfindungsfunktionen (WFF) wurden die gefundenen Analytmengen der aufgestockten Proben um die Analytmenge der einen nicht aufgestockten Probe korrigiert. Diese korrigierten Werte ergaben, aufgetragen gegen die eingesetzten Mengen der Analyten, die WFF. In den Abbildungen 3 und 4 sind die Wiederfindungsfunktionen für HHCB und AHTN dargestellt.

Die Prüfung des Verfahrens auf systematische Fehler wurde anhand statistischer Daten der WFF vorgenommen:

- Enthält der Vertrauensbereich der Steigung den Wert 1, so liegt kein proportional systematischer Fehler vor
- Enthält der Vertrauensbereich des Achsenabschnittes den Wert 0, so liegt kein konstant systematischer Fehler vor.

Die Steigung der Wiederfindungsfunktion ergibt die Wiederfindungsrate (WFR). Sie beträgt bei vollständiger Wiederfindung der Analyten also idealerweise 1 oder 100 %.

Die aus den Wiederfindungsfunktionen errechneten WFR beider Prüfaufträge sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Das analytische Verfahren wies für HHCB im Jahr 2004 und für Moschus-Keton im Jahr 2001 systematische Fehler auf. Die jeweils recht exakt auf den Regressions-Geraden liegenden Messwerte für Matrix- und Grund-Kalibrierung ergaben enge Vertrauensbereiche, die sich in den genannten Fällen nicht mehr überlappten. Gründe hierfür könnten unterschiedliche chemische Eigenschaften von Analyt und IS sein, zudem wurde 2004 die Probeneinwaage von 5 auf 2 g reduziert. Die engen Vertrauensbereiche zeigten aber für beide Analyten gute Reproduzierbarkeiten des Verfahrens in den geprüften Konzentrationsbereichen an. Das Verfahren wurde daher nicht weiter auf systematische Fehler untersucht, sondern die Ergebnisse werden mit der WFR korrigiert (siehe Kapitel 7 'Ergebnisse und Ergebnisberechnung').

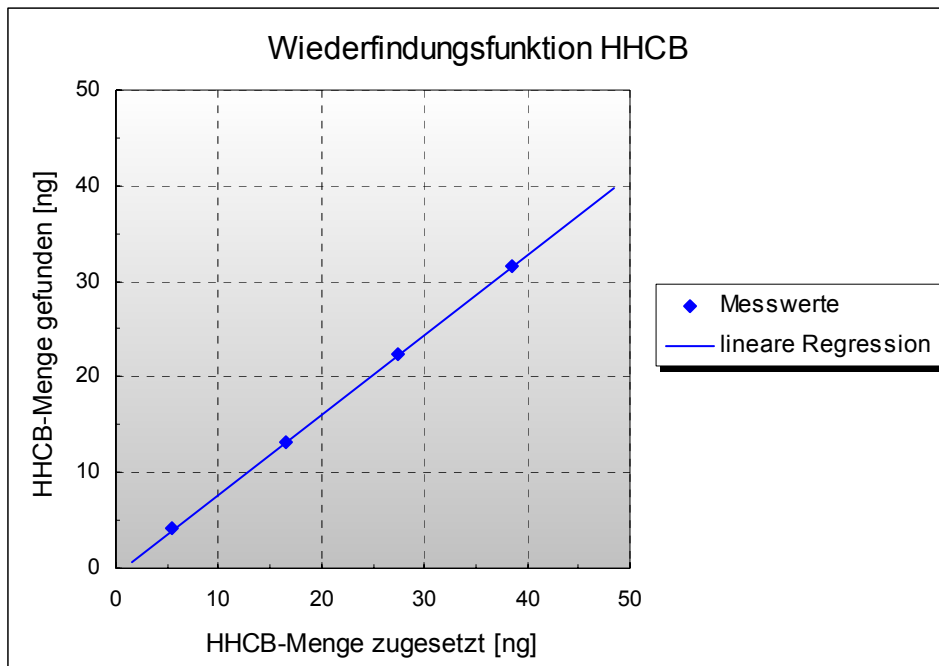


Abbildung 3: **WFF für HHCB (Galaxolide®) und die Matrix Brassensmuskulatur**

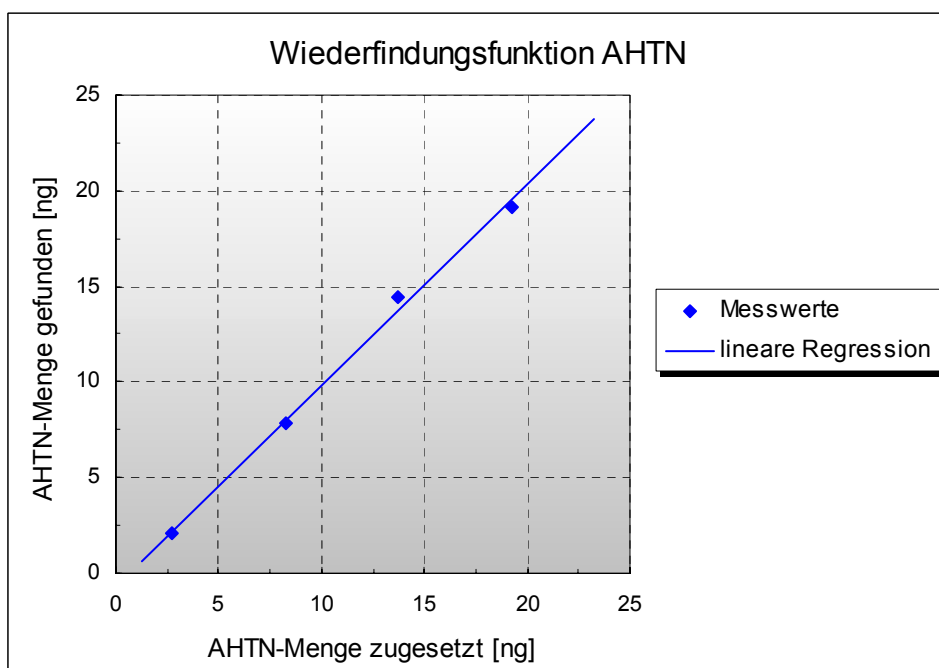


Abbildung 4: **WFF für AHTN (Tonalide®) und die Matrix Brassensmuskulatur**

Tabelle 7: *Wiederfindungsraten der Polycyclischen- und Nitro-Moschusduftstoffe für die Matrices Brassermuskulatur und Silbermöwenei*

Substanz	Brassermuskulatur		Silbermöwenei
	Prüfauftrag 2001	Prüfauftrag 2004	
Galaxolide (HHCB)	1,02	0,83	1,02
Tonalide (AHTN)	1,05	1,05	1,06
Celestolide (ADBI)	0,91		0,93
Phantolide (AHDI)	0,94		1,01
Versalide (ATTN)	1,04		0,97
Traseolide (ATII)	1,10		1,04
Moschus-Xylol (MX)	1,04		1,03
Moschus-Keton (MK)	1,35		1,00

6.4. Verfahrens-Leerwerte und Bestimmungsgrenze

In jeder Analysenserie wurde ein Verfahrens-Leerwert aufgearbeitet und gemessen; hierzu wurde das gesamte Verfahren ohne Matrix durchgeführt. Dieser gemessene Leerwert wurde bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt.

Die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen (BG) wurden in Anlehnung an DIN 32 645 [4] mit dem EDV-Programm SQS 2000 [3] aus den Grund-Kalibrierungen berechnet. Es ergaben sich je nach Analyt BG von ca. 5 bis 15 ng/g Frischgewicht (FG). Durch Absenkung des Arbeitsbereiches der Grund-Kalibrierungen wäre eine Reduktion der BG (nach DIN 32 645) möglich gewesen. Auf diese Möglichkeit der Senkung der BG wurde jedoch verzichtet, da die über das Gesamtverfahren erhaltenen Leerwerte schon an der unteren Grenze des Arbeitsbereichs der Kalibrierungen lagen. Dies bedeutete, dass sich die Bestimmungsgrenzen für die Quantifizierung der Polycyclischen und Nitro-Moschusduftstoffe (PNMF) aus biologischen Matrices aus den Leerwert-Gehalten des Verfahrens und nicht aus den Messwerten der Grund-Kalibrierungen ergaben.

Die Belastung der Leerwert-Proben mit den Analyten entsprach den Mengen-Verhältnissen der PNMF in den organischen Matrices, d.h. für HHCB und AHTN wurden höhere Leerwerte ermittelt, als für die anderen Moschusduftstoffe. Die aus den Leerwert-Gehalten und einer Einwaage von 5 g ermittelten Bestimmungsgrenzen lagen 2001 für HHCB und AHTN bei 0,2 ng/g FG und für die weiteren PNMF bei 0,1 ng/g FG. Aufgrund der geringeren Einwaage ergaben sich für die Matrix Silbermöwenei BG von 0,5 ng/g FG für HHCB und AHTN und für die weiteren PNMF 0,25 ng/g FG.

Die 'Standard-Probeneinwaage 2001' von 4 – 5 g Biota-Homogenat wurde im zweiten Prüfauftrag 2004 auf 2 – 2,5 g reduziert. Mit den 2004 gemessenen Leerwertgehalten und der reduzierten Einwaage ergaben sich BG für HHCB und AHTN von je 0,4 ng/g FG. Diese Werte entsprachen den Werten von 0,2 ng/g FG aus dem Jahr 2002. Somit konnte in beiden Prüfzeiträumen von einer vergleichbaren Leerwertbelastung ausgegangen werden.

Um den großen Unterschied im Gehalt der einzelnen Analyten (Galaxolide > Tonalide >> andere PNMF) für die Messung auszugleichen, wurden unterschiedliche aliquote Volumina des ASE-Extraktes mit internem Standard versetzt und in den Arbeitsbereich der Kalibrierung verdünnt. Diese Verdünnung wurde in gleichem Verhältnis mit dem entsprechenden Leerwert durchgeführt. Zur Quantifizierung aller PNMF wurden 2001 daher (fast) alle Extrakte zwei mal gemessen. Im Jahr 2004 wurde der erwartete Unterschied in den Gehalten für HHCB und AHTN schon in der Grund-Kalibrierung berücksichtigt (siehe Kapitel 6.2)

6.5. Methoden-Präzision

6.5.1. Ermittlung der Mess- und Ergebnisunsicherheit nach dem EURACHEM-Konzept

Die Fehlerbetrachtung nach dem EURACHEM-Konzept [2] wurde 2001 beispielhaft für HHCB und die Matrix Brassenmuskulatur durchgeführt. Für die weiteren Polycyclischen und Nitro-Moschusduftstoffe wurden aufgrund der exakt gleichen Methode und somit gleicher Unsicherheitsquellen ähnliche Ergebnisunsicherheiten erwartet.

Für Moschus-Keton wurde durch die Matrix-Kalibrierung ein proportional systematischer Fehler erkannt. Für Moschus-Keton wurde daher diese Unsicherheitsquelle (= Standardabweichung der Steigung der Wiederfindungsfunktion) mit in die Berechnung einbezogen.

Die weiteren berücksichtigten Unsicherheitsquellen waren:

- Kalibrierung (Unsicherheiten in den Regressionsparametern)
- Probeneinwaage (Toleranz der Waage)
- Verdünnung der Extrakte (Toleranzen der Messkolben und Pipetten)
- Wiederholpräzision in der Probenaufarbeitung (Standardabweichung der Wiederfindungsraten)
- Wiederholpräzision der Leerwerte (Standardabweichung der Leerwert-Gehalte)

Zur Berechnung der Analysenergebnisse (siehe Kapitel 7) wurden zunächst die Informationswerte (Messgröße = Peakflächenverhältnis von Analyt/IS) über die Regressionsparameter der linearen Regression der Grund-Kalibrierungen in Analyt-Gehalte der Messlösungen umgerechnet (Quantifizierungsdaten der GC/MS/MS-Messungen). Von diesen Gehalten wurde der zugehörige Leerwert der Mess-Serie subtrahiert, mit der Wiederfindungsrate korrigiert und auf die Einwaage bezogen. Die weitere Einrechnung der Verdünnungsfaktoren ergaben dann die Analysenergebnisse in Einheiten von ng/g FG.

Die Ergebnisunsicherheit wurde analog berechnet, in dem die Werte dieser Rechnung (siehe Formel (2)) durch die entsprechenden Unsicherheitsbeiträge, d.h. Toleranzen und Wiederholpräzisionen ersetzt wurden.

Die Wiederholpräzision für HHCB in der Serie wurde für eine Brassenmuskulatur-Probe durch eine fünffache Aufarbeitung und Messung nach SOP V7 – 561/01 in der Verdünnung 1:10 bestimmt. Der Mittelwert der gemessenen Informationswerte (PFV HHCB/PFV IS) betrug 0,567 bei einer Standardabweichung von 0,0206; dies entsprach einem Variationskoeffizienten von 3,63 %.

Die Wiederholpräzision des Leerwertes für HHCB wurde aus den Daten mehrerer Mess-Serien in der Verdünnung 1: 10 des ASE-Extraktes ermittelt. Der Mittelwert der gemessenen Informationswerte (PFV HHCB/PFV IS) betrug 0,0096 bei einer Standardabweichung von 0,0012; dies entsprach einem Variationskoeffizienten von 12,5 %.

Die Rechnung ergab für eine reale Probe ein Resultat R (Analyt-Gehalt) von $R = 56,0$ ng/g Brassenmuskulatur und eine kombinierte Standardunsicherheit $(u)R$ von 2,86 ng/g. Dies entspricht einer prozentualen Standardunsicherheit von 5,1 %.

Durch Einbeziehung des Erweiterungsfaktors von $k=2$ wurde gemäß Formel 1 die erweiterte Ergebnisunsicherheit U errechnet.

$$U = k \cdot u(R) \quad (1)$$

Für die Bestimmung von HHCB in organischen Matrices ergab sich somit eine erweiterte Ergebnisunsicherheit von $U = 5,72$ ng HHCB/g Brassenmuskulatur oder 10,2 %.

Betrachtet man die prozentualen Anteile so zeigt sich, dass die Wiederholpräzision der Probenaufarbeitung mit 37 % den größten Anteil an der Ergebnisunsicherheit hat. Die Unsicherheiten in den Regressionsparametern der Kalibrierung liefern mit Anteilen von 34 % für den Achsenabschnitt und 21 % für die Steigung insgesamt aber den größten Beitrag zur Ergebnisunsicherheit. Sowohl der Leerwert, als auch die gerätebedingten Toleranzen liefern nur einen unbedeutenden Beitrag zur Unsicherheit.

Für Moschus-Keton wurde zusätzlich die Wiederfindungsrate mit der entsprechenden Unsicherheit in R eingerechnet. Für Moschus-Keton (nur für die Matrix Brassenmuskulatur) errechneten sich folgende Werte:

$R = 41,6$ µg Moschus-Keton/kg Brassenmuskulatur

$(u)R = 2,2$ µg Moschus-Keton/kg Brassenmuskulatur oder 5,3 %.

$U = 4,4$ µg Moschus-Keton/kg Brassenmuskulatur oder 10,7 %.

Die Wiederfindungsrate liefert in dieser Betrachtung einen Unsicherheitsbeitrag von 14,4 % zur gesamten Ergebnisunsicherheit. Die Anteile der anderen wichtigen Unsicherheitsfaktoren sinken folglich auf 32,1 % für die Wiederholpräzision der Probenaufarbeitung, auf 28,9 % für den Achsenabschnitt der Kalibrierung sowie auf 17,6 % für die Steigung der Kalibrierung.

6.5.2. Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

Nach Wiedereinführung der Analytik 2004 zur Bestimmung von polycyclischen Moschusverbindungen in Umweltproben wurde zunächst ein Vergleichbarkeitstest an zwei Proben unterschiedlichen Analyt-Gehalts durchgeführt, die bereits 2002 analysiert worden waren.⁵ Die erhaltenen Ergebnisse sind im Vergleich zu den 2001 durchgeführten Messungen in Tabelle 8 zusammengefasst.

Die Problematik der Vergleichbarkeit bzw. Reproduzierbarkeit von Messungen der UPB-Proben untereinander wurde im zweiten Prüfauftrag 2004 an 34 Proben der Matrix Brassenmuskulatur näher untersucht.

Die Wiederholbarkeit der analytischen Methode in der Serie - eingeschlossen auch die Inhomogenitäten der untersuchten UPB-Proben – wurde anhand von fünf Dreifachmessungen aus einem UPB-Gefäß ermittelt.

Tabelle 8: Vergleichbarkeit von Ergebnissen der Messjahre 2002 und 2004, Gehalte in ng/g FG

PNF und Jahr	HHCB (Galaxolide®)			AHTN (Tonalide®)		
	Mess-Jahr		Abweichung	Mess-Jahr		Abweichung
	2002	2004		2002	2004	
Saar/Güdingen, 1995	1150	1163	+ 13 (+ 1,1 %)	431	498	+ 67 (+ 15,5 %)
Rhein/Bimmen, 1995	23,6	27,5	+ 3,9 (+ 16,5 %)	8,3	7,6	- 0,7 (- 8,4 %)

Zur Abschätzung der Vergleichbarkeit der UPB-Teilproben untereinander wurde zusätzlich von weiteren fünf Proben gleicher PNF und gleichen Jahrgangs jeweils Material aus drei Gefäßen mit unterschiedlichen UPB-Codes untersucht; die Probenaufarbeitungen bzw. Messungen erfolgten wieder in Serie.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 9 und 10 zusammen mit den berechneten statistischen Daten aufgelistet. Zur Abschätzung der laborinternen Präzision wurde die Wiederholstandardabweichung s_L und die relative laborinterne Wiederholstandardabweichung V_L [%] berechnet.

⁵ Es zeigte sich, dass die zunächst eingesetzte GC-Kapillarsäule HT8 der Firma SGE die beiden HHCB-Isomeren nur antrennt. Um aber die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die schon 2001/2002 eingesetzte Kapillarsäule RESTEK RTX-50 wieder in das GC/MS-System eingebaut. Zudem wurden die WFR für HHCB und AHTN und die aktuellen Verfahrenskenngrößen neu ermittelt.

Tabelle 9: Messergebnisse zur Abschätzung der Wiederholbarkeit der analytischen Methode

PNF und Jahr	Substanz	Einzelwerte der Dreifachbestimmungen aus einem UPB-Gefäß [ng/g FG]			Mittelwert [ng/g FG]	s _L [ng/g FG]	V _L [%]
Elbe/Prossen, 1994	HHCB	25,0	23,9	23,3	24,1	0,86	3,6
	AHTN	11,9	11,9	11,1	11,6	0,47	4,1
Mulde, 1996	HHCB	112	108	113	111	2,75	2,5
	AHTN	24,7	24,9	23,9	24,5	0,50	2,0
Saar/Güdingen, 2001	HHCB	524	457	492	491	33,4	6,8
	AHTN	58,5	43,4	47,2	49,7	7,86	15,8
Rhein/Iffezheim, 2002	HHCB	302	263	300	288	22,1	7,7
	AHTN	17,2	16,0	17,3	16,9	0,74	4,4
Donau/Ulm, 2003	HHCB	43,5	49,3	42,7	45,2	3,59	8,0
	AHTN	3,6	4,4	3,9	3,9	0,41	10,4

Tabelle 10: Messergebnisse zur Abschätzung der Vergleichbarkeit der UPB-Teilproben

PNF und Jahr	Substanz	Einzelwerte der Dreifachbestimmungen aus verschiedenen UPB-Gefäßen [ng/g FG]			Mittelwert [ng/g FG]	s _L [ng/g FG]	V _L [%]
Saar/Rehlingen, 1994	HHCB	782	693	768	748	47,6	6,4
	AHTN	314	300	318	311	9,5	3,1
Rhein/Weil, 1996	HHCB	309	277	264	283	23,2	8,2
	AHTN	60,1	63,4	57,7	60,4	2,9	4,8
Saale, 1998	HHCB	994	1036	837	956	105	11,0
	AHTN	151	168	134	151	17,0	11,3
Belauer See, 2001	HHCB	0,64	0,59	0,60	0,6	0,03	4,6
	AHTN	< 0,4	< 0,4	< 0,4	-	-	-
Elbe/Barby, 2002	HHCB	19,7	21,4	19,8	20,3	0,96	4,7
	AHTN	2,25	2,52	2,52	2,4	0,16	6,5

Die relativen laborinternen Wiederholstandardabweichungen (V_L-Werte) in Tabelle 9 variieren für HHCB von 2,5 bis 8,0 % und für AHTN von 2,0 bis 15,8 %. Die V_L-Werte in Tabelle 10 liegen für HHCB zwischen 4,6 und 11,0 % und für AHTN zwischen 3,1 und 11,3 %.

6.5.3. Routine-Qualitätssicherung im Jahr 2004

Die Überprüfung der Zuverlässigkeit des analytischen Verfahrens in der Routine-Phase des zweiten Prüfauftrags (Februar bis Juli 2004) erfolgte durch die Untersuchung der sogenannten Rhein-Referenzprobe⁶. Die Referenzprobe wurde in jeder Messserie, insgesamt 11 mal aus drei unterschiedlichen UPB-Gefäßen aufgearbeitet und die Analyt-Gehalte bestimmt; die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: *Messergebnisse zur Überprüfung der Zuverlässigkeit des analytischen Verfahrens bzw. der laborinternen Präzisionsmessungen an der Rhein-Referenzprobe*

UBA-Code	Analyse-Datum	Ergebnisse in ng/g FG	
		HHCB *)	AHTN *)
31110000042019697	20. April 04	160	16,5
31110000042019697	23. April 04	172	16,6
31110000042019697	28. April 04	144	16,1
31110000042019697	3. Mai 04	179	22,9
31110000042019696	11. Mai 04	176	16,0
31110000042019696	24. Mai 04	205	20,2
31110000042019696	1. Juni 04	178	19,8
31110000042019695	14. Juni 04	175	20,3
31110000042019695	24. Juni 04	175	24,7
31110000042019695	21. Juni 04	178	22,1
31110000042019695	28. Juni 04	175	21,5
Mittelwert:		174	19,7
laborinternen Wiederholstandardabweichung, s_L :		14,6	3,0
relative Wiederholstandardabweichung V_L , [%]:		8,4	15,4

*) Es wurden keine Ausreißer mit einem Test nach Grubbs mit $P = 95\%$ festgestellt.

6.5.4. Beurteilung der analytischen Methode

Zur Beurteilung der Methoden-Präzision wurden die relativen laborinternen Wiederholstandardabweichungen V_L [%] der verschiedenen Experimente und die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Messjahre in Tabelle 12 zusammengefasst.

⁶ Das Rhein-Referenzmaterial wurde aus linker Brassenmuskulatur der PN-Fläche Weil am Rhein und den PN-Jahrgängen 2000 bis 2002 hergestellt.

Tabelle 12: Zusammenstellung der relativen laborinternen Wiederholstandardabweichung (Mittelwert, V_L in %) und die Abweichung bei unterschiedlichen Messjahren (%)

Experiment	HHCB	AHTN
Wiederholbarkeit der analytischen Methode, V_L in % (3fache Analyse des gleichen UPB-Gefäßes)	3,6 / 2,5 / 6,8 / 7,7 / 8,0 (Mittelwerte)	4,1 / 2,0 / 15,8 / 4,4 / 10,4 (Mittelwerte)
Vergleichbarkeit an UPB-Proben, V_L in % (3fache Analyse der gleichen UPB-Probe)	6,4 / 8,2 / 11,0 / 4,6 / 4,7 (Mittelwerte)	3,1 / 4,8 / 11,3 / - / 6,5 (Mittelwerte)
Routine-Qualitätssicherung, V_L in % (11fache Analyse der Rhein-Referenzprobe)	8,4 (Mittelwert aus 11 Messungen)	15,4 (Mittelwert aus 11 Messungen)
Abweichung bei unterschiedlichen Messjahren in % (2fache Analyse der gleichen UPB-Probe)	1,1 / 16,5 (Einzelwerte)	15,5 / - 8,4 (Einzelwerte)

Die Experimente zur Wiederholbarkeit der analytischen Methode, zur Abschätzung der Vergleichbarkeit der UPB-Teilproben (analytische Methode und der Einfluss unterschiedlicher UPB-Gefäße) sowie die Untersuchungen der Rhein-Referenzprobe variieren in vergleichbarem Maße. Ein Einfluss der unterschiedlichen UPB-Proben bzw. der unterschiedlichen UPB-Gefäße auf die Methoden-Präzision ist nicht gegeben.

Auch die Abweichung von Ergebnissen zweier unterschiedlicher Messjahre (Einzelwerte) liegt nur geringfügig oberhalb der (maximalen) V_L -Werte aus den Tabellen 9 – 11. Dies belegt die Vergleichbarkeit der Werte für die unterschiedlichen Mess-Jahre 2002 und 2004.

Fasst man die einzelnen Mittelwerte der Zeilen 2 und 3 der Tabelle 12 zu weiteren Mittelwerten zusammen, so erhält man für HHCB 5,7 und 7,0 % bzw. für AHTN 8,1 und 6,4 %. Diese Werte der Methoden-Präzision liegen unterhalb der erweiterten Ergebnisunsicherheit U , die im ersten Prüfauftrag für HHCB mit 10,2 % berechnet wurde.

Die Präzision der analytische Methode wird somit durch die 2001 nach dem EURACHEM-Konzept ermittelte erweiterte Ergebnisunsicherheit U für HHCB von ca. 10 % recht gut beschrieben.

7. Ergebnisse und Ergebnisberechnung

Die Ergebnisse wurden aus den Quantifizierungsdaten der GC/MS/MS-Messungen (= Analyt-Konzentration in den Messlösungen) nach Formel (1) berechnet, eine Umrechnung auf den Fettgehalt erfolgte nicht.

$$G = \frac{C_P - C_{LW}}{WFR \cdot m \cdot V} \quad (2)$$

G = Analyt-Gehalt [ng/g Frischgewicht]

C_P = Analyt-Konzentration in der Messlösung der Probe [ng/0,1 mL]

C_{LW} = Analyt-Konzentration in der Messlösung des Leerwertes [ng/0,1 mL]

WFR = Wiederfindungsrate [-]

m = Einwaage [g]

V = Verdünnungsfaktor (Volumen des zur Quantifizierung eingesetzten Extrakt-Aliquots/
Gesamtvolumen des Probenextrakts)

Die berechneten Analyt-Gehalte sind in den Tabellen 13a bis 13f für das Jahr 2001 und in Tabelle 14 für das Jahr 2004 aufgelistet. Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze sind mit '<Zahlenwert der BG' angegeben (siehe Kapitel 6.4, Verfahrens-Leerwerte und Bestimmungsgrenze).

Tabelle 13d: Analyt-Gehalte der Matrix Brassenmuskulatur in ng/g Frischgewicht

Probenahme-		HHCB	AHTN	ADBI	AHDl	ATII	ATTN	MX	MK
Fläche	Jahr								
Elbe/Prossen	1993	35,0	18,1	2,2	< 0,1	1,4	< 0,1	6,0	1,1
Elbe/Prossen	1995	15,0	5,3	0,35	0,16	0,52	< 0,1	1,5	0,24
Elbe/Prossen	1997	55,6	13,5	0,69	2,3	1,5	< 0,1	3,1	0,58
Elbe/Prossen	1999	50,8	9,5	0,47	1,0	0,83	< 0,1	3,2	0,46
Elbe/Zehren	1999	49,5	10,1	0,48	0,68	0,59	< 0,1	1,2	0,43
Elbe/Barby	1993	124	51,2	2,6	0,15	2,5	< 0,1	4,6	4,8
Elbe/Barby	1995	92,0	27,9	1,8	0,50	1,8	< 0,1	1,0	1,3
Elbe/Barby	1997	128	27,1	0,84	1,6	1,9	< 0,1	0,53	0,44
Elbe/Barby	1999	51,2	9,6	0,60	0,76	0,60	< 0,1	0,19	0,31
Elbe/Cumlosen	1999	31,1	5,9	0,58	< 0,1	0,58	< 0,1	0,15	0,27
Elbe/Blankenese	1993	55,3	28,9	3,1	0,31	1,9	< 0,1	1,2	4,8
Elbe/Blankenese	1995	107	43,3	3,4	1,4	2,7	< 0,1	0,48	1,7
Elbe/Blankenese	1997	74,6	21,1	2,4	1,4	1,6	< 0,1	0,11	0,50
Elbe/Blankenese	1999	41,1	12,2	1,3	1,3	0,97	0,12	< 0,1	0,63
Saale	1997	574	126	7,3	16,1	8,2	< 0,1	1,4	1,9
Saale	1999	321	55,6	3,6	5,3	3,9	< 0,1	0,35	1,1
Mulde	1997	101	21,9	0,78	1,1	1,8	< 0,1	0,27	0,24
Mulde	1999	14,5	3,4	0,12	< 0,1	0,19	< 0,1	0,17	< 0,1
Saar/Güdingen	1995	1150	431	12,0	5,0	34,1	0,17	12,2	6,6
Saar/Güdingen	1997	1677	439	25,1	33,1	53,5	< 0,1	6,3	5,4
Saar/Güdingen	1999	613	112	9,1	12,7	15,7	< 0,1	2,4	2,0
Saar/Rehlingen	1995	526	216	11,4	4,6	23,4	< 0,1	4,1	5,6
Saar/Rehlingen	1997	1004	236	12,3	21,2	28,6	< 0,1	2,4	3,9
Saar/Rehlingen	1999	670	132	9,9	15,0	15,0	< 0,1	1,7	3,5
Bornhöved	1992	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Bornhöved	1997	0,74	0,50	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Bornhöved	1999	0,57	0,26	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Rhein/Weil	1995	111	34,3	2,2	0,7	4,3	< 0,1	0,97	0,87
Rhein/Weil	1997	258	62,7	3,5	2,2	5,3	< 0,1	1,00	0,78
Rhein/Weil	1999	109	20,9	1,7	1,2	1,7	< 0,1	0,54	0,37
Rhein/Iffezheim	1995	149	41,2	2,9	0,95	5,5	< 0,1	1,0	0,75
Rhein/Iffezheim	1997	300	61,2	2,8	2,6	4,5	< 0,1	0,59	0,63
Rhein/Iffezheim	1999	159	29,2	2,8	2,9	2,4	< 0,1	0,37	0,67
Rhein/Koblenz	1995	66,0	20,8	1,0	0,29	1,9	< 0,1	0,20	0,32
Rhein/Koblenz	1997	145	33,0	1,4	1,9	3,3	< 0,1	0,28	0,48
Rhein/Koblenz	1999	49,0	9,2	0,64	0,73	0,88	< 0,1	0,11	0,12
Rhein/Bimmen	1995	23,6	8,3	0,44	0,15	0,70	< 0,1	0,15	0,22
Rhein/Bimmen	1997	51,4	9,9	0,66	0,64	0,88	< 0,1	0,13	0,16
Rhein/Bimmen	1999	32,7	6,4	0,59	0,60	0,98	< 0,1	< 0,1	0,22

Tabelle 14: Analyt-Gehalte der Matrix Brassenmuskulatur in ng/g Frischgewicht

Probenahme-fläche	Probenahme-Jahr	HHCB	AHTN
Saar, Staustufe Gündingen	1994	1478	605
	1996	2005	512
	1998	1628	298
	2000	667	77,2
	2001	491 *)	49,7 *)
	2002	651	55,1
	2003	366	22,0
Saar, Staustufe Rehlingen	1994	748 *)	311 *)
	1996	1154	259
	1998	1793 **)	332 **)
	2000	820	114
	2001	969	112
	2002	525	45,8
	2003	440	30,6
Rhein, Weil	1996	283 *)	60,4 *)
	1998	340	60,3
	2000	171	29,6
	2001	153	20,2
	2002	154	18,5
	2003	128	13,2
Rhein, Iffezheim	1996	307	48,4
	1998	419	65,3
	2000	233 **)	25,8 **)
	2001	185 **)	14,3 **)
	2002	288 *)	16,9 *)
	2003	271 **)	14,1 **)
Rhein, Koblenz	1996	172	36,5
	1998	60,4	9,4
	2000	56,3	7,6
	2001	66,8	6,8
	2002	84,3	7,3
	2003	37,4	3,2
Rhein, Bimmen	1996	45,2	8,2
	1998	78,3	11,1
	2000	57,5	8,0
	2001	53,2	5,9
	2002	59,6	6,2
	2003	129	10,5

Fortsetzung der Tabelle 14

Probenahme­fläche	Probenahme-Jahr	HHCB	AHTN
Elbe, Prossen	1994	24,1 *)	11,6 *)
	1996	33,1	9,6
	1998	63,0	14,3
	2000	53,4	11,8
	2001	60,8	9,8
	2002	103	12,6
	2003	36,6	4,2
Elbe, Zehren	2001	62,6	8,5
	2003	40,2	3,9
Elbe, Barby	1994	88,5	30,1
	1996	154	33,2
	1998	47,0	8,3
	2000	29,9	6,0
	2001	43,1	5,3
	2002	20,3 *)	2,4 *)
	2003	24,4	2,2
Elbe, Cumlosen	2001	29,1	3,7
	2003	9,6	0,84
Elbe, Blankenese	1994	92,4	41,1
	1996	73,3	19,6
	1998	116	24,1
	2000	40,7	7,2
	2001	51,2	7,0
	2002	63,7	10,2
	2003	74,6	8,7
Saale, Wettin	1995	349	90,9
	1996	299	74,7
	1998	956 *)	151 *)
	2000	298	57,4
	2001	381	65,0
	2002	418	47,9
	2003	172	15,9
Mulde, Dessau	1995	89,7	24,8
	1996	111 *)	24,5 *)
	1998	36,8	6,7
	2000	17,7	2,8
	2001	20,4	2,4
	2002	19,9	2,1
	2003	29,7	2,8

Fortsetzung der Tabelle 14

Probenahme­fläche	Probenahme-Jahr	HHCB	AHTN
Belauer See, Bornhöved	2001	0,60 *)	< 0,4 *)
	2003	< 0,4	< 0,4
Donau, Ulm	2002	45,3	4,8
	2003	45,2 *)	3,9 *)
Donau, Kelheim	2002	38,9	4,6
	2003	35,2	3,1
Donau, Jochenstein	2002	77,6	8,5
	2003	29,8	2,9

*) Dreifachmessung im Rahmen der Ermittlung der Methoden-Präzision

**) Doppelbestimmung

8. Literatur

- [1] DIN EN ISO/IEC 17025, Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (2000), Beuth Verlag, Berlin
- [2] EURACHEM/CITAC GUIDE (2000): Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Ellison, S. L. R., Rosslein, M., Williams, A. (Editors), 2nd Edition, April 2000
- [3] SQS 2000, Software zur statistischen Qualitätskontrolle analytischer Daten (Microsoft-EXCEL-Add-On-Produkt). Dr. Joachim Kleiner, Individuelle Software & Schulung, Mühlestrasse 5, D-78345 Moos
- [4] DIN 32 645 (1994), Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze - Ermittlung unter Wiederholbedingungen (Begriffe, Verfahren, Auswertung), Beuth Verlag, Berlin

Anhang I Analytisches Verfahren

Auf den Seiten 31 bis 42 ist die Verfahrens-SOP V7 – 561/02 „Bestimmung von Polycyclischen- und Nitro-Moschusduftstoffen (PNMF) in organischen Matrices mittels Gaschromatographie/ Massenspektrometrie (GC/MS/MS)“ des IME in Schmallenberg in der 2003 novellierten Fassung aufgeführt.

Auf die Einbeziehung der Unterschriftenseite in diesem Bericht wurde hier verzichtet. Weiterhin wurden die Kopfzeile und die Seitennummerierung dem vorliegenden Bericht angepasst. Die SOP wurde ab 12. November 2003 von QAU des IME gültig gestellt.

Inhalt der SOP V7 – 561/02		Seite
1	Anwendungsbereich	32
2	Zusammenfassung	32
3	Geräte	34
4	Lösungsmittel und Reagenzien	35
5	Vorbemerkungen zur PNMF-Spurenanalytik	35
6	Extraktion der Analyten aus dem organischen Probenmaterial	35
7	Aufreinigung der ASE-Extrakte mittels GPC an Bio-Beads S-X3	37
8	Aufreinigung der GPC-Eluate mittels Adsorptionschromatographie	38
9	Gaschromatographisch-massenspektrometrische Messung	41
10	Qualitätssicherungsmaßnahmen	41
11	Literatur	42

1 Anwendungsbereich

Das Verfahren dient zur quantitativen Bestimmung von ausgewählten Polycyclischen und Nitro-Moschusduftstoffen (PNMF, polycyclic and nitro musk fragrances) in organischen Matrices mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS/MS). Der Gehalt der Einzelkomponenten (siehe Tabelle AI, 1a bzw. Tabelle AI, 1b) wird in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Frischgewicht (FG) ermittelt. Es wird keine Fettbestimmung und keine Umrechnung der PNMF-Gehalte auf den Fettanteil der Probe vorgenommen. Die Bestimmungsgrenzen (BG) des Verfahrens liegen je nach Zielsubstanz und Leerwert unterhalb von $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ FG.

Die Methode ist anwendbar für die folgenden organischen Matrices:

- Miesmuscheln
- Dreikantmuscheln
- Brassenmuskulatur
- Blasentang
- Silbermöwenei
- Aalmuttermuskulatur

Ausgangsmaterialien sind in der Regel tiefgefrorene und gemahlene Proben der Umweltprobenbank des Bundes (UPB).

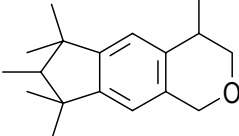
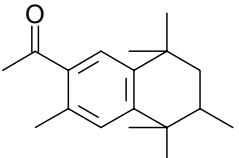
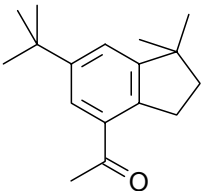
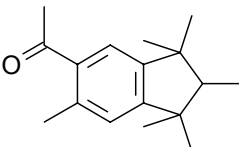
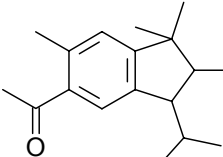
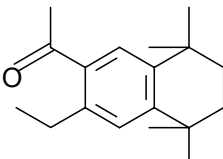
2 Zusammenfassung

Die organischen Proben werden mit Natriumsulfat (Na_2SO_4) verrieben und anschließend mittels „Beschleunigter Lösemittelextraktion“ (accelerated solvent extraction, ASE) extrahiert. Nach der ASE-Prozedur werden die n-Hexan-Extrakte in Messkolben auf exakte Volumina eingestellt. Aliquote Anteile der Extrakte werden dann mit dem Internen Standard (IS) versetzt, durch Abblasen mit Stickstoff (N_2) eingengt und anschließend einer zweistufigen Reinigung unterworfen:

- Gelpermeationschromatographie (GPC) an Bio-Beads S-X3 mit dem Elutionsgemisch Dichlormethan/Cyclohexan
- Adsorptionschromatographie / Fraktionierung an aktiviertem Kieselgel.

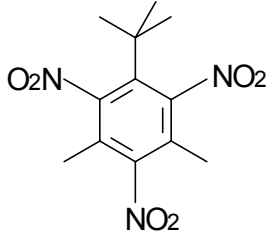
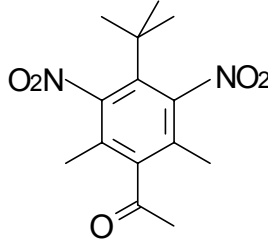
Als Interner Standard für die PNMF-Bestimmung wird deuteriertes Moschus-Xylol ($\text{C}_{12}\text{D}_{15}\text{N}_3\text{O}_6 \equiv \text{MX-D15}$) eingesetzt.

Tabelle AI, 1a: Formeln, Namen, Akronyme und CAS RN sowie Handelsnamen der Polycyclischen Moschusduftstoffe (PMF)

Chemische Struktur	Summenformel	Chemischer Name	Akronym CAS RN	Handelsnamen
	C ₁₈ H ₂₆ O	1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[g]-2-benzopyrane	HHCB 1222-05-5	Galaxolide® (Abbalide®, Pearlide®)
	C ₁₈ H ₂₆ O	1-(5,6,7,8-tetrahydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naphthalenyl)-ethanone	AHTN 1506-02-1	Tonalide® (Fixolide®)
	C ₁₇ H ₂₄ O	1-[6-(1,1-dimethylethyl)-2,3-dihydro-1,1-dimethyl-1H-inden-4-yl]-ethanone	ADBI 13171-00-1	Celestolide® (Crysolide®)
	C ₁₇ H ₂₄ O	1-(2,3-dihydro-1,1,2,3,3,6-hexamethyl-1H-inden-5-yl)-ethanone	AHDI 15323-35-0	Phantolide®
	C ₁₈ H ₂₆ O	1-[2,3-dihydro-1,1,2,6-tetramethyl-3-(1-methylethyl)-1H-inden-5-yl]-ethanone	ATII 68140-48-7	Traseolide®
	C ₁₈ H ₂₆ O	1-(3-ethyl-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-ethanone	ATTN 88-29-9	Versalide®

Daten der Tabelle übernommen aus: G. Rimkus, Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment [1].

Tabelle AI, 1b: Formeln, Namen, Akronyme und CAS RN sowie Handelsnamen der Nitro-Moschusduftstoffe (NMF)

Chemische Struktur	Summenformel	Chemischer Name	Akronym CAS RN	Handelsnamen
	$C_{12}H_{15}N_3O_6$	2,4,6,-Trinitro- 1,3-dimethyl- 5-tert. butylbenzol	MX 81-15-2	Moschus-Xylol
	$C_{14}H_{18}N_2O_5$	4-tert.-Butyl- 2,6-dimethyl- 3,5-dinitro- acetophenon	MK 81-14-1	Moschus-Keton

3 Geräte

- Anlage zum Abblasen von Lösungsmitteln mit Stickstoff (N₂), z.B. ZYMARK® TurboVap®II,
- Muffelofen,
- Trockenschrank (Temperaturbereich bis 300 °C),
- ASE-Probenfläschchen (40 oder 60 mL),
- ASE-Extraktionszellen (33, 22 oder 11 mL),
- Microvials für die Chromatographie (300 µL),
- Porzellan-Mörser,
- übliche Glasgeräte wie Messkolben, Mess-, Voll- und Microman-Pipetten, Pasteurpipetten, Schraubdeckelgläser, Einengungskolben etc.,
- Mini-Chromatographiesäule 5 mm ID, 30 cm Länge mit ausgezogener Spitze und Vorratsreservoir für Elutionsmittel (20 bis 30 mL),
- ASE-Extraktionssystem, z.B. ASE200 der Firma DIONEX,
- GC/MS/MS-System, z.B. VARIAN SATURN 2000,
- Gelpermeationschromatographie-Anlage, z.B. CleanUp XL der Firma ABIMED.

4 Lösungsmittel und Reagenzien

- n-Hexan zur Rückstandsanalyse / für die organische Spurenanalytik,
- Dichlormethan (DCM) zur Rückstandsanalyse / für die organische Spurenanalytik,
- Cyclohexan zur Rückstandsanalyse / für die organische Spurenanalytik,
- Natriumsulfat, zur Analyse (2 h bei 500 °C gegläht),
- Standardlösungen der Analyten in n-Hexan,
- Standardlösung des IS in n-Hexan,
- Kieselgel, Fa. ICN: Kieselgel 60a, 100-200 mesh (2 h bei 500 °C gegläht),
- Bio-Beads® S-X3, 200-400 mesh, BIO-RAD Nr. 152-2750.

5 Vorbemerkungen zur PNMF-Spurenanalytik

Polycyclische und Nitro-Moschusduftstoffe sind häufige Bestandteile in Kosmetika, Waschmitteln und Reinigungsmitteln. Eine Kontamination der zur Probenaufarbeitung und Messung benötigten Geräte ist deshalb nicht auszuschließen bzw. nicht zu vermeiden.

Zur Minimierung der Kontaminationen während der Probenaufarbeitung und Messung sind deshalb die folgenden Schritte durchzuführen:

- Alle Glasgeräte sorgfältig reinigen und mindestens 24 Stunden bei 250 °C ausheizen, ggf. vor dem Gebrauch noch mit dem verwendeten Lösungsmittel ausspülen;
- ASE-Zellen mindestens 24 Stunden bei 150 °C ausheizen;
- ASE-Filter aus Cellulose vor Gebrauch mehrfach mit n-Hexan extrahieren (z.B. in der ASE-Anlage oder im Ultraschallbad)
- alle Einengungsschritte werden durch Abblasen mit N₂ durchgeführt;

Zur Überprüfung und zur Quantifizierung der Leer- oder Blindwerte (Reinheit von Lösungsmitteln und Geräten) werden Analysengänge nur mit Natriumsulfat durchgeführt (siehe Methoden-Leerwerte).

6 Extraktion der Analyten aus dem organischen Probenmaterial

Je nach Art der Probe werden ca. 1 bis 5 g der gemahlenden, tiefgefrorenen Probe im Verhältnis von ca. 1:6 mit Natriumsulfat im Porzellan-Mörser verrieben und homogenisiert. Die „rieselfähige“ Mischung wird dann in der folgenden Weise in eine 33mL-ASE-Zelle eingefüllt:

- Zusammenbau der ausgeheizten ASE-Zelle und Einlegen des unteren Papier-Filters
- Einfüllen des Probengemisches,
- Aufgabe des IS (nur wenn die Probe ohne Verdünnung aufgearbeitet wird, siehe Anmerkung 3),
- Auffüllen der Zelle mit Na₂SO₄,
- Verschließen der ASE-Zelle.

Tabelle AI, 2: Bedingungen zur Extraktion der PNMF aus organischer Matrix mittels ASE

Gerät	ASE 200 der Fa. DIONEX
Extraktions- / Lösungsmittel	n-Hexan
Temperatur	80 °C
Druck	14 MPa
Flush (mit Extraktionsmittel)	60 % des Zellvolumens
Purge (mit N ₂)	1 MPa für 99 s
Statische Extraktion	10 min
Aufheizphase (bis 100 °C)	5 min
Zahl der Extraktionszyklen	2
Eluatmenge	ca. 40 mL bei einer 33mL-Zelle

Die ASE-Zelle wird dann in den Extraktor ASE 200 der Firma DIONEX eingesetzt und unter den in Tabelle 2 angegebenen Bedingungen extrahiert. Das Eluat wird in gereinigten und septumverschlossenen ASE-Fläschchen aufgefangen. Zur Trocknung werden ca. 1 g Na₂SO₄ zugesetzt und kräftig geschüttelt.

Nach dem Absitzen des Natriumsulfats wird das Eluat in einen 50mL-Meßkoben überführt und mit n-Hexan bis zur Marke aufgefüllt.

Um den großen Unterschied im Gehalt der einzelnen Analyten (HHCB > AHTN >> andere PNMF) für die Messung auszugleichen werden unterschiedliche aliquote Volumina des Extraktes (z.B. 5 und 45 mL) in ein Einengungsgefäß überführt, mit IS versetzt und mit N₂ bis auf ca. 0,2 mL eingengt (vgl. Punkt 10.1).

Anmerkung 1: Das Verreiben mit Na₂SO₄ wird je nach Matrix unterschiedlich durchgeführt. Die Proben von Mies- und Dreikantmuscheln werden aufgrund von Inhomogenitäten (hoher Wassergehalt) nach dem Auftauen vollständig mit Na₂SO₄ vermischt. Aliquote Anteile dieser Mischung werden dann in die ASE-Zelle eingefüllt. Von den Proben der anderen genannten Matrices wird die zur Analyse vorgesehene Probenmenge direkt mit der entsprechenden Menge Na₂SO₄ vermischt und anschließend in die ASE-Zelle eingefüllt. Verbleibendes Totvolumen in der ASE-Zelle wird mit Na₂SO₄ aufgefüllt.

Anmerkung 2: Sollen nur geringe Probenmengen untersucht werden, so können auch ASE-Zellen von 22 oder 11 mL Inhalt verwendet werden.

Anmerkung 3: Liegt der Analytgehalt des Extraktes für alle PNMF im Arbeitsbereich der Kalibrierfunktion, so kann der IS der Probe direkt in die ASE-Zelle zugesetzt werden. Der Verdünnungsschritt wird dann nicht vorgenommen, sondern der ASE-Extrakt direkt in ein Einengungsgefäß überführt und mit N₂ bis auf ca. 0,2 mL eingengt. Bei genügend großer Verdünnung (> 1:50) kann auf den GPC-Schritt verzichtet werden. Die Reinigung des Extraktes erfolgt dann nur mittels Adsorptionschromatographie an Kieselgel.

7 Aufreinigung der ASE-Extrakte mittels GPC an Bio-Beads S-X3

Zur Entfernung der extrahierten Probenmatrix (Fettgehalt von Brassen bis ca. 10 Gew.-%) wird der ASE-Extrakt zunächst durch Gelpermeationschromatographie (GPC) an Bio-Beads S-X3 aufgereinigt. Hierzu wird eine automatische GPC-Anlage, z.B. das System CleanUp XL der Firma Abimed eingesetzt.

7.1 Vorbereitungen

Das Bettmaterial Bio-Beads S-X3 (12 bis 15 g) wird über Nacht im Elutionsgemisch Dichlormethan/Cyclohexan im Volumenverhältnis (1+1, v/v) vorgequollen und mit dem Fließmittel in eine GPC-Säule mit 10 mm Innendurchmesser eingespült (Füllhöhe ca. 40 cm). Die Konditionierung wird in der GPC-Anlage zuerst mit einem erhöhten Fluss von 2,5 mL/min und dann mit dem Trennfluss von 1,5 mL/min durchgeführt. Entstehende Totvolumina werden durch Nachführen des Kolbens entfernt.

Anmerkung 4: Die GPC-Säule muss ständig mit dem entsprechenden Elutionsgemisch gefüllt sein.

Anmerkung 5: Nach jeder Neubefüllung wird zunächst ein Standard-PNMF-Gemisch mit bekannten Konzentrationen chromatographiert und in mehreren Fraktionen auffangen. Diese werden anschließend mit N₂ bis zur Trockne eingengt und mittels GC/MS analysiert.

7.2 Durchführung

Der ASE-Extrakt (0,2 mL) wird mit dem GPC-Laufmittel auf ca. 2,2 mL verdünnt und dann mit einer automatisierten GPC-Anlage CleanUp XL und dem Lösungsmittelgemisch Dichlormethan/Cyclohexan (1+1, v/v) bei einem konstanten Fluss von 1,5 mL/min durchgeführt. Die Verfahrensschritte sind:

- Konditionieren der GPC-Säule,
- Aufgabe der ASE-Lösung auf die GPC-Trennsäule, Injektionsvolumen: 2 mL,
- Abtrennung der Matrix: 0 - 12 min,
- Sammlung der Analyt-Fraktion 12 - 20 min,
- Abtrennung weiterer Matrix: 20 - 30 min und erneutes Konditionieren des Gelbettes.

Das GPC-Eluat wird mit N₂ bis auf ca. 1 mL abgeblasen. Zur Entfernung des verbliebenen Dichlormethans werden 5 mL n-Hexan zugegeben und dann wieder auf ca. 1 mL eingengt.

8 Aufreinigung der GPC-Eluate mittels Adsorptionschromatographie

Zur Eliminierung polarer Probenmatrix wird das GPC-Eluat durch Adsorptionschromatographie an aktiviertem Kieselgel weiter aufgereinigt. Die Prozedur wird manuell in Mini-Chromatographiesäulen durchgeführt.

8.1 Vorbereitungen

Das Kieselgel wird zur Aktivierung (Aktivitätsstufe 0) 2 Stunden im Muffelofen bei 500°C geblüht und nach dem Abkühlen (im Exsikkator) in einer Schraubdeckelflasche gasdicht gelagert (Ausschluss der Luftfeuchtigkeit).

8.2 Durchführung

Eine Mini-Chromatographiesäule wird mit Quarzwolle verschlossen und mit 1,0 g aktiviertem Kieselgel gefüllt. Die Reinigung der Extrakte erfolgt dann entsprechend des nachfolgend beschriebenen Schemas (die Säule darf nicht mehr trocken laufen):

- Konditionieren: 10 mL n-Hexan;
- Probenaufgabe: 1 mL n-Hexan (siehe Punkt 7.2);
- Spülen: 9 mL n-Hexan/Dichlormethan (90:10, v/v);
- Eluieren: 15 mL n-Hexan/Dichlormethan (30:70, v/v).

Das Eluat wird in einem Einengungsgefäß aufgefangen und mit N₂ auf ca. 0,5 mL eingeengt. Anschließend wird das Eluat mit einer Pasteurpipette in ein 300 µL-Microvial überführt, weiter auf 100 µL eingeblasen und mit einer Aluminiumbördelkappe (mit teflonkaschierter Butylgummieinlage) verschlossen.

Anmerkung 6: siehe Anmerkung 5 (gilt analog bei Änderungen der Kieselgel-Charge).

Tabelle AI, 3: Betriebsparameter des Ion Trap GC/MS/MS-Systems Varian Saturn 2000

GASCHROMATOGRAPH	VARIAN CP-3800
Trennkapillare	RESTEK Rtx [®] -50 ^{*)} ; 30 m L x 0,25 mm ID; 0,1 µm Filmdicke;
Ofentemperatur	1,0 min 100 °C isotherm; Rate 1: 10 °C/min auf 175 °C; 6,0 min 175 °C isotherm; Rate 2: 10 °C/min auf 300 °C; 8,0 min 300 °C isotherm; GC-Laufzeit: 35,0 min;
INJEKTOR	VARIAN 1079 MIT EFC ^{**)}
Temperatur(programm)	260 °C isotherm;
Trägergasart	nachgereinigtes Helium;
Trägergasfluss	1,1 mL/min ^{***)} (constant flow mode);
Druckprogramm (resultierend)	1,0 min 11,7 psi isobar; Rate 1: 0,60 psi/min auf 16,2 psi; 6,0 min 16,2 psi isobar; Rate 2: 0,57 psi/min auf 23,3 psi; 8,0 min 23,3 psi isobar;
Splitsteuerung	Initial: Verhältnis1:10; 0,0-1,0 min: off; 1,0 - 35,0 min: Verhältnis 1:50.
PROBENGEBER	GERSTEL MPS2
Probenaufgabe	2 µL n-Hexan (1,0 min splitlos);
Spülmedien	A: n-Hexan mit 10% Aceton; B: n-Hexan.
MASSENSPEKTROMETER	VARIAN SATURN 2000
Ionisation	Elektronenstoß (EI) mit 70 eV;
Ion Trap Temperatur	180 °C;
Manifoldtemperatur	80 °C;
Transferlinietemperatur	250 °C

^{*)} Rtx[®]-50 Phase: Crossbond[®]50%phenyl-50%methylpolysiloxan;

^{**)} EFC ≡ electronic flow control

^{***)} ⇒ resultierende lineare Gasströmungsgeschwindigkeit: 39 cm/sec bei 100°C

Tabelle AI, 4: **Substanzabhängige Geräteeinstellungen zum MS/MS-Prozeß für die PMF und zum MS/µSIS-Prozeß für die NMF am Varian Saturn 2000**

Segment set points (Ionization mode: EI Auto)						
Compound PNMF	Segm. no. (mode)	Segment time [min]	Mass range [m/z]	Scan time [sec/scan]	Multiplier offset [V]	Emission current [µA]
Solvent	1 (MS off)	0 – 9,0	-	-	-	-
ADBI/AHDI	2 (MS/MS)	9,0-10,8	170-230	0,70	300	50
ATTN	3 (MS/MS)	10,8–11,6	180-250	0,70	300	50
ATII	4 (MS/MS)	11,6–12,1	170-220	0,70	300	50
HHCb/AHTN	5 (MS/MS)	12,1–13,3	170-250	0,70	300	50
MX-D15 (IS)	6 (MS/µSIS)	13,3–14,0	246-300	0,53	300	50
MX	7 (MS/µSIS)	14,0–16,0	246-290	0,52	300	50
MK	8 (MS/µSIS)	16,0–20,0	245-285	0,44	300	50
Count threshold: 1 count; mass defect: 0mmu/100u						
MS/MS Ion Preparation (Waveform type: resonant)						
Compound PNMF	Prescan ionization time [µsec]	Excitation storage level [m/z]	Excitation amplitude [V]	Isolation window [m/z]	Precursor (parent) ion mass [m/z]	Product (daughter) ion mass [m/z] *)
ADBI/ AHDI	1.500	100	0,40	1,0	229	173+187 (201)/ 187 (173)
ATTN	1.500	107	0,42	3,0	243	187 (201, 228)
ATII	1.500	95	0,35	3,0	215	171 + 173
HHCb/ AHTN	1.500	107	0,42	3,0	243	213 (187)/ 187 (201)
MX-D15 (IS)	5.000	-	-	2,0	294,3 + 248	-
MX	5.000	-	-	2,0	282,2 + 251	-
MK	5.000	-	-	3,0	279,2 + 247	- (280)
Background mass = mass range – 1 m/z; Max. Ionisation time: 25.000 µsec; Target TIC: 10.000						

*) gleichzeitig auch Quantifizierungsmasse (n), "qualifier ions" in Klammern

9 Gaschromatographisch-massenspektrometrische Messung

Die Elution der PNMF erfolgt in einer unpolaren Kapillarsäule (RESTEK Rtx[®]-50) in der Reihenfolge: ADBI, AHDI, ATTN, ATII, HHCB, AHTN, MX-D15 (IS), MX und MK. Die beiden HHCB-Isomere werden mit dieser Phase bis fast zur Basislinie aufgetrennt.

Die Identifizierung und Quantifizierung der Polycyclischen Moschusduftstoffe (PMF) erfolgt dann mittels GC/MS/MS und der Nitro-Moschusduftstoffe (NMF) mittels GC/MS/μSIS. Die GC/MS Betriebsparameter sind in der Tabelle AI, 3 und die substanzabhängigen Geräteeinstellungen zum MS/MS- und μSIS-Prozeß in der Tabelle AI, 4 für das GC/MS/MS-System VARIAN Saturn 2000 dargestellt.

10 Qualitätssicherungsmaßnahmen

10.1 Kalibrierung und Identifizierung

Zur Bezugskalibrierung (Grundkalibrierung) des Verfahrens werden Bezugslösungen in n-Hexan hergestellt (PNMF-Multikomponentenlösungen), welche die Analyten in variablen und den Internen Standard (IS) in konstanten Konzentrationen enthalten.

Die Gehalte der PNMF variieren substanz- und matrixabhängig sehr stark. Diese Differenzen können nicht direkt in der Bezugskalibrierung berücksichtigt werden, da für alle PNMF eine niedrige Bestimmungsgrenze angestrebt wird. Nach der ASE-Extraktion werden die Extrakte daher zunächst auf ein exaktes Volumen aufgefüllt und dann in Aliquote unterschiedlicher Größe geteilt. Erst jetzt wird der IS zugesetzt, die Probe gereinigt und gemessen (vgl. Punkt 6).

Die PNMF werden anhand der Retentionszeiten und der enthaltenen MS-Spektren (Übereinstimmung der gemessenen Spektren mit den Bibliotheksspektren der Kalibrierung) identifiziert.

Die Bezugsfunktionen der einzelnen PNMF werden durch mehrere (min. acht, möglichst äquidistant über den Arbeitsbereich verteilte) Kalibrierkonzentrationen ermittelt. Die integrierten Peakflächen der Analyten werden ins Verhältnis zu den Peakflächen des IS gesetzt (Peakflächenverhältnis, PFV) und ergeben mit den zugrundeliegenden Massengehalten der PNMF die Kalibrierfunktionen.

Die Kalibrierfunktionen gelten nur für den über den Massengehalt abgedeckten Konzentrationsbereich (Arbeitsbereich). Sie sind vom Betriebszustand des GC/MS-Systems abhängig und müssen daher regelmäßig überprüft werden. Die Standardlösungen der Analyten sind dunkel und kühl zu lagern.

10.2 Methoden-Leerwerte

Zur Kontrolle des Untersuchungsverfahrens ist pro Analysenserie ein Methoden-Leerwert aufzuarbeiten und zu messen. Dazu wird das gesamte Verfahren ohne Matrix (nur Na₂SO₄ in der ASE-Zelle) durchgeführt.

Bei einem signifikanten Leerwert können die Informationswerte der Proben um den gemessenen Leerwert korrigiert werden, wenn sich der Leerwert durch Wechsel der Chemikalien und Reinigung der Geräte nicht weiter verringern lässt.

10.3 Überprüfung des Verfahrens auf systematische Fehler

Das Meßsystem wird wie beschrieben mit Bezugslösungen in n-Hexan kalibriert. Die erhaltene Grundkalibrierung muss daher durch Aufstellung einer Wiederfindungsfunktion (WFF) auf konstante oder proportional systematische Fehler überprüft werden.

Die Aufstellung der Wiederfindungsfunktionen der Verfahren wird durch Aufstockung von Matrixproben mit Standardlösungen vorgenommen. Das Verfahren beruht auf dem von Funk, Damman und Donnevert beschriebenen Verfahren der "Standard-Addition" [2]. Hierzu werden mindestens vier gleiche Teilproben mit unterschiedlichen Standardmengen aufgestockt, während eine weitere Teilprobe ohne Addition von PNMF-Standard verbleibt. Diese Aufstockungen der Proben werden direkt in den ASE-Zellen vorgenommen, anschließend werden alle Aufarbeitungsschritte wie beschrieben durchgeführt.

Für die aufgestockten Matrix-Proben werden, basierend auf der Grundkalibrierung, die Analyt-Gehalte ermittelt. Die Darstellung der analysierten, um den Gehalt der nicht aufgestockten Teilprobe reduzierten Menge, gegen die addierte PNMF-Mengen ergibt dann die WFF.

Die aufgestellte WFF sollte augenscheinlich linear verlaufen. Es liegen keine konstanten oder proportional systematischen Fehler vor, wenn mit einer Wahrscheinlichkeit von $P=99\%$ der Vertrauensbereich (VB) des Ordinatendurchganges die „0“ und der VB der Steigung die „1“ enthält.


Die PNMF verflüchtigen sich geringfügig bei jedem Einengungsschritt, d.h. jeder Einengungsschritt reduziert die Ausbeute. Der Interne Standard MX-D15 kann diese Verluste (abhängig vom Dampfdruck des Analyten) nur bedingt ausgleichen, als Folge können daher proportional systematische Fehler auftreten. Der Analytgehalt wird mit der sich aus der WFF errechneten Wiederfindungsraten korrigiert. Typische Wiederfindungsraten der PNMF für die Matrices Brassenmuskulatur und Silbermöwenei liegen zwischen 90 und 110%.

11 Literatur

- [1] Rimkus, Gerhard G.: Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. Toxicology Letters, 111 (1999) 37-56.
- [2] Funk, W., Dammann, C., Donnevert, G.: Qualitätssicherung in der analytischen Chemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1992) 27–36.

Anhang II Kopie der Akkreditierungsurkunde

DACH Deutsche Akkreditierungsstelle Chemie GmbH
vertreten im
Deutschen AkkreditierungsRat



Akkreditierung

Die DACH Deutsche Akkreditierungsstelle Chemie GmbH bestätigt hiermit, daß das Prüflaboratorium

**Fraunhofer-Institut für
Molekularbiologie und Angewandte Oekologie
Auf dem Aberg 1
57392 Schmallenberg**

die Kompetenz nach DIN EN ISO / IEC 17025 besitzt, Prüfungen

im Bereich **Chemische und chemisch-physikalische Analytik**

zu den Prüfarten **Gaschromatographie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Atomspektrometrie, Probenvorbereitung**

zu den einzelnen Prüfverfahren der Prüfarten
Photometrie

zur Untersuchung von **Wasser, Boden, Klärschlamm, Luft, Bedarfsgegenständen, Reizstoffgeräten, Umweltproben (z.B. Blasentang, Miesmuscheln, Dreikantmuscheln, Brassenleber, Brassenmuskulatur, Aalmutter, Silbermöwe), biologischen Materialien (z.B. Vollblut, Serum, Urin)**

auszuführen.

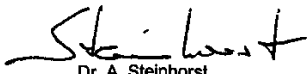
Mit der Erfüllung der Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 erfüllt das Qualitätsmanagementsystem des Prüflaboratoriums für seine Prüftätigkeiten auch die Anforderungen von DIN EN ISO 9001:1994.

Die Akkreditierung ist gültig bis: 28.01.2007


Die Anlage ist Bestandteil der Urkunde und besteht aus 4 Seiten.

DACH-Registriernummer: **DAC-P-0029-97-10**

Frankfurt, den 27.05.2002



Dr. A. Steinhorst
Geschäftsführer



Siehe Hinweise auf der Rückseite



Kopie der Akkreditierungsurkunde, Seite 2

Die Akkreditierung erfolgt aufgrund einer Begutachtung und des mit der Akkreditierungsstelle abgeschlossenen Vertrages über die Akkreditierung eines Prüflaboratoriums nach den Regeln und Verfahren des Deutschen Akkreditierungssystems, gemäß den Normen DIN EN ISO/IEC 17025 und DIN EN 45003.

Die materiellen und personellen Voraussetzungen nach DIN EN ISO/IEC 17025 für die in der Akkreditierungsurkunde angegebenen Prüfgebiete sowie für die in der Anlage zur Akkreditierungsurkunde beschriebenen Verfahren sind erfüllt.

Angaben über den Umfang der Akkreditierung (Prüfgebiete, Verfahren und Spezifikationen) sind in der Anlage zu dieser Akkreditierungsurkunde aufgeführt.

Die Anlage sowie die eingereichten Unterlagen sind Bestandteil der Akkreditierung. Änderungen bedürfen der Schriftform.

Die Akkreditierung wird unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs bei Wegfall der im Vertrag sowie in der Anlage zu dieser Akkreditierungsurkunde festgelegten Voraussetzungen erteilt.

Akkreditierungsurkunden und Anlagen dürfen nur unverändert weiterverbreitet werden. Die auszugsweise Veröffentlichung bedarf der Genehmigung der Akkreditierungsstelle.

Es darf nicht der Anschein erweckt werden, dass der Kontrolle des Prüflaboratoriums auch solche Produkte und Leistungen des Trägers unterliegen, die von dieser Akkreditierung nicht erfasst werden. Sollte der Anschein dennoch erweckt werden, so ist die Akkreditierungsstelle berechtigt, Änderungen zu verlangen.