

**BEISPIEL EINER  
METHODENVALIDIERUNG  
ANHAND VON EDTA UND NTA**



**BEISPIEL EINER  
METHODENVALIDIERUNG  
ANHAND VON  
EDTA UND NTA**

Klaudia STEPHAN  
Franz SVABENICKY  
et al.

**UBA-BE-012**

Wien, Juni 1994

Bundesministerium für Umwelt,  
Jugend und Familie



- *Methodenentwicklung (Analytik):*  
Dr. Walter Pichler, Gerhard Citroni (Zweigstelle West/Salzburg)
- *Methodenvalidierung und statistische Verfahrenskontrolle:*  
Klaudia Stephan, Ing. Franz Svabenicky,  
Ing. Werner Hartl, Mag. Gundi Elke Lorbeer (Abt. Analytik II)

**Impressum:**

Medieninhaber und Herausgeber: Umweltbundesamt, 1090 Wien, Spittelauer Lände 5

© Umweltbundesamt, Wien, Juni 1994

Alle Rechte vorbehalten  
ISBN 3-85457-174-7

# Inhalt

- Kurzbeschreibung der Methode
- Meßverfahren
- Grundkalibrierung
- Gesamtkalibrierung
- Normen und Literatur
- Grundvalidierung
- Kenndaten der Grund- und Gesamtvalidierung
- Wiederfindungsfunktion
- Laufende Kontrolle
  - \* Vergleich: "aktuelle" Kalibrierung - validierte Kalibrierung
  - \* Wiederfindungsproben
  - \* Blindproben
  - \* Doppelbestimmungen
- Analysenverfahren
  - \* Probenvorbereitung
  - \* GC - Analyse

2

## **EINLEITUNG:**

Das Umweltbundesamt wurde mit der Analyse von 4 Parametern (MBAS, LAS, NTA, EDTA) in Fließgewässerproben zur Wassergütererhebung im Beobachtungszeitraum 1993/94 beauftragt.

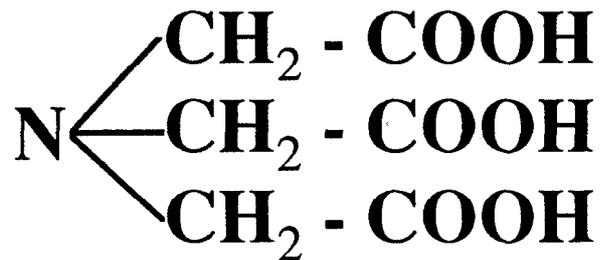
Seitens des Umweltbundesamtes wurde der Wunsch des BM f. Land- u. Forstwirtschaft nach Offenlegung der Qualitätssicherungsmaßnahmen zur Analytik der Wassergütererhebung unterstützt. Zu diesem Thema wurde ein Informationstag am 28. April 1994 im Umweltbundesamt abgehalten.

Der vorliegende Bericht stellt eine Zusammenfassung des Vortrages zur Qualitätssicherung der Komplexbildner (NTA, EDTA) dar. Die in diesem Vortrag verwendeten Folien sind im Bericht mit "Folie" gekennzeichnet.

Der Bericht stellt ein praktisches Beispiel einer Methodenentwicklung und Methodvalidierung dar. Das Verfahren wurde von den Mitarbeitern des Umweltbundesamtes Salzburg und den Mitarbeitern des Umweltbundesamtes Wien (Analytik 2) erarbeitet.

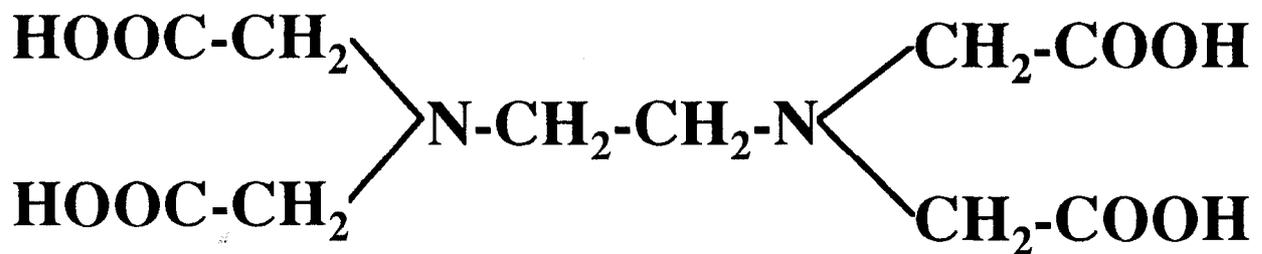
**NITRILOTRIESSIGSÄURE**  
**NTA**

Komplexon I



**ETHYLENDIAMINTETRAESSIGSÄURE**  
**EDTA**

Komplexon II



**Kurzbeschreibung der Methode zur Bestimmung  
von NTA und EDTA in Wasser**

Für die Bestimmung von Nitrilotriessigsäure (NTA) und Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) wurde das Verfahren nach DEV, P3, Blaudruck 1985 in modifizierter Form verwendet. Die Modifikation besteht in der Änderung der Art und der eingesetzten Menge des Anionenaustauschers und des Elutionsvolumens bei der Anreicherung. Diese Änderung ist notwendig, da die Norm die Bestimmung von EDTA nicht umfasst.

Die GC-Endbestimmung der NTA und EDTA erfolgt als NTA-tri-n-butylester und als EDTA-tetra-n-butylester auf 2 Säulen unterschiedlicher Polarität unter Verwendung eines internen Standards.

Die Quantifizierung erfolgte über das Gesamtverfahren. Für die Erstellung der Meßmethode und zum Erhalt einer Wiederfindungsrate wurde zusätzlich eine Grundkalibrierung erstellt.

## **Probenvorbereitung:**

Die Wasserprobe wird zur Entfernung von störendem Hydrogencarbonat angesäuert und das dabei gebildete CO<sub>2</sub> durch Einleitung von Stickstoff verdrängt.

Danach wird die Probe auf einen, in der Formiatform vorliegenden, stark basischen Anionenaustauscher aufgebracht, wobei sich die Anionen der NTA und EDTA am Austauscher anreichern. Die Elution der NTA und EDTA erfolgt mit 16 M Ameisensäure. Das Eluat wird zur Trockene eingeeengt.

Die Derivatisierung der NTA und EDTA zum Tri- bzw. Tetra-n-butylester erfolgt mit einem n-Butanol-Acetylchlorid-Gemisch. Nach Zugabe von Wasser zum Reaktionsgemisch werden die Butylester mit n-Hexan extrahiert.

Der n-Hexanextrakt wird eingeeengt, mit interner Standardlösung (Heptadecansäurenitril in n-Hexan) versetzt und der GC-Analyse zugeführt.

## **Modifizierung und Optimierung der Probenvorbereitung:**

### *1.) Anreicherung:*

Zur Kontrolle einer ausreichenden Kapazität des Ionenaustauschers wurde eine Standardlösung nach Durchlaufen des Anionenaustauschers aufgefangen, zur Trockene eingeeengt, derivatisiert und gemessen.

Dabei zeigte sich, daß die in der Norm angegebene Kapazität für EDTA-Mengen größer 3 µg nicht ausreichend ist. Es wurde daher ein Anionenaustauscher größerer Kapazität (kleinere Korngröße) verwendet.

Die Optimierung des Elutionsvolumens erfolgte über Nachelution des Anionenaustauschers, wobei sich zeigte, daß zur vollständigen Elution von NTA das Elutionsvolumen vergrößert werden muß.

### *2.) Derivatisierung:*

Bei der Derivatisierung wurde kontrolliert, ob die, in der Literatur angegebene, Reaktionszeit von 1 Stunde ausreichend ist. Dazu wurden Standardlösungen 1/2 Stunde, 1 Stunde und 1 1/2 Stunden mit dem Veresterungsgemisch reagieren

gelassen. Dabei zeigte sich, daß die Reaktionsausbeute bei allen drei Versuchen gleich war.

### **GC - Analyse:**

Die GC-Analyse des NTA-tri-n-butylesters und des EDTA-tetra-n-butylesters erfolgt auf zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität mittels interner Standardkalibration.

Zur Detektion wird ein Stickstoff-Phosphor sensitiver Detektor verwendet.

Die beiden oben angeführten Ester sind im Handel nicht erhältlich. Daher wurde die Synthese dieser Verbindungen in Auftrag gegeben. Die Reinheit der fertigen Ester wurde mittels MS- und NMR-Spektrometrie überprüft.

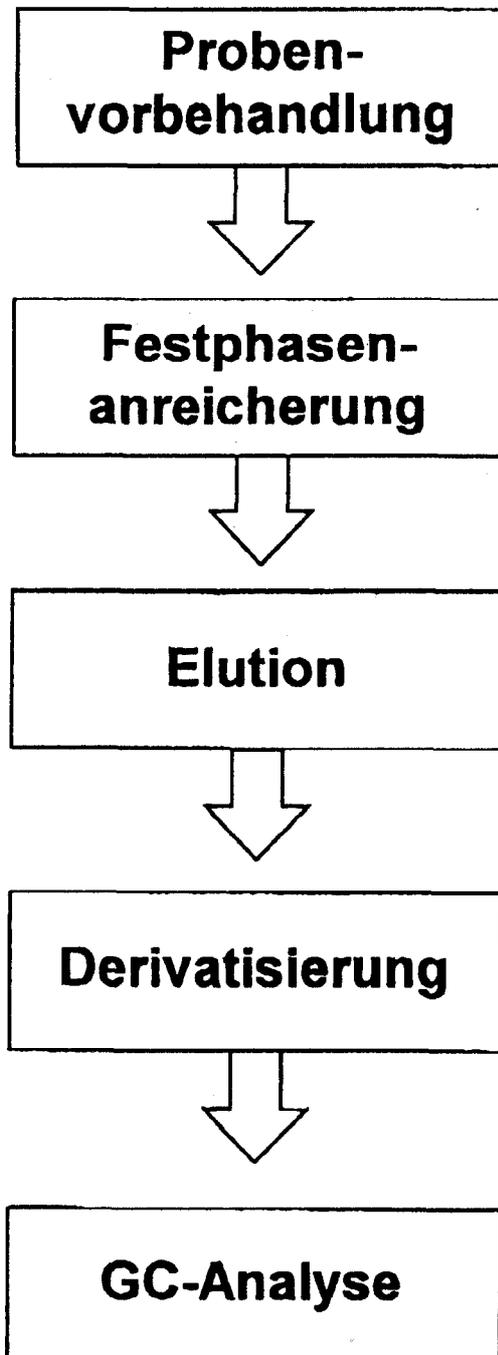
Die Butylester wurden benötigt zur:

- Ermittlung der Retentionszeit
- Überprüfung der Trennleistung der beiden Säulen
- Bestimmung der absoluten Empfindlichkeit
- Erstellung der Grundkalibrierung
- Ermittlung von Massenspektren mittels GC-MS

Die Identifizierung des GC-Elutionsmusters erfolgte mittels GC-MS.

Ebenso wurden ausgewählte Proben, deren Gehalt an Ester größer als die BG waren, massenspektrometrisch abgesichert.

# Prinzip der Bestimmung von NTA / EDTA in Wasserproben



# Meßverfahren

## GC-NPD - Bestimmung von

**NTA-n-butylester**  
**EDTA-n-butylester**

Injektion	
Einspritzvolumen	1 $\mu$ l
splitless	60 s

Trennung		
Säule	<b>SPB - 608</b>	<b>DB - 1301</b>
Länge	30 m	60 m
I. D.	0,25 mm	0,32 mm
Filmdicke	0,25 $\mu$ m	0,25 $\mu$ m

Detektion
<b>NP - Detektor</b>
Spezifisch für Stickstoff und Phosphor

## **Kalibrierverfahren:**

Es wurden Kalibrierungen nach 2 Verfahren erstellt:

1.) "Grundkalibrierung"; Kalibrierung mittels Reinstandards"

Die Kalibrationslösungen der "Grundkalibrierung" wurden aus einer Stamm-  
lösung der beiden Ester hergestellt.

Die Grundkalibrierung wurde für die Erstellung und Optimierung der  
Meßmethode benötigt.

2.) "Gesamtkalibrierung"; "Kalibrierung mittels Wiederfindungsstandards, -proben"

Die Kalibrationslösungen der "Gesamtkalibrierung" wurden hergestellt, indem  
wässrige Lösungen der Na-Salze der NTA und EDTA mit unterschiedlichen  
Konzentrationen der gesamten Probenvorbereitung unterzogen wurden.

Die Proben wurden mittels Gesamtkalibrierung (unter Verwendung eines  
internen Meßstandards) quantifiziert.

### **Grundkalibration:**

Die "Grundkalibrierung" wurde erstellt, indem die Stammlösung des NTA-tri-n-butylesters und des EDTA-tetra-n-butylesters auf Konzentrationen von 0,5 - 50 ng/ $\mu$ l (siehe Folie 4) verdünnt und der GC-Messung zugeführt wurden.

Aus der Grundkalibrierung konnte die absolute Empfindlichkeit des Meßsystems bestimmt werden. Weiters konnte durch Vergleich der Grund- zur Gesamtkalibrierung die Wiederfindungsrate errechnet werden.

# Grundkalibrierung

Messung der Reinstandards ergibt den Datensatz der Grundkalibrierung

NTA-n-butylester		EDTA-n-butylester	
Konzentrationen	Anzahl Wh.	Konzentrationen	Anzahl Wh.
0,50 ng/μl	5	0,50 ng/μl	5
1,00 ng/μl	5	1,00 ng/μl	5
2,00 ng/μl	5	2,00 ng/μl	5
4,00 ng/μl	5	4,00 ng/μl	5
8,00 ng/μl	5	8,00 ng/μl	5
10,00 ng/μl	5	10,00 ng/μl	5
20,00 ng/μl	5	20,00 ng/μl	5
40,00 ng/μl	5	40,00 ng/μl	5

**8 x 5 = 40 Messungen**

### **Gesamtkalibration:**

Für die Gesamtkalibrierung wurden die Natriumsalze der NTA und EDTA in Reinstwasser auf Konzentration von 4 - 80 µg/l (siehe Folie 5) verdünnt. Pro Kalibrationslevel wurde 5mal jeweils 100 ml dieser Lösungen der kompletten Probenvorbereitung unterzogen. Zur Bestimmung von Blindwerten aus der Probenvorbereitung wurden 5 mal jeweils 100 ml Reinstwasser der Probenvorbereitung unterzogen.

Die Gesamtkalibrierung wurde für die Quantifizierung der Proben verwendet.

# Gesamtkalibrierung

Messung der Wiederfindungsproben ergibt den Datensatz der Gesamtkalibrierung

NTA		EDTA	
gemessen als n - Butylester			
Konzentrationen	Anzahl Wh.	Konzentrationen	Anzahl Wh.
4 µg/l	5	4 µg/l	5
10 µg/l	5	10 µg/l	5
30 µg/l	5	30 µg/l	5
50 µg/l	5	50 µg/l	5
70 µg/l	5	70 µg/l	5
80 µg/l	5	80 µg/l	5

## **Statistische Auswertung der Datensätze:**

Die Auswertung erfolgte mittels **Validata<sup>®</sup> (Version 1.01)**, in dem folgende **Normen** zitiert werden:

DIN 32645

DIN 38402 Teil 51

Ferner wurde folgende **Literatur** verwendet:

- 1) Funk, W.; V.Dammann; G. Donnewert: Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie, VCH, Weinheim 1992.
- 2) Sachs L.: Angewandte Statistik, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin 1984.
- 3) Doerffel, K.: Statistik in der analytischen Chemie, Weinheim 1983.

# Grundvalidierung

Statistische Auswertung der  
Grundkalibrierung

DIN 38402/51

Varianzanalyse

Linearitätstest

Analysenpräzision

Kalibrierfunktion

Reststandardabw.

Achsenabschnitt

Steigung

Prüfwert

Verfahrensstandardabw.

NWG = LID  
BG = LIQ

rel. Verfahrensstandardabw.

Arbeitsbereich des Detektors  
Verfahrenskennndaten

# Kenndaten zur Grundvalidierung

<b>Kenndaten NTA-tri-n-butylester</b>		
	DB 1301	SPB 608
Arbeitsbereich [ $\mu\text{g} / \text{l}$ ]	0,3 - 40	
Steigung	0,047	0,045
Achsenabschnitt	0,008	-0,012
Reststandardabw.	0,0478	0,0303
rel. Verfahrensstandardabw. [%]	2,7	1,8
NWG / LID [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ]	0,15	0,14
BG / LIQ [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ]	0,3	0,28

<b>Kenndaten EDTA-tetra-n-butylester</b>		
	DB 1301	SPB 608
Arbeitsbereich [ $\mu\text{g} / \text{l}$ ]	0,5 - 40	0,7 - 40
Steigung	0,046	0,045
Achsenabschnitt	0,016	-0,269
Reststandardabw.	0,0785	0,1218
rel. Verfahrensstandardabw. [%]	5,1	6,9
NWG / LID [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ]	0,25	0,33
BG / LIQ [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ]	0,5	0,66

Der Datensatz der Gesamtkalibrierung wurde statistisch nach DIN 38402/51 analog zur Grundvalidierung ausgewertet.

Die so erhaltenen Kenndaten der Gesamtkalibrierung wurden mit den Kenndaten der Grundkalibrierung verglichen (siehe Wiederfindungsfunktion).

# Kenndaten zur Gesamtkalibrierung

Kenndaten EDTA ("freie Säure")		
	DB 1301	SPB 608
Arbeitsbereich [ $\mu\text{g} / \text{l}$ ]	4 - 80	
Steigung	0,045	0,046
Achsenabschnitt	0,022	-0,032
Reststandardabw.	0,1403	0,1628
rel. Verfahrensstandardabw. [%]	8,4	11,7
NWG / LID [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ]	3,3	3,5
BG / LIQ [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ]	6,6	7

Kenndaten NTA ("freie Säure")		
	DB 1301	SPB 608
Arbeitsbereich [ $\mu\text{g} / \text{l}$ ]	3 - 80	
Steigung	0,048	0,048
Achsenabschnitt	0,003	0,035
Reststandardabw.	0,0854	0,0879
rel. Verfahrensstandardabw. [%]	5,1	5,5
NWG / LID [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ]	2,3	2
BG / LIQ [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ]	4,6	4,1

Um Kenntnis über den Einfluß der Probenvorbereitung auf das Analyseergebnis zu erhalten, wurde eine mittlere Wiederfindungsrate berechnet.

### **Berechnung der mittleren Wiederfindungsrate:**

Die Berechnung der mittleren Wiederfindungsrate kann auf unterschiedliche Weise erfolgen:

#### **1) durch Mittelwertbildung der einzelnen Wiederfindungsraten:**

Die mittlere Wiederfindungsrate wird durch Mittelwertbildung der einzelnen Wiederfindungsraten (bei gleichen oder unterschiedlichen Dotationsmengen) berechnet ("klassisch").

#### **2) mittels Wiederfindungsfunktion (siehe Folie 7):**

es gilt:

$$\begin{aligned} \text{WFR \%} &= \text{bf} \cdot 100 \\ &= \text{b(gesamt)} / \text{b(grund)} \cdot 100 \end{aligned}$$

WFR .....mittlere Wiederfindungsrate  
bf.....Steigung der Wiederfindungsfunktion  
b(grund).....Steigung der Grundkalibrierung  
b(gesamt).....Steigung der Gesamtkalibrierung

Für Wiederfindungsraten <100% ist der Zahlenwert für bf < 1; (siehe EDTA)

Für Wiederfindungsraten >100% ist der Zahlenwert für bf > 1; (siehe NTA)

Aus dem Vertrauensbereich für  $bf$  ( $bf$  = Steigung der Wiederfindungsfunktion) ergibt sich ein **Bereich für die mittlere Wiederfindungsrate**. Die Bereichsgrenzen wurden im laufenden Verfahren als Kontrollgrenzen verwendet (siehe "laufende Kontrolle - Wiederfindungsproben").

	WFR	Bereich für die WFR
EDTA	86 %	81 - 91%
NTA	102%	98 - 107%

Die mittlere Wiederfindungsrate wurde mittels Wiederfindungsfunktion aus Grund- und Gesamtkalibrierung berechnet.

**Anmerkung 1:**

**Überprüfung von systematischen und zufälligen Fehlern zwischen Grund- und Gesamtkalibrierung mit Hilfe der Wiederfindungsfunktion:**

*Die Probenvorbereitung kann systematische oder zufällige Abweichungen des Analysenergebnisses vom "wahren" Wert verursachen. Besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in der Analysenpräzision zwischen Grund- und Gesamtkalibrierung, kann die Wiederfindungsfunktion zur Erfassung systematischer Fehler verwendet werden. In der Praxis jedoch streuen die Meßdaten der Gesamtkalibrierung stärker als die Meßdaten der Grundkalibrierung. Der **größere Streubereich** der Gesamtkalibrierung, bedingt durch die Probenvorbereitung, kann in der Regel nicht verkleinert werden.*

*Mathematisch drückt sich dies als statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Verfahrensstandardabweichung der Gesamtkalibrierung und der Reststandardabweichung der Wiederfindungsfunktion aus Grund- und Gesamtkalibrierung aus. In diesem Fall kann mit Hilfe der Wiederfindungsfunktion aus Grund- und Gesamtkalibrierung keine Aussage über das **Nicht-Vorliegen systematischer Fehler** gemacht werden. das heißt, die Wiederfindungsfunktion ist hier zur Kontrolle der Probenvorbereitung nicht geeignet. Zur Erfassung von systematischen bzw. zufälligen Fehlern, verursacht durch die Probenvorbereitung, sind daher andere statistische Verfahren wie z.Bsp. **robuste Regression** zu verwenden.*

# Wiederfindungsfunktion

## Statistischer Vergleich zweier Kalibrationen

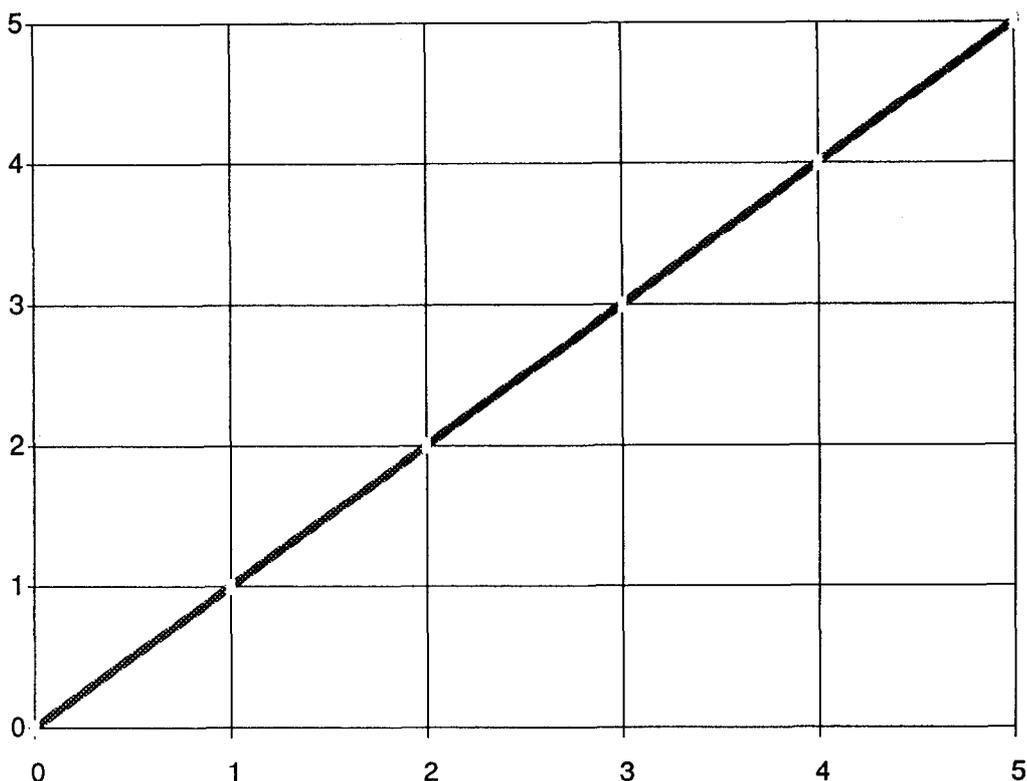
**1. Vergleich der Analysenpräzisionen**

**2. Vergleich der Steigungen**

**3. Vergleich der Achsenabschnitte**

# Ableitung der Wiederfindungsfunktion

X - Wert (Kalibrierung 2)  
"gefundene Menge"



X - Wert (Kalibrierung 1)  
"eingesetzte Menge"

⇒ Wiederfindungsfunktion:

$$y = a_f + b_f x$$

theoretisch:

$$a_f \text{ (Achsenabschnitt)} = 0$$

$$b_f \text{ (Steigung)} = 1$$

⇒ mittlere Wiederfindungsrate:

$$\text{WFR \%} = b \text{ (Gesamt)} / b \text{ (Grund)} * 100$$

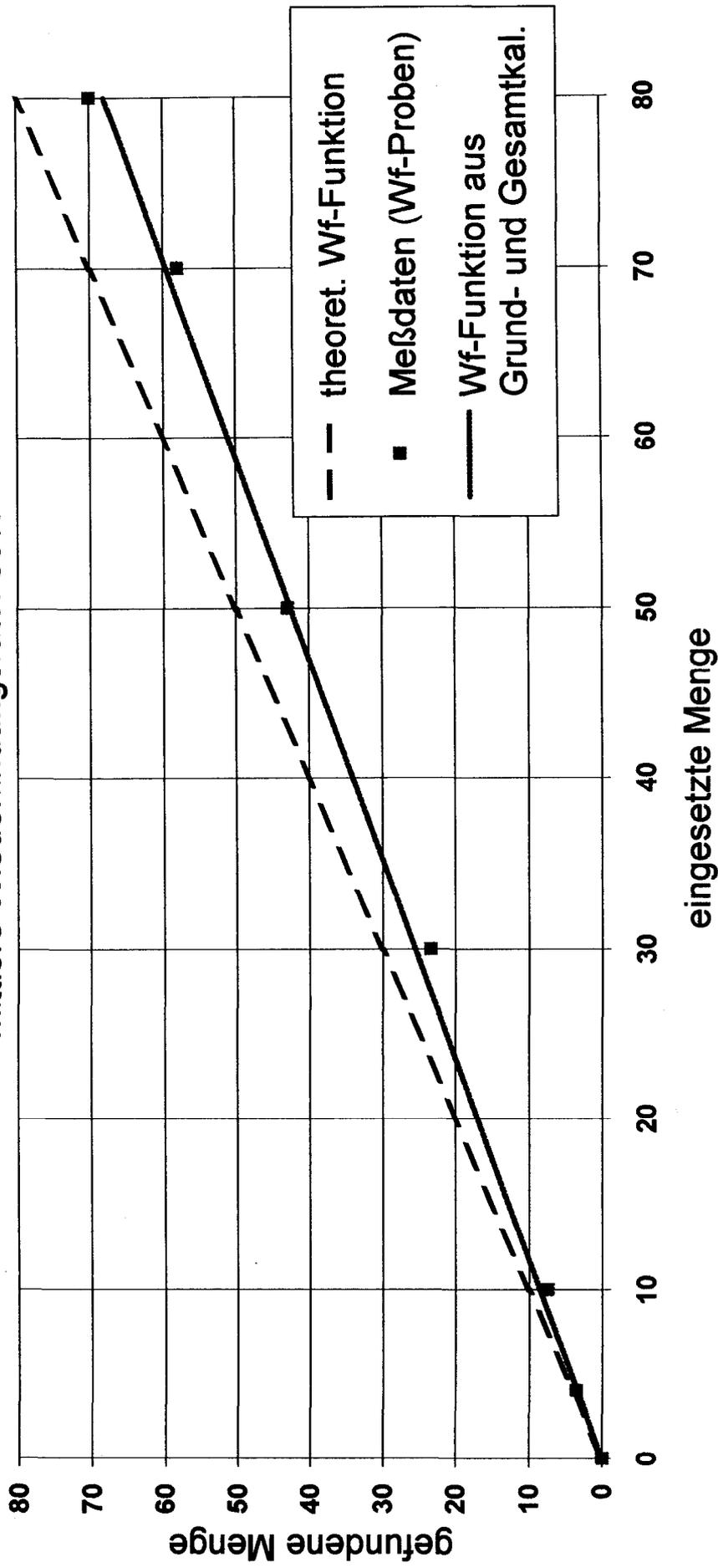
$$= b_f * 100$$

ad Folie 11 und Folie 12

Folie 11 und Folie 12 zeigen Wiederfindungsfunktionen aus Grund- und Gesamtkalibrierungen bei mittleren Wiederfindungsraten von **86%** für EDTA und **102%** für NTA.

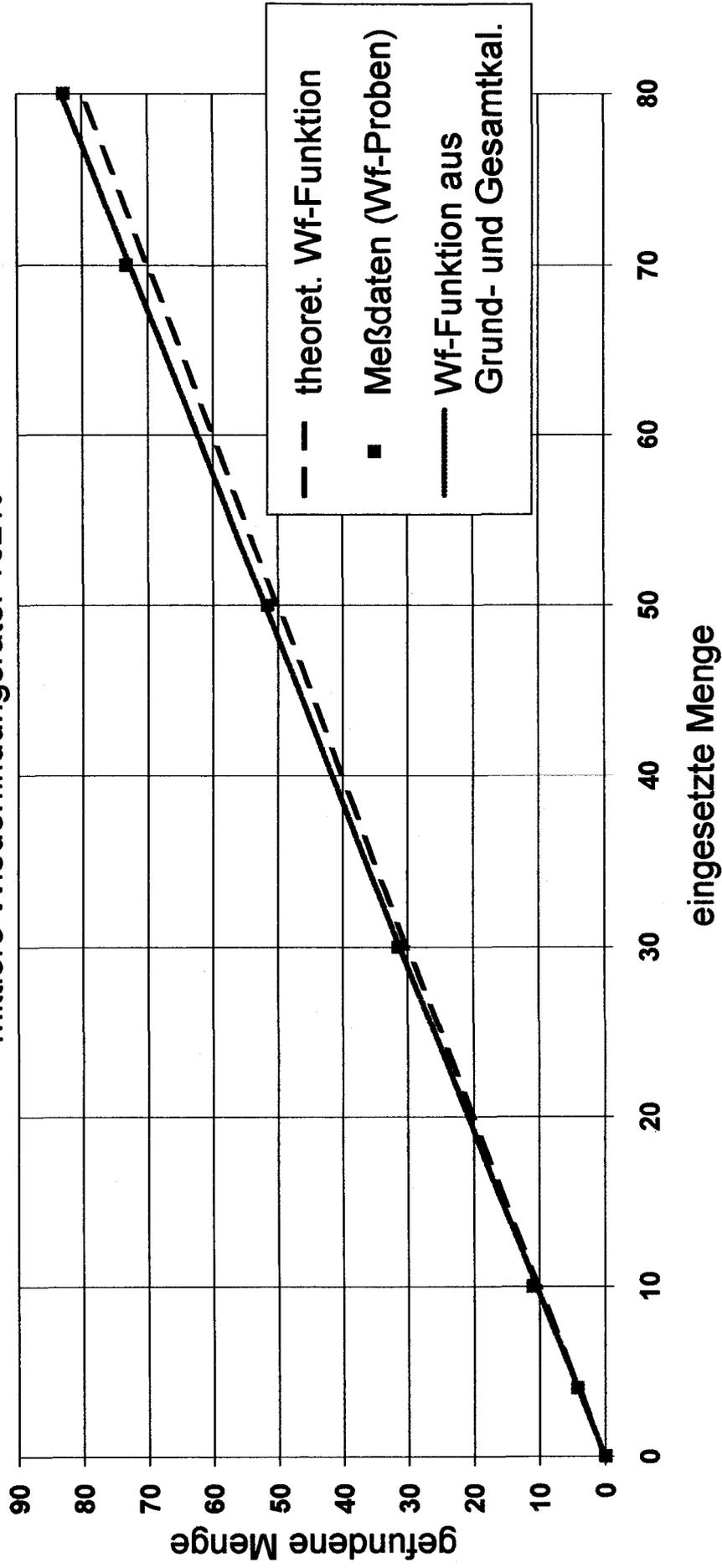
## Vergleich von Grund- und Gesamtkalibration mittels Wiederfindungsfunktion

mittlere Wiederfindungsrate: 86%



# Vergleich von Grund- und Gesamtkalibration mittels Wiederfindungsfunktion

mittlere Wiederfindungsrate: 102%



## **Laufende Kontrolle**

- 1) Vergleich: "aktuelle Kalibrierung"- validierte Kalibrierung**
- 2) Wiederfindungsproben**
- 3) Blindproben**
- 4) Doppelbestimmungen**

### **1) Vergleich: "aktuelle Kalibrierung" - validierte Kalibrierung**

Nach jedem GC-Service wurde analog zur validierten Gesamtkalibrierung eine Gesamtkalibrierung neu erstellt.

Die "**aktuelle**" **Gesamtkalibrierung** beinhaltet alle Kalibrationslevel der validierten Gesamtkalibrierung dh. zu jedem Kalibrationslevel der validierten Gesamtkalibrierung wurden fünf Wiederfindungsproben (Wiederfindungsstandards) einmal gemessen (siehe Folie 5).

Wenn der Meßwert einer Wiederfindungsprobe den Bereich der mittleren Wiederfindungsrate unter- bzw. überschritt, wurde ein Reinstandard gemessen und überprüft, ob dieser Meßwert innerhalb des für diese Konzentration aus der Grundvalidierung erhaltenen Vertrauensintervalles lag. War dies nicht der Fall, wurde ein GC - Service vorgenommen.

Nach "kleineren" Servicearbeiten am GC (Bsp.: Injektorservice), wurde eine **Nachkalibrierung** vorgenommen.

Die Nachkalibrierung beinhaltet alle Kalibrationslevel der validierten Gesamtkalibrierung dh. zu jedem Kalibrationslevel der validierten Gesamtkalibrierung wurde eine Wiederfindungsprobe (=Wiederfindungsstandard) einmal gemessen.

Um **zeitlich bedingte Veränderungen** des Analysenverfahrens erfassen und eliminieren zu können, wurden *die zu einem späteren Zeitpunkt erstellten Kalibrierungen ("aktuelle" Kalibrierung)* mit der validierten Gesamtkalibrierung mittels Wiederfindungsfunktion in Beziehung gesetzt.

Die **Wiederfindungsfunktion** ist geeignet, um systematische Fehler zwischen Verfahren mit gleicher Analysenpräzision (siehe Anmerkung 1) zu erfassen.

## Vergleich der Standardabweichungen

### ***Konstanz der Analysenpräzision zwischen den Meßserien:***

Unser Qualitätsziel war es, die Präzision des Verfahrens konstant zu halten.

Deshalb wurde darauf geachtet, daß die Analysenpräzision zweier aufeinander folgenden Kalibrierungen konstant ist. Dies ist der Fall, wenn kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Verfahrensstandardabweichung der validierten Gesamtkalibrierung und der Reststandardabweichung der Wiederfindungsfunktion aus validierter Gesamtkalibrierung und aktueller Gesamtkalibrierung besteht.

#### *Anmerkung 2:*

*Eine Charge qualitativ minderwertiger Alkaliperlen führte zu einem Absinken der Analysenpräzision und der Analysenempfindlichkeit (siehe auch "Vergleich der Steigungen"). Aus diesem Grund wurden diese gegen Perlen einer anderen Charge getauscht.*

## Vergleich der Steigungen

### ***Konstanz der Empfindlichkeit zwischen den Meßserien:***

Ein weiteres Qualitätsziel war es, die Empfindlichkeit des Verfahrens konstant zu halten.

Aus diesem Grund wurde darauf geachtet, daß die Steigung der aktuellen Kalibrierung innerhalb des Vertrauensbereiches der Steigung der validierten Gesamtkalibrierung liegt.

Für die Wiederfindungsfunktion aus validierter Gesamtkalibrierung und aktueller Kalibrierung gilt in diesem Fall: Das Vertrauensintervall der Steigung der Wiederfindungsfunktion (bf) beinhaltet den Wert 1:

Fall 1:  $b(\text{aktuell}) < b(\text{validiert})$

Zum Zeitpunkt der Erstellung der aktuellen Kalibrierung war das System unempfindlicher als zum Zeitpunkt der Erstellung der validierten Gesamtkalibrierung. In diesem Fall wurde nachjustiert, bis die gewünschte Empfindlichkeit (siehe "Vergleich der Standardabweichungen") erreicht war.

Fall 2:  $b(\text{aktuell}) > b(\text{validiert})$

Dies bedeutet, daß zum Zeitpunkt der Erstellung der aktuellen Kalibrierung das System größere Empfindlichkeit aufweist, als zum Zeitpunkt der Erstellung der validierten Gesamtkalibrierung. Dieser Fall trat nicht auf, da die validierte Gesamtkalibrierung bei größtmöglicher Empfindlichkeit ermittelt wurde.

## Vergleich der Achsenabschnitte

### ***Kontrolle der Blindwerte:***

Es wurde darauf geachtet, daß der Achsenabschnitt der aktuellen Kalibrierung innerhalb des Vertrauensbereiches des Achsenabschnittes der validierten Gesamtkalibrierung liegt.

Für die Wiederfindungsfunktion aus aktueller Kalibrierung und validierter Gesamtkalibrierung gilt in diesem Fall: Das Vertrauensintervall für den Achsenabschnitt der Wiederfindungsfunktion ( $a_f$ ) beinhaltet den Wert 0.

Da Blindwerte nur während der Methodenoptimierung auftraten, war der Achsenabschnitt der validierten Gesamtkalibrierung bzw. der aktuellen Kalibrierung annähernd 0.

Folie 13 zeigt die Wiederfindungsfunktion aus Gesamtkalibrierung 1 und Gesamtkalibrierung 2 für EDTA.

$$f: y = 1,06 x$$

Diese Wiederfindungsfunktion beschreibt folgenden Zusammenhang:

Die Steigung für  $b(\text{gesamt1})$  liegt innerhalb des Vertrauensbereichs für  $b(\text{gesamt2})$ ;

Der Vertrauensbereich für  $b_f$  beinhaltet den Wert 1;

Der Achsenabschnitt für  $a(\text{gesamt1})$  liegt innerhalb des Vertrauensbereichs für  $a(\text{gesamt2})$ ; Der Vertrauensbereich für  $a_f$  beinhaltet den Wert 0;

Folie 14 zeigt den oben beschriebenen Zusammenhang für NTA;

$$f: y = 0,99 x$$

$b_f$ .....Steigung der Wiederfindungsfunktion

$a_f$ .....Achsenabschnitt der Wiederfindungsfunktion

$b(\text{gesamt1})$ .....Steigung der Gesamtkalibrierung 1

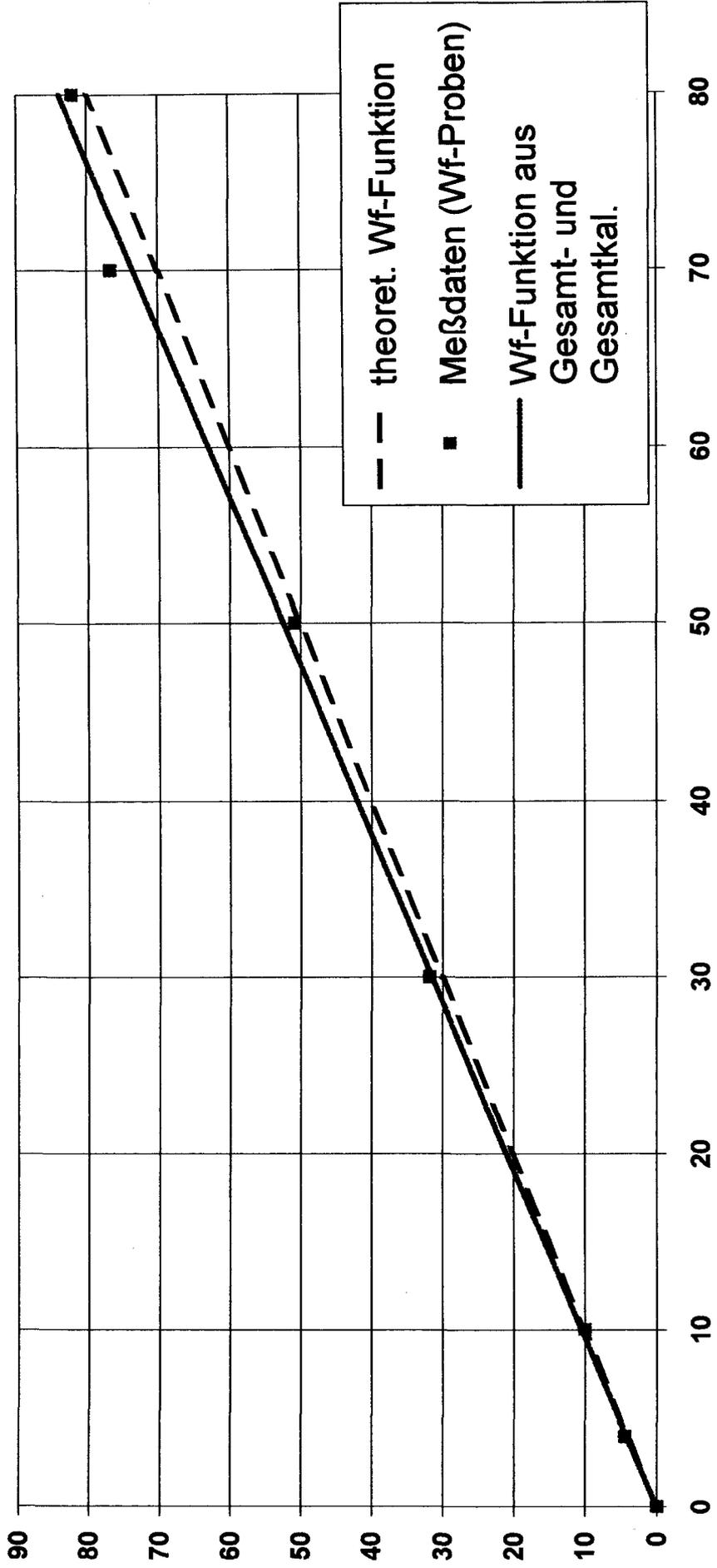
$b(\text{gesamt2})$ .....Steigung der Gesamtkalibrierung 2

$a(\text{gesamt1})$ .....Achsenabschnitt der Gesamtkalibrierung 1

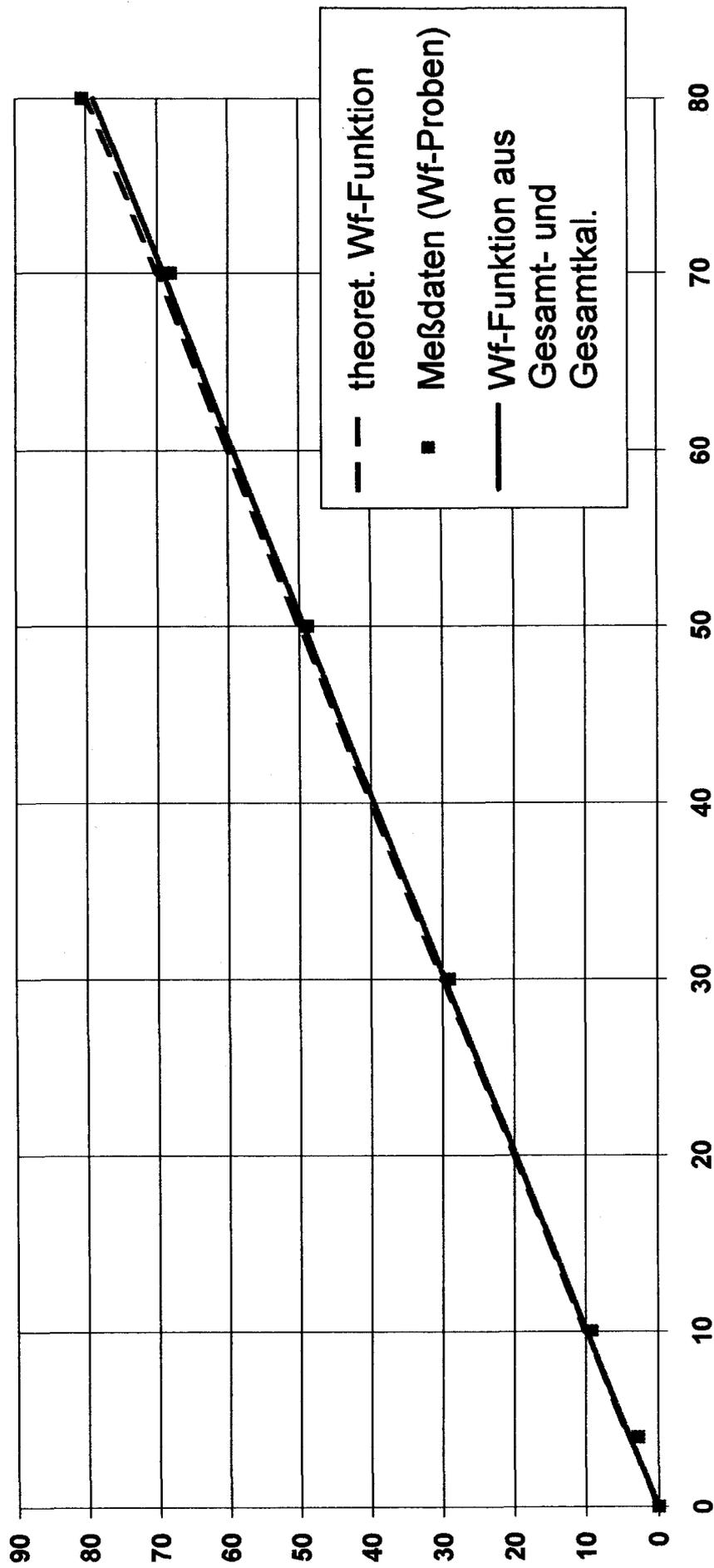
$a(\text{gesamt2})$ .....Achsenabschnitt der Gesamtkalibrierung 2

# EDTA

## Vergleich zweier Gesamtkalibrationen mittels Wiederfindungsfunktion



## Vergleich zweier Gesamtkalibrationen mittels Wiederfindungsfunktion



## **2) Wiederfindungsproben**

Zu je zehn Proben wurde mindestens eine Wiederfindungsprobe bestimmt.

### ***Kontrolle der Wiederfindungsproben:***

Es wurde darauf geachtet, daß die Wiederfindungsrate dieser Wiederfindungsprobe im Vertrauensbereich der mittleren Wiederfindungsrate liegt.

Ferner wurde kontrolliert, ob der Mittelwert der jeweiligen Wiederfindungsprobe, ermittelt mit der Kapillarsäule DB-1301, im Vertrauensintervall des Mittelwertes der Wiederfindungsprobe, ermittelt mit der Kapillarsäule SPB-608, liegt.

## **3) Blindproben**

Zu je zehn Proben wurde eine Blindprobe bestimmt.

### ***Anmerkung 3:***

*Herstellung der Wiederfindungsproben und Blindproben siehe "Kurzbeschreibung der Methode" bzw. "Probenvorbereitung".*

#### 4) Doppelbestimmungen

Von Proben, deren Gehalt an NTA bzw. EDTA über der Bestimmungsgrenze lag, wurde eine **zweite Meßprobe ("Doppelbestimmung")** hergestellt und analog zur Erstprobe auf zwei Kapillarsäulen (DB-1301, SPB-608) quantifiziert.

Für diese Proben wurde zu jeder Säule aus den Einzelergebnissen der zwei Meßproben ein Mittelwert und der dazugehörige Vertrauensbereich berechnet.

Es wurde verglichen, ob der Mittelwert, der mit der Trennsäule SPB-608 erhalten wurde, im Vertrauensbereich des Mittelwertes, der mit der Trennsäule DB-1301 ermittelt wurde, liegt.

# Bestimmung von EDTA und NTA in Wasserproben mittels Gaschromatographie

## Anwendungsbereich

Bestimmung von EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure) und NTA (Nitrilotriessigsäure) in Wasserproben. Die Methode kann für Konzentrationen ab 10 µg/l EDTA bzw. 6 µg/l NTA eingesetzt werden.

## Interferenzen

Die Kapazität des Ionenaustauschers beträgt ca. 4 mequ/g. Dieser Wert stellt einen limitierenden Faktor für die Anwendung dieser Methode in Hinblick auf den Salzgehalt der Probe dar. Wasser mit einer spez. el. Leitfähigkeit von > 1mS müssen daher vor der Analyse so verdünnt werden, daß sie diese Leitfähigkeit unterschreiten.

## Referenzen

- 1) Arbeitskreis d. Fachgruppe Wasserchemie (Bonnekessel, BASF; Brauch, T.K. Karlsruhe; Dietz, Ruhrverband; Giger, EAWA; Hansen, WaBoLu; Reichert, RWTH Aachen; Rottiers, Procter & Gamble; Leitung: N.T. de Oude, Procter & Gamble), "Bestimmung von Nitrilotriessigsäure mittels Gaschromatographie", DEV, 14. Lieferung, P 3, 1985
- 2) Landesamt für Wasser und Abfall, NRW, "Bestimmung von NTA und EDTA in Wasser (nach DEV, P 3, Blaudruck, 1985)"

## Grundzüge des Verfahrens

- 1) Anreicherung der Anionen von NTA und EDTA an einem in der Formiat-Form befindlichen stark basischen Anionenaustauscher
- 2) Elution mit 16 M Ameisensäure
- 3) Eindampfen zur Trockne
- 4) Veresterung von NTA und EDTA zu NTA-tri-n-butylester und EDTA-tetra-n-butylester mit 1-Butanol
- 5) Aufnahme mit Wasser, Zugabe von n-Hexan und Extraktion, Phasentrennung
- 6) Organische Phase wird an den Labor Koordinator (Dr. Hobiger) nach Wien versendet

## G e r ä t e

### Ionenaustauschersäulen

(Sonderanfertigung: mit PTFE-Hahn, 8mm Innendurchmesser, mit Einstichen, Nutzlänge 200 mm, Vorratsgefäß 100 ml (NS 29,2))

### Bechergläser

(diverse)

### Gaswaschflaschen

250 ml mit NS 29,2/32; mit Einsätzen (Glasrohr ohne Fritte)

### Spitzkolben mit Normschliffstopfen

50 ml mit NS 14,5

### Übergangsstücke

NS 14,5 (Kern) auf 29,2 (Hülse)

### Wasserbad

Julabo SW 1

### Pasteurpipetten

### Rotationsverdampfer

Büchi RE 121; Resona Technics Labo Rota SE 320

### Vakuostat

Vacu-Box, PVK 600 MLT AG Labortechnik

### Umlaufkühlung

Resona Technics Coolstar SC-500

### Ölbad

Fa. Memmert, 50-200°C

### Vollpipetten

Volumen: 50 ml, 20 ml u. a.

### Pipetten mit variablem Volumen und PP-Spitzen

Pipetman, Gilson, max. 5000 ml; Eppendorf-Pipette

### Pipetten mit PP-Spitzen

Eppendorf, 50 µl; Eppendorf, 1000 µl

### Mikropipetten

Socorex: Nennvolumen 10-50 µl, 50-100 µl

### pH-Meter samt Einstabmeßkette

z. B. Orion EA 940

### Meßkolben

50 ml, 100 ml, 1000 ml, u. a.

### Hamiltonspritze

1000 µl (5000 µl)

### 4ml-Schraubvials mit Septum und Verschuß

## R e a g e n z i e n l i s t e

Ameisensäure	98-100%; HCOOH p.a. Merck Art. 264
Anionenaustauscher	stark basisch, Amberlite CG-400, 100-200 mesh; Fluka 06438
Stickstoff	N <sub>2</sub> , AGA, 4.6
1-Butanol	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH, >99,5 % p.a. Merck 1990
Acetylchlorid	CH <sub>3</sub> COCl, >99%, p.a.; Merck Art. 31
n-Hexan	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> , >99%, p.a. Merck Art. 4367
Heptadecansäurenitril	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> CN, Fluka Art. 51650 (Assay >98%(GC))
Nitrilotriessigsäure (NTA)	N(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>3</sub> , "Titriplex I", p.a. >99%, Merck Art. Nr. 8416
Ethylendinitrilotetraessig- säure (EDTA), Di-Natriumsalz- -Dihydrat	p.a. >99% "Titriplex III", NaH(CH <sub>2</sub> COO) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> COO) <sub>2</sub> HNa. 2H <sub>2</sub> O (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O), Merck Art. Nr. 8418
Nitrilotriessigsäure, Trinatriumsalz-Hydrat	N(CH <sub>2</sub> COO Na) <sub>3</sub> 99+% "Gold Marke" Aldrich-Chemie Art. Nr. 10,630-5
Wasser	H <sub>2</sub> O, Reinstwasser ca. 18 MΩ; Reinigung durch Millipore "Ultra Pure Water System"

Formaldehydlösung wird bei der Probenahme eingesetzt - (37%, p.a.)

# R e a g e n z i e n z u b e r e i t u n g e n

## Herstellung von 16 M Ameisensäure

604 ml Ameisensäure werden in einem 1000 ml Meßkolben bis zur Marke aufgefüllt.

## Überführung des Anionenaustauschers von der Chlorid- in die Formiat-Form

Diese Operationen sind unmittelbar vor der Probenvorbereitung auszuführen:

- 1) Amberlit (Cl<sup>-</sup>Form) wird mit 16 M Ameisensäure aufgeschlämmt und 15 - 30 Minuten stehen gelassen.
- 2) Die Ionenaustauschersäulen werden am unteren Ende mit einem locker gepackten Glaswollebausch versehen. An der Säule wird 8 cm über der Glaswolle eine Markierung angebracht.
- 3) Der vorbereitete Amberlit wird in die Säulen bis zur Marke eingefüllt.
- 4) Das Reservoir der Ionenaustauschersäulen wird zu etwa 2/3 mit 16 M Ameisensäure gefüllt und letztere durch den Ionenaustauscher gespült. Unter Klopfen wird das Harz komprimiert.
- 5) Das Reservoir wird mit Reinstwasser gefüllt und die Säulen gespült (pH-Kontrolle). Der pH-Wert des Wassers nach dem Passieren des Ionenaustauschers soll am Ende des Waschvorganges bei  $5 \pm 0,5$  liegen.
- 6) Der Ionenaustauscher ist somit für die Probenaufgabe vorbereitet.

Achtung!

Das Austauschharz darf niemals trockenlaufen!  
Arbeiten mit Ameisensäure bei Verwendung offener Gefäße dürfen nur unter dem Abzug vorgenommen werden!

## Veresterungsreagens

45 ml n-Butanol werden in einer 100 ml Weithals-Schliff-Flasche aus Duran-Glas (Schott) vorgelegt. Unter Schütteln wird auf dem Eisbad 5 ml Acetylchlorid zugegeben und die Flasche mit einem Normschliffstopfen verschlossen.

Vorsicht: Bei zu rascher Zugabe des Acetylchlorids oder bei ineffizienter Kühlung kann starke Erwärmung eintreten!  
Acetylchlorid ist eine ätzende, inhalationstoxische und feuergefährliche Chemikalie!  
1-Butanol ist brennbar!

Das Reagens ist mindestens eine Woche lang haltbar.

## Stammlösung für Kalibration (EDTA/NTA)

1,2737 g Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat und 1,0000 g Nitrilotriessigsäure (1,4393 g Trinatriumsalz-Hydrat) werden in einen 1000-ml-Meßkolben eingewogen. Der Meßkolben wird mit Reinstwasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Stammlösung enthält 1000 mg EDTA und 1000 mg NTA pro Liter.

## D u r c h f ü h r u n g

Der Arbeitsablauf der Probenvorbereitung beginnt mit der Lieferung der fixierten Proben per Bahnexpress in das Labor der UBA-Zweigstelle West.

- 1) Je 100 ml Wasserprobe werden in Gaswaschflaschen gefüllt und mit 16 M Ameisensäure auf einen pH von 2,8 bis 3,0 eingestellt. Die Überprüfung des pH erfolgt potentiometrisch.
  - 2) Die Waschflaschen werden mit den Einsätzen versehen, in ein auf 65°C temperiertes Wasserbad gestellt. Durch die Proben wird zur Entgasung 1/2 Stunde lang Stickstoff geleitet.
  - 3) Die ausgegasten Proben werden auf Raumtemperatur abgekühlt und in die Reservoirs der vorbereiteten Ionenaustauschersäulen aufgegeben. Die Waschflaschen werden mit einer Minimalmenge Reinstwasser nachgespült und die so erhaltenen Spülwässer ebenfalls in den Reservoirs mit den bereits aufgegebenen Proben vereinigt.
  - 4) Der Inhalt der Reservoirs muß die Ionenaustauschersäulen passieren. Die Analyten werden am Ionenaustauscher gebunden. Die aus den Ionenaustauschersäulen tropfende Flüssigkeit wird in Bechergläsern gesammelt und verworfen.
  - 5) Unter die Säulen werden 50-cm<sup>3</sup>-Spitzkolben gestellt (auf Korkringen).
  - 6) Die Reservoirs werden mit jeweils 40 ml 16 M Ameisensäure beschickt. Mit einer Tropfgeschwindigkeit von etwa 10 Tropfen pro Minute werden die Ionenaustauschersäulen eluiert und die Eluate in den Spitzkolben gesammelt.
  - 7) Die Spitzkolben werden mittels Übergangsstücken (Kern 14,5 - Hülse NS29) am Rotavapor angebracht. Bei einer Temperatur von 78°C und maximaler Rotationsgeschwindigkeit bei einem Druck von anfangs ca. 300 mbar bis ca. 130 mbar am Ende werden die Eluate auf ca. 0,5 ml Volumen eingeeengt.
- An dieser Stelle des Verfahrensablaufes besteht die einzige Möglichkeit, die Probenvorbereitung zu unterbrechen. Die eingeeengten Eluate sind mindestens 72 Stunden haltbar.
- 8) In die Spitzkolben wird Stickstoff mittels Pasteurpipetten bis zur Trockne des Inhalts eingeblasen.

- 9) Mittels Eppendorf-Pipette (oder Gilson/Pipetman-Pipette) werden 2 ml Veresterungsreagens unter Drehen des Spitzkolbens von oben entlang der Kolbenwandung einfließen gelassen.
- 10) Die Spitzkolben werden mit Normschliff-Stopfen verschlossen und 1 Stunde lang bei 90°C im Ölbad thermostatisiert.
- 11) Nach dem Abkühlen wird 20 ml Reinstwasser zugegeben, kräftig geschüttelt und die Flüssigkeit mittels Gilson/Pipetman-Pipette in 50-ml-Meßkolben überführt. Die Spitzkolben werden zweimal mit ca. 10 ml Wasser nachgespült und diese Spülwasser ebenfalls mittels Pipette in die 50-ml-Meßkolben überführt.
- 12) In den Meßkolben wird mittels Hamiltonspritze (1000 µl) 1 ml n-Hexan zugegeben. Die Kolben werden kräftig (2 Minuten) geschüttelt und nach der Phasentrennung die Hexanphase mittels Pipette mit PP-Spitze (1-ml-Eppendorf-Pipette) abgehebert. Die Hexanphase wird in einem 4-ml-Vial mit Septum und Schraubverschluß gesammelt. Die Extraktion wird zweimal wiederholt und die Hexanphase in dasselbe Vial überführt.
- 13) Die Vials mit den Hexanphasen werden - stets kühl gehalten - nach Wien versendet.

#### K a l i b r i e r u n g

Die 1000-mg/l-EDTA/NTA Stammlösung wird auf 4, 10, 30, 50, 70 sowie 80 µg/l mit Reinstwasser verdünnt. Die so erhaltenen Kalibrationslösungen werden exakt wie die Proben dem Gesamtverfahren (s. Durchführung) unterzogen. Dasselbe gilt für die Blindproben. Für die Bestimmung der Blindwerte wird anstelle der Kalibrationslösungen Reinstwasser eingesetzt.

## GC-ANALYSE:

Gaschromatographische Endbestimmung mit Stickstoff-Phosphor-Detektor nach interner Standardmethode auf 2 Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität.  
 Interner Standard: Heptadecansäurenitril in n-Hexan (20ng/µl)

### Analysenbedingungen:

**Säule 1:** DB 1301 0,25µm Filmdicke 60m 0,32mm I.D.  
**Injektor:** 280°C  
**Detektor:** NPD 280°C  
 Make Up: 1,4bar  
 H<sub>2</sub>: 0,7 bar  
 Air: 0,9 bar  
**Temp.Progr:** 1 Minute bei 60°C  
 von 60°C auf 197°C mit 20,0°/min.  
 von 197°C auf 285°C mit 8,0°/min.  
 17 Minuten bei 285°C

**Säule 2:** SPB 608 0,25µm Filmdicke 30m 0,25mm I.D.  
**Injektor:** 280°C  
**Detektor:** NPD 285°C  
 Make Up: 1,4bar  
 H<sub>2</sub>: 0,7 bar  
 Air: 0,9 bar  
**Temp.Progr:** 1 Minute bei 60°C  
 von 60°C auf 200°C mit 20,0°/min.  
 von 200°C auf 285°C mit 8,0°/min.  
 20 Minuten bei 285°C

### Kenndaten des Gesamtverfahrens:

Kenndaten	NTA		EDTA	
	DB 1301	SPB 608	DB1301	SPB608
Arbeitsbereich	3-80µg/l		4-80µg/l	
Steigung	0,048	0,048	0,045	0,046
Achsenabschnitt	0,003	0,035	0,022	-0,032
Reststandardabw.	0,0854	0,0879	0,1403	0,1628
rel. Verfahrensstandardabw. [%]	5,1	5,8	8,4	11,7
NWG/LID [µg/l]	2,3	2,0	3,3	3,5
BG/LIQ [µg/l]	4,6	4,1	6,6	7,0

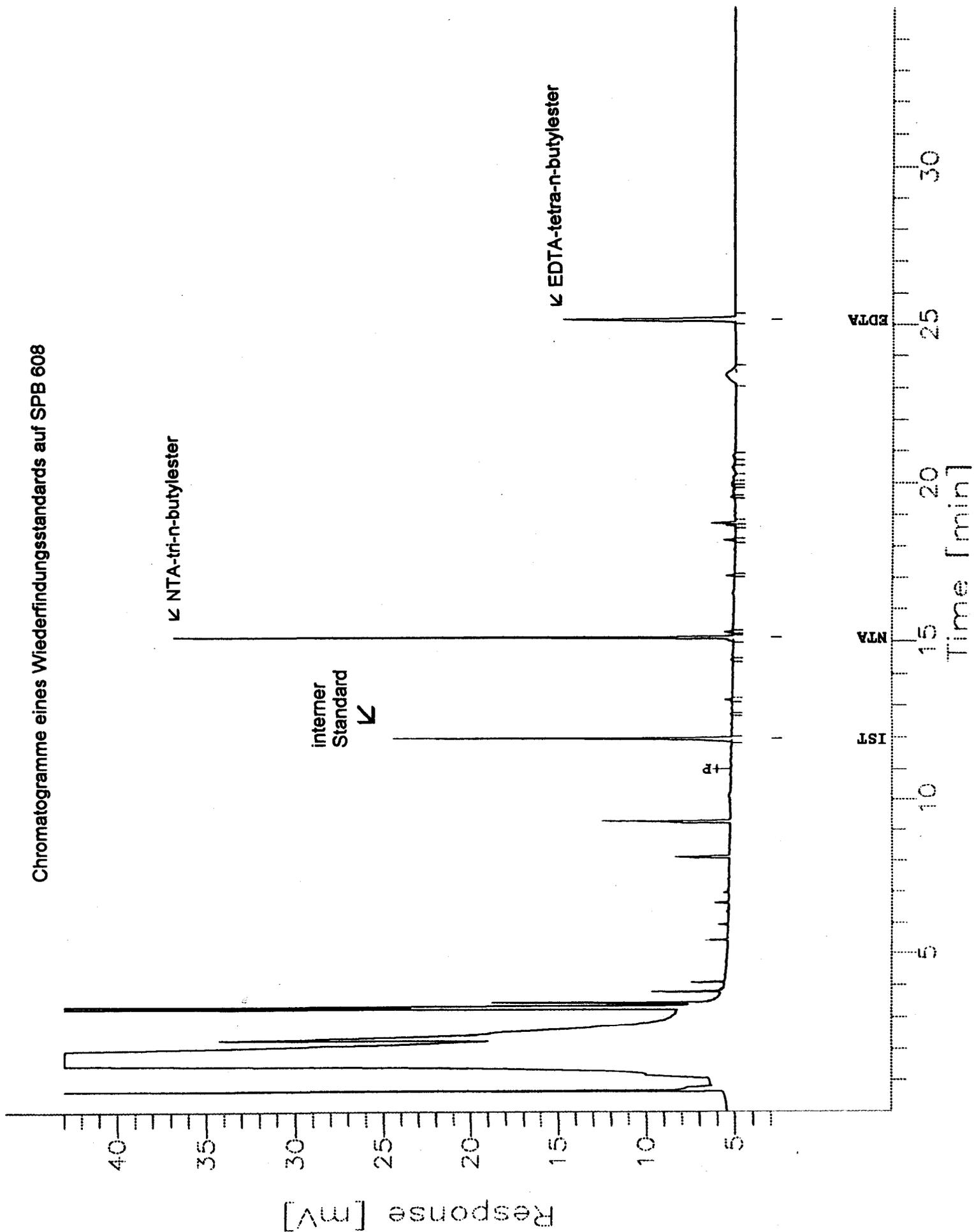
# Chromatogram

Sample Name : C30/50  
FileName : K:\DATA5\T51M004.RAW  
Method : fne5.ins  
Start Time : 0.00 min  
Scale Factor: 0.0

End Time : 35.00 min  
Plot Offset: 3 mV

Sample #: 4  
Date : 13/06/1994 12:40  
Time of Injection: 31/03/1994 12:08  
Low Point : 3.00 mV  
High Point : 43.00 mV  
Plot Scale: 40.0 mV

Chromatogramme eines Wiederfindungsstandards auf SPB 608



# Chromatogram

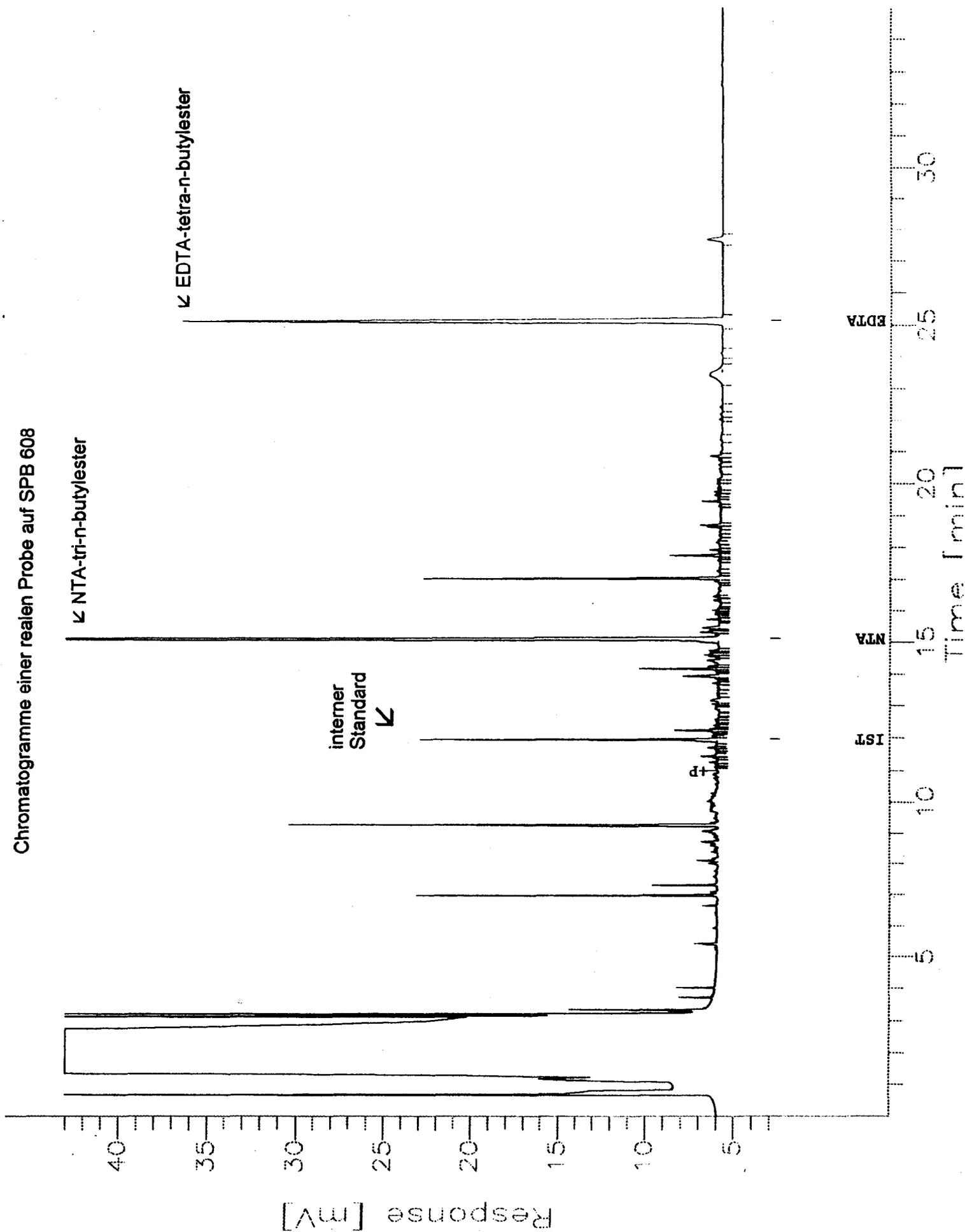
Sample Name : W9403 0231  
FileName : K:\DATA5\T51P003.RAW  
Method : fne5.ins  
Start Time : 0.00 min  
Scale Factor: 0.0

End Time : 35.00 min  
Plot Offset: 3 mV

Sample #: 3  
Date : 13/06/1994 12:51  
Time of Injection: 05/04/1994 15:31  
Low Point : 3.00 mV  
High Point : 43.00 mV  
Plot Scale: 40.0 mV

Page 1 of 1

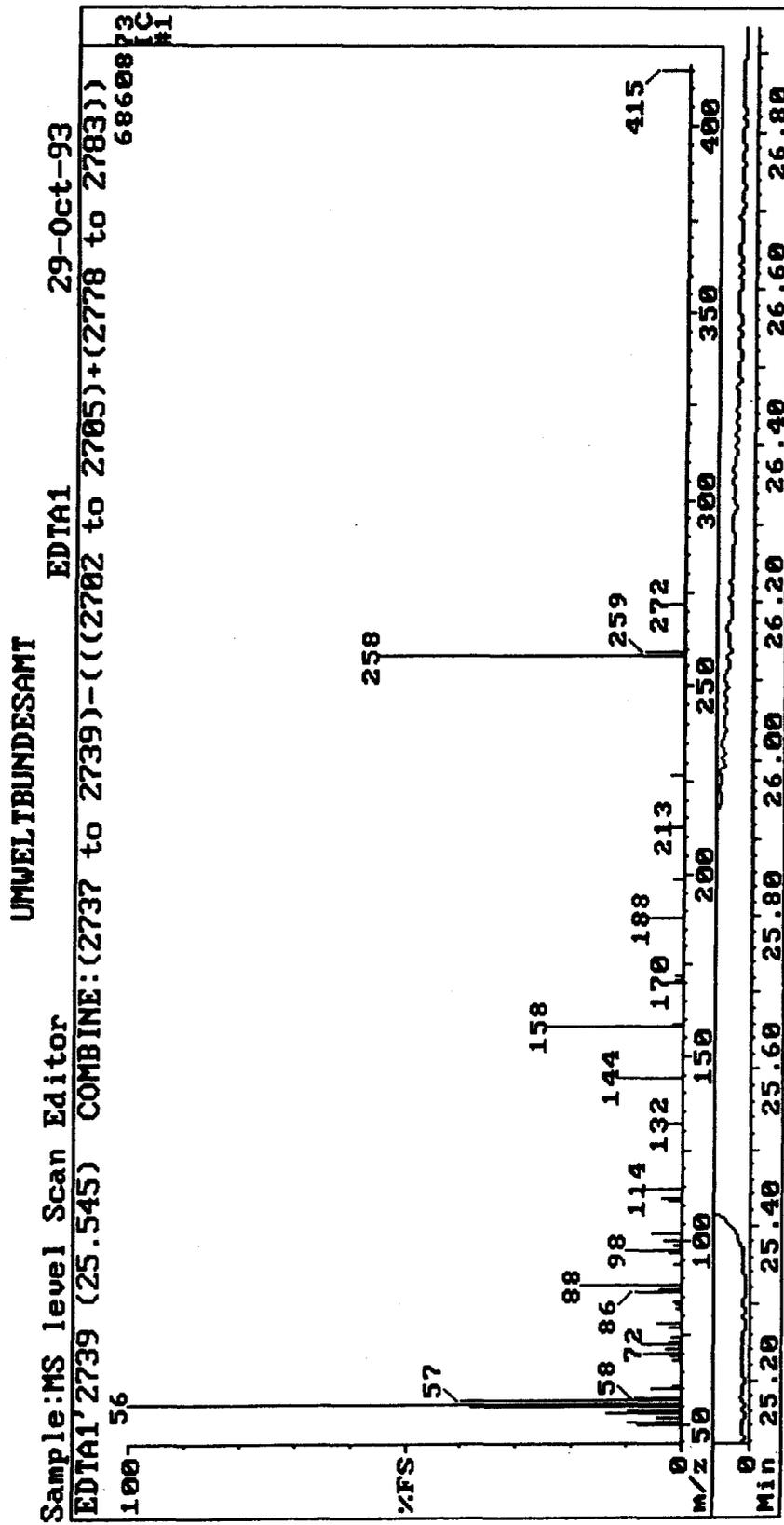
Chromatogramme einer realen Probe auf SPB 608



Massenspektrum des EDTA-tetra-n-butylesters (M/Z = 516)

Säule: SPB 608

Fissions: Trio 1000  
Mass Range 50 - 600  
Scan Time 0,5s  
Interscan 0,15s



Massenspektrum des NTA-tetra-n-butylesters (M/Z = 359)

Säule: SPB 608

Fisions: Trio 1000  
Mass Range 50 - 600  
Scan Time 0,5s  
Interscan 0,15s

UMWELTBUNDESAMT

NTA 29-Oct-93

Sample:MS level Scan Editor  
NTA 1541 (16.559)

