

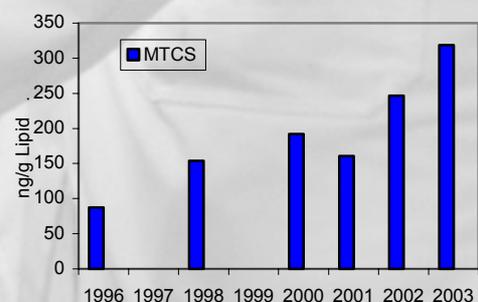
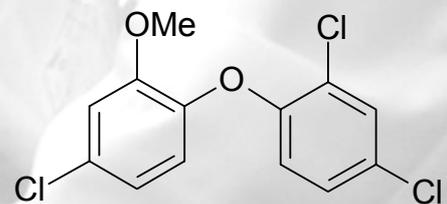
# Retrospektives Monitoring von Triclosan und Methyl-Triclosan in Brassenmuskelproben der Umweltprobenbank

## Teil I

Analytische Bestimmung von Triclosan und  
Methyl-Triclosan in Brassenmuskelproben  
der Umweltprobenbank

Fraunhofer IME  
im Auftrag des  
Umweltbundesamtes

**Oktober 2004**



Fraunhofer  
Institut  
Molekularbiologie und  
Angewandte Oekologie

Umwelt  
Bundes  
Amt   
Für Mensch und Umwelt



**Fraunhofer** Institut  
Molekularbiologie und  
Angewandte Oekologie

Abschlussbericht

## **Retrospektives Monitoring von Triclosan und Methyl-Triclosan in Brassenmuskulaturproben der Umweltprobenbank**

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und  
Angewandte Oekologie  
57392 Schmallenberg

### **Institutsleitung**

Prof. Dr. Rainer Fischer

### **Stellvertretung und Bereichsleitung Angewandte Oekologie**

Prof. Dr. Andreas Schäffer

### **Projektleitung**

Dr. Heinz Rüdell  
Walter Böhmer

### **Auftraggeber**

Umweltbundesamt  
Fachgebiet IV 2.2  
Seecktstraße 6 – 10  
13581 Berlin-Spandau

31. Juli 2004



## **Retrospektives Monitoring von Triclosan und Methyl-Triclosan in Brassenmuskulaturproben der Umweltprobenbank**

Der Bericht besteht aus 2 Teilen:

**Teil I: Analytische Bestimmung von Triclosan und Methyl-Triclosan  
in Brassenmuskulaturproben der Umweltprobenbank**

**Prüfauftrag-Code: K-UBA-007/7-61 (gilt nur für Teil I)**

Walter Böhmer, Thorsten Bernhardt

**Teil II: Bewertung der Analysen von Triclosan und Methyl-Triclosan  
in Brassenmuskulaturproben der Umweltprobenbank**

Dr. Heinz Rüdell, Dr. Martin Müller, Dr. Andrea Wenzel



## **Retrospektives Monitoring von Triclosan und Methyl-Triclosan in Brassenmuskulaturproben der Umweltprobenbank**

### **Teil I: Analytische Bestimmung von Triclosan und Methyl-Triclosan in Brassenmuskulaturproben der Umweltprobenbank**

**Prüfauftrag-Code: K-UBA-007/7-61( gilt nur für Teil I)**

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

**Bearbeitung**

Thorsten Bernhardt

**Auftraggeber**

Umweltbundesamt

Fachgebiet IV 2.2

Seecktstraße 6 – 10

13581 Berlin

31. Juli 2004

## Retrospektives Monitoring von Triclosan und Methyl-Triclosan in Brassenmuskulaturproben der Umweltprobenbank

### Teil I: Analytische Bestimmung von Triclosan und Methyl-Triclosan in Brassenmuskulaturproben der Umweltprobenbank

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>2. Allgemeine Angaben zur Prüfung</b>	<b>5</b>
<b>3. Erklärung zur Qualitätssicherung</b>	<b>6</b>
<b>4. Abkürzungen</b>	<b>6</b>
<b>5. Einleitung und Aufgabenstellung</b>	<b>8</b>
<b>6. Probenkennzeichnung und SOP-Liste</b>	<b>8</b>
<b>7. Entwicklung und Validierung der analytischen Methode</b>	<b>9</b>
7.1. Vorbemerkungen	9
7.1.1. Analytische Methode	9
7.1.2. GC/MS-Messtechniken	9
7.1.3. Analytische Standards	10
7.2. Methodenentwicklung	11
7.2.1. Derivatisierung und Messung der polaren Analyten	11
7.2.2. GC/MS/MS-Analytik von Methyl-Triclosan	16
7.2.3. Extraktion und Extraktreinigung	17
7.3. Validierung der analytischen Methode	22
7.3.1. Grund-Kalibrierung und Verfahrenskenngrößen	22
7.3.2. Matrix-Kalibrierung	24
7.3.3. Leerwerte	26
7.3.4. Qualitätssicherung und Methoden-Präzision	26
<b>8. Abschätzung der Mess- und Ergebnisunsicherheit</b>	<b>29</b>
<b>9. Ergebnisse</b>	<b>30</b>
<b>10. Literatur</b>	<b>34</b>
<b>Anhang I-1 Massenspektren und Chromatogramme</b>	<b>36</b>
<b>Anhang I-2 Beschreibung des analytischen Verfahrens</b>	<b>51</b>
<b>Anhang I-3 Kalibrierfunktionen</b>	<b>64</b>
<b>Anhang I-4 Kopie der Akkreditierungsurkunde</b>	<b>69</b>
<b>Anhang I-5 Analysenzertifikate der Referenzsubstanzen</b>	<b>71</b>

## Zusammenfassung

Der hier vorliegende Bericht gibt die Ergebnisse von Untersuchungen wieder, die im Rahmen der Umweltprobenbank des Bundes gewonnen wurden. Es wurde eine analytische Methode zur quantitativen Bestimmung von Triclosan (TCS), Methyl-Triclosan (MTCS) und Chlorophene (CP) in Biota-Proben entwickelt und validiert. Die Analysen wurden als Prüfauftrag unter Akkreditierungsbedingungen nach DIN EN ISO 17025 [1] durchgeführt.

Das Verfahren beruht auf einer Extraktion der Analyten mittels „Beschleunigter Lösemittelextraktion“, einer Aufreinigung der gewonnenen Extrakte mittels Gelpermeationschromatographie und einer anschließenden Fraktionierung der Analyten an Kieselgel. Die 'unpolare' MTCS-Fraktion wird aufkonzentriert und anschließend direkt per GC/MS/MS gemessen. Die 'polare' Fraktion, welche die chlorierten Phenol-Derivate enthält, wird eingeengt, mit PFBBr derivatisiert und anschließend mittels GC/NCI-MS gemessen.

Es wurden 92 Proben der Matrix Brassenmuskulatur aus den Beständen der UPB zum aktuellen und retrospektiven Monitoring analysiert. Zusätzlich wurden 24 Proben gleicher Matrix zur analytischen Qualitätssicherung in das Messprogramm aufgenommen, so dass insgesamt 116 Proben untersucht wurden. Einen Überblick über die untersuchten Proben verschafft Tabelle I-1.

**Tabelle I-1: Im Rahmen des Prüfauftrages (aktuelles und retrospektives Monitoring) untersuchte Proben der Matrix Brassenmuskulatur**

Probenahme-Fläche	Probenahme-Jahre
Saar, Gündingen	1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003
Saar, Rehlingen	1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhein, Weil	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhein Iffezheim	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhein, Koblenz	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhein Bimmen	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Prossen	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Zehren	1996, 2001, 2002, 2003
Elbe, Barby	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Cumlosen	1996, 2001, 2002, 2003
Elbe, Blankenese	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Saale, Wettin	1995, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Mulde, Dessau	1995, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Belauer See, Bornhöved	1997, 2001, 2003
Donau, Ulm	2002, 2003
Donau, Kelheim	2002, 2003
Donau, Jochenstein	2002, 2003

Die Untersuchungsergebnisse sind in der Tabelle I-12 auf den Seiten 30 bis 33 zusammengefasst.

**Summary**

This report describes the results of investigations carried out in the context of the German Environmental Specimen Bank (ESB). An analytical method was developed and validated for the quantitative determination of Triclosan (TCS), Methyl Triclosan (MTCS) and Chlorophene (CP) in biota samples. The analyses were performed in compliance with DIN EN ISO 17025 (General requirements for the competence of testing and calibration laboratories).

The method based on a pressurized liquid extraction method, a clean up of the gained extracts with gel permeation chromatography and a subsequent fraction of the analytes on silica gel. The 'non polar' MTCS fraction is concentrated and analyzed directly by GC/MS/MS. The 'polar' fraction, which contains the chlorinated phenol derivatives, is derivatized with PFBBr and measured by GC/NCI-MS.

92 samples of the matrix bream muscles derived from the stock of the German Environmental Specimen Bank were analyzed for the retrospective monitoring. Additionally 24 samples of the same matrix were included in the measuring program for analytical quality control. Altogether 116 samples were analyzed, an overview is given in table I-1.

**Table I-1:** *Within the investigations (actual and retrospective monitoring) analysed samples of the matrix bream muscle*

sampling site	sampling year
Saar, Gündingen	1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003
Saar, Rehlingen	1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhine, Weil	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhine, Iffezheim	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhine, Koblenz	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Rhine Bimmen	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Prossen	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Zehren	1996, 2001, 2002, 2003
Elbe, Barby	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Elbe, Cumlosen	1996, 2001, 2002, 2003
Elbe, Blankenese	1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Saale, Wettin	1995, 1996, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Mulde, Dessau	1995, 1998, 2000, 2001, 2002, 2003
Bornhöved Lake District, Lake Belau	1997, 2001, 2003
Danube, Ulm	2002, 2003
Danube, Kelheim	2002, 2003
Danube, Jochenstein	2002, 2003

The results of the investigations are summarized in table I-12, pages 30 to 33.

## 1. Allgemeine Angaben zur Prüfung

Die analytische Bestimmung von Triclosan und Methyl-Triclosan in Brassenmuskulaturproben der Umweltprobenbank (in Teil I des Berichts) wurde als Prüfauftrag unter Akkreditierungsbedingungen durchgeführt.

**Titel der Untersuchung:** Retrospektives Monitoring von Triclosan und Methyl-Triclosan

**Zielsubstanzen:** TCS Triclosan  
MTCS Methyl-Triclosan  
CP Chlorophene

**Prüfauftrag-Code:** **K-UBA-007/7-61**

**Auftraggeber:** Umweltbundesamt  
Fachgebiet IV 2.2  
Seecktstraße 6 – 10  
13581 Berlin

**Prüfinstitut:** Fraunhofer-Institut für  
Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME);  
Auf dem Aberg 1  
57392 Schmallenberg

**Institutsleitung:** Prof. Dr. Rainer Fischer  
**Bereichsleitung Angewandte Oekologie:** Prof. Dr. Andreas Schäffer

**Prüfleiter:** Walter Böhmer

**Durchführung:** Thorsten Bernhardt

**Qualitätssicherungsgruppe:** Dr. Ulrich Fritsche, Dr. Gerd Wasmus

**Prüfungszeitraum:** 14.10.2003 - 22.06.2004

**Berichtsdatum:** 31.07.2004

**Verteiler:**

Auftraggeber	1 Original, 1 Kopie
Archiv Auftragnehmer	1 Original, 1 Kopie
Prüfleiter Auftragnehmer	1 Kopie
Labor Auftragnehmer	1 Kopie

Dieser Abschlußbericht darf von Auftraggeber und Auftragnehmer unter der Voraussetzung vervielfältigt werden, dass etwaige Ergänzungen zum Bericht jeder Kopie beigelegt werden. Die ermittelten Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die untersuchten Proben.

## 2. Erklärung zur Qualitätssicherung

Hiermit bestätigen wir nach bestem Wissen, dass alle Daten korrekt wiedergegeben wurden und dass die Prüfung nach den beschriebenen Methoden durchgeführt wurde. Das Fraunhofer-IME ist nach DIN EN ISO/IEC 17025 [1] akkreditiert und besitzt die Kompetenz, Prüfungen im Bereich der chemischen und chemisch-physikalischen Analytik durchzuführen. Eine Kopie der Akkreditierungs-urkunde ist diesem Bericht beigelegt (Anhang I-4).

Die QAU des Fraunhofer IME überprüft regelmäßig die Labore, Rohdaten sowie stichprobenartig die Abschlussberichte von Projekten, die im Rahmen der Akkreditierung durchgeführt werden. Dieser Abschlussbericht wurde der QAU zur Prüfung vorgelegt. Die QAU hat diesen Bericht geprüft.

Schmallenberg, den 15. Oktober 2004

Prof. Dr. Andreas Schäffer  
Bereichsleitung angewandte Oekologie

Dipl.-Ing. (FH) Walter Böhmer  
Prüfleitung

## 3. Abkürzungen

AGC	automatic gain control (in der IonTrap MS-Messtechnik)
AKK	Akkreditierung
amu	atom mass unit
ASE	accelerated solvent extraction (beschleunigte Lösungsmittel-Extraktion)
BG	Bestimmungsgrenze
BP	Basispeak in der Massenspektrometrie (Ion mit der größten Intensität [= 100 %])
CP	Chlorophene
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESB	(German) Environmental Specimen Bank
FG	Frischgewicht
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Massenspektrometrie, gekoppelt mit der Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HFBA	Heptfluorbuttersäureanhydrid (Heptafluorobutyric anhydride)
IS	Interner Standard
k. A.	keine Angabe

M <sup>+</sup>	Molekül-Ion, M <sup>+</sup> -Ion
mmu	milli mass units
MS	Massenspektrum / Massenspektrometrie
MS/MS	Messtechnik in der Massenspektrometrie, Tandem- Massenspektrometrie (weiterer MS-Zyklus nach Kollisionsaktivierung selektiver Vorläufer-Ionen)
MSTFA	N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoroacetamide
MTCS	Methyl-Triclosan (Triclosan-Methyl)
MTCS-D3	Methyl-(D3)-Triclosan
NCI	negative chemische Ionisierung (negative ion chemical ionization)
NWG	Nachweisgrenze
P	Signifikanzniveau, statistische Wahrscheinlichkeit
PFBBr	2,3,4,5,6-Pentafluorbenzylbromid
PFBCl	2,3,4,5,6-Pentafluorbenzoylchlorid
PFPA	Pentafluorpropionsäureanhydrid (Pentafluoropropionic anhydride)
PFV	Peakflächenverhältnis (= Peakfläche Analyt / Peakfläche IS)
PNF	Probenahmefäche
PP	2-Phenylphenol (2-Biphenylol, 2-Hydroxybiphenyl)
QAU	Quality assurance unit
r	Korrelationskoeffizient
RIC	reconstructed ion current
SIM	single ion monitoring (Mess-Modus bei Quadrupol-MS-Geräte)
s <sub>L</sub>	laborinterne Wiederholstandardabweichung
S/N-Verhältnis	Signal/Rausch-Verhältnis (signal to noise ratio)
SOP	Standardarbeitsanweisung (standard operating procedure)
TCS	Triclosan
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid (Trifluoroacetic anhydride)
TFMPP	4-[4-(Trifluormethyl)-phenoxy]phenol
TIC	total ion current
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
TMSI	N-Trimethylsilylimidazole; 1-(Trimethylsilyl)imidazole
U	erweiterte Ergebnisunsicherheit
UPB	Umweltprobenbank des Bundes
u(R <sub>w</sub> )	laborinterne Reproduzierbarkeit (reproducibility within-laboratory)
V <sub>L</sub> [%]	relative (laborinterne) Wiederholstandardabweichung
V <sub>x0</sub>	relative Verfahrensstandardabweichung oder Verfahrensvariationskoeffizient
WFF	Wiederfindungsfunktion (Matrix-Kalibrierung)
WFR	Wiederfindungsrate (Matrix-Kalibrierung)

#### 4. Einleitung und Aufgabenstellung

Die Durchführung des Projektes beinhaltet im ersten Schritt die Entwicklung und Validierung der analytischen Methode sowie die Erstellung einer Verfahrens-SOP (Standardarbeitsanweisung). Die entwickelte SOP „Bestimmung von Triclosan, Methyl-Triclosan und Chlorophene in biologischen Matrices mittels gaschromatographisch/massenspektrometrischer Verfahren“ ist in Anhang I-2 aufgeführt. Im zweiten Schritt erfolgt dann die Analyse der Biota-Proben entsprechend der erarbeiteten Verfahrens-SOP.

#### 5. Probenkennzeichnung und SOP-Liste

Die Umweltprobenbank-Proben wurden von der Arbeitsgruppe „Umweltprobenbank und Elementanalytik“ des Fraunhofer-IME im tiefgefrorenem Zustand zur Analytik an das Labor Umwelt- und Rückstandsanalytik übergeben. Sie wurden dort nach der Arbeitsanweisungen 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 I-2) begonnen.

**Tabelle I-2: Relevante Standard-Arbeitsanweisungen (SOPs), Kurztitel**

V7 – 174/01	Triclosan und Methyl-Triclosan in biologischen Matrices
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 - 154/02	Gaschromatograph HP 5890
G7 - 170/02	Reinstwasseranlage ELGASTAT UHQ-PS
G7 - 204/02	Abimed/Gilson-System Clean-Up XL
G7 - 222/02	Kaltaufgabesystem KAS 3, Gerstel
G7 - 224/02	Ion Trap GC/MS/MS Magnum - Saturn 4D
G7 - 225/02	Extraktionsgerät ASE 200, DIONEX
G7 - 245/02	TurboVap II Concentration Workstation

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

## 6. Entwicklung und Validierung der analytischen Methode

Die analytische Methode (siehe Kapitel 6.1 bis 6.2.3.3.2) wurde im Vorfeld der Untersuchungen nach Akkreditierung (AKK) entwickelt.

Die Validierung des Verfahrens (Kapitel 6.3) und die Routine-Untersuchungen der UPB-Proben wurden dann als Prüfauftrag unter Akkreditierungsbedingungen nach DIN EN ISO 17025 [1] durchgeführt

### 6.1. Vorbemerkungen

#### 6.1.1. Analytische Methode

Bei den analytischen Zielsubstanzen Triclosan (TCS) und Methyl-Triclosan (MTCS) handelt es sich zum einen um eine relativ polare Verbindung mit einer freien Hydroxy-Gruppe und zum anderen um den nur gering polaren Methyl-Ether (vgl. Strukturen in Tabelle I-A2-1 in der SOP). Dieser Unterschied in den physikalisch-chemischen Eigenschaften bedingt in der Regel auch unterschiedliche spurenanalytische Probenaufarbeitungstechniken und somit einen deutlichen Mehraufwand. Es wurde aber zunächst geprüft, ob eine gemeinsame Analysenmethode für beide Stoffe erarbeitet werden konnte.

Hinsichtlich der TCS-Bestimmung ergeben sich folgende grundlegende Anforderungen an die analytische Methode:

- Polare Verbindungen lassen sich erst nach Derivatisierung empfindlich auf unpolare Kapillarsäulen<sup>1</sup> gaschromatographisch analysieren
- Die Derivatisierung von TCS muss auch im Spurenbereich quantitativ ablaufen. Damit die Störeinflüsse minimiert werden, müssen die Matrixkomponenten vor der Umsetzung durch Aufreinigungsschritte aus den Probenextrakten entfernt werden. Dies bedingt wiederum, dass das (unpolare) MTCS bei dieser Aufreinigung möglicherweise vom TCS abgetrennt wird. Eine Bestimmung in einer GC/MS-Messung wäre dann nicht mehr möglich.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob auch andere Biozide [2] z. B. 2-Phenylphenol (PP) oder Chlorophene (CP) entsprechend der Methode für TCS bestimmt werden können.

#### 6.1.2. GC/MS-Messtechniken

Der Nachweis und die Quantifizierung von organischen Verbindungen in komplexen organischen Matrices im Spurenbereich erfordert den Einsatz empfindlicher Mess-Systeme, z.B. der GC/MS-Kopplung. Die „klassische“ GC/MS stößt im Spurenbereich aber an ihre Grenzen, wenn die in der Messlösung verbleibenden Matrixkomponenten im Vergleich zu den Analyten in deutlich höherer

<sup>1</sup> Unpolare GC-Phasen sind thermisch sehr stabil und ermöglichen Messungen mit geringem S/N-Verhältnis auch bei höheren Temperaturen, wie sie für die Chromatographie von TCS(-Derivaten) notwendig sind.

Konzentration auftreten. Dies ist aber häufig auch dann noch der Fall, wenn der GC/MS-Messung schon eine mehrstufige Probenvorbereitung vorgeschaltet wurde.

Die Überwindung dieser Problematik gelingt durch höher spezifische MS-Techniken, z. B. der MS/MS-Technik ( $MS^n$ ) oder der Ionisierung mittels negativer chemischer Ionisierung (NCI). Während die MS/MS-Technik die gezielte weitere Fragmentierung von Vorläuferionen des „normalen“ Massenspektrums nutzt, gewinnt die NCI-MS ihre Spezifität aus den Fragmentierungsreaktionen nach Elektroneneinfang mit einem ionisierten Moderator- oder Reaktantgas.

Für die Erzeugung selektiver Produkt-Ionen durch Kollisionsaktivierung von Vorläuferionen im MS/MS-Prozess sind in der Regel keine Modifikationen der analytischen Zielsubstanz notwendig. Das in den Biota-Proben schon alkyliert vorliegende Methyl-Triclosan (MTCS) muss für eine GC-Analyse nicht derivatisiert werden. Für MTCS wurde daher die Möglichkeit zur Bestimmung mittels GC/MS/MS getestet.

Im Gegensatz hierzu müssen die Analyten, welche keine elektronenaffinen Gruppen im Molekül enthalten für die selektive Ionisierungstechnik per NCI-MS derivatisiert werden, d.h. es muss eine „NCI-aktive“-Gruppe in das Molekül eingeführt werden. TCS, CP und PP stellen polare Verbindungen dar, die zur Optimierung der gaschromatographischen Eigenschaften an unpolaren Phasen derivatisiert werden müssen. Ziel der Methodenentwicklung war es daher, die für die Chromatographie notwendige Derivatisierung mit der Einführung einer „NCI-aktiven“-Gruppe zu verbinden.

### 6.1.3. Analytische Standards

Die zur Kalibrierung der Analysensysteme notwendigen Referenzsubstanzen waren nur teilweise als 'Analytische Standards' auf dem Chemikalienmarkt erhältlich.

Als Interne Standards (IS) haben sich bei massenspektrometrischen Bestimmungen isotopenmarkierte Verbindungen bewährt. Entsprechende IS waren im Fachhandel im Jahr 2003 ebenfalls nicht verfügbar. MTCS und der IS MTCS- $D_3$  wurden daher vor Beginn der Arbeiten zur Synthese beauftragt.

$^{13}C_6$ -TCS wurde dankenswerterweise von Herrn Dr. A. Hauk, CIBA Speciality Chemicals Inc. (Basel, Schweiz) für diese Studie zur Verfügung gestellt.

Die Aufstellung in Tabelle I-3 gibt einen Überblick über die eingesetzten Referenzsubstanzen, die zugehörigen Analysenzertifikate sind im Anhang I-5 abgelegt. Da das  $^{13}C_6$ -TCS zu Beginn der Arbeiten noch nicht zur Verfügung stand, wurden die Tests zur Entwicklung und Optimierung der Probenaufarbeitung zunächst mit 4-[4-(Trifluormethyl)-phenoxy]phenol (TFMPP) als 'phenolischem' IS durchgeführt.

**Tabelle I-3: Überblick über die eingesetzten Referenzsubstanzen und Internen Standards**

Substanz [CAS-No.]	Reinheit/Gehalt und Charge	Hersteller/Bezugsquelle
TCS [3380-34-5]	99,5 %, Lot.-No. 805604	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Zertifikat in Abbildung I-A5.1
MTCS [4640-01-1]	> 98 %, reference No. WA03071501	VeZerf Laborsynthesen GmbH, Zertifikat in Abbildung I-A5.2
CP [120-32-1]	98 %, Lot.-No. F8373B-BS	ABCR, Karlsruhe, Nr. AV20112
PP [90-43-7]	99+%, Lot.-No. 06925LI-163	Aldrich, Taufkirchen, Cat.-No. W39,590-0
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -TCS [-]	Chemische Reinheit: 98,7 %, Isotopenanreicherung: k. A., Batch-No. ILS-49.2	CIBA SC, Zertifikat in Abbildung I-A5.3
MTCS-D <sub>3</sub> [-]	Chemische Reinheit: >95 %, Isotopenanreicherung: > 97 atom%, Auftrag-Nr. 09KO3051	Syntheselabor Dr. A. Weiß, Zertifikat in Abbildung I-A5.4
TFMPP [39634-42-9]	98 %, Charge: k. A.	Aldrich, Taufkirchen Cat.-No. 39,645-1

## 6.2. Methodenentwicklung

### 6.2.1. Derivatisierung und Messung der polaren Analyten

Die Derivatisierungs-Methode wurde unter den folgenden Gesichtspunkten für den Analyten Triclosan entwickelt:

- Optimierung der gaschromatographischen Eigenschaften
- Steigerung der Empfindlichkeit
- Steigerung der Spezifität
- Stabilität der Umsetzungsprodukte

Getestet wurden die Umsetzungen mit den Perfluorcarbonsäureanhydriden TFAA, PFPA und HFBA, Trimethylsilylierungen mit MSTFA und TMSI sowie die Acylierung mit PFBCl und die Alkylierung mit PFBBr. Die Strukturformeln und weitere Informationen zu den eingesetzten Derivatisierungsmitteln sind in Tabelle I-4 zusammengestellt.

**Tabelle I-4: Informationen zu den eingesetzten Derivatisierungsmitteln und den TCS-Derivaten**

Chemische Struktur der Derivatisierungsmittel	Name und Summenformel der Derivatisierungsmittel	Akronym CAS-No. der Derivatisierungsmittel	Molmasse und Summenformel der TCS-Derivate *)
	Trifluoressigsäure-anhydrid C <sub>4</sub> F <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	TFAA 407-25-0	384 g/mol C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>3</sub>
	Pentafluorpropionsäure-anhydrid C <sub>6</sub> F <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	PFPA 356-43-3	434 g/mol C <sub>15</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>5</sub>
	Heptfluorbuttersäure anhydrid C <sub>8</sub> F <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	HFBA 336-59-4	484 g/mol C <sub>16</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>7</sub>
	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -Trimethylsilyltrifluoracetamid C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NOSi	MSTFA 24589-78-4	360 g/mol C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub> Si
	<i>N</i> -Trimethylsilylimidazole C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> Si	TMSI 18156-74-6	360 g/mol C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub> Si
	Pentafluorobenzoyl-chlorid C <sub>7</sub> ClF <sub>5</sub> O	PFBCl 2251-50-5	482 g/mol C <sub>19</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>5</sub>
	Pentafluorobenzyl-bromid C <sub>7</sub> H <sub>2</sub> BrF <sub>5</sub>	PFBBr 1765-40-8	468 g/mol C <sub>19</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>5</sub>

\*) Die Strukturformeln der TCS-Derivate sind in den Abbildungen der Massenspektren S1 bis S8 (siehe Anhang I-1) dargestellt. Alle TCS-Derivate liefern EI-Massenspektren mit Molekül-Ionen (M<sup>+</sup>) entsprechend der jeweiligen Molmasse

Die verschiedenen Experimente wurden so durchgeführt, dass die Konzentrationen (bezogen auf TCS) in den injektionsfertigen Lösungen jeweils ca. 1 ng/μL betragen.

Die GC/MS-Messungen erfolgten mittels IonTrap-MS (VARIAN Saturn 2000) im EI-Modus im Massenbereich von m/z 100 – 650 (die UPB-Proben wurden später mit einem IonTrap-MS-Gerät der Fa. FINNIGANMAT gemessen).

Die gaschromatographischen Trennungen erfolgten in einer gering polaren SGE HT8 Kapillare bei einem Helium-Volumenstrom von 1,1 mL/min, einer Injektionstemperatur von 250 °C und einem Temperaturprogramm von 130 bis 320 °C bei einer Heizrate von 8 °C/min.

Die fluorierten TCS-Derivate wurden zusätzlich mittels GC/NCI-MS gemessen (näheres siehe Tabelle I-A2-4 in der Verfahrens-SOP).

#### 6.2.1.1. Silylierungen

Die Bildung von Trimethylsilyl-Ethern (TMS-Ethern) ist eine häufig beschriebene Derivatisierungsmethode zur gaschromatographischen Bestimmung von polaren Analyten. Im Fraunhofer-IME wurden u.a. Alkylphenole [3] und Steroidhormone [4] mittels GC/MS/MS nach Umsetzung mit *N*-Methyl-*N*-Trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) bestimmt. *N*-Trimethylsilylimidazole (TMSI) wurde als weiteres Reagenz zur Trimethylsilylierung der polaren Analyten getestet.

Die Umsetzungen erfolgten mit 100 µL MSTFA jeweils bei 60 °C über 10 min bzw. mit 100 µL TMSI bei Raumtemperatur über 30 min. Vor den GC/MS-Messungen wurden die Silylierungsmittel mit 800 µL Toluol verdünnt.

TCS bildete sowohl mit MSTFA als auch mit TMSI den entsprechenden, sehr gut gaschromatographierbaren TMS-Ether. Die Derivate sind für GC/MS-Bestimmungen ausreichend stabil, die Reaktionen verlaufen vollständig. Ein Massenspektrum ist in Abbildung I-S3 im Anhang I-1 dargestellt. Es zeigt das  $M^+$ -Ion ( $m/z$  360) mit einer geringen Intensität von nur ca. 20 % des Basispeaks (BP), den BP bildet mit  $m/z$  345 das Molekülion, von dem, typisch für TMS-Ether, eine Methyl-Gruppe abgespalten wurde.

#### 6.2.1.2. Acylierungen mit Perfluorcarbonsäureanhydriden

Die Acylierung von TCS wurde mit Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA), Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA) und Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) durchgeführt. Das Verfahren beruht auf einer für Steroidhormone, Alkylphenole und Bisphenol A beschriebenen Methode [5].

Die Umsetzungen von TCS erfolgten jeweils in Toluol (250 µL), dem 10 µL der Perfluorcarbonsäureanhydride und in Parallelansätzen zur Katalyse 5 µL Pyridin zugesetzt wurden. Die Reaktionsgemische wurden für 10 min bei 60 °C im Trockenschrank temperiert und anschließend im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Nach Lösung des Rückstands in 1 mL Toluol wurde mittels IonTrap-GC/MS gemessen.

Die Massenspektren der Perfluorcarbonsäure-Derivate sind in den Abbildung I-S4 bis I-S6 im Anhang 1 dargestellt. Alle TCS-Derivate zeigen das  $M^+$ -Ion mit der jeweils höchsten Intensität; mit Intensitäten von  $\geq 50$  % tritt jeweils das „TCS Rumpf-Ion“ mit  $m/z$  252 auf (= TCS  $-^{35}\text{Cl} - \text{H}$ , vgl. Massenspektrum von MTCS in Abbildung I-I-S2).

Mittels MS/MS lassen sich die  $M^+$ -Ionen weiter zerlegen. Als Beispiel wird in Abbildung I-S9 das MS/MS-Spektrum des HFBA-Derivats gezeigt. Das MS/MS-Spektrum enthält wenige, aber charakteristische Linien, sodass eine selektive Analyse per GC/MS/MS möglich ist.

Da bei diesen Umsetzungen keine (alkalische) Waschung der Reaktionsgemische durchgeführt wurde, kann die Vollständigkeit der Umsetzungen anhand des verbleibenden, underivatisierten TCS verglichen werden. Bei Umsetzung mit HFBA wurden noch 2,7 %, mit PFPA noch 1,2 % und mit TFAA noch 0,8 % verbleibendes TCS detektiert.

Durch den Zusatz von Pyridin zum Reaktionsansatz konnte keine Steigerung der Ausbeute erzielt werden. Weitere Versuche mit HFBA zeigten, dass die Ausbeute optimiert werden kann, indem man ein Phasengemisch temperiert, das aus 1 mL n-Hexan und 1 mL Wasser besteht und dem dann noch 50  $\mu$ L einer 2 M Kaliumhydroxidlösung und 10  $\mu$ L HFBA zugesetzt werden.

Das HFBA-Derivat ist in Lösung (Toluol, n-Hexan) mindestens 24 Stunden stabil, jedoch zersetzt sich das Derivat während eines Aufreinigungsschrittes in einer Kieselgelsäule vollständig!

Von den Acylierungen mit Perfluorcarbonsäureanhydriden wird die Umsetzung mit HFBA als die optimale angesehen, da hier ein  $M^+$ -Ion mit relativ hoher Masse entsteht, welches massenspektrometrisch von der niedermolekularen Matrix gut abzutrennen ist. Das Verfahren ist relativ einfach durchzuführen und wurde deshalb oft in der Methodenentwicklung eingesetzt.

Auch Chlorophene und Phenylphenol können mit HFBA zu den entsprechenden Derivaten umgesetzt werden.

### 6.2.1.3. Acylierungen mit Pentafluorbenzoylchlorid

Die Acylierungen mit Pentafluorbenzoylchlorid (PFBCl) wurden nach der Methode

- (a) von Cajsja Wahlberg im Lösungsmittel [6] und durch
- (b) 'Extraktive Derivatisierung' nach Renberg [7] durchgeführt.

Die Umsetzungen von TCS nach Methode (a) erfolgten jeweils in 10 mL Reagenzgläsern mit 1 mL Toluol, dem 10  $\mu$ L PFBCl und in einem Parallelansatz zur Katalyse 5  $\mu$ L Pyridin zugesetzt wurden. Die Reaktionsgemische wurden für 10 min bei 60 °C temperiert. Zur Entfernung des verbleibenden Carbonsäurechlorids wurden die Gemische nach dem Abkühlen mit 5 mL Wasser und 5 mL 2 M KOH versetzt und für 1 min kräftig geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde die Toluolphase per GC/MS untersucht.

Zur 'Extraktiven Derivatisierung' (b) wurden zunächst TCS-Lösungen in 10 mL Reagenzgläser überführt und im Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt. Das TCS wurde dann in alkalischem Wasser (2 mL Reinstwasser versetzt mit 50  $\mu$ L 2 M KOH) wieder gelöst<sup>2</sup>.

Zur Derivatisierung wurde zunächst 10  $\mu$ L einer 10 %igen PFBCl-Lösung in Toluol zugesetzt. Nach Zugabe von 2 mL Toluol wurde für 2 min kräftig geschüttelt und nach erfolgter Phasentrennung mittels GC/MS analysiert.

Aufgrund der alkalischen Waschung konnte die Vollständigkeit der Reaktion durch Analyse des underivatisierten TCS nicht überprüft werden. Durch die Umsetzung in Toluol (Methode (a)) wird aber eine ca. doppelt so große Ausbeute erzielt als mit der 'Extraktive Derivatisierung' nach Renberg. Der Einsatz von Pyridin bei Methode (a) erhöht die Ausbeute nicht.

Das Massenspektrum des PFBCl-Derivats in Abbildung I-S7 zeigt das  $M^+$ -Ion mit einer Intensität von < 25 %, den Basispeak mit m/z 195 bildet der unspezifische Pentafluorbenzoyl-Rest.

<sup>2</sup> TCS ist in verdünnter Natronlauge mäßig löslich [8]

#### 6.2.1.4. Alkylierung mit Pentafluorbenzylbromid

Die Alkylierung von TCS mit PFBBr wurde in Anlehnung an das für Steroidhormone beschriebene Verfahren in 4mL-Vials durchgeführt [9].

Zur Derivatisierung wurden TCS-Lösungen in Toluol zur Trockne eingeeengt und in 1 mL Aceton wieder gelöst. Nach Zugabe von 100 µL 10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und 100 µL einer Lösung von 5 % PFBBr in Aceton wurde für 1 Stunde unter gelegentlichem Schütteln bei 60 °C im Trockenschrank temperiert. Die Mischung wurde anschließend mit einem feinen N<sub>2</sub>-Strom bis fast zur Trockne eingeeengt und der Rückstand in 1 mL Toluol wieder aufgenommen. Die organische Phase wurde zur Entfernung des verbliebenen PFBBr mit 2,5 mL Reinstwasser gewaschen und nach der Phasentrennung mittels GC/MS gemessen.

Das optimierte Derivatisierungsverfahren ist in Abschnitt 10 der Verfahrens-SOP dokumentiert.

Das EI-Massenspektrum des TCS-PFBBr-Derivats ist in den Abbildung I-S8 dargestellt. Es zeigt das M<sup>+</sup>-Ion mit m/z 468 mit einer Intensität von ca. 40 % und das „TCS Rumpf-Ion“ mit m/z 252 als Basis-Ion.

Die Vollständigkeit der Reaktion durch Analyse des verbleibenden TCS konnte aufgrund der Waschung wieder nicht überprüft werden. Die Peakhöhe des PFBBr-Derivats entspricht jedoch den Peakhöhen des PFBCI- und des HFBA-Derivats, sodass für alle Fälle von einer annähernd vollständigen Reaktion ausgegangen wird.

Auch CP und PP lassen sich mit PFBBr in gleicher Weise derivatisieren, die EI-Massenspektren sind in Abbildung I-S10 und I-S11 im Anhang 1 dargestellt. Es entstehen in beiden Fällen charakteristische Molekülionen mit ca. 100 % Intensität.

Mittels MS/MS lassen sich die M<sup>+</sup>-Ionen der PFBBr-Derivate weiter zerlegen. Es wird jeweils ein Chlor-Atom durch den CID-Vorgang herausgeschlagen. Das MS/MS-Spektrum enthält wenige, aber charakteristische Produkt-Ionen, sodass eine selektive und empfindliche Analyse per GC/MS/MS möglich ist.

#### 6.2.1.5. Messungen mittels NCI-GC/MS

Die Derivate der polaren Analyten sind für die analytische Bestimmung per GC/MS ausreichend stabil, gut gaschromatographierbar und mittels EI-MS oder EI-MS/MS selektiv zu detektieren.

Die fluorierten Derivate von TCS, CP und PP wurden anschließend auch mittels der sehr selektiven GC/NCI-MS-Technik analysiert. Die mit PFBCI und PFBBr gebildeten Derivate zeigten sehr gute Empfindlichkeiten, während die mit den Perfluorcarbonsäureanhydriden hergestellten Verbindungen nicht bzw. nur in sehr hohen Mengen zu detektieren waren.

Die NCI-Massenspektren der PFBCI- und der PFBBr-Derivate von TCS sind in den Abbildung I-S12 und I-S13 dargestellt. Das TCS-PFBBr-Derivat bildet im NCI-Modus ein linienarmes Spektrum der Ionen m/z 287, 289 und 291 (Chlor-Cluster). Die entspricht dem [M-H]<sup>-</sup>-Ion des underivatisierten TCS, das M<sup>-</sup>-Ion des PFBBr-Derivats entsteht nicht. Das PFBCI-Derivat bildet zwar das charakteristische

[M]<sup>-</sup>-Ion auf m/z 482 als Basispeak, das NCI-Spektrum enthält aber deutlich mehr Linien als das Spektrum des PFBBr-Derivats.

### 6.2.1.6. Fazit

Zur Entscheidung, welche Derivatisierungsmethode und welche Messtechnik zur Bestimmung von TCS eingesetzt werden sollte, wurden TCS-Lösungen mit unterschiedlichen Gehalten mittels GC/NCI-MS im SIM-Modus gemessen. Anschließend wurden die S/N-Verhältnisse ermittelt und bezogen auf die Derivatisierungsmethode und die injizierte, absolute Menge verglichen (Tabelle I-5).

**Tabelle I-5: Berechnete S/N-Verhältnisse (RMS noise)**

TCS-Gehalt [pg]	PFBCI-Derivat *)	PFBBr-Derivat **)
10	6000	21500
1	700	2250
0,1	70	210

\*) Methode nach C. Wahlberg, SIM Massen = m/z 482 und 484

\*\*\*) SIM Massen = m/z 287 und 289

Die Empfindlichkeit der TCS-Bestimmung hängt gemäß Tabelle I-5 vom Derivatisierungsverfahren und den gemessenen SIM-Massen ab, die PFBBr-Derivate lassen sich auf den MS-Basispeaks ca. 3 mal empfindlicher nachweisen als die PFBCI-Derivate.

Des weiteren hängt die Empfindlichkeit von der gewählten GC/MS-Technik ab. Die Nachweisgrenze des eingesetzten IonTrap-GC/MS/MS- Systems (siehe Kapitel 11 der Verfahrens-SOP) liegt erfahrungsgemäß im Bereich von ca. 1 pg. Mit der NCI-Messtechnik kann TCS aber sowohl als PFBCI- als auch als PFBBr-Derivat deutlich empfindlicher detektiert werden.

Zur Bestimmung von TCS in Biota-Proben wurde also die Derivatisierung mit Pentafluorbenzylbromid mit nachfolgender GC/NCI-MS-Messung im SIM-Modus gewählt, das Chromatogramm einer UPB-Probe ist in Abbildung I-C2 dargestellt.

### 6.2.2. GC/MS/MS-Analytik von Methyl-Triclosan

Wie im Kapitel 6.1.2 erwähnt, muss Methyl-Triclosan für GC-Analysen nicht derivatisiert werden; als Messtechnik bietet sich hier die GC/MS/MS-Technik an.

MTCS und der Interne Standard MTCS-D<sub>3</sub> werden gaschromatographisch nur „angetrennt“. Dies bedeutet, dass eine Trennung von Analyt und IS massenspektrometrisch erfolgen muss. Bei der Quantifizierung mit dem IS MTCS-D<sub>3</sub> ergibt sich hier jedoch ein Problem, da beim kollisionsinduzierten Zerfall sowohl aus den Vorläufer-Ionen des Analyten als auch aus den Vorläufer-Ionen des IS gleiche MS-Basispeaks mit m/z 252 resultieren<sup>3</sup>. Es wird jeweils ein Chlor-Atom und die CH<sub>3</sub>- bzw. die

<sup>3</sup> Zum Vergleich ist neben dem Massenspektrum von MTCS in Abbildung I-S2 auch das Massenspektrum von MTCS-D<sub>3</sub> dargestellt, siehe Abbildung I-S14.

CD<sub>3</sub>-Gruppe aus dem Molekül-Ion eliminiert, sodass für beide Substanzen das „TCS Rumpf-Ion“ als Produkt-Ion resultiert. Eine massenspektrometrische Trennung des GC-Peaks in Analyt und IS ist auf m/z 252 also nicht durchführbar. Dies bedeutet weiterhin, dass das intensivste Produkt-Ion für die Quantifizierung von MTCS verloren geht.

Die Einbeziehung eines intensiven Vorläufer-Ions in die Quantifizierung ist aber für den IS MTCS-D<sub>3</sub> möglich, wenn als Vorläufer-Ion statt m/z 305 das Ion m/z 307 eingesetzt und gleichzeitig für den Analyten als Vorläufer-Ion nur m/z 302 eingesetzt wird.<sup>4</sup> Aufgrund der Chlor-Isotopenverteilung kann dann m/z 254 mit in die Integration des IS eingebunden werden. Für die MTCS-Bestimmung wurden die in Tabelle I-6 fett markierten Vorläufer-Ionen und Quantifizierungs-Ionen ausgewählt. Die Trennung von Analyt und IS ist in Abbildung I-C1 für eine aufgearbeitete UPB-Probe dargestellt.

Die Einführung weiterer Ionen (m/z 267 bzw. m/z 270/272) in die Integration ergibt keine signifikante Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses

**Tabelle I-6:** *Auswahl der Vorläufer- und Quantifizierungs-Ionen für die MTCS-Bestimmung*  
(*Unterstreichung = intensiveres Ion des Chlor-Clusters*)

MTCS			MTCS-D <sub>3</sub>		
Vorläufer-Ion [m/z]	Produkt-Ionen [m/z]	Quantifizierungs-Ion [m/z]	Vorläufer-Ion [m/z]	Produkt-Ionen [m/z]	Quantifizierungs-Ionen [m/z]
302	232, 252, 267	232	305	235, 252, 270	-
304	<u>232/234,</u> <u>252/254,</u> <u>267/269</u>	-	307	<u>235/237,</u> <u>252/254,</u> <u>270/272</u>	235 +254

### 6.2.3. Extraktion und Extraktreinigung

Die UPB-Proben sollten möglichst ohne großen Aufwand in der Probenvorbereitung (und in der Methodenentwicklung) für die Messungen per massenspektrometrischer Verfahren aufgearbeitet werden. Es wurde deshalb auf bewährte Verfahren zurückgegriffen, die bereits erfolgreich zur Aufarbeitung von Biota-Proben zur spurenanalytischen Bestimmung von organischen Kontaminanten eingesetzt wurden.

<sup>4</sup> Die Ionen m/z 302 (MTCS) und m/z 305 (MTCS-D<sub>3</sub>) enthalten nur <sup>35</sup>Cl-Isotope, die Ionen m/z 304 und 307 hingegen ein Gemisch von <sup>35</sup>Cl und <sup>37</sup>Cl-Isotopen. Folglich werden auch durch den kollisionsinduzierten Zerfall während des MS/MS-Prozesses im ersten Fall 'isotopenreine' Produkt-Ionen erzeugt; im zweiten Fall entstehen Produktionen-Mischungen aus <sup>35</sup>Cl und <sup>37</sup>Cl-Isotopen. Durch das Heranziehen von m/z 302 und m/z 305 als Vorläufer-Ionen des MS/MS-Prozesses werden die entstehenden Zerfallsprodukte also auf wenige Ionen konzentriert.

### 6.2.3.1. Extraktion nach Aufschluss der Matrix im alkalischen Milieu

#### 6.2.3.1.1. Aufschluss mit Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH)

Die Extraktions-Versuche wurden in Anlehnung an eine für zinnorganische Verbindungen beschriebene Bestimmung-Methode [10] durchgeführt; die organische Matrix wurde zunächst mit TMAH-Lösung (CAS No. 75-59-2) aufgeschlossen. Die Ansäuerung erfolgte jedoch anstatt mit Essigsäure mit verdünnter Salzsäure.

Im Basistest zeigte sich, dass die Analyten TCS und MTCS die alkalische Behandlung mit TMAH-Lösung bei 70 °C über 30 min ohne Abbau überstehen. Somit wurden weitere Experimente mit aufgestockter biologischer Matrix (Brassenmuskulatur) durchgeführt; zunächst wurde das in der Literatur angegebene Verfahren angepasst und nachgearbeitet:

- Auflösen von 2 g Matrix in 5 mL 25 %iger TMAH-Lösung über 30 min bei 70 °C
- Verdünnung mit 8 mL Reinstwasser
- Aussalzen mit 7 g Natriumchlorid
- Ansäuern mit 6 mL 10 %iger Salzsäure
- Flüssig/Flüssig-Extraktion mit n-Hexan und Phasentrennung durch Zentrifugation
- Cleanup an Kieselgel mit n-Hexan/Aceton-Gemischen
- Derivatisierung HFBA oder PFBBR
- GC/EI-MS-Analyse der HFBA-Derivate und des MTCS

Als Variante wurde nach dem Auflösen und Aussalzen auch eine Flüssig/Flüssig-Extraktion der alkalischen Phase vorgenommen, dies bedingt eine Trennung des MTCS von den polaren Analyten. Die wässrige Phase, welche die polaren Analyten als Phenolate enthält, wurde mit Salzsäure versetzt und anschließend mit n-Hexan extrahiert. Die organische Phase (enthält MTCS) wurde nach der Phasentrennung mit angesäuertem Reinstwasser gewaschen. Beide Hexanphasen wurden dann eingeeengt, getrennt an Kieselgel gereinigt, derivatisiert und analysiert.

Besonders die Messlösungen der polaren Kieselgel-Fractionen waren aufgrund verbliebener Matrix trübe und wurden daher nicht gemessen. Nur im Variantenansatz war MTCS mit guter Ausbeute (ca. 100 %) zu messen, die Wiederfindung für aufgestocktes TCS lag bei diesem Experiment jedoch unterhalb von 10 %.

Zur Erhöhung der Extraktionsausbeute und zur gleichzeitigen Abtrennung von Matrixkomponenten wurden Experimente mit dem 'Extraktionshilfsmittel' Extrelut<sup>®</sup> (Kieselgur, Diatomeenerde) durchgeführt. Die säulenchromatographische Extraktion mit Extrelut<sup>®</sup> wurde von Matsushima zur TCS- und Hexachlorophen-Bestimmung in „medizinischen“ Abwässern eingesetzt [11].

Zunächst wurde wieder Brassenmatrix mit den Analyten aufgestockt, mit TMAH aufgelöst und anschließend mit Reinstwasser verdünnt und angesäuert. Diese Mischung wurde dann auf eine Glassäule gegeben, in der 20 g Extrelut<sup>®</sup> leicht verdichtet vorgelegt waren. Nach 15 min Wartezeit (Verteilung der aufgelösten Brassenmuskulatur auf dem Kieselgurmaterial) wurde mit 60 mL n-Hexan

eluiert. Nach Einengung des Eluats wurde wie beschrieben aufgereinigt, mit HFBA derivatisiert und gemessen.

Die Wiederfindung für die phenolischen Analyten PP, CP und TCS lag bei über 90 %, jedoch konnte in diesem Fall das MTCS nur mit einer Ausbeute von < 40 % gemessen werden.

#### 6.2.3.1.2. Aufschluss mit Kaliumhydroxid-Lösung

Aufgrund von Leerwert-Problemen bei der Probenbehandlung mit TMAH, der geringen Ausbeute für MTCS und der verbleibenden Matrix nach dem Kieselgel-Cleanup wurde folgende Probenaufarbeitung mit den Lösungsmitteln n-Hexan und Toluol getestet:

- Auflösen von 2 g aufgestockter Brassenmuskulatur in 5 mL 20 %iger KOH-Lösung (1 h bei 70 °C)
- Verdünnung mit 8 mL Reinstwasser
- Ansäuern mit 8 mL 10 %iger Salzsäure (pH-Wert ca. 2)
- Aufziehen auf 20 g leicht verdichtetes Extrelut<sup>®</sup>
- Extraktion mit 60 mL n-Hexan bzw. Toluol
- Einengung zur Trockne und Derivatisierung mit PFBBr
- Cleanup an Kieselgel mit n-Hexan
- GC/MS-Analyse von MTCS und der PFBBr-Derivat in einem Chromatogramm

Bei der Extraktion mit Toluol werden große Anteile der Matrix mit erfasst, sodass die GC/MS-Analytik besonders im Retentionsbereich von TCS stark beeinträchtigt wurde. Die Wiederfindung bei der Extraktion mit n-Hexan für die phenolischen Analyten lag wiederum bei 90 % (TCS) bis 100 % (PP und CP), die Ausbeute für MTCS sank jedoch auf ca. 25 %.

#### 6.2.3.1.3. Anmerkungen und Fazit

Auch durch weitere Tests und Varianten konnte keine gemeinsame Extraktionsmethode für alle Analyten erarbeitet werden, die als Basisschritt einen Aufschluss der Matrix im alkalischen Milieu beinhaltet. Besonders nachteilig für dieses Verfahren war es, dass auch vergleichbare Extraktionsschritte nur mit sehr ungenügender Reproduzierbarkeit wiederholt werden konnten. Die Messlösungen enthielten oft noch größere Mengen an Matrix; für einen Routineeinsatz der Methode wäre somit eine weitere Aufreinigung erforderlich gewesen. Die Effektivität der Aufreinigung an Kieselgel konnte gesteigert werden, indem zuerst die Derivatisierung mit PFBBr und erst dann der Cleanup-Schritt durchgeführt wurde (siehe Absatz 6.2.3.3.2).

#### 6.2.3.2. Extraktion mittels ASE

Aufgrund der ungenügenden Extraktionsausbeuten und Reproduzierbarkeiten der TCS/MTCS-Bestimmung nach Aufschluss der Matrix im alkalischen Milieu, wurde auf eine andere Methode zur spurenanalytischen Bestimmung von organischen Spurenstoffen in Brassenmuskulatur zurückgegriffen.

Dieses Verfahren wurde im IME zur quantitativen Bestimmung von Alkylphenolen und Alkylphenolmonoethoxylaten eingesetzt [3] und beruht auf einer Extraktion der Analyten mittels ASE, einer zweistufigen Aufreinigung der gewonnenen Extrakte sowie Derivatisierung und Messung mittels GC/MS/MS.

Dieses Verfahren wurde später nach geringfügigen Anpassungen und Optimierungen auch zur Bestimmung von Polycyclischen und Nitro-Moschusverbindungen in biologischen Umweltproben eingesetzt [12].

Die folgenden 'Parameter' des ASE-Verfahrens wurden getestet bzw. optimiert<sup>5</sup>:

- Lösungsmittelzusammensetzung
- Säurezusatz
- Extraktions-Temperatur

#### 6.2.3.2.1. Lösungsmittelzusammensetzung

Die Auswahl der Lösungsmittel erfolgte auf Basis der Löslichkeiten der Analyten im Lösungsmittel und der Verwendung der Lösungsmittel während der weiteren Probenaufarbeitung, z.B. als Laufmittel in der GPC. Getestet wurden:

- Cyclohexan
- Dichlormethan
- Cyclohexan/Dichlormethan-Gemisch (1/1, v/v)
- Cyclohexan/Aceton-Gemisch (1/1, v/v)

Die Extraktionsausbeuten zeigten für aufgestockte Marix-Proben (je 2 g Brassenmuskulatur) keine Abhängigkeit vom eingesetzten Lösungsmittel (Extraktionstemperatur = 80 °C). Das Cyclohexan/Aceton-Gemisch erwies sich aufgrund von mitextrahierten Wasserresten als ungünstig. Aufgrund dieser Ergebnisse und toxikologischer Abwägungen wurde Cyclohexan als Lösungsmittel für die ASE ausgewählt.

#### 6.2.3.2.2. Säurezusatz

Da die phenolischen Analyten (leicht) acide Verbindungen darstellen (pKa von TCS = 7,9) wurde die Verwendung von „Säure“ während der ASE getestet. Zum einen wurde dem Natriumsulfat, mit dem die Biota-Proben homogenisiert wurden, ca. 4 %  $\text{KHSO}_4$  zugesetzt und zum anderen wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Cyclohexan und 1 Vol.-% Essigsäure eingesetzt.

Der Säurezusatz führte in beiden Fällen für aufgestockte Marix-Proben nicht zu einer Erhöhung der Extraktionsausbeuten; auch hier erwies sich „reines“ Cyclohexan als ASE-Lösungsmittel optimal für die Extraktion sowohl der phenolischen Analyten als auch für das unpolare MTCS.

---

<sup>5</sup> Der Druck während der ASE-Extraktion spielt für die Ausbeute erfahrungsgemäß nur eine untergeordnete Rolle, alle Experimente wurden deshalb bei einem „Standard“-Druck von 14 MPa durchgeführt.

### 6.2.3.2.3. Temperaturoptimierung

Die Temperaturoptimierung wurde mit jeweils 2 g Brassenmuskulatur dem Lösungsmittel Cyclohexan bei den Temperaturen 60, 80, 100 und 120 °C durchgeführt. Die Proben wurden hierzu mit Natriumsulfat verrieben in ASE-Zellen eingefüllt und entsprechend der späteren Verfahrens-SOP extrahiert und aufgearbeitet. Die Messungen der PFBBr-Derivate wurden allerdings mittels GC/EI-MS durchgeführt.

Es zeigte sich für die polaren Analyten keine Abhängigkeit der Extraktions-Ausbeute von der Temperatur. Für MTCS ergab sich ein Optimum bei 100 °C, dieser Wert wurde somit in die Verfahrens-SOP übernommen.

### 6.2.3.3. Aufreinigung der ASE-Extrakte (Cleanup)

Zur Aufreinigung der ASE-Extrakte wurden die Verfahren angepasst, die bereits zur Bestimmung von Moschusduftstoffen und Alkylphenolen in Proben der UPB eingesetzt wurden.

#### 6.2.3.3.1. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Zur Fettentfernung wurden die ASE-Extrakte zunächst mittels GPC an Bio-Beads S-X3 aufgereinigt. Das für die Moschusverbindungen eingesetzte Verfahren wurde ohne Änderungen übernommen, die Elutionszeit der Analyt-Fraktion wurde neu ermittelt, sie lag zwischen 14 und 21 Minuten.

#### 6.2.3.3.2. Adsorptionschromatographie an Kieselgel

Der GPC-Cleanup-Schritt erwies sich für die Matrix Brassenmuskulatur als nicht ausreichend, im GC-Retentionsbereich für MTCS traten Störungen durch Matrix-Peaks auf, die auch durch die Detektion per MS/MS nicht behoben werden konnten.

Deshalb wurde die weitere Reinigung durch Adsorptionschromatographie an aktiviertem Kieselgel für die Analyten PP, CP, TCS und MTCS und die Lösungsmittelgemische Cyclohexan/Aceton und n-Hexan/ Aceton getestet und optimiert.<sup>6</sup>

Es zeigte sich, dass mit n-Hexan/Aceton-Gemischen an Kieselgel weitere Matrixbestandteile abgetrennt werden konnten und das eine Abtrennung des MTCS von den Phenolen möglich ist.

Somit war es jetzt auch möglich, das MTCS direkt, d.h. ohne den Derivatisierungs-Schritt mittels GC/MS/MS zu messen. Nur die phenolischen Analyten wurden der Derivatisierungsprozedur unterworfen und per GC/NCI-MS gemessen.

---

<sup>6</sup> Auch hier wurde das Verfahren basierend auf der für die Moschusverbindungen beschriebenen Methode entwickelt.

### 6.3. Validierung der analytischen Methode

#### 6.3.1. Grund-Kalibrierung und Verfahrenskenngrößen

Zur Bezug-Kalibrierung (Grund-Kalibrierung) der Messsysteme wurden Bezugslösungen für MTCS und TCS/CP hergestellt. Diese enthielten die Analyten in variablen und die Internen Standards (IS) in konstanten Konzentrationen (vgl. Kap. 12.1 der SOP im Anhang I-2).

Die MTCS-Bezugslösungen wurden in n-Hexan angesetzt und direkt per GC/MS/MS gemessen. Zur Bezugs-Kalibrierung des GC/NCI-MS-Systems für TCS und CP wurden die Bezugslösungen in Aceton hergestellt und vor der Messung mit PFBB<sub>r</sub> derivatisiert.

Die Grund-Kalibrierungen der GC/MS-Mess-Systeme wurden in jeweils zwei Konzentrationsbereichen durchgeführt. Zum einen in einem Bereich mit dem die aufgearbeiteten Biota-Proben quantifiziert wurden (Arbeitsbereich) und zum anderen in einem reduzierten Bereich, der zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze (BG) nach DIN 32 645 [13] genutzt wurde<sup>7</sup>. Die Grund-Kalibrierung für Methyl-Triclosan im Bereich von 0,2 bis 2,0 ng/0,1 mL zur Ermittlung der BG ist in Abbildung I-1 dargestellt, Abbildung I-2 zeigt die Kalibration für Triclosan im Arbeitsbereich von 0,1 bis 10 ng/0,1 mL; die weiteren Kalibrierfunktionen sind im Anhang I-3 dargestellt.

Mit dem EDV-Programm SQS 2000 [14] wurden die Verfahrenskenngrößen Linearität, der Korrelationskoeffizient r, die relative Verfahrensstandardabweichung  $V_{x0}$  und die Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645 berechnet. Die Verfahrenskenndaten inklusive der Wiederfindungsrate (WFR) für die Matrix Brassenmuskulatur und der Leerwertgehalte sind in Tabelle I-7 für die Analyten MTCS, TCS, CP und PP zusammengestellt.

**Tabelle I-7: Verfahrenskenngrößen, berechnet aus Grund- und Matrix-Kalibrierung**

Kenngröße		MTCS	TCS	CP	PP
Linearität <sup>*)</sup>	F-Test	linear	linear	linear	linear
	R	0,9990	1,0000	0,9998	0,9931 (BG)
$V_{x0}$	Arbeitsbereich	3,16 – 3,52 %	0,51 – 1,06 %	1,26 – 2,83 %	-
	BG	4,1 %	1,4 %	3,9 %	7,4 %
BG nach DIN	Bezugs-Lösung	0,50 ng/0,1 mL	0,18 ng/0,1 mL	0,48 ng/0,1 mL	0,90 ng/0,1 mL
	Verfahren <sup>**)</sup>	0,25 ng/g FG	0,09 ng/g FG	0,25 ng/g FG	0,45 ng/g FG
WFR <sup>***)</sup>		1,006	1,010	1,066	1,143
Verfahrensleerwerte [ng/g]		0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,005 <sup>****)</sup>	0,12 ± 0,07	-

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

\*\*\*) Ergebnis der Bezugs-Lösungen auf eine Einwaage von 2 Probe umgerechnet

\*\*\*\*) Für die Matrix-Brassenmuskulatur

\*\*\*\*\*) vgl. Kapitel 6.3.3

<sup>7</sup> Die nur sehr gering belasteten Biota-Proben der PNF 'Belauer See, Bornhöved' wurden ebenso über diese Kalibrierung ausgewertet.

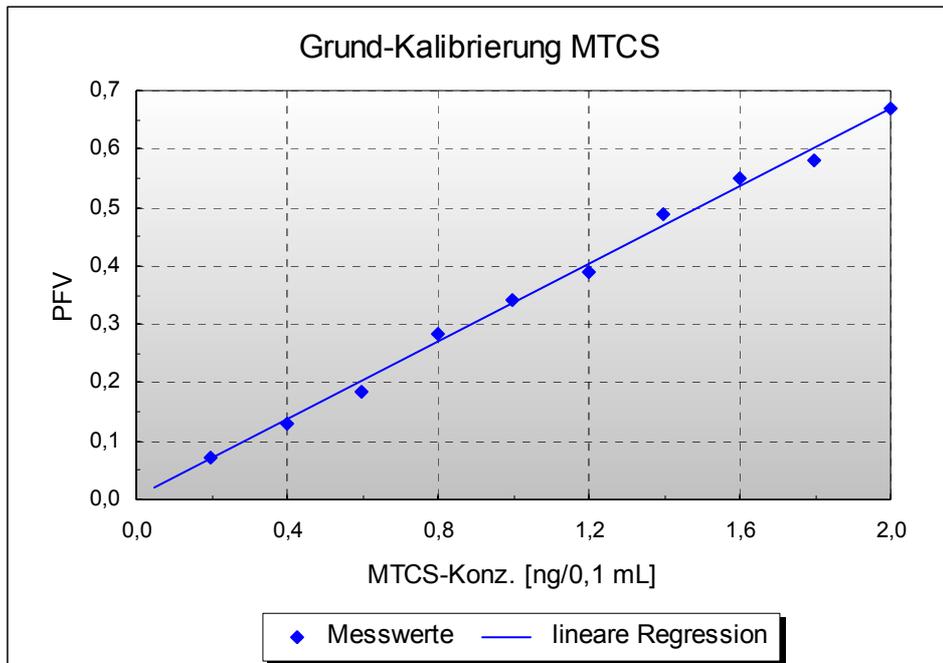


Abbildung I-1: Grund-Kalibrierung für Methyl-Triclosan im Bereich von 0,2 bis 2,0 ng/0,1 mL zur Ermittlung der BG

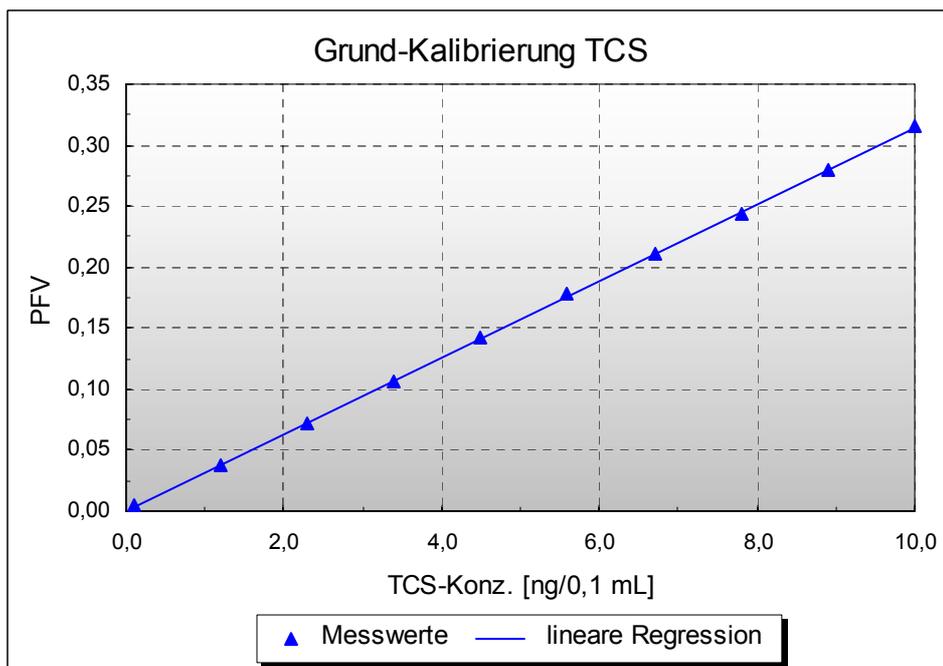


Abbildung I-2: Grund-Kalibrierung für Triclosan im Arbeitsbereich von 0,1 bis 10 ng/0,1 mL

### 6.3.2. Matrix-Kalibrierung

Als grundlegendes Experiment zur Validierung des analytischen Verfahrens (die Prüfung auf systematische Fehler) wurden für die Matrix Brassenmuskulatur die Wiederfindungsfunktionen (WFF) der Analyten TCS, CP, PP und MTCS aufgestellt.

Hierzu wurden 15 g des Rheinreferenzmaterials mit ca. 140 g Natriumsulfat homogenisiert, in sechs gleiche Teilproben geteilt und in ASE-Zellen eingefüllt. Fünf dieser Teilproben wurden dann mit jeweils ca. 6, 17, 28, 39 und 50 ng der Analyten TCS, CP, PP und MTCS versetzt (dies entspricht Gehalten in den Biota-Proben von ca. 2,4 bis 20 ng/g FG). Alle Proben wurden dann mit der IS-Lösung versetzt und die ASE-Zellen mit Natriumsulfat volumenfrei aufgefüllt.

Anschließend wurden die Matrix-Proben entsprechend der Verfahrens-SOP aufgearbeitet und gemessen. Die gemessenen Peakflächenverhältnisse (PFV) wurden gegen die aufgestockten Analytmengen aufgetragen und so die Matrix-Kalibrierungen erstellt. In Abbildung I-3 sind Grund- und Matrix-Kalibrierung für MTCS vergleichend dargestellt.

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 ergeben, aufgetragen gegen die eingesetzten Mengen der Analyten, die WFF. In Abbildung I-4 ist die Wiederfindungsfunktion für MTCS und die Matrix Brassenmuskulatur dargestellt.

Die Grund- und Matrix-Kalibrierungen sowie die WFF der weiteren Analyten sind im Anhang I-3 dargestellt.

Die Prüfung des Verfahrens auf systematische Fehler wird 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 % (siehe Tabelle I-7).

Das analytische Verfahren weist für keinen Analyten systematische Fehler auf, die WFR für MTCS und TCS liegen bei idealen 100,6 bzw. 101,0 %. Die WFR für CP liegt mit 106,6 % noch im akzeptablen Bereich für spurenanalytische Verfahren. Chlorophene wird daher mit in das Untersuchungsprogramm aufgenommen, die WFR wird mit in die Ergebnisberechnung einbezogen.

Die WFR für PP liegt mit 114 % schon deutlich oberhalb der Werte, die für die anderen Analyten gefunden wurden. Weiterhin deutet auch der relativ hohe Verfahrensvariationskoeffizient von 7,4 % auf eine Schwachstelle in der Probenaufarbeitung oder Messung hin; es wird deshalb im Rahmen dieser Studie auf die Bestimmung von PP verzichtet.

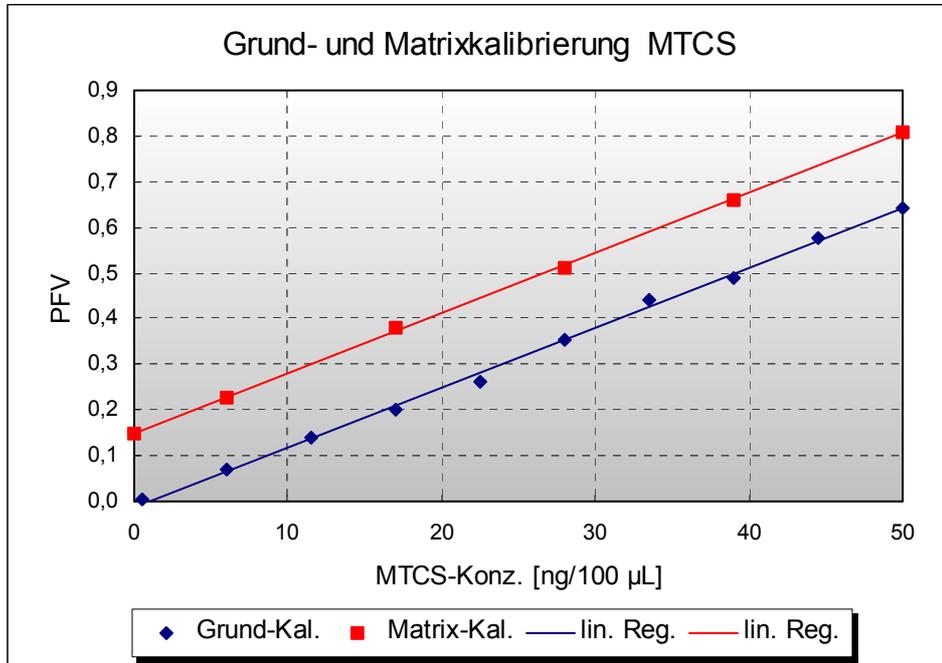


Abbildung I-3: Vergleich von Grund- und Matrix-Kalibrierung für Methyl-Triclosan

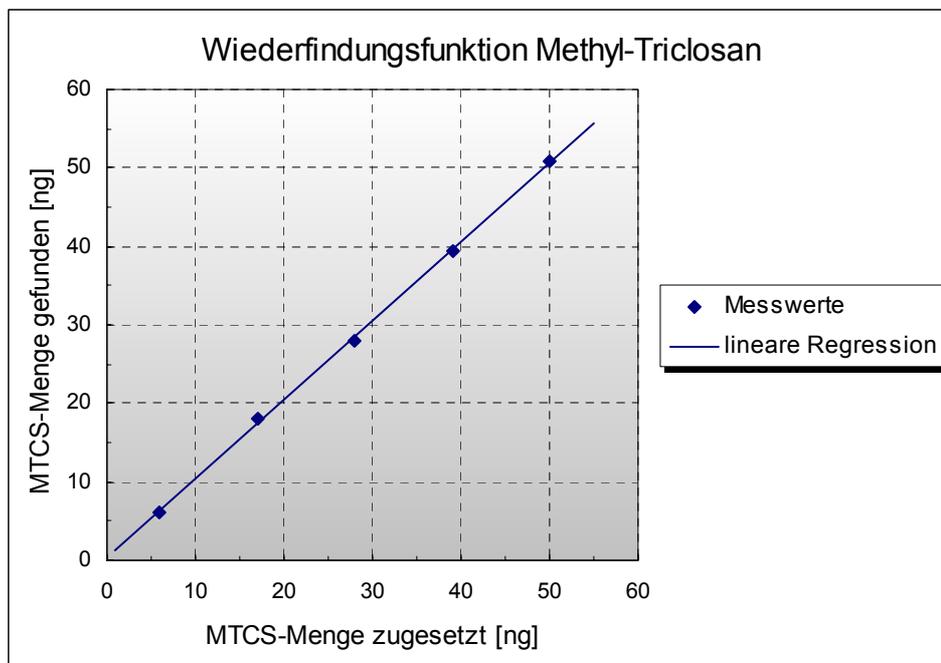


Abbildung I-4: WFF für Methyl-Triclosan und die Matrix Brassenmuskulatur

### 6.3.3. Leerwerte

In jeder Analysenserie wurde ein Methoden-Leerwert aufgearbeitet und gemessen; hierzu wurde das gesamte Verfahren ohne Matrix durchgeführt.

Die Leerwerte lagen für MTCS und CP unterhalb der Bestimmungsgrenzen nach DIN 32 645 von jeweils 0,25 ng/g FG.

Im Untersuchungszeitraum von November 2003 bis Januar 2004 wurden auch für TCS Leerwerte bestimmt, die geringfügig unter der BG von 0,1 ng/g FG lagen. Ab Februar 2004 stiegen die Leerwerte um ca. den Faktor 2 an, gleichzeitig nahm die Reproduzierbarkeit ab. Aufgrund dieser ungünstigen Veränderungen, für die keine abschließende Erklärung gefunden werden konnte, musste die Bestimmungsgrenze für TCS auf 0,2 ng/g FG angehoben werden.

### 6.3.4. Qualitätssicherung und Methoden-Präzision

#### 6.3.4.1. Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit an UPB-Proben

Die Wiederholbarkeit der analytischen Methode - eingeschlossen die Inhomogenitäten der untersuchten Proben - wurde anhand von zwei Vierfachmessungen aus einem UPB-Gefäß bestimmt; die Probenaufarbeitungen bzw. Messungen erfolgten in einer Serie.

Zur Abschätzung der Vergleichbarkeit der UPB-Teilproben untereinander wurde zusätzlich von zwei Proben der gleichen PNF und des gleichen Jahrgangs jeweils Material aus drei bzw. vier Gefäßen (mit unterschiedlichen UPB-Codes) untersucht. Aufgrund von Aufarbeitungen mit unterschiedlicher Probeneinwaage wurden die Bestimmungen nicht in einer Serie vorgenommen.

Die Proben der Matrix Brassenmuskulatur wurden jeweils wie in der Verfahrens-SOP beschrieben aufgearbeitet und die Analyt-Gehalte bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen I-8 und I-9 zusammen mit den berechneten statistischen Daten aufgelistet.

Zur Abschätzung der laborinternen Präzision wurde die Wiederholstandardabweichung  $s_L$  bzw. die relative laborinterne Wiederholstandardabweichung  $V_L$  [%] berechnet.

#### 6.3.4.2. Routine-Qualitätssicherung

Die Überprüfung der Zuverlässigkeit des analytischen Verfahrens in der Routine-Phase des Projektes erfolgte durch die Aufarbeitung und Messung der sogenannten Rhein-Referenzprobe<sup>8</sup>. Die Referenzprobe wurde in jeder Messserie, insgesamt 12 mal aus drei unterschiedlichen UPB-Gefäßen aufgearbeitet und die Gehalte an MTCS, TCS und CP bestimmt; die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle I-10 angegeben.

<sup>8</sup> Das Rhein-Referenzmaterial wurde aus linker Brassenmuskulatur der PN-Fläche Weil am Rhein und den PN-Jahrgängen 2000 bis 2002 hergestellt.

**Tabelle I-8: Messergebnisse zur Abschätzung der Wiederholbarkeit der analytischen Methode**

PN-Fläche	PN-Jahr	Ergebnisse in ng/g FG		
		CP	MTCS	TCS
Saar, Güdingen	1994	2,81	9,85	0,68
		2,79	10,0	0,69
		2,82	10,9	0,76
		3,13	12,0	0,71
Mittelwert, m:		2,89	10,7	0,71
laborinternen Wiederholstandardabweichung, s <sub>L</sub> :		0,16	0,97	0,033
relative Wiederholstandardabweichung V <sub>L</sub> , [%]:		<b>5,6</b>	<b>9,1</b>	<b>4,7</b>
Bestimmungsgrenze, vgl. 6.3.1		0,25	0,20	0,25
Saar, Güdingen	2002	0,52	27,1	0,74
		0,52	25,3	0,69
		0,50	26,3	0,65
		0,53	25,8	0,72
Mittelwert, m:		0,52	26,1	0,70
laborinternen Wiederholstandardabweichung, s <sub>L</sub> :		0,013	0,77	0,04
relative Wiederholstandardabweichung V <sub>L</sub> , [%]:		<b>2,5</b>	<b>2,9</b>	<b>5,6</b>
Bestimmungsgrenze:		0,25	0,20	0,25

**Tabelle I-9: Messergebnisse zur Abschätzung der Vergleichbarkeit der UPB-Teilproben**

PN-Fläche	PN-Jahr	Ergebnisse in ng/g FG		
		CP	MTCS	TCS
Saale, Wettin	2002	0,93	- **)	0,50
		0,90	29,2	0,48
		0,97	35,7	0,75
		0,95	32,9	1,77 *)
Mittelwert, m:		0,94	32,6	0,58
laborinternen Wiederholstandardabweichung, s <sub>L</sub> :		0,029	3,3	0,15
relative Wiederholstandardabweichung V <sub>L</sub> , [%]:		<b>3,0</b>	<b>10,1</b>	<b>25,6</b>
Bestimmungsgrenze:		0,25	0,20	0,25
Saar, Güdingen	1998	1,47	14,3	0,71
		1,32	15,4	0,94
		1,32	16,5	0,86
Mittelwert, m:		1,37	15,4	0,83
laborinternen Wiederholstandardabweichung, s <sub>L</sub> :		0,088	1,1	0,12
relative Wiederholstandardabweichung V <sub>L</sub> , [%]:		<b>6,4</b>	<b>7,0</b>	<b>14,0</b>
Bestimmungsgrenze:		0,25	0,20	0,25

\*) Ausreißer nach Grubbs mit P = 95 %, die Berechnung der statistischen Daten wurde ohne diesen Wert vorgenommen

\*\*) Der Messwert lag außerhalb des Arbeitsbereichs der Kalibrierfunktion

Die Ergebnisse wurden wieder zur Berechnung der Präzision herangezogen, ausgedrückt in der Wiederholstandardabweichung  $s_L$  bzw. der relativen Wiederholstandardabweichung  $V_L$  [%].

**Tabelle I-10: 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		
		MTCS	TCS	CP
311100000042019699	20. Nov. 03	6,59	0,38	(0,11)
311100000042019004	25. Nov. 03	7,01	0,38	(0,11)
311100000042019004	2. Dez. 03	6,48	0,40	(0,17)
311100000042019004	4. Dez. 03	8,30	0,37	(0,17)
311100000042019004	8. Dez. 03	6,96	0,39	(0,19)
311100000042019699	10. Dez. 03	7,35	0,35	(0,15)
311100000042019004	7. Jan. 04	7,12	0,40	(0,08)
311100000042019699	14. Jan. 04	6,37	0,38	(0,08)
311100000042019699	2. Feb. 04	6,32	0,41	(0,07)
311100000042019698	16. Feb. 04	7,06	0,58 <sup>*)</sup>	(0,08)
311100000042019698	19. Feb. 04	7,48	0,47	< NWG
311100000042019698	17. Mrz. 04	6,59	0,54	< NWG
Mittelwert, m:		6,85	0,41	(0,12) <sup>**)</sup>
laborinternen Wiederholstandardabweichung, $s_L$ :		0,40	0,05	0,04
relative Wiederholstandardabweichung $V_L$ , [%]:		<b>5,8</b>	<b>12,8</b>	<b>35,9<sup>**)</sup></b>
Bestimmungsgrenze, vgl. 6.3.1:		0,25	0,20	0,25

\*) Ausreißer nach Grubbs mit  $P = 95\%$ , die Berechnung der statistischen Daten wurde ohne diesen Wert vorgenommen

\*\*\*) Die Werte in Klammern liegen zwischen der BG und der NWG

Zur Beurteilung der Methoden-Präzision wurden die relativen laborinternen Wiederholstandardabweichungen  $V_L$  [%] in der Tabelle I-11 zusammengestellt.

**Tabelle I-11: Zusammenstellung der relativen laborinternen Wiederholstandardabweichung  $V_L$  in %**

Experiment	MTCS	TCS	CP
Wiederholbarkeit an UPB-Proben	9,1 / 2,9	4,7 / 5,6	5,6 / 2,5
Vergleichbarkeit an UPB-Proben	10,1 / 7,0	25,6 / 14,0	3,0 / 6,4
Routine-Qualitätssicherung	5,8	12,8	36

Die  $V_L$ -Werte schwanken in einem Bereich, wie er für spurenanalytische Verfahren mit umfangreicher Probenaufarbeitung und Messung mittels gaschromatographisch-massenspektrometrischer Methoden zu erwarten ist.

Die Vergleichbarkeit und die Wiederholbarkeit sind für MTCS und CP nicht signifikant unterschiedlich. Auffällig ist im Vergleich hierzu der hohe Unterschied zwischen diesen beiden Experimenten für TCS.

Die  $V_L$ -Werte, die in der Routine-Phase des Projektes gewonnen wurden, belegen die Zuverlässigkeit der analytischen Methode. Die Wiederholstandardabweichungen steigen erwartungsgemäß mit Annäherung der Konzentrationen an die jeweilige Bestimmungsgrenze, der Gehalt für MTCS liegt deutlich oberhalb der BG, der TCS-Gehalt an der BG und der Gehalt von CP unterhalb der BG des Verfahrens.

## 7. Abschätzung der Mess- und Ergebnisunsicherheit

Die Ergebnisunsicherheit wird über die laborinterne Reproduzierbarkeit (reproducibility within-laboratory)  $u(R_w)$  abgeschätzt. Die Methode ist in einem Nordtest Report [15] beschrieben und beruht auf der wiederholten Messung ( $\geq 50$  Einzelmessungen) einer stabilen Kontroll-Probe gleicher Matrix. Dabei ist es äußerst wichtig, dass alle Schritte der Probenaufarbeitung und Messung in die Abschätzung einfließen. Weiterhin wird als wichtig beschrieben, dass Langzeitveränderungen (z.B. unterschiedliche Kalibrierfunktionen oder neue Chargen verwendeter Lösungsmittel, Adsorbentien oder Derivatisierungsreagenzien) mit eingeschlossen werden.

Zur Ermittlung der Mess- und Ergebnisunsicherheit wird in dieser Studie auf die Präzisions-Daten der Rhein-Referenzprobe aus Tabelle I-10 zurückgegriffen. Der geforderte Datenumfang wird zwar nicht erreicht, jedoch werden die weiteren Bedingungen dieser Abschätzungsmethode erfüllt, sodass diese Vorgehensweise genügend begründet erscheint.

Als  $u(R_w)$ -Werte werden die relativen laborinternen Wiederholstandardabweichungen  $V_L$  von 5,8 % für MTCS und 12,8 % für TCS zu Grunde gelegt. Unter Einbeziehung des Erweiterungsfaktors von  $k=2$  ergeben sich dann die erweiterten Ergebnisunsicherheiten  $U$  von 11,6 % für MTCS und 25,6 % für TCS.

Der deutliche Unterschied für MTCS und TCS ist auf die Gehalte in der Rhein-Referenzprobe zurückzuführen; der Gehalt von 6,85 ng/g FG für MTCS liegt deutlich oberhalb der BG des Verfahrens während der Gehalt von 0,41 ng/g FG für TCS jedoch nur geringfügig oberhalb der BG von 0,20 ng/g FG liegt. Bei höheren Gehalten dürfte die erweiterte Ergebnisunsicherheit auch für TCS in einen Bereich von 10 % fallen.

Die Ergebnisunsicherheit kann für CP mit dem hier beschriebenen Verfahren nicht ermittelt werden, da der CP-Gehalt im Referenzmaterial unterhalb der BG lag. Die Präzisionsdaten aus der Tabellen Tabelle I-8 und Tabelle I-9 deuten aber darauf, dass eine Ergebnisunsicherheit im Bereich von MTCS zu erwarten ist.

Für die Moschusduftstoffe Galaxolide und Moschus-Keton sowie die Matrix Brassenmuskulatur wurde im Fraunhofer IME nach dem EURACHEM-Konzept (Eurochem/Citac Guide, 2000) die Mess- und Ergebnisunsicherheit unter Berücksichtigung der einzelnen Unsicherheitsquellen berechnet [12]. Das Verfahren beruht ebenso wie das in diesem Projekt eingesetzte aus einer ASE-Extraktion, einem zweistufigen Cleanup und einer GC/MS/MS-Messung. Die ermittelten erweiterten Ergebnisunsicherheiten  $U$  betragen für Galaxolide 10,2 % und für Moschus-Keton 10,7 %. Die gute Übereinstimmung dieser Werte mit der erweiterten Unsicherheit für MTCS belegt das in diesem Projekt angewandte Verfahren.

## 8. Ergebnisse

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

$$G = \frac{C_P - C_{LW}}{WFR \cdot m} \quad (1)$$

$G$  = Analyt-Gehalt [ng/g FG]

$C_P$  = 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]

Die berechneten Analyt-Gehalte sind in der Tabelle I-12 aufgelistet, Werte unterhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenze sind mit < 'Zahlenwert der BG' angegeben.

Eine Umrechnung der auf Frischgewicht bezogenen Analyt-Gehalte in Fettgehaltbezogene Konzentrationen (als ng/g Lipid) erfolgt im Anhang des Teils II dieses Berichts.

**Tabelle I-12: Analyt-Gehalte von Methyl-Triclosan, Triclosan und Chlorophene in ng/g Frischgewicht**

Probenahme-Fläche	Probenahme-Jahr	Methyl-Triclosan	Triclosan	Chlorophene
Saar, Güdingen	1994	10,7	0,71	2,9
	1995	8,0	0,44	0,80
	1996	11,4	0,69	3,3
	1997	12,5	0,56	2,0
	1998	15,4	0,83	1,4
	1999	14,4	0,87	0,61
	2000	18,2	0,89	0,67
	2001	14,0	0,58	0,31
	2002	26,1	0,70	0,52
	2003	16,6	0,36	< 0,25

**Tabelle I-12: Analyt-Gehalte von Methyl-Triclosan, Triclosan und Chlorophene in ng/g Frischgewicht**

Probenahme-Fläche	Probenahme-Jahr	Methyl-Triclosan	Triclosan	Chlorophene
Saar, Rehlingen	1994	4,0	< 0,2	1,3
	1995	3,8	0,42	2,0
	1996	6,8	0,32	0,82
	1997	5,9	< 0,2	1,1
	1998	14,6	3,4	2,1
	1999	12,6	1,1	1,8
	2000	16,0	0,62	0,85
	2001	19,5	1,7	1,8
	2002	15,9	0,29	0,80
	2003	22,7	< 0,2	0,41
Rhein, Weil	1996	4,3	0,37	0,84
	1998	14,9	0,66	0,43
	2000	6,0	0,24	< 0,25
	2001	6,3	0,29	< 0,25
	2002	7,1	0,39	< 0,25
	2003	7,5	0,49	< 0,25
Rhein, Iffezheim	1996	3,6	0,21	0,35
	1998	11,2	0,34	< 0,25
	2000	7,0	< 0,2	< 0,25
	2001	7,6	< 0,2	< 0,25
	2002	10,6	0,27	< 0,25
	2003	12,2	0,42	< 0,25
Rhein, Koblenz	1996	3,6	< 0,2	< 0,25
	1998	3,1	< 0,2	< 0,25
	2000	4,1	< 0,2	< 0,25
	2001	7,4	< 0,2	< 0,25
	2002	8,5	< 0,2	< 0,25
	2003	8,0	< 0,2	0,26
Rhein, Bimmen	1996	1,0	< 0,2	< 0,25
	1998	3,4	< 0,2	< 0,25
	2000	5,4	< 0,2	< 0,25
	2001	4,5	< 0,2	< 0,25
	2002	7,6	< 0,2	< 0,25
	2003	21,1	< 0,2	< 0,25

**Tabelle I-12: Analyt-Gehalte von Methyl-Triclosan, Triclosan und Chlorophene in ng/g Frischgewicht**

Probenahme-Fläche	Probenahme-Jahr	Methyl-Triclosan	Triclosan	Chlorophene
Elbe, Prossen	1996	1,1	< 0,2	0,38
	1998	2,3	< 0,2	0,89
	2000	2,2	< 0,2	0,25
	2001	3,5	< 0,2	< 0,25
	2002	4,2	< 0,2	< 0,25
	2003	2,9	< 0,2	< 0,25
Elbe, Zehren	1996	1,1	< 0,2	0,33
	2001	3,8	< 0,2	< 0,25
	2002	3,4	< 0,2	< 0,25
	2003	4,0	< 0,2	< 0,25
Elbe, Barby	1996	3,4	< 0,2	0,93
	1998	3,4	< 0,2	< 0,25
	2000	2,9	< 0,2	< 0,25
	2001	4,8	< 0,2	< 0,25
	2002	2,5	< 0,2	0,26
	2003	5,7	< 0,2	< 0,25
Elbe, Cumlosen	1996	2,7	< 0,2	< 0,25
	2001	4,7	< 0,2	< 0,25
	2002	3,6	< 0,2	< 0,25
	2003	2,3	< 0,2	< 0,25
Elbe, Blankenese	1996	1,8	< 0,2	< 0,25
	1998	3,3	< 0,2	< 0,25
	2000	2,1	< 0,2	< 0,25
	2001	3,8	< 0,2	< 0,25
	2002	3,9	< 0,2	< 0,25
	2003	4,8	< 0,2	< 0,25
Saale, Wettin	1995	1,9	0,67	2,6
	1996	1,7	< 0,2	1,2
	1998	17,1	0,20	1,1
	2000	13,6	0,22	0,4
	2001	25,8	0,62	0,80
	2002	32,6	0,58	0,94
	2003	16,8	0,21	< 0,25

**Tabelle I-12: Analyt-Gehalte von Methyl-Triclosan, Triclosan und Chlorophene in ng/g Frischgewicht**

Probenahme-Fläche	Probenahme-Jahr	Methyl-Triclosan	Triclosan	Chlorophene
Mulde, Dessau	1995	2,2	0,38	1,0
	1998	1,6	< 0,2	0,3
	2000	1,9	< 0,2	< 0,25
	2001	3,3	< 0,2	< 0,25
	2002	2,9	< 0,2	< 0,25
	2003	4,5	< 0,2	< 0,25
Belauer See, Bornhöved	1997	< 0,25	< 0,2	< 0,25
	2001	< 0,25	< 0,2	< 0,25
	2003	< 0,25	< 0,2	< 0,25
Donau, Ulm	2002	2,5	< 0,2	< 0,25
	2003	4,5	< 0,2	< 0,25
Donau, Kelheim	2002	2,5	< 0,2	< 0,25
	2003	4,5	< 0,2	< 0,25
Donau, Jochenstein	2002	5,1	< 0,2	< 0,25
	2003	3,4	< 0,2	< 0,25

## 9. Literatur

- [1] DIN EN ISO/IEC 17025, Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (2000), Beuth Verlag, Berlin
- [2] Ternes, T.A., Knacker, T., Oehlmann, J.: Körperpflegemittel in der aquatischen Umwelt. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox., 15 (3) (2003) 169 – 180
- [3] Wenzel, A., Böhmer, W., Müller, J. Rüdell, H., J., Schröter-Kermani, C.: Retrospective Monitoring of Alkylphenols and Alkylphenol Monoethoxylates in Aquatic Biota from 1985 to 201: Results from the German Environmental Specimen Bank. Environ. Sci. Technol., 38 (2004) 1654 – 1661.
- [4] Böhmer, W., Kurzawa, B.: Bestimmung von 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol mittels GC/MS/MS nach SPE-Extraktion an EMPORE disks. GIT Labor-Fachzeitschrift, 1 (2001) 57 - 59
- [5] Lerch, O., Zinn, P.: Derivatisation and gas chromatography- chemical ionisation mass spectrometry of selected synthetic and natural endocrine disruptive chemicals. Journal of Chromatography A, 991 (2003) 77 - 97
- [6] Wahlberg, C., Renberg, L., Wideqvist, U.: Determination of Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates as their Pentafluorobenzoates in Water, Sewage Sludge and Biota. Chemosphere, Vol. 20, Nos. 1-2 (1990) 179 - 195
- [7] Renberg, L.: Gas Chromatographic Determination of Phenolic Compounds in Water as their Pentafluorobenzoyl Derivates. Chemosphere, Vol. 10, No. 7 (1981) 767 – 773
- [8] RÖMPP Lexikon Online, <http://www.roempp.com/>, Georg Thieme Verlag KG (Copyright© 2004), Stuttgart
- [9] Nakamura, S., Sian, T.H., Daishima, S.: Determination of estrogens in river water by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 919 (2001) 275 - 282
- [10] Rüdell, H., Lepper, P., Steinhilber, J., Schröter-Kermani, C.: Retrospective Monitoring of Organotin Compounds in Marine Biota from 1985 to 1999: Results from the German Environmental Specimen Bank. Environ. Sci. Technol., 37 (2003) 1731 – 1738
- [11] Matsushima, H.: A selected Ion Monitoring Assay for Triclosan in Medical Waste Water. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, 16 (1988) 255 - 257
- [12] Wenzel, A., Müller, J., Böhmer, W.: Bericht 'Verfolgung von Umweltbelastungen durch Moschusverbindungen in repräsentativen Umweltproben / Methodische Entwicklung und aktuelles sowie retrospektives Monitoring ' des IME zum Prüfauftrag an das Umweltbundesamt mit Prüfcode K-UBA-005/7-61 (2003)
- [13] DIN 32645 „Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen“. Deutsches Institut für Normung e.V. (1994), Beuth Verlag, Berlin.



- [14] SQS 2000: Software zur statistischen Qualitätskontrolle analytischer Daten.  
Dr. Joachim Kleiner, Individuelle Software & Schulung, Mühlestrasse 5, D-78345 Moos
  
- [15] Magnusson, B., Näykki, T., Hovind, H., Krysell, M.: Handbook for calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, Version 1.2 June 2003, NORDTEST Report TR 537, Nordtest, Finland  
(<http://www.dach-gmbh.de/DACHDok/Messunsicherheit/Nordtest%20Messunsicherheit.pdf>)

## Anhang I-1 Massenspektren und Chromatogramme

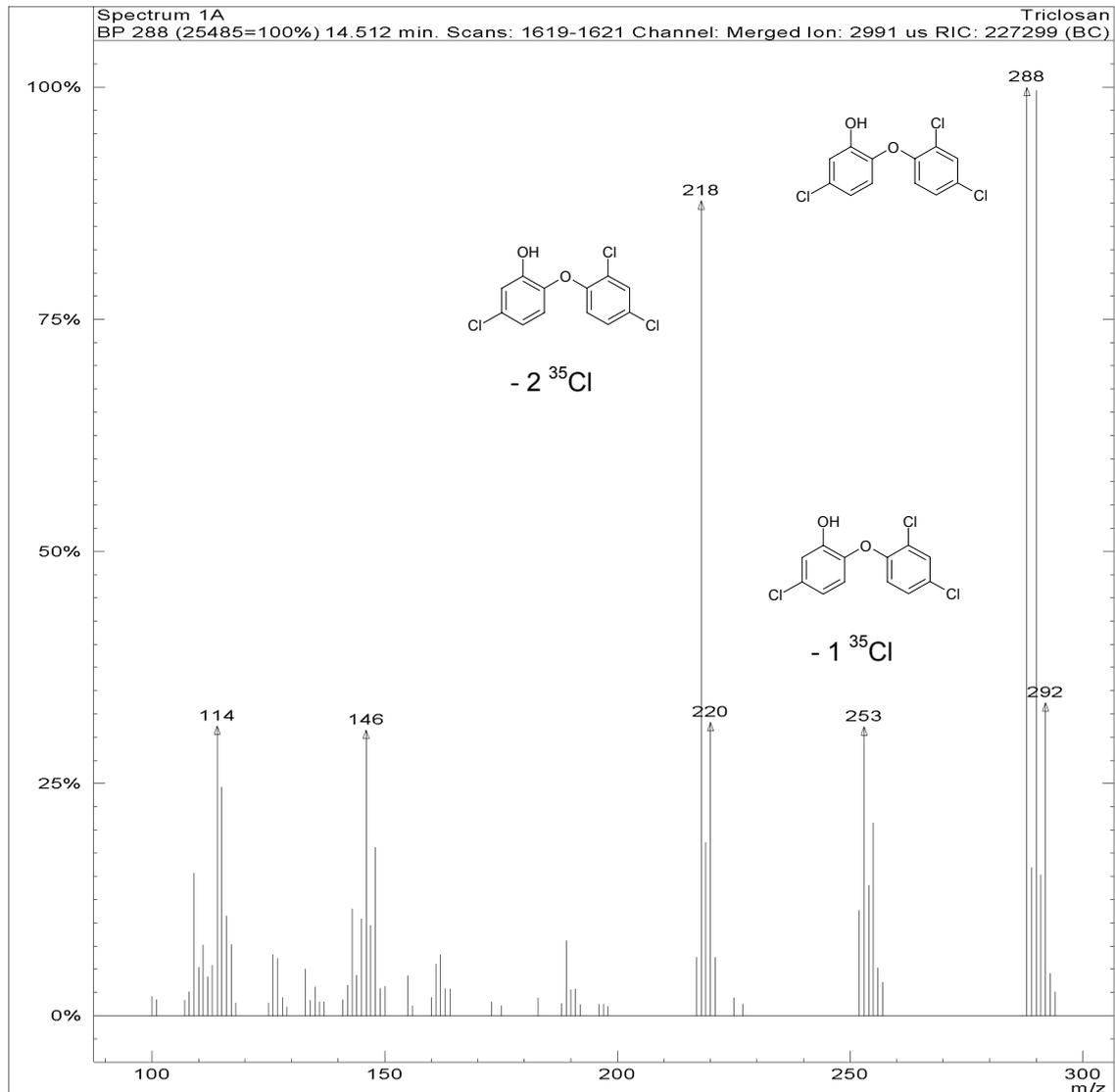


Abbildung I-S1: EI-Massenspektrum von Triclosan (TCS)

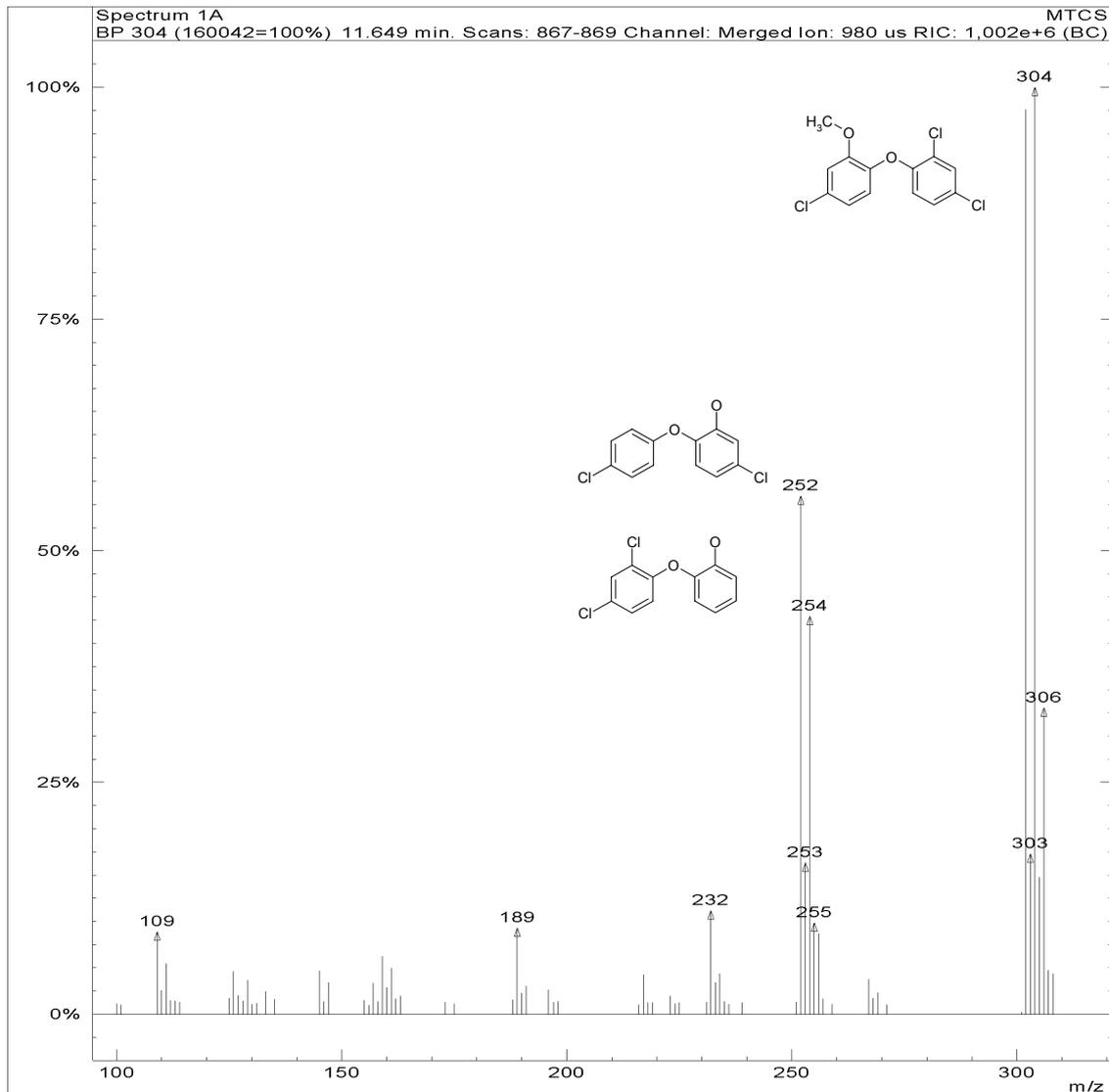


Abbildung I-S2: *EI*-Massenspektrum des TCS-Methylethers (MTCS)

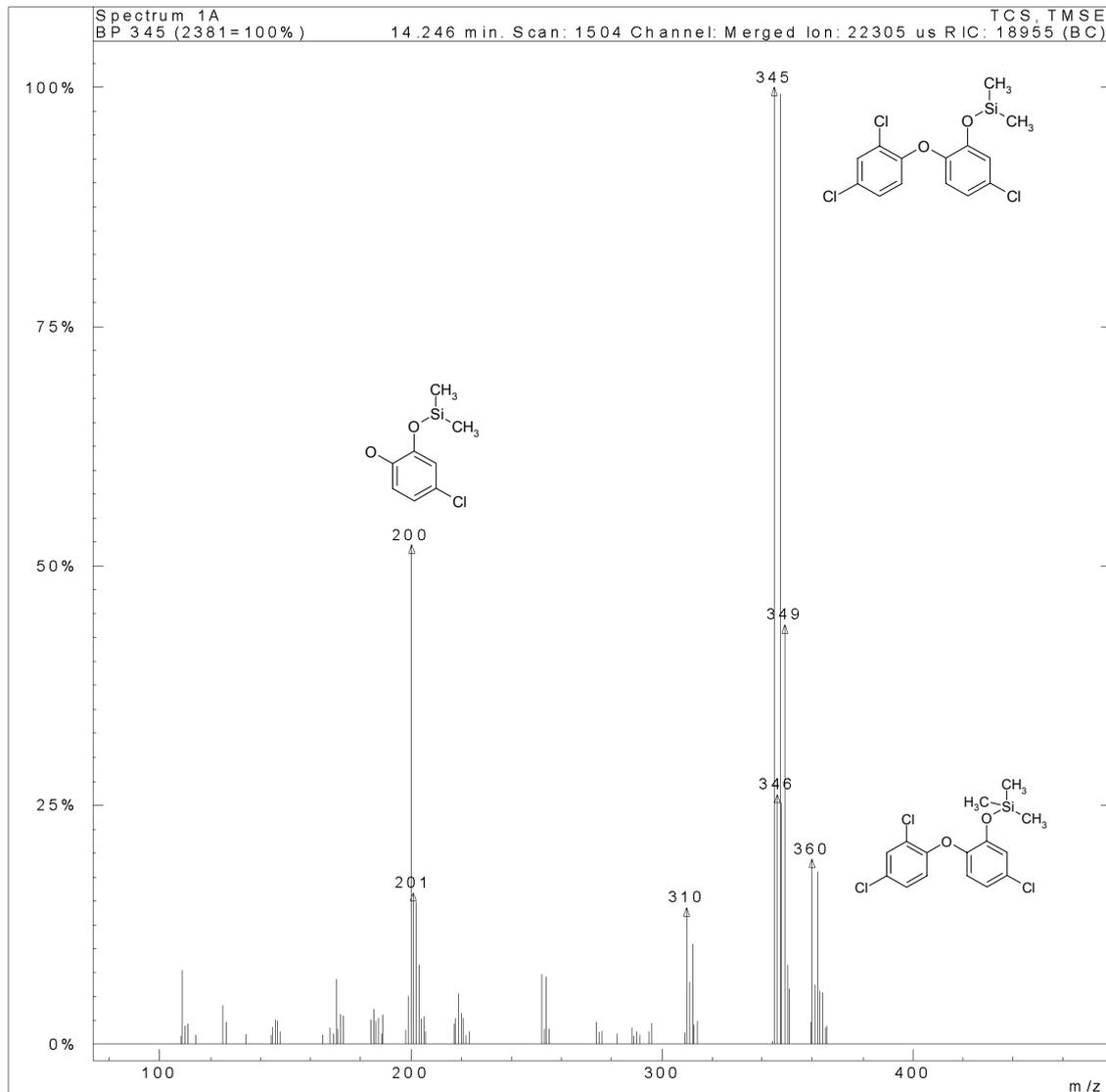
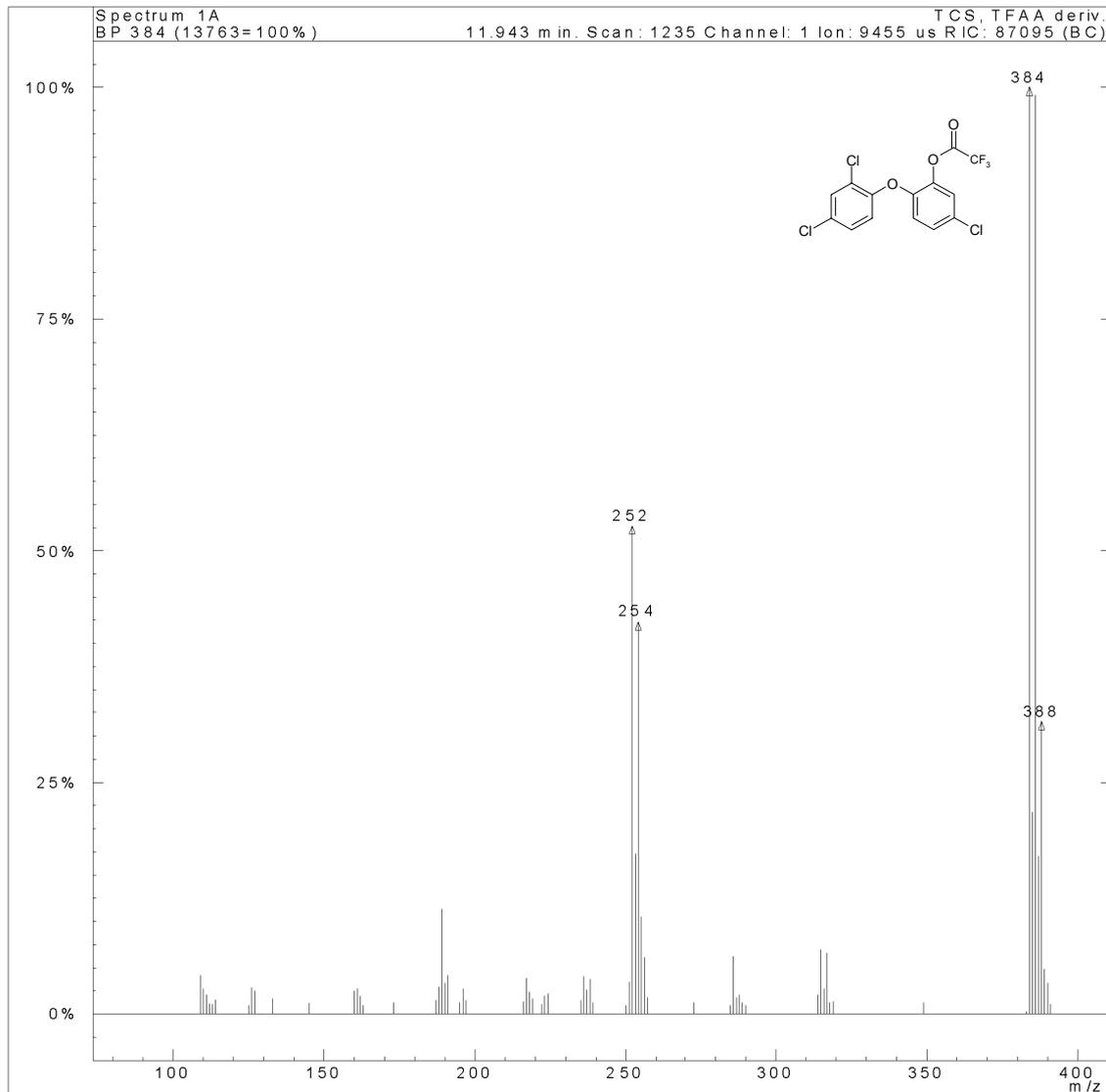
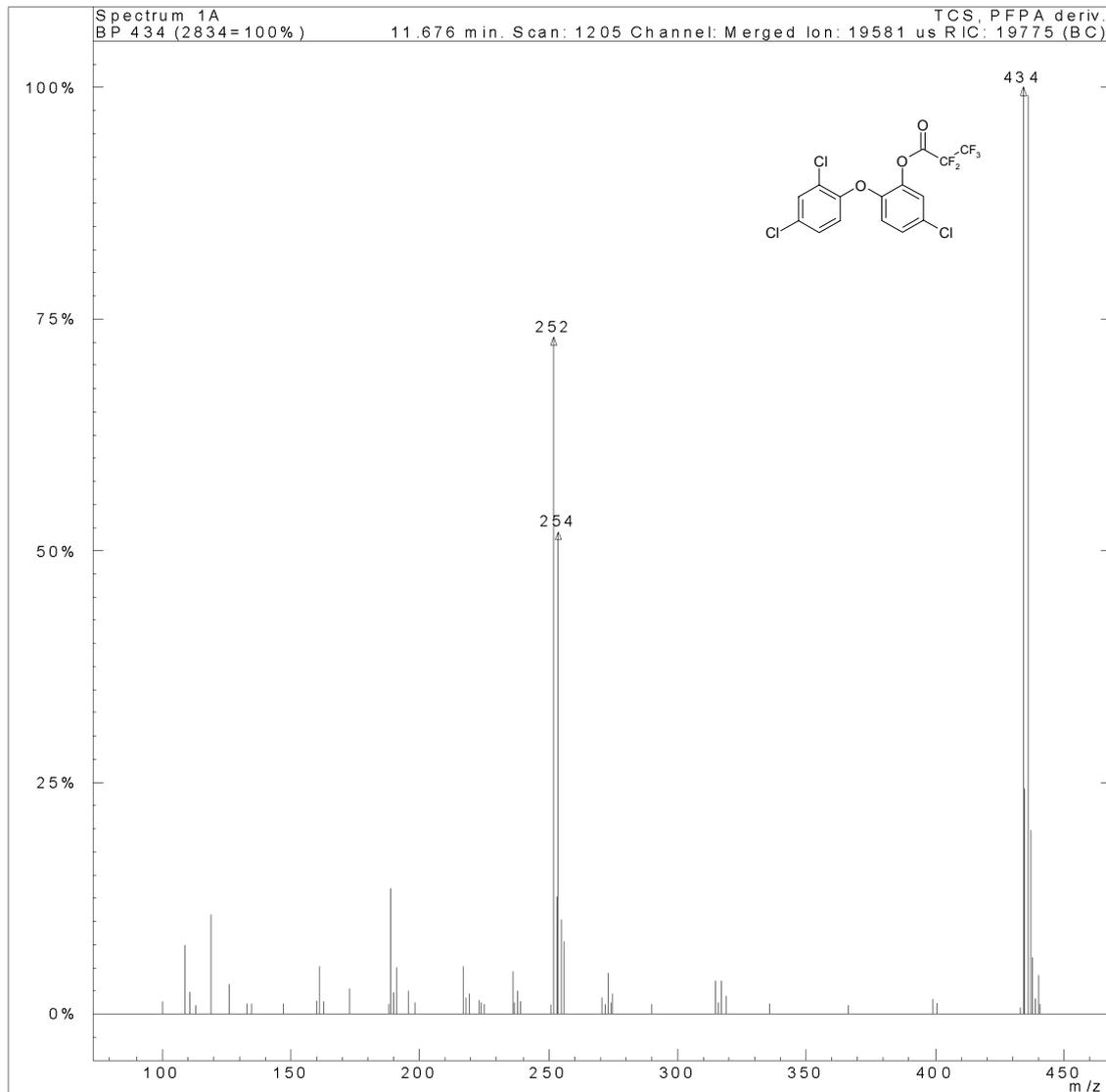


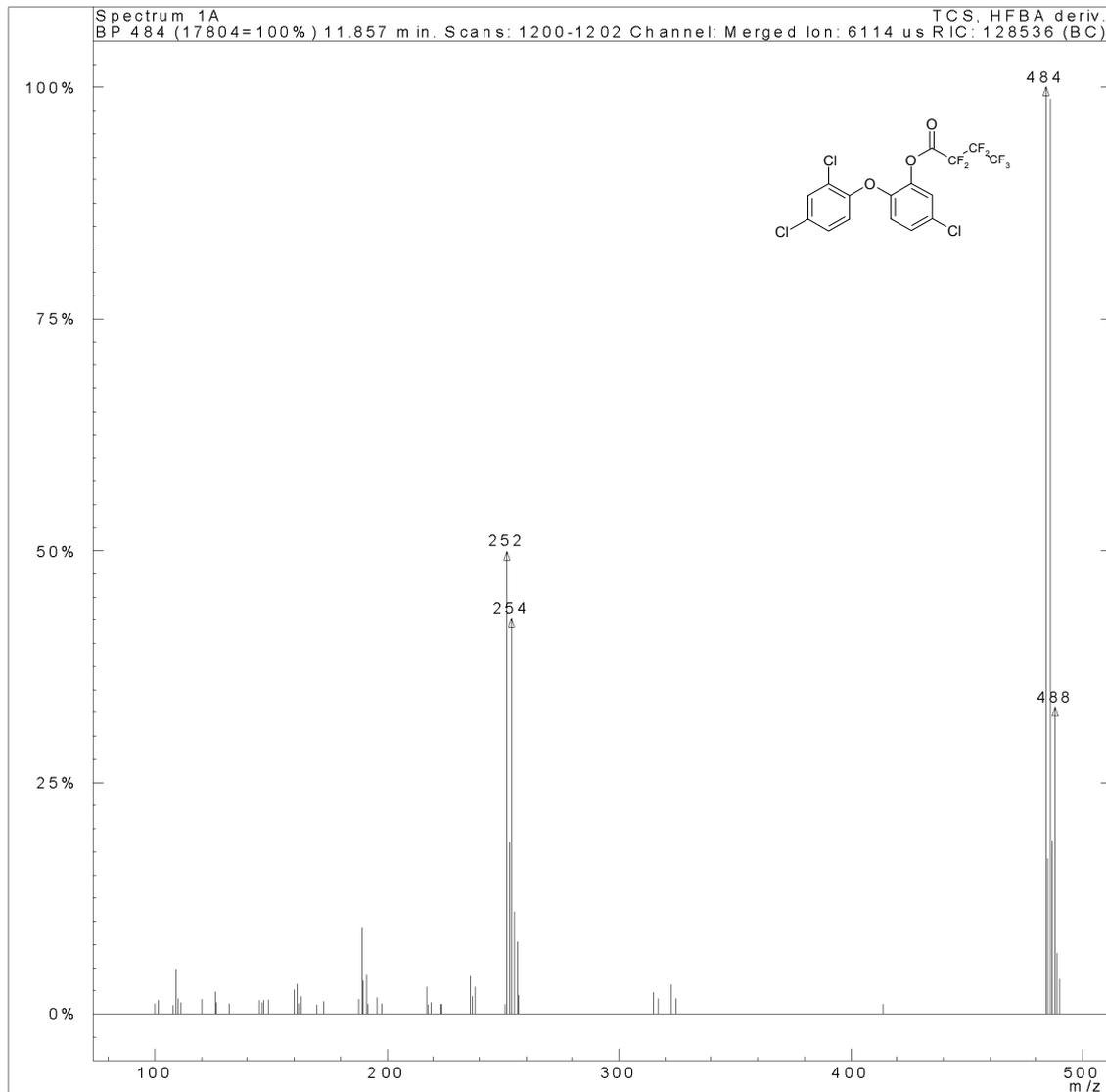
Abbildung I-S3: EI-Massenspektrum des TCS-Trimethylsilyl-Ethers



**Abbildung I-S4:** EI-Massenspektrum des TCS-TFAA-Derivats



**Abbildung I-S5:** EI-Massenspektrum des TCS-PFPA-Derivats



**Abbildung I-S6:** EI-Massenspektrum des TCS-HFBA-Derivats

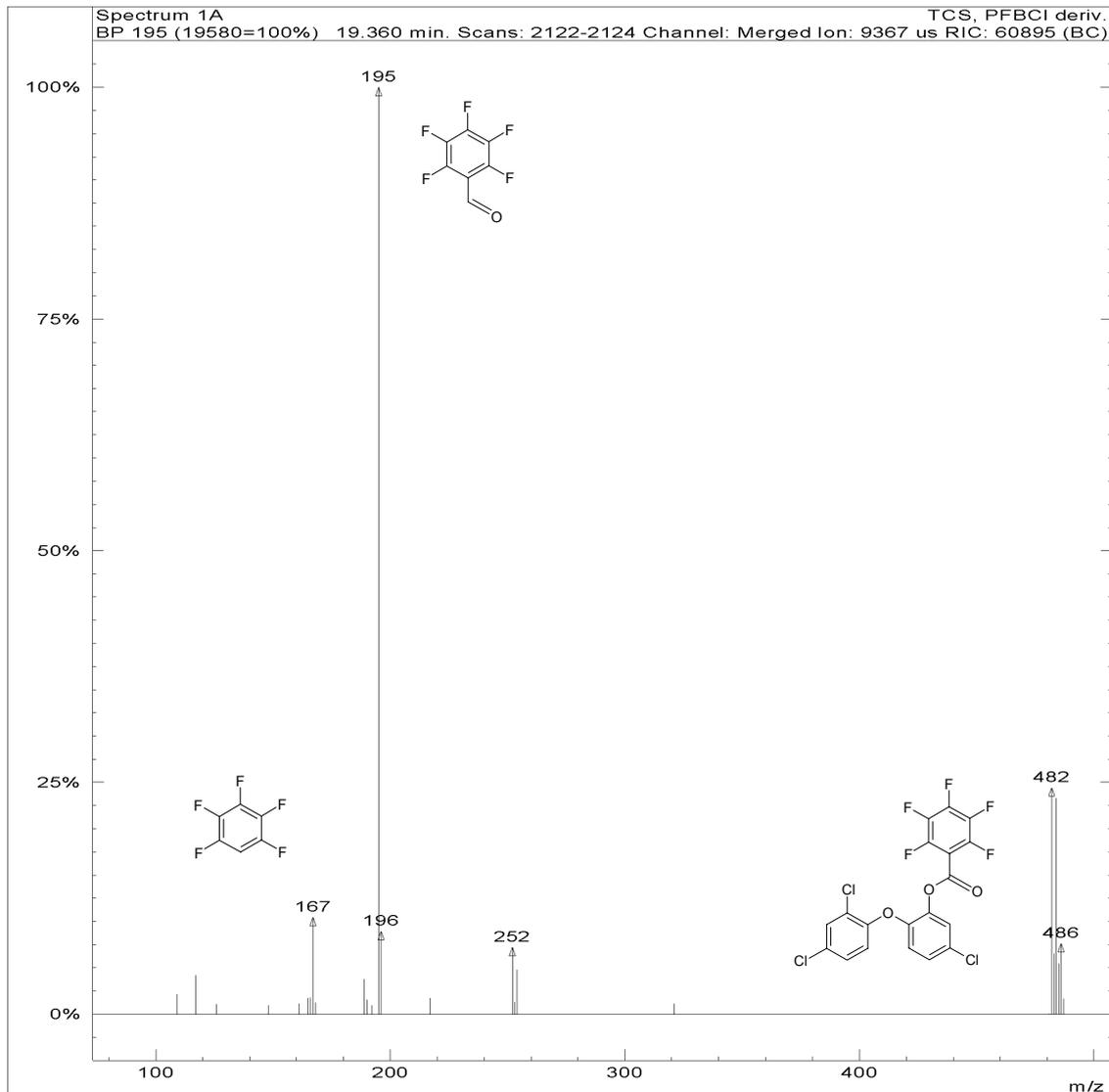
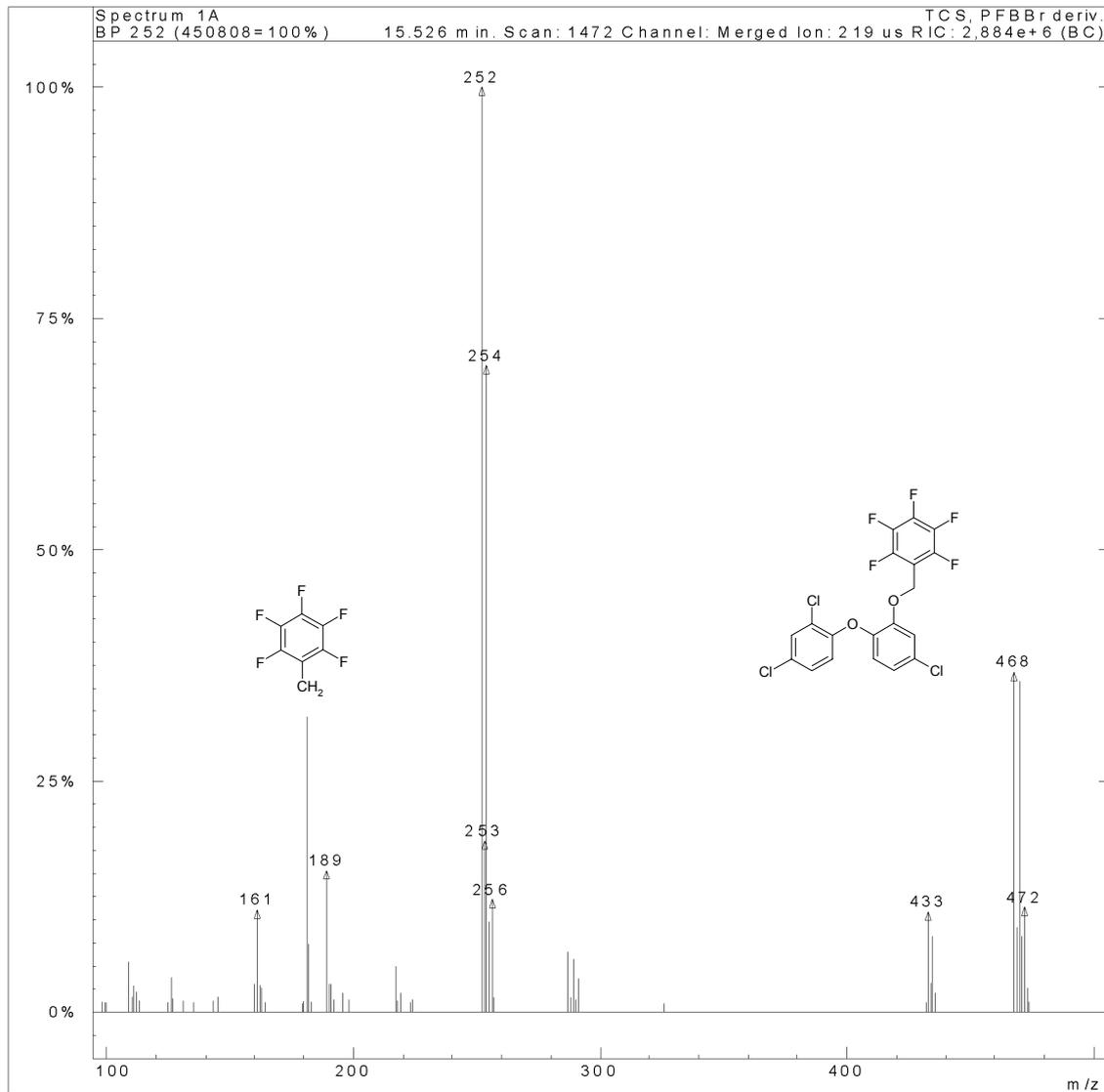


Abbildung I-S7: EI-Massenspektrum des TCS-PFBCI-Derivats



**Abbildung I-S8:** EI-Massenspektrum des TCS-PFBBBr-Derivats

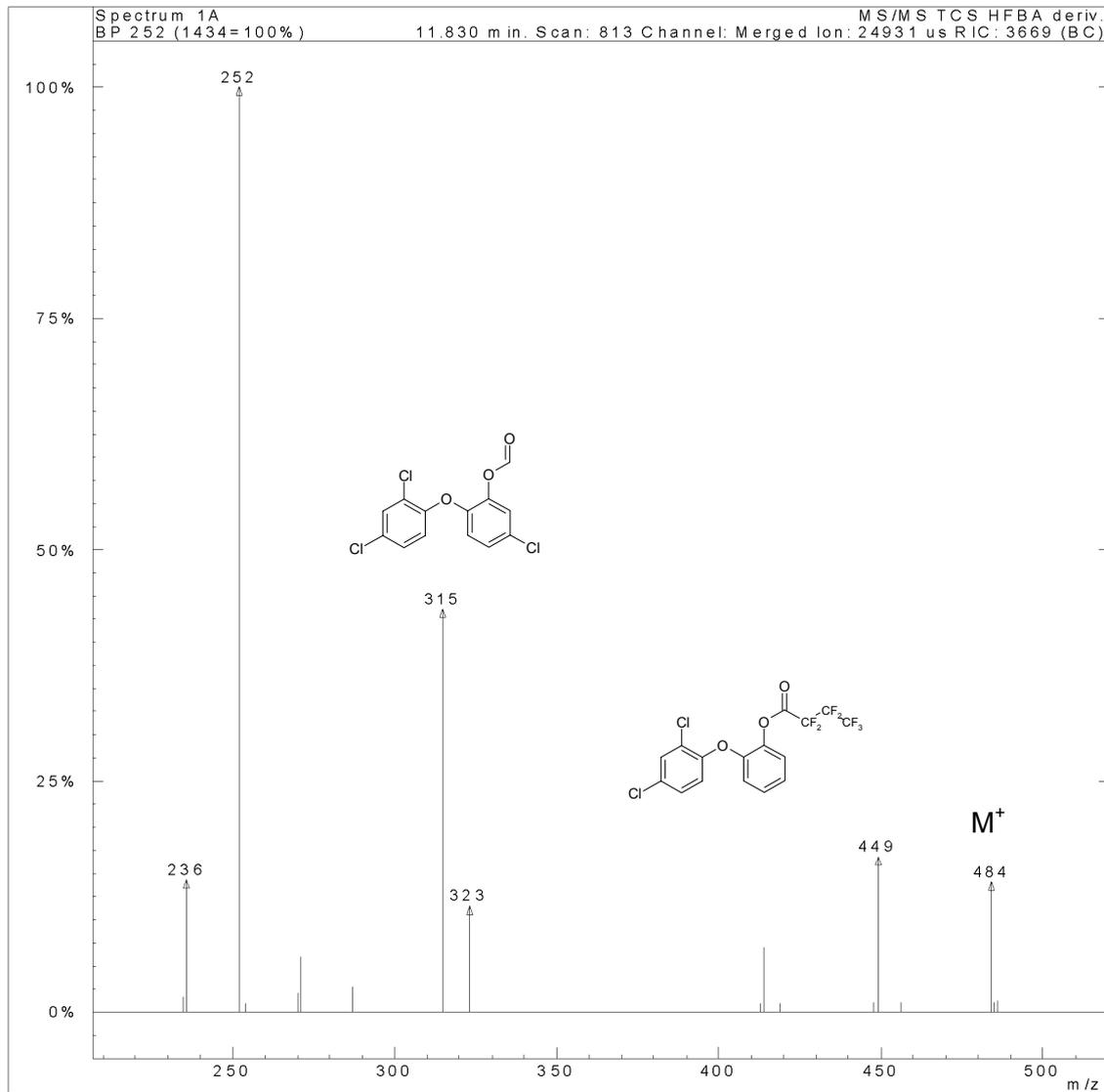


Abbildung I-S9: EI-MS/MS-Spektrum des TCS-HFBA-Derivats, Vorläufer-Ion: m/z 484 (enthält nur <sup>35</sup>Cl)

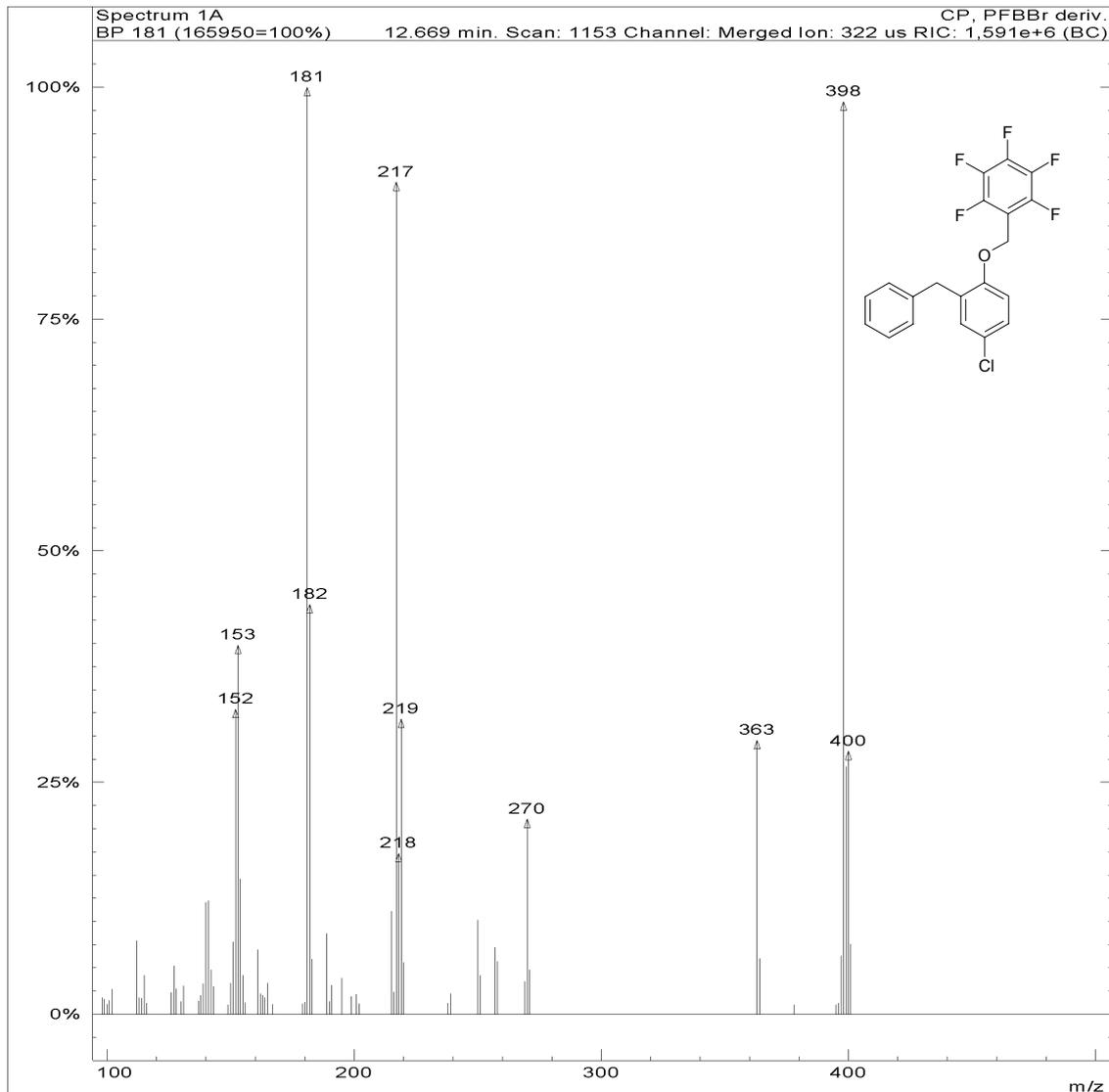
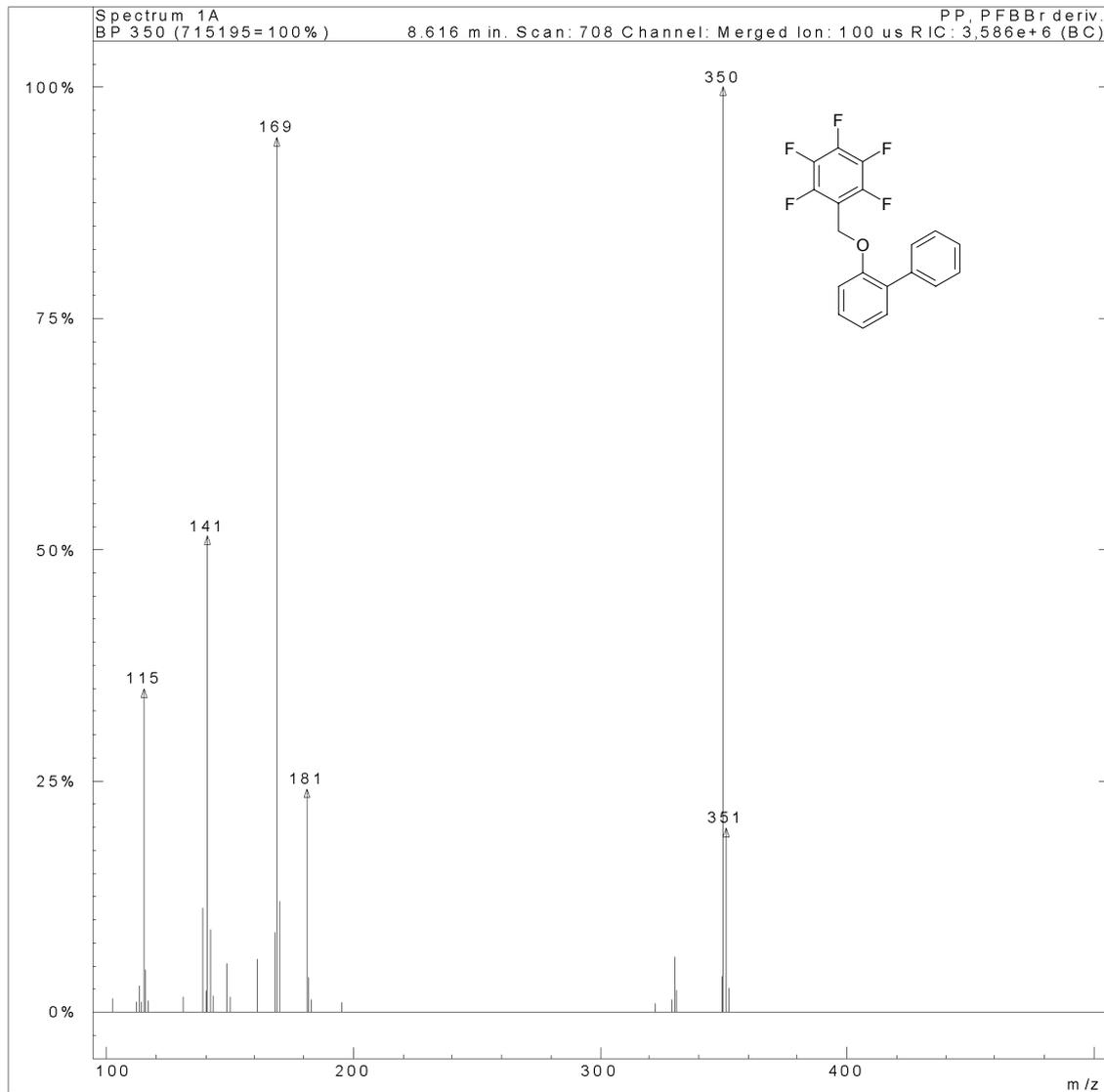


Abbildung I-S10: EI-Massenspektrum des Chlorophene-PFBBR-Derivats



**Abbildung I-S11:** EI-Massenspektrum des Phenylphenol-PFBBR-Derivats

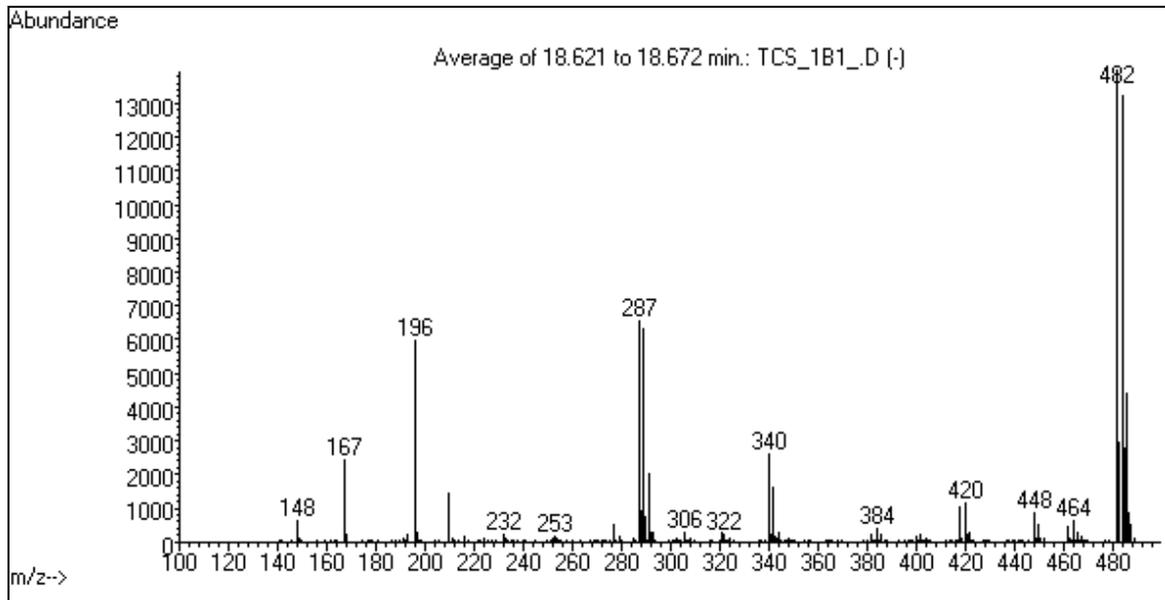


Abbildung I-S12: NCI-Massenspektrum des TCS-PFBCI-Derivats

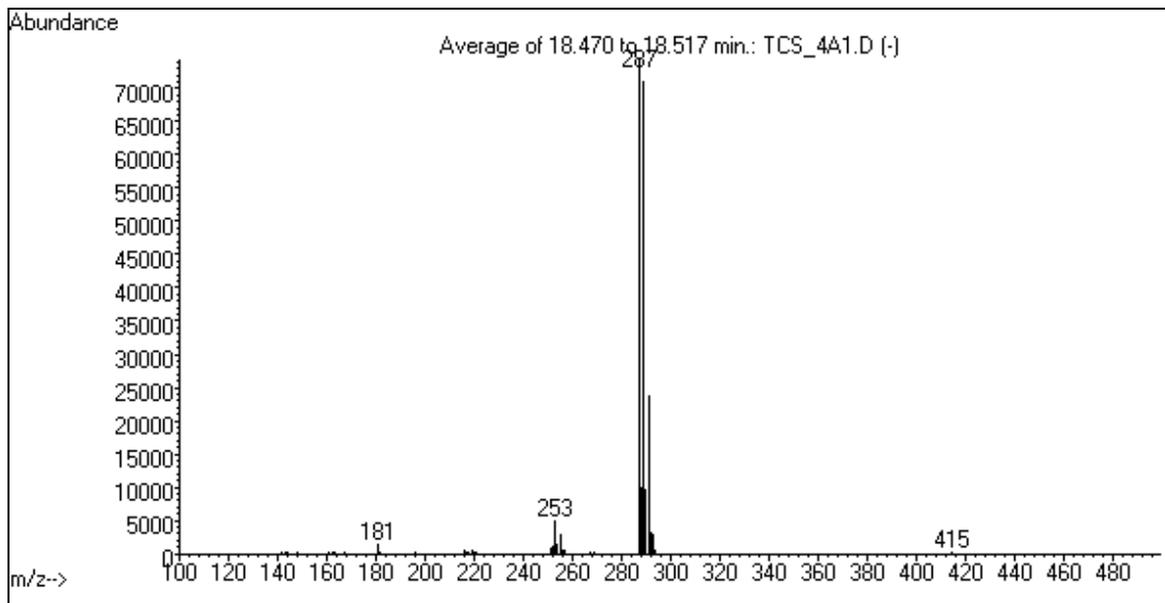


Abbildung I-S13: NCI-Massenspektrum des TCS-PFBBr-Derivats

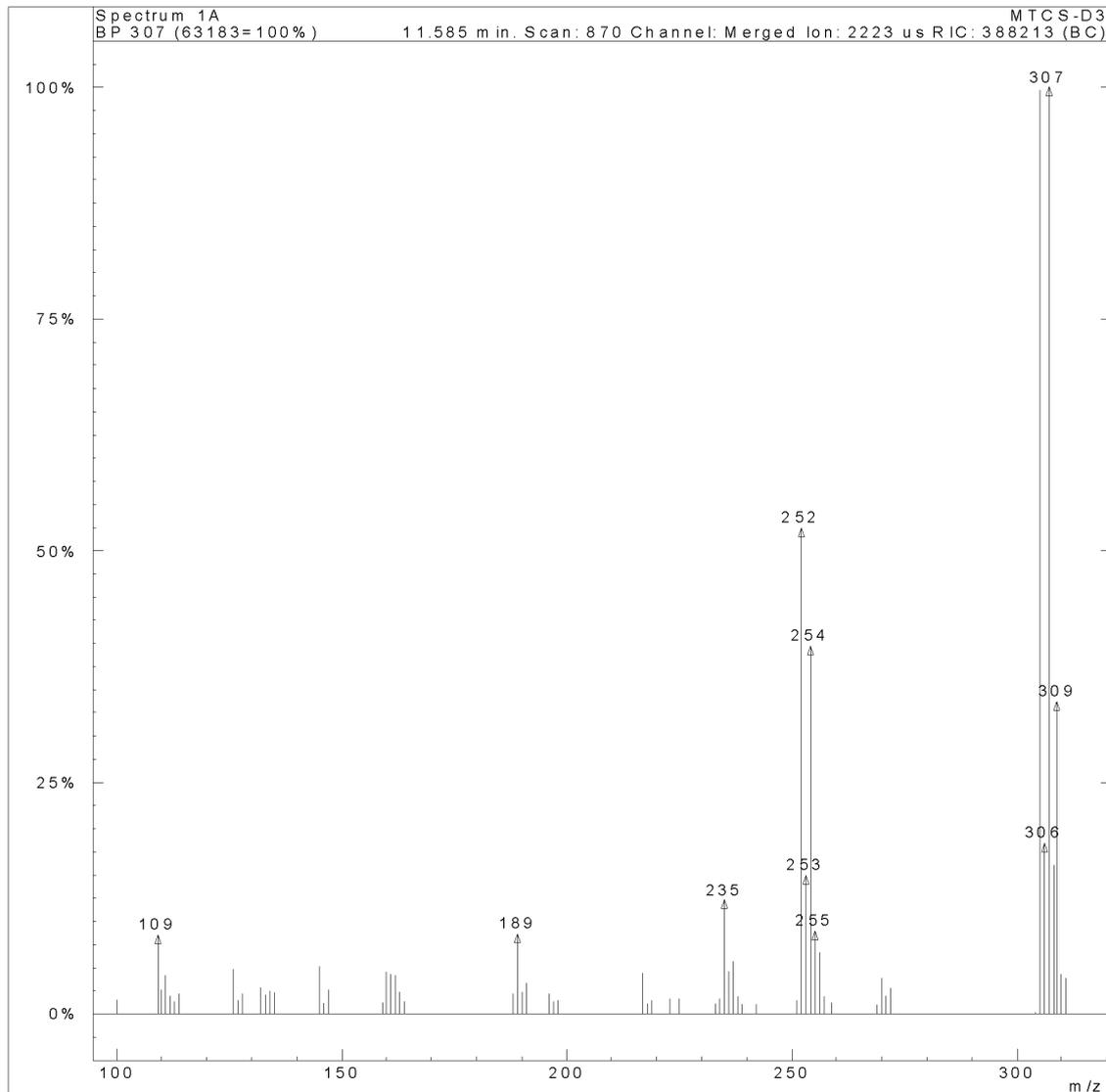
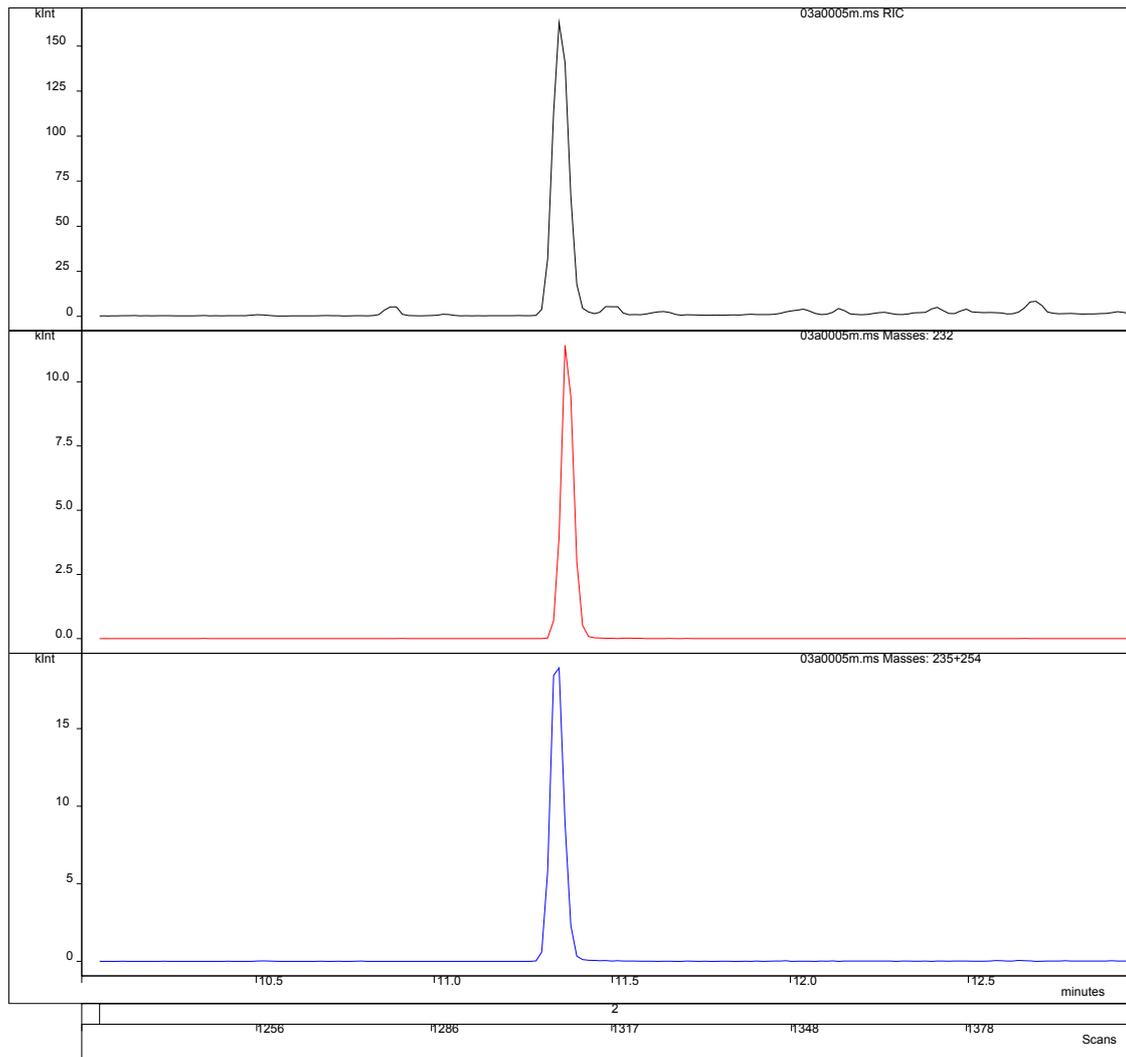


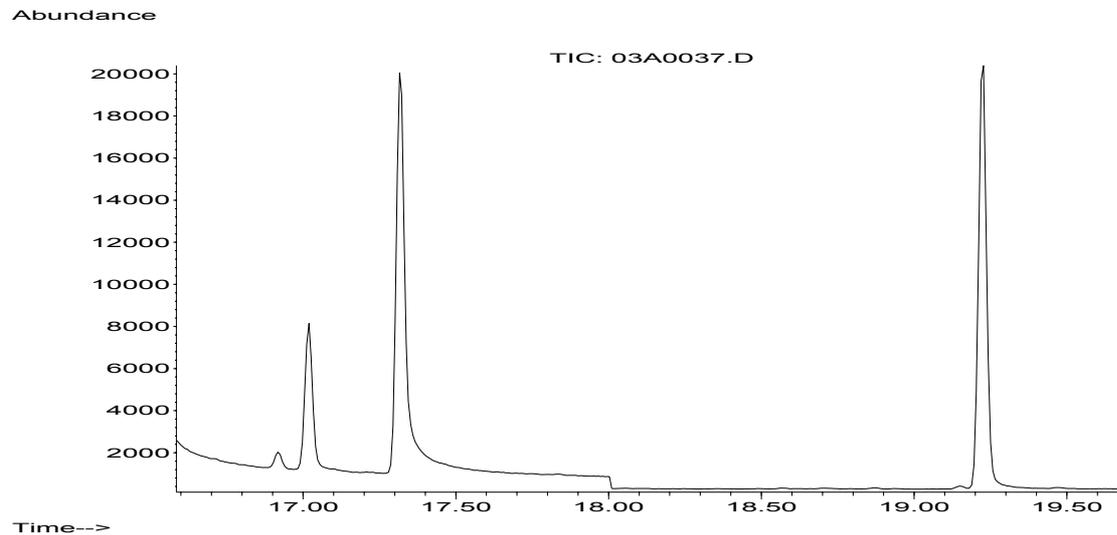
Abbildung I-S14: EI-Massenspektrum des Internen Standards Methyl-(D<sub>3</sub>)-Triclosan (MTCS-D<sub>3</sub>)

### Overlay Plots

File: d:\data\triclo\_1\03a0005m.ms  
Sample: AMA:4.0; 25m HT8: 0.22mmID x 0.25umDF Date 11/18/2003 18:58:51  
Comment: Saar Rehlingen; 2001; 2,03g; PAB v. 17.11.03;  
Operator: 100 KPa, 1 SL Scan Range: 1 - 1408 Time Range: 0.01 - 12.98 min.



**Abbildung I-C1:** GC/MS/MS-Chromatogramm der MTCS-Fraktion; Probe Saar, Rehlingen, 2001:  
obere Ionenspur: RIC,  
mittlere Ionenspur: m/z 232 (MTCS),  
untere Ionenspur: m/z 235 + 254 (MTCS-D<sub>3</sub>).



**Abbildung I-C2:** GC/NCI-MS-Chromatogramm der TCS/CP-Fraktion; Probe Saar, Güdingen, 1994;  
Retentionszeit CP = 17,02 min, Retentionszeit TCS = 19,22 min<sup>9</sup>

<sup>9</sup> Der Basislinienversatz bei 18 min ist auf die Umschaltung der SIM-Massen von CP auf TCS zurückzuführen. Das GC-Temperaturprogramm wurde im Lauf der Untersuchungen gekürzt, vgl. Datenaufnahmezeiten in Tabelle I-A2-4.

## Anhang I-2 Beschreibung des analytischen Verfahrens

Auf den Seiten 53 bis 65 ist die erarbeitete Verfahrens-SOP V7-174 „Bestimmung von Triclosan, Methyl-Triclosan und Chlorophene in biologischen Matrices mittels gaschromatographisch/massenspektrometrischer Verfahren“ des IME in Schmallenberg 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 02. Februar 2004 von QAU des IME gültig gestellt.

<b>Inhaltsverzeichnis zur SOP V7-174</b>		<b>Seite</b>
1	Anwendungsbereich	52
2	Abkürzungen	52
3	Zusammenfassung	54
4	Geräte	54
5	Lösungsmittel und Reagenzien	55
6	Vorbemerkungen zur Spurenanalytik	55
7	Extraktion der Analyten aus dem organischen Probenmaterial	56
8	Aufreinigung der ASE-Extrakte mittels GPC an Bio-Beads S-X3	57
9	Aufreinigung und Fraktionierung der GPC-Eluate	58
10	Alkylierung von Triclosan und Chlorophene mit PFBBr	59
11	Gaschromatographisch-massenspektrometrische Messungen	59
12	Qualitätssicherungsmaßnahmen	61
13	Literatur	63

## 1 Anwendungsbereich

Das beschriebene Verfahren dient zur quantitativen Bestimmung von Triclosan, Methyl-Triclosan und Chlorophene in organischen Matrices mittels gaschromatographisch/ massenspektrometrischer Verfahren. Die chlorierten Diphenyl(ether)-Derivate Triclosan und Chlorophene werden nach Alkylierung mit Pentafluorbenzylbromid (PFBBBr) gaschromatographisch getrennt und dann im 'negative (ion) chemical ionization mode (NCI)''-SIM-Modus gemessen. Die Detektion von Methyl-Triclosan wird mittels IonTrap-GC/MS im MS/MS-Modus vorgenommen.

Der Gehalt der Einzelkomponenten (siehe Tabelle I-A2-1) wird in ng/g Frischgewicht (FG) ermittelt<sup>10</sup>. Die Bestimmungsgrenzen (BG) der Verfahren liegen je nach Zielsubstanz und Leerwert unterhalb von 0,25 ng/g FG.

Die Methode ist anwendbar für die folgenden organischen Matrices:<sup>11</sup>

Miesmuscheln	Dreikantmuscheln	Brassenmuskulatur
Blasentang	Silbermöwenei	Aalmuttermuskulatur

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

## 2 Abkürzungen

AGC	Automatic gain control
amu	Atom mass unit
ASE	Accelerated solvent extraction (beschleunigte Lösungsmittel-Extraktion)
BG	Bestimmungsgrenze
CP	Chlorophene
FG	Frischgewicht
GPC	Gelpermeationschromatographie
mmu	milli mass units
MS/MS	Weiterer MS-Zyklus nach Kollisionsaktivierung selektiver Vorläufer-Ionen
MTCS	Methyl-Triclosan
NCI	negative (ion) chemical ionization
PFBBBr	Pentafluorbenzylbromid
PFV	Peakflächenverhältnis
SIM	Single ion monitoring
TCS	Triclosan
TIC	Total ion current
UPB	Umweltprobenbank des Bundes

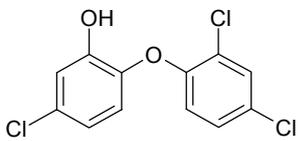
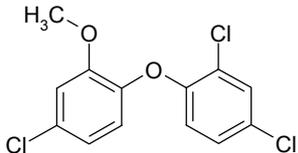
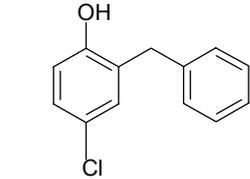
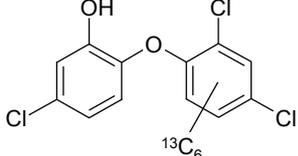
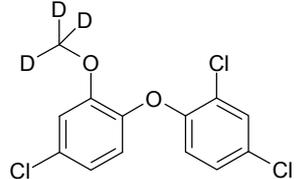
<sup>10</sup> Eine Fettbestimmung und die Umrechnung auf den Fettanteil der Proben wird nicht vorgenommen.

<sup>11</sup> Die matrixspezifische Validierung wurde bis zum Gültigstellungstermin dieser SOP nur für Brassenmuskulatur durchgeführt. Erfahrungsgemäss ist das Verfahren auch für die weiteren Matrices anwendbar, eine matrixspezifische Validierung sollte zu Beginn entsprechender Untersuchungen aber durchgeführt werden.

WFF Wiederfindungsfunktionen

WFR Wiederfindungsrate

**Tabelle I-A2-1: Formeln, Namen, Akronyme und CAS-No. sowie Handelsnamen der Analyten und der IS**

Chemische Struktur	Summenformel, Molmasse	Name (n)	Akronym CAS-No.	Handelsnamen
	$C_{12}H_7Cl_3O_2$ 289,5 g/mol	2,4,4'-Trichlor-2'-hydroxydiphenylether; 2-Hydroxy-4,2',4'-trichlordiphenylether; 5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol;	TCS 3380-34-5	Triclosan (INN) <sup>12</sup> , Irgasan, Irgasan DP300, Lexol 300, Irgacare®
	$C_{13}H_9Cl_3O_2$ 303,6 g/mol	4-Chlor-1-(2,4-dichlorphenoxy)-2-methoxybenzol; 5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-anisol	MTCS 4640-01-1	Methyl-Triclosan; Triclosan-methyl
	$C_{13}H_{11}ClO$ 218,7 g/mol	2-Benzyl-4-chlorophenol; 4-Chloro-2-(phenylmethyl)-phenol	CP 120-32-1	Chlorophene, Clorofene, Preventol, Santophen
	$^{13}C_6^{12}C_6H_7Cl_3O_2$ 295,4 g/mol	$^{13}C_6$ -markiertes Triclosan	$^{13}C_6$ -TCS -	(wird als IS eingesetzt)
	$C_{13}H_6Cl_3O_2D_3$ 306,6 g/mol	D <sub>3</sub> -markiertes MTCS; Methyl-(D <sub>3</sub> )-triclosan	MTCS-D <sub>3</sub> -	(wird als IS eingesetzt)

<sup>12</sup> International Nonproprietary Names (INN) for pharmaceutical substances (World Health Organization)

### 3 Zusammenfassung

Die organischen Proben werden mit Natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) verrieben und nach dem Einfüllen in ASE-Zellen mit den Internen Standards (IS, Tabelle I-A2-1) versetzt. Anschließend wird mittels 'accelerated solvent extraction (ASE)' extrahiert. Der organische Extrakt wird durch Abblasen mit Stickstoff eingengt und anschließend einer zweistufigen Reinigung unterworfen:

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

Die Analyten werden durch die Adsorptionschromatographie in eine 'unpolare' und eine 'polare' Fraktion aufgetrennt. Die 'unpolare' MTCS-Fraktion wird aufkonzentriert und anschließend direkt per GC/MS/MS gemessen. Die 'polare' Fraktion, die die chlorierten Phenol-Derivate enthält, wird eingengt, mit PFBBR derivatisiert und anschließend mittels GC/NCI-MS gemessen.

### 4 Geräte

- Anlage zum Abblasen von Lösungsmitteln mit Stickstoff ( $\text{N}_2$ ), z.B. ZYMARK TurboVap<sup>®</sup> II
- ZYMARK-Einengungsgefäße (50 mL Volumen, ausgezogener Spitze)
- Muffelofen (Temperaturbereich bis 600 °C)
- Trockenschrank (Temperaturbereich bis 250 °C)
- Trockenschrank zur Derivatisierung, Temperatur ca. 60 °C
- Minifuge GL (KENDRO)
- ASE-Probenfläschchen (Volumen 40 oder 60 mL)
- ASE-Extraktionszellen (33, 22 oder 11 mL Inhalt)
- Vials für die Chromatographie (2 mL, 11 mm Ø)
- Microvials für die Chromatographie (300 µL, 11 mm Ø)
- Aluminiumbördelkappen (mit teflonkaschierter Butylgummieinlage, 11 mm Ø)
- Schraubkappenvials (4 mL) mit zugehörigen Kappen (mit teflonkaschierter Butylgummischeibe)
- Achat- oder Porzellan-Mörser
- übliche Glasgeräte wie Messkolben, Mess-, Voll- und Microman-Pipetten, Pasteurpipetten, Schraubdeckelgläser, Einengungskolben etc.
- 10 mL Reagenzglas mit Normschliff NS 14,5
- 5 mL GPC-Reagenzglas, ohne Normschliff
- Mini-Chromatographiesäule mit Fritte, ausgezogener Spitze und Vorratsreservoir für das Elutionsmittel, 5 mm Ø<sub>i</sub>, Länge = 30 cm
- ASE-Extraktionssystem ASE 200 der Firma DIONEX, (SOP: Extraktionsgerät ASE 200, DIONEX)
- Gelpermeationschromatographie-Anlage, z.B. CleanUp XL der Firma ABIMED (SOP: Abimed/ Gilson-System CleanUp XL, Bedienung)

- GC/MS/MS-System, siehe Tabelle I-A2-3 (SOP: Ion Trap GC/MS Magnum – Saturn 4D)
- GC/NCI-MS-System, siehe Tabelle I-A2-4.

## 5 Lösungsmittel und Reagenzien

- n-Hexan zur Rückstandsanalyse / für die organische Spurenanalytik
- Dichlormethan zur Rückstandsanalyse / für die organische Spurenanalytik
- Cyclohexan zur Rückstandsanalyse / für die organische Spurenanalytik
- Aceton zur Rückstandsanalyse / für die organische Spurenanalytik
- Natriumsulfat, zur Analyse (2 h bei 500 °C gegläht)
- MTCS-Standardlösungen in n-Hexan
- Standardlösungen der Analyten TCS und CP in n-Hexan
- Standardlösung des IS  $^{13}\text{C}_6$ -TCS in n-Hexan
- Standardlösung des IS MTCS-D<sub>3</sub> in n-Hexan
- Kieselgel, Fa. ICN: Kieselgel 60a, 100-200 mesh (2 h bei 500 °C gegläht)
- Bio-Beads<sup>®</sup> S-X3, 200-400 mesh, BIO-RAD Nr. 152-2750
- Reinstwasser, hergestellt mit einer Reinstwasseranlage, z.B. ELGASTAT UHQ-PS
- Kaliumcarbonat,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , pro analysi, z.B. MERCK Nr. 4928
- $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung, 10 %ig in Reinstwasser
-  Pentafluorbenzylbromid, PFBBr, CAS-No. 1765-40-8, z.B. PIERCE No. 58220, 98 %  
**Sicherheitshinweis: Ätzender Stoff!** PFBBr kann Verätzungen der Atemwege, der Augen und der Haut verursachen! Weitere Hinweise über mögliche Gefahren und Maßnahmen: siehe **Sicherheitsdatenblatt der Fa. PIERCE.**

## 6 Vorbemerkungen zur Spurenanalytik

TCS und CP sind häufige, antibakteriell wirkende Bestandteile (Konservierungsmittel) in Körperpflege-mitteln wie Badezusätzen, Seifen und Haut- oder Zahnpflegemitteln. 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 sind sorgfältig zu reinigen und mindestens 24 Stunden bei 250 °C auszuheizen, ggf. werden sie vor dem Gebrauch noch mit dem verwendeten Lösungsmittel ausgespült
- Die ASE-Zellen sind mindestens für 24 Stunden bei 150 °C auszuheizen
- Alle Einengungsschritte werden durch Abblasen mit  $\text{N}_2$  durchgeführt

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

## 7 Extraktion der Analyten aus dem organischen Probenmaterial

Je nach Art der Probe werden ca. 1 bis 2,5 g der gemahlenden, tiefgefrorenen Probe im Verhältnis von ca. 1:6 mit Natriumsulfat im Mörser verrieben und homogenisiert. Die „rieselfähige“ Mischung wird dann in der folgenden Weise in eine 33mL-ASE-Zelle eingefüllt:

- Zusammenbau der ausgeheizten ASE-Zelle
- Einlegen des unteren Cellulose-Filters
- Einfüllen des Probengemisches
- Aufgabe der IS-Lösungen
- Auffüllen der Zelle mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Verschließen der ASE-Zelle.

Die ASE-Zelle wird dann in den Extraktor ASE 200 der Firma DIONEX eingesetzt und unter den in Tabelle I-A2-2 angegebenen Bedingungen extrahiert. Das Eluat wird in gereinigten und septum-verschlossenen ASE-Fläschchen aufgefangen.

**Tabelle I-A2-2: Bedingungen zur Extraktion der PNMF aus organischer Matrix mittels ASE**

Gerät	ASE 200 der Fa. DIONEX
Extraktions- / Lösungsmittel	Cyclohexan
Temperatur	100 °C
Druck	14 MPa
Flush (mit Extraktionsmittel)	60 % des Zellvolumens
Purge (mit N <sub>2</sub> )	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

Das ASE-Eluat wird in ein 50mL Zymark-Einengungsgefäß überführt und mit einem N<sub>2</sub>-Strom bis auf ca. 1,0 mL eingengt. Hierbei bildet sich eine wässrige Phase von ca. 0,1 mL aus (unten).

Anmerkung 1: Sollen nur geringe Probenmengen untersucht werden, so können auch ASE-Zellen von 22 oder 11 mL Inhalt verwendet werden.

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

Zur Entfernung der extrahierten Probenmatrix 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.

### 8.1 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 2: Die GPC-Säule muss ständig mit dem entsprechenden Elutionsgemisch gefüllt sein.

Anmerkung 3: Nach jeder Neubefüllung wird zunächst eine MTCS (TCS)-Standardlösung mit bekannten Konzentrationen chromatographiert und in mehreren Fraktionen aufgefangen. Diese werden anschließend mit N<sub>2</sub> bis zur Trockne eingengt, in n-Hexan wieder aufgenommen und mittels GC/MS/MS analysiert.  
(Wird die Chromatographie auch mit TCS getestet, so sind die Fraktionen aufzuteilen und für die TCS-Messung zu derivatisieren, siehe: Punkt 10).

### 8.2 Durchführung

Der organische ASE-Extrakt (ca. 1 mL Cyclohexan, obere Phase aus Punkt 7) wird in ein GPC-Reagenzglas überführt, mit 1 mL Dichlormethan versetzt und gut durchmischt. Die Aufreinigungsprozedur wird sequentiell mit einer automatischen 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 - 14 min
- Sammlung der Analyt-Fraktion: 14 - 21 min
- Abtrennung weiterer Matrix: 21 - 30 min und erneutes Konditionieren des Gelbettes.

Das GPC-Eluat wird zur Entfernung des Dichlormethans mit N<sub>2</sub> bis auf ca. 0,2 mL abgeblasen und anschließend mit 0,8 mL n-Hexan wieder auf ca. 1 mL aufgefüllt.

## 9 Aufreinigung und Fraktionierung der GPC-Eluate

Zur Eliminierung polarer Probenmatrix und zur Trennung der polaren und unpolaren Analyten wird das GPC-Eluat durch Adsorptionschromatographie an aktiviertem Kieselgel fraktioniert und aufgereinigt. Die Prozedur wird manuell in Mini-Chromatographiesäulen durchgeführt.

### 9.1 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 zum Ausschluss der Luftfeuchtigkeit gasdicht gelagert.

### 9.2 Durchführung

Eine Mini-Chromatographiesäule wird mit 0,8 g aktiviertem Kieselgel gefüllt. Die Reinigung der Extrakte bzw. Fraktionierung erfolgt dann entsprechend dem nachfolgend beschriebenen Schema (die Säule darf nicht mehr trocken laufen):

- Spülen: 10 mL n-Hexan/Aceton (90/10, v/v)
- Konditionieren: 10 mL n-Hexan
- Probenaufgabe: 1 mL n-Hexan (aus 8.2)
- Eluieren der Fraktion 1: 16 mL n-Hexan
- Eluieren der Fraktion 2: 13 mL n-Hexan/Aceton (90/10, v/v).

Anmerkung 4: siehe Anmerkung 3 (sie gilt analog bei Änderungen der Kieselgel-Charge, hier müssen die polaren und die unpolaren Analyten getestet werden).

Die Eluate werden in Zymark-Einengungsgefäßen aufgefangen und mit N<sub>2</sub> auf ca. 0,3 mL eingengt.

Anschließend wird das Eluat der Fraktion 1 mit einer Pasteurpipette in ein 300 µL-Microvial überführt, weiter auf 100 µL eingeblasen und mit einer Aluminiumbördelkappe verschlossen. Der Gehalt an MTCS wird dann direkt mittels GC/MS/MS bestimmt.

Die Fraktion 2, welche die chlorierten Phenol-Derivate TCS und CP enthält, wird in ein 4 mL Schraubkappenvial überführt und zur Vorbereitung auf die Derivatisierung mit N<sub>2</sub> bis zur Trockne eingengt.

## 10 Alkylierung von Triclosan und Chlorophene mit PFBBr

Die chlorierten Diphenyl(ether)-Derivate TCS und CP werden mittels PFBBr in ihre Pentafluorobenzyl-Derivate überführt. Sowohl TCS-PFB als auch CP-PFB liefern bei der Detektion im NCI-Modus ionenarme Massenspektren, die sehr empfindliche und selektive Bestimmungen ermöglichen.

Der Rückstand der Kieselgel-Fraktionierung wird in 2 mL Aceton aufgenommen und mit 250 µL 10 %iger K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Nach der Zugabe von 10 µL des Derivatisierungsmittels PFBBr wird die Mischung über 1 Stunde unter gelegentlichem Schütteln bei 60 °C im Trockenschrank derivatisiert. Nach dem Abkühlen wird die Mischung in ein Reagenzglas überführt in dem 5 mL Reinstwasser und 1 mL Cyclohexan vorgelegt sind. Die Mischung wird für 1 min kräftig mit der Hand geschüttelt. Nach der Phasentrennung, zu der kurz zentrifugiert wird, wird die Cyclohexan-Phase in ein 2 mL Vial überführt. Nach dem Verschließen mit einer Bördelkappe werden die Gehalte an TCS-PFB und CP-PFB mittels GC/NCI-MS gemessen.

## 11 Gaschromatographisch-massenspektrometrische Messungen

Die Analyten werden in unpolaren oder leicht polaren GC-Kapillarsäulen chromatographiert.

Die Identifizierung und Quantifizierung der Analyten erfolgt dann substanzabhängig mittels IonTrap-GC/MS/MS (MTCS) oder GC/NCI-MS im SIM-Modus (TCS-PFB, CP-PFB).

Die GC/MS Betriebsparameter sind in den folgenden Tabellen I-A2-3 und I-A2-4 beispielhaft für ein GC/MS/MS-IonTrapSystem der Fa. FinniganMAT und ein Agilent Quadrupol GC/NCI-MS System aufgelistet.

**Tabelle I-A2-3: Betriebsparameter des IonTrap GC/MS/MS-Systems FINNIGANMAT Magnum**

<b>Gaschromatograph</b> Trennkapillare Ofentemperatur	<b>VARIAN 3400</b> SGE HT8; 25 m L x 0,22 mm ID; 0,25 µm Filmdicke 1,0 min 100 °C isotherm; Rate 1: 20 °C/min auf 230 °C; Rate 2: 5 °C/min auf 250 °C; Rate 3: 15 °C/min auf 300 °C; 5,0 min 300 °C isotherm GC-Laufzeit: 19,83 min		
<b>Injektor</b> Temperaturprogramm  Trägergasart Trägergasvordruck	<b>GERSTEL KAS 3</b> 0,05 min 60 °C isotherm; Rate 1: 12 °C/sec auf 280 °C; 5,0 min 300 °C isotherm nachgereinigtes Helium 110 kPa		
<b>Probengeber</b> Probenaufgabe Spülmedien	<b>GERSTEL MPS2</b> 1 µL n-Hexan (1,0 min splitlos) A: Aceton; B: n-Hexan.		
<b>Massenspektrometer</b> Ionisierung Manifold-Temperatur Transferline-Temperatur Massenbereich Massendefekt Hintergrundmasse Scan time Multiplifier offset Filament emission current Prescan ionization time Max. Ionization time AGC Target TIC	<b>FINNIGANMAT Magnum</b> Electron impact (EI) with 70 eV 220 °C 290 °C 230 – 310 m/z 0 mmu/100 amu 229 m/z 0,49 sec (= 3 µScans) 200 V 50 µA 1500 µsec 25.000 µsec 10.000		
Substanzabh. Einstellungen Substanz	MTCS	MTCS-D <sub>3</sub> (IS)	
Excitation storage level	120	120	m/z
Excitation amplitude	0,37	0,47	V
Isolation window	1	1	m/z
Vorläufer-Ionen	302	307	m/z
Produkt-Ionen	232, 252, 267	235/237, 252/254, 270/272	m/z
Quantifizierungs-Ionen	232	235+254	m/z
Retentionszeit	11,36	11,39	min

Bemerkungen zur Auswahl der Quantifizierungs-Ionen zur MTCS-Bestimmung:

- MTCS und MTCS-D<sub>3</sub> werden chromatographisch nur „angetrennt“. Dies bedeutet, dass eine Trennung in Analyt und IS nur massenspektrometrisch erfolgen kann.
- Die intensivsten Ionen im MS/MS-Massenspektrum von MTCS und MTCS-D<sub>3</sub> sind m/z 252 bzw. m/z 252+254. Dies entspricht dem Molekular-Ion (M<sup>+</sup>) reduziert um die CH<sub>3</sub>- bzw. CD<sub>3</sub>-Gruppe und jeweils ein Cl-Atom (vgl. Tabelle I-A2-1). Eine massenspektrometrische Trennung des GC-Peaks in Analyt und IS ist auf m/z 252 also nicht durchführbar. Dies bedeutet weiterhin, dass das intensivste Ion für die Quantifizierung von MTCS verloren geht.
- Die Einbeziehung des intensivsten Ions in die Quantifizierung gelingt aber für den IS MTCS-D<sub>3</sub>, wenn als Vorläufer-Ion des MS/MS-Prozesses statt m/z 305 m/z 307 eingesetzt und gleichzeitig für den Analyten als Vorläufer-Ion nur m/z 302<sup>13</sup> eingesetzt wird. Aufgrund der Cl-Isotopenverteilung kann dann m/z 254 mit in die Integration des IS eingebunden werden.

## 12 Qualitätssicherungsmaßnahmen

### 12.1 Kalibrierung und Identifizierung

Zur Bezugskalibrierung (Grundkalibrierung) der Messsysteme werden Bezugslösungen für MTCS und TCS/CP hergestellt, welche die Analyten in variablen und die Internen Standard (IS) in konstanten Konzentrationen enthalten.

Die MTCS-Bezugslösungen werden in n-Hexan angesetzt und direkt per GC/MS/MS gemessen.

Zur Bezugs-Kalibrierung des GC/NCI-MS-Systems für TCS und CP werden die Bezugslösungen in Aceton hergestellt. Anschließend wird die Derivatisierung sowie die weitere Probenaufarbeitung und Messung wie unter 'Alkylierung von Triclosan und Chlorophene mit PFBB<sup>r</sup>' beschrieben durchgeführt.

MTCS wird anhand der Retentionszeit und der enthaltenen MS/MS-Spektren (Übereinstimmung der gemessenen Spektren mit den Bibliotheksspektren der Kalibrierung) identifiziert.

TCS und CP werden, wie beschrieben, im SIM-Modus gemessen. Hier dient neben der Retentionszeit das Cl-Isotopenverhältnis zur qualitativen Identifizierung.

Die Bezugsfunktionen der Analyten 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 Bezugslösungen die Kalibrierfunktionen.

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

<sup>13</sup> Das Ion m/z 302 (MTCS) enthält nur <sup>35</sup>Cl-Isotope; das Ion m/z 307 (MTCS-D<sub>3</sub>) besteht hingegen aus einem Gemisch von <sup>35</sup>Cl und <sup>37</sup>Cl-Isotopen.

**Tabelle I-A2-4: Betriebsparameter des AGILENT TECHNOLOGIES Quadrupol GC/NCI-MS System**

<b>Gaschromatograph</b> Trennkapillare Ofentemperatur	<b>AGILENT TECHNOLOGIES 6890N</b> Agilent HP-5MS; 30 m L x 0,25 mm ID; 0,25 µm Filmdicke; 1,0 min 120 °C isotherm; Rate 1: 20 °C/min auf 240 °C; Rate 2: 8 °C/min auf 280 °C; 5,0 min 280 °C isotherm GC-Laufzeit: 17,0 min.			
<b>Injektor</b> Temperatur Splitsteuerung Trägergasart Trägergasvordruck	<b>AGILENT TECHNOLOGIES Split/Splitless</b> 250 °C isotherm 1,0 min splitlos nachgereinigtes Helium 53 bis 141 kPa im 'constant flow mode' bei 1,0 mL/min			
<b>Probengeber</b> Probenaufgabe Spülmedien	<b>GERSTEL MPS2</b> 1 µL n-Hexan (1,0 min splitlos) A: Aceton; B: Cyclohexan.			
<b>Massenspektrometer</b> Ionisierung Reaktant-Gas MS source temperature MS quad temperature Multiplifier offset Filament emission current Auflösung	<b>AGILENT TECHNOLOGIES 5973 Network Mass Selective Detector</b> Negative (ion) chemical ionization Modus bei 230 eV Methan 5.5, Volumenstrom: 40 Einheiten <sup>14</sup> 150 °C 150 °C ± 0 V 49 µA low (0,7 – 0,9 amu)			
Substanzabh. Einstellungen				
Substanz	CP		TCS	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -TCS
Gruppe / Anzahl der Ionen	1 / 2		2 / 4	2 / 4
SIM-Ionen	217,0 + 219,0		287,0 + 289,0	295,0 + 297,0 m/z
Dwell time	200		100	100 msec
Scan rate	2,3		2,15	2,15 cycles/sec
Datenaufnahme	9,0 – 10,5		10,5 - 12,2	10,5 - 12,2 min
Retentionszeit	9,7		11,4	11,4 min
Quantifizierungs-Ionen	217		287	295 m/z

## 12.2 Methoden-Leerwerte

Zur Kontrolle des Untersuchungsverfahrens ist pro Analysenserie ein Methoden-Leerwert aufzuarbeiten und zu messen. Dazu wird das gesamte Verfahren ohne Matrix (nur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in der ASE-Zelle) durchgeführt.

Bei einem signifikanten Leerwert werden die Informationswerte der Proben um den gemessenen Leerwert korrigiert und dann die weitere Umrechnung auf ng/g Frischgewicht vorgenommen.

<sup>14</sup> in % des maximalen Volumenstroms von 5 mL/min

### 12.3 Überprüfung des Verfahrens auf systematische Fehler

Das Messsystem wird wie beschrieben mit Bezugslösungen kalibriert. Die erhaltenen Grundkalibrierungen werden durch Aufstellung von Wiederfindungsfunktionen (WFF) auf konstante oder proportional systematische Fehler überprüft.

Die Aufstellung der Wiederfindungsfunktionen des Verfahrens wird durch Aufstockung von Matrixproben mit Standardlösungen vorgenommen. Das Verfahren beruht auf dem von Funk, Damman und Donnevert beschriebenen Verfahren der "Standard-Addition" [1]. Hierzu werden mindestens vier gleiche Teilproben mit unterschiedlichen Standardmengen aufgestockt, während eine weitere Teilprobe ohne Addition der Analyt-Standard verbleibt. Diese Aufstockungen der Proben werden direkt in den ASE-Zellen vorgenommen, anschließend werden alle Aufarbeitungs-, Derivatisierungs- und Messschritte wie beschrieben durchgeführt.

Die Analyt-Gehalte der Matrix-Proben werden über die jeweilige Grundkalibrierung ermittelt. Diese berechneten Gehalte werden dann um die Menge der nicht aufgestockten Teilprobe reduziert. Die grafische Auftragung dieser korrigierten Analyt-Gehalte gegen die addierten Mengen ergeben dann die WFF.

Die aufgestellten 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 Wiederfindungsraten (WFR) der analytischen Verfahren wird durch Multiplikation der Steigung der WFF mit 100 % errechnet.

Der Analytgehalte der Proben können bei Vorliegen von proportional systematischen Fehlern mit der errechneten WFR korrigiert werden.

## 13 Literatur

- [1] Funk, W., Damman, C., Donnevert, G.: Qualitätssicherung in der analytischen Chemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1992) 27–36.

## Anhang I-3 Kalibrierfunktionen

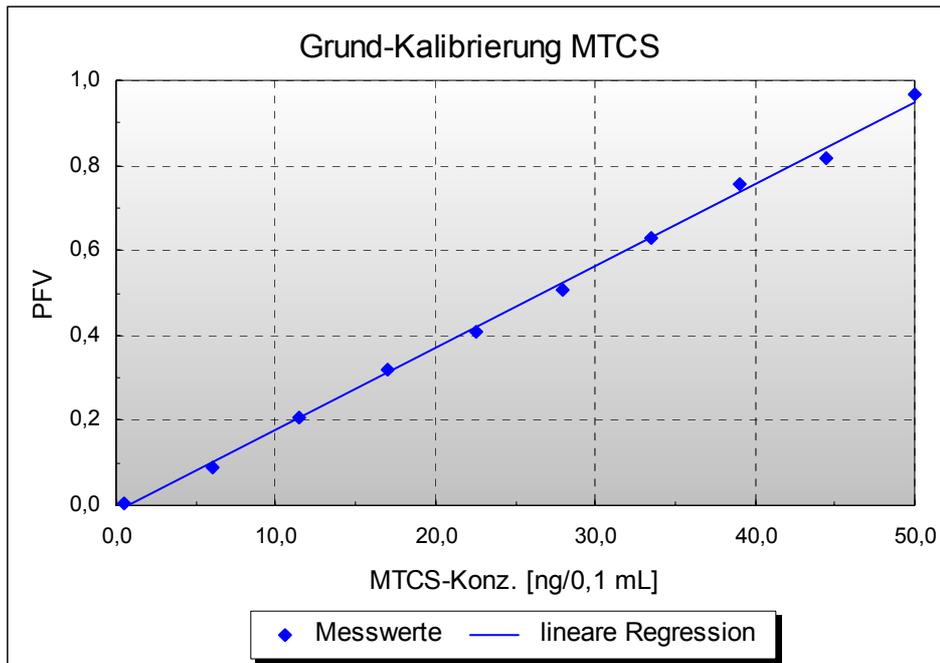
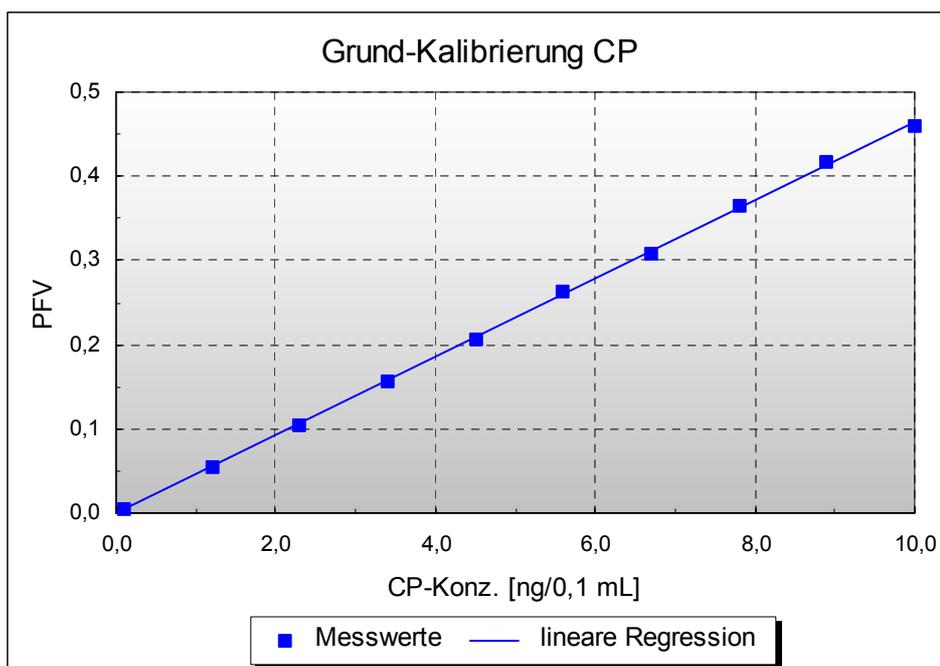
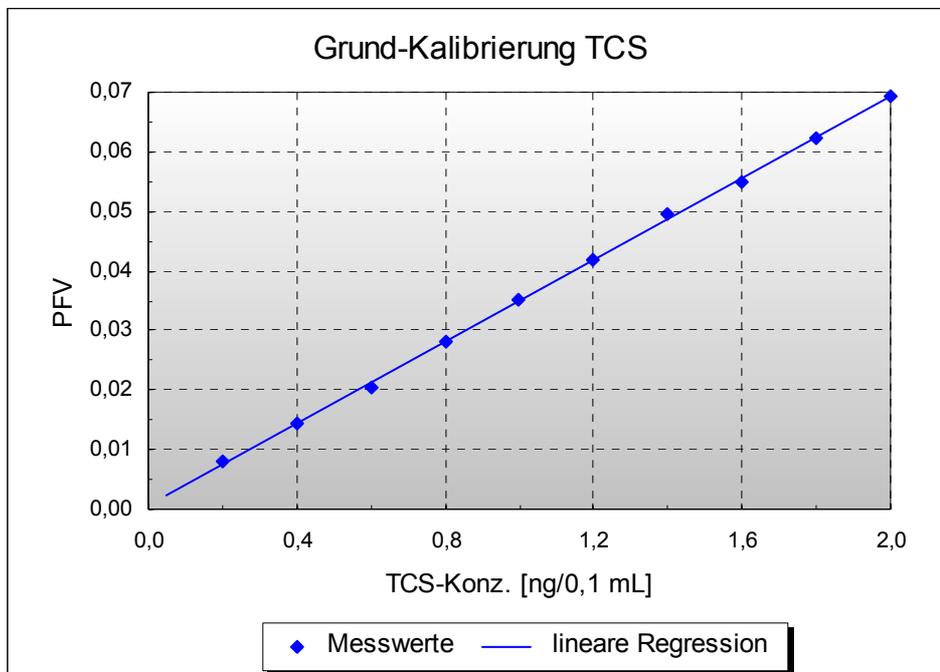
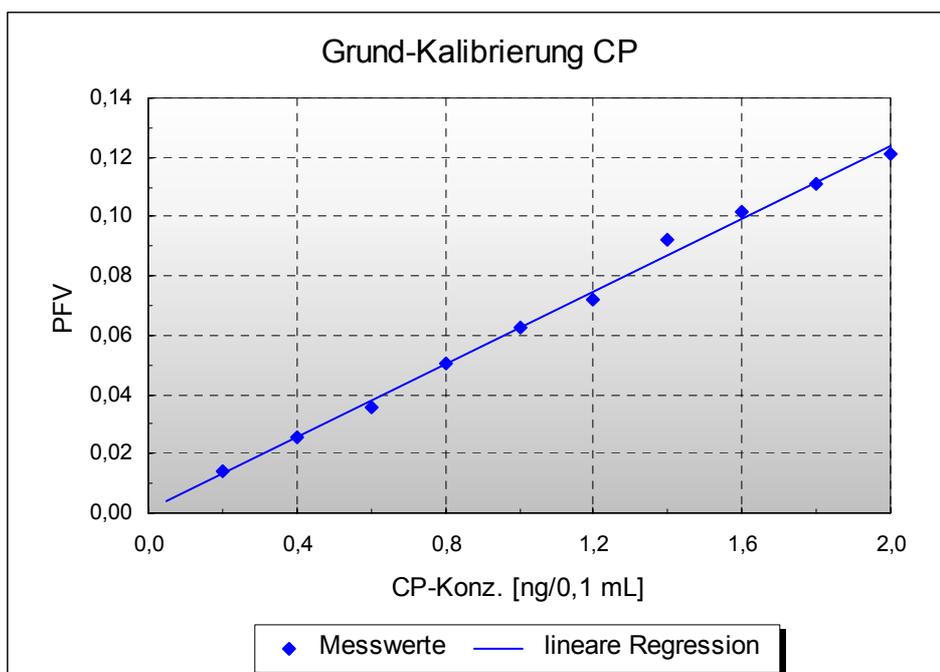
Abbildung I-5: Grund-Kalibrierung für Methyl-Triclosan im Arbeitsbereich von 0,5 bis 50 ng/0,1 mL

Abbildung I-6: Grund-Kalibrierung für Chlorophene im Arbeitsbereich von 0,1 bis 10 ng/0,1 mL



**Abbildung I-7:** Grund-Kalibrierung für Triclosan im Bereich von 0,2 bis 2,0 ng/0,1 mL zur Ermittlung der BG



**Abbildung I-8:** Grund-Kalibrierung für Chlorophene im Bereich von 0,2 bis 2,0 ng/0,1 mL zur Ermittlung der BG

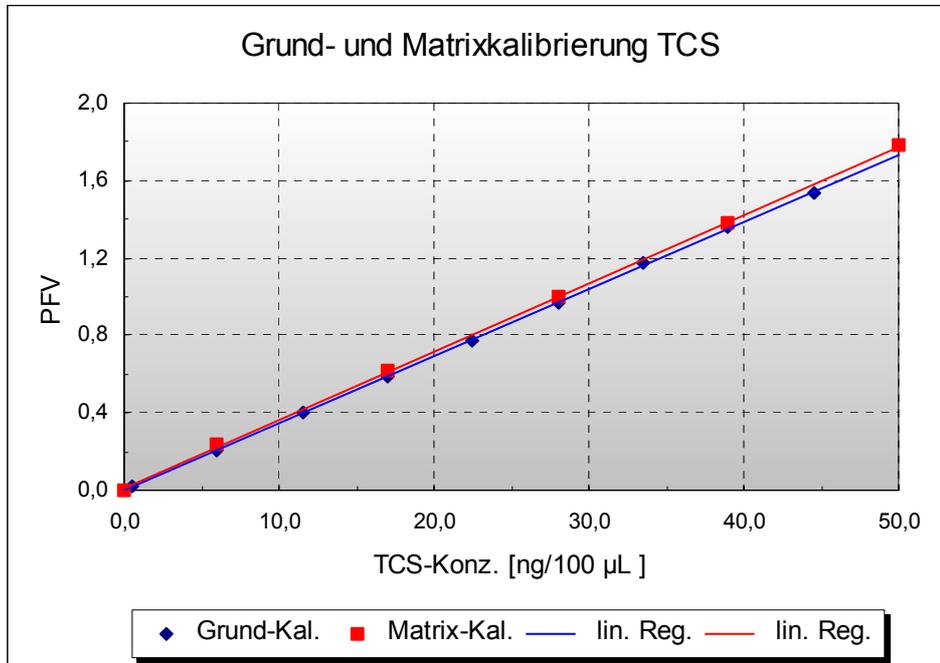


Abbildung I-9: Vergleich von Grund- und Matrix-Kalibrierung für Triclosan

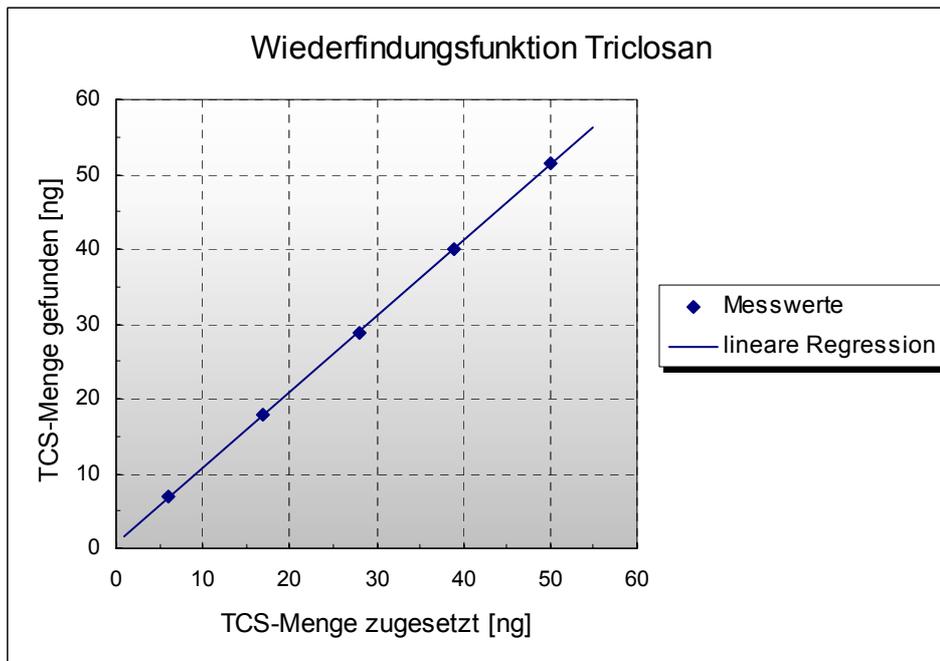


Abbildung I-10: WFF für Triclosan und die Matrix Brassenmuskulatur

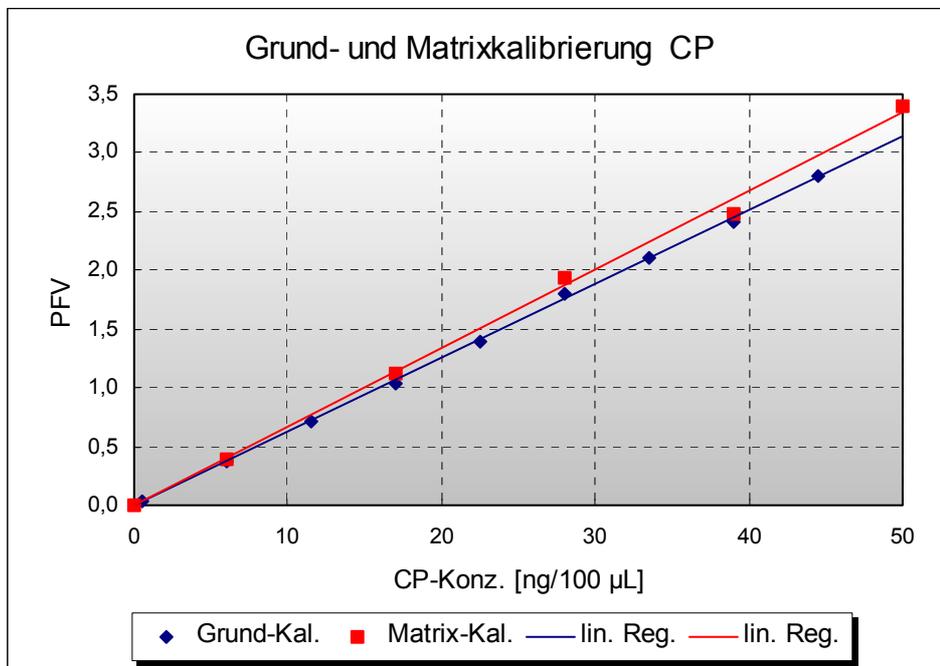


Abbildung I-11: Vergleich von Grund- und Matrix-Kalibrierung für Chlorophene

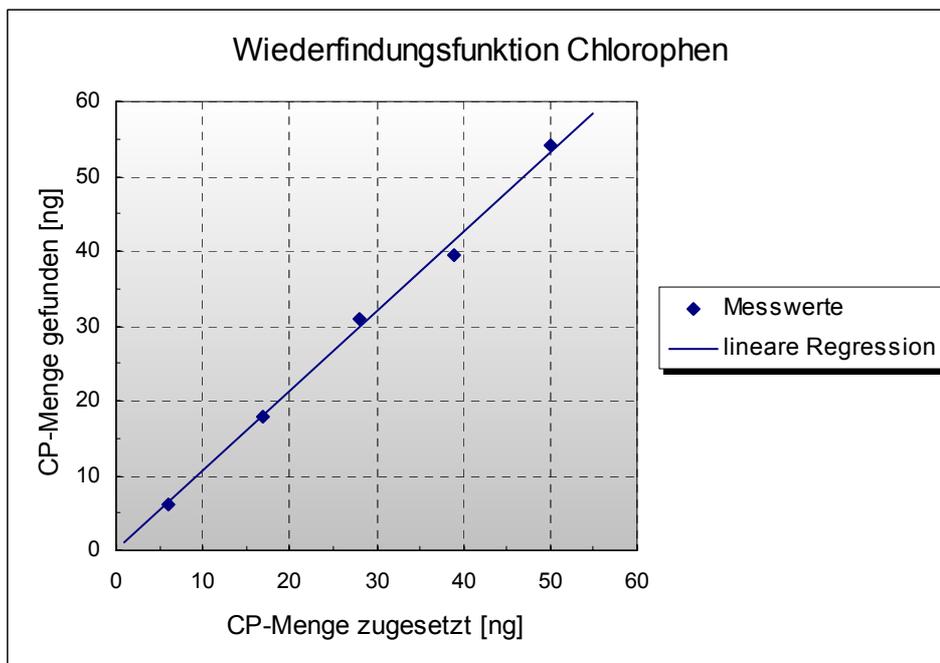


Abbildung I-12: WFF für Chlorophene und die Matrix Brassenmuskulatur

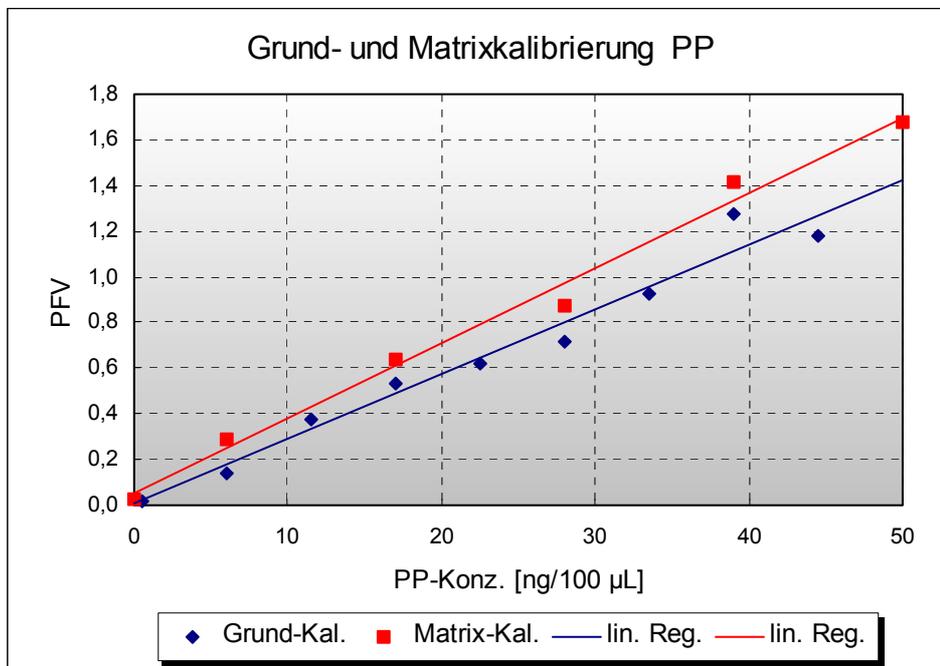


Abbildung I-13: Vergleich von Grund- und Matrix-Kalibrierung für 2-Phenylphenol

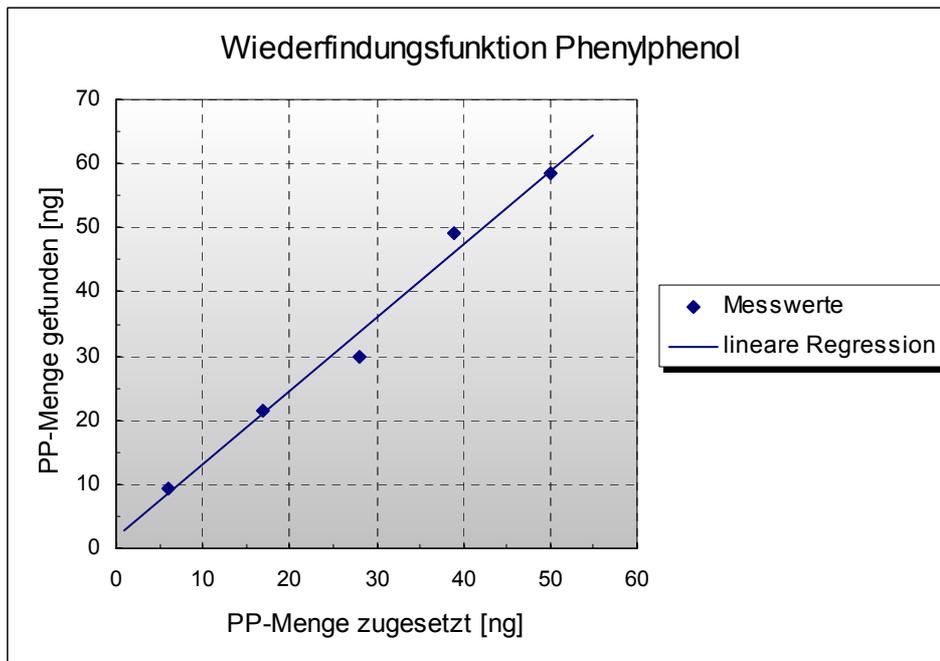


Abbildung 1-14: WFF für 2-Phenylphenol und die Matrix Brassenmuskulatur

## Anhang I-4 Kopie der Akkreditierungsurkunde, Seite 1

**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.

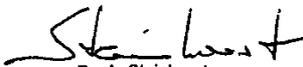
Mit der Erfüllung der Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 erfüllt das Qualitätsmanagementsystem des Prüflaboratoriums für seine Prüftätigkeiten auch die Anforderungen von DIN EN ISO 9001:1994.

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.



Anhang I-5 Analysezertifikate der Referenzsubstanzen

Certificate of Analysis

Dr. Ehrenstorfer   
*Reference Materials for  
Residue Analysis*

Product Identification

17803000	Triclosan	Expiry Date	01.03.2005
CA	5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol	Lot Number	805604
IUPAC		Store at	20 °C
Formula	$C_{12}H_7Cl_3O_2$		
Mol. Weight	289.53		
CAS No.	3380-34-5		

Please Note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only

Physical Data

Phase	crystalline solid	Vapour pressure	at °C
Colour	colourless	Solubility in Water	g/l at °C
Melting Point	57.0 °C	Solubility in	g/l at °C

Toxicological Data

Symbol  
R-Code  
S-Code  
LD50 (Rats female/male in mg/kg) N/A

Analytical Data

Method 1	GC/MSD	Column	DB-5, 60 m, ID 0.25 mm
Inj. Volume (µl)	1	Temperature (°C)	60-280 / 280
Method 2	HPLC/DAD	Column	Nucleosil 5 C18
Inj. Volume (µl)	10	Flow (ml/min.)	0.5

Eluent A Acetonitrile  
Eluent B H<sub>2</sub>O + 0.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
Gradient 4:1  
Comment Lot: 805604 D9. Identity was confirmed by MS- and IR-Spectroscopy.

Water Content 0.1 % Determined by Karl-Fischer Titration  
Det. Purity 99.5 % Tolerance +/- 0.5 %  
Please Note: Results are based on a minimum of three determinations  
Vapour pressure and solubility information according to literature.

Certified 12.03.2001  
by DR. HEIDRICH



Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers · Bgm.-Schlosser-Str. 6 A · D-86199 Augsburg · Germany  
Phone +49 821 906080 · Fax +49 821 9060888 · info@analytical-standards.com  
The information herein is believed to be correct, but is provided without warranty of any kind.



Abbildung I-A5.1: Analysezertifikat/Spezifikationen von Triclosan



**VeZerf Laborsynthesen GmbH**  
Langenfelderstr. 12  
D-55743 Idar-Oberstein  
Tel. +49 (0)6784 903 764  
Fax +49 (0)6784 903 765  
E-Mail [mail@vezerf.de](mailto:mail@vezerf.de)  
Internet <http://www.vezerf.de>

**VeZerf Laborsynthesen GmbH**  
Langenfelderstr. 12, 55743 Idar-Oberstein.

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und  
Angewandte Ökologie  
z. Hdn. Herrn Dipl.-Ing. Walter Boehmer  
Auf dem Aberg 1

D-57392 Schmallenberg

Idar-Oberstein, 11.07.03

#### CHARGE ANALYSIS

4-Chlor-1-(2,4-dichlorphenoxy)-2-methoxybenzol, 1 g

our reference: WA03071501

Methods: HPLC/UV, GC/FID, GC/MS, <sup>1</sup>H-NMR

Results:	HPLC-purity:	ca. 98 %
	gaschromatographic purity:	> 98 %
	MS	corresponds
	<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	corresponds

cf. attn. spectra / chromatogramms

Dr. W.-G. Veck

Geschäftsführende Gesellschafter:  
Dr. rer. nat. Walter-Georg Veck,  
Dr. rer. nat. Torsten Zerfuß  
Deutsche Bank Idar-Oberstein (BLZ 562 700 44), Kto.-Nr. 110 5303  
Kreissparkasse Birkenfeld (BLZ 562 500 30), Kto.-Nr. 614 831

Wissenschaftliche Begleitung:  
Prof. Dr. R. Mülhaupt  
Prof. Dr. M. Regitz  
Registergericht: Amtsgericht Idar-Oberstein HRB 912  
USt-IdNr.: DE 180 168 483

**Abbildung I-A5.2: Analysezertifikat/Spezifikationen von Methyl-Triclosan**

c i b a - G E I G Y  
Division Agro  
Fachbereich Chemie  
Isotopenlabor  
PP 2.234

Datum: 21. Juli 1994

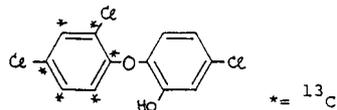
Abgabe an:

Dr. B. Schatowitz  
R-1055.5.04  
Tel. 79227

C H E M I S C H E   S P E Z I F I K A T I O N

Substanz Nummer :  $[^{13}\text{C}]$ IRGASAN

Struktur :



Batch-No. : ILS-49.2

Menge : 1,0 gr

chemische  
Reinheit : 98,7%

Analyse-Methode : DC: Kieselgel 60F 254, MERCK  
Hexan/Ethylacetat 95:5

HPLC: Lichrosorb RP-18, 5 µm  
(250mm x 4,6mm)  
Acetonitril/Wasser 75:25

Bemerkungen : 1,0 ml/Min. - 283 nm

Analysiert : 19. Juli 1994

Unterschrift:

P. Thür  
Isotopenlabor  
R-1055.U1.43  
7 51 65 / 7 26 64

Sachbearbeiter Radiosynthese  
referee radiosynthesis

Dr. A. Häuk  
Trace Analysis & Isotope Analysis  
R-1055.5.04 © C 20 04

Z-Nr. 49 / AS-31

Abbildung I-A5.3: Analysezertifikat/Spezifikationen von  $^{13}\text{C}_6$ -Triclosan



**Syntheselabor Dr. A. Weiß**  
Synthese und Präparation von Feinchemikalien

EINGEGANGEN

02. Juli 2003

am .....

Syntheselabor Dr. A. Weiß \* Ruhlsdorfer Str 95 \* 14532 Stahnsdorf

IME Fraunhofer  
Herr Dipl.-Ing. Walter Böhmer  
Abt.: Umweltanalytik  
Auf dem Aberg 1  
57392 Schmallenberg

15432 Stahnsdorf  
Ruhlsdorfer Str. 95  
Haus 4 4. Etage  
Tel.+Fax: 03329 / 614555

Ihr Zeichen

Ihr Schreiben

Unser Zeichen

Datum

30.06.03

**Lieferschein**

gemäß Auftrag von Phychem Auftrag-Nr.: 09KO3051

**Methyl-(D3)-Triclosan** 0,5 g

Anreicherung: > 97 atom%  
Chem. Reinheit: >95%

Syntheselabor Dr. A. Weiß

Ruhlsdorfer Straße 95  
14532 Stahnsdorf  
Telefon u. Fax: 0 33 297 68 29 21

Bankverbindung: Mittelbrandenburgische Sparkasse Potsdam BLZ: 160 500 00  
Steuer-Nr.: 047/286/02088 Kto.: 3523 000 377

**Abbildung I-A5.4: Lieferschein/Spezifikationen von Methyl-Triclosan-D<sub>3</sub>**