

Validierung und Vergleich einer gas- und flüssigchromatographischen Methode zur Messung schwerflüchtiger PAK

J. Linke, D. Breuer

KURZFASSUNG Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind aufgrund ihres ubiquitären Auftretens im Alltag und an verschiedenen Arbeitsplätzen sowie ihrer persistenten, bioakkumulierenden und toxischen Eigenschaften von besonderer Relevanz für den Arbeits- und Umweltschutz. Hauptsächlich werden dabei die 16 PAK analysiert, die in den 1970er-Jahren von der US-amerikanischen Environmental Protection Agency (EPA) priorisiert wurden. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass höhermolekulare PAK (mindestens Fünf-Ring-Systeme), die in der Routineanalytik für gewöhnlich nicht untersucht werden, ein teils deutlich höheres karzinogenes Potenzial aufweisen. Um diese PAK analysieren zu können, sind entsprechende Methoden notwendig. In diesem Projekt wurden daher eine gaschromatographische (GC) sowie eine flüssigchromatographische (HPLC) Methode entwickelt und anhand von Kenndaten wie den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie der Linearität miteinander verglichen. Bei der Auswahl der Analyten lag der Fokus auf PAK mit mindestens fünf Ringen und alkylierten PAK. Der Vergleich der beiden Methoden entspricht den Erwartungen, dass die entwickelte GC-Methode durch die Kopplung mit einem Massenspektrometer eine höhere Empfindlichkeit erzielt, wobei diese mit steigender molarer Masse der Analyten abnimmt. Die für die HPLC entwickelte Methode hingegen weist auch bei den höhermolekularen PAK eine gute Empfindlichkeit auf, ist jedoch aufgrund fehlender Linearität bei hohen Konzentrationen in ihrem Messbereich eingeschränkt. Welche der beiden Methoden eher für die Routineanalytik geeignet ist, muss aufgrund der stark unterschiedlichen Analysezeiten – ca. zwei Stunden für GC und ca. 32 Minuten für HPLC – abgewogen werden.

Validation and comparison of a gas- and liquid chromatographic method for the analysis of non-volatile PAHs

ABSTRACT Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are of particular relevance for occupational safety and environmental protection due to their ubiquitous occurrence in everyday life and at various workplaces and their persistent, bioaccumulative and toxic properties. Mainly the 16 PAHs prioritized by the US Environmental Protection Agency (EPA) are analyzed. However, it is now known that higher-molecular weight PAHs (at least five-ring systems), which are usually not examined in routine analysis, exhibit a, sometimes significantly higher carcinogenic potential. In order to analyze these PAHs, appropriate methods are necessary. Therefore, a gas chromatographic (GC) and a liquid chromatographic (HPLC) method were developed and compared based on characteristics like the limits of detection and quantification and the linearity. For the selection of analytes, PAHs with at least five rings and alkylated PAHs were focused. The comparison of the methods was in line with expectations, as the GC method achieved a higher sensitivity due to the coupled mass spectrometer, although this sensitivity decreased with increasing molar mass of the analytes. The method developed for HPLC, on the other hand, shows good sensitivity even for higher-molecular mass PAHs, but is limited in its concentration range due to a lack of linearity at high concentrations. Which of the two methods is better suited for routine analysis, must be thought over as the run times of the methods differ strongly (approx. two hours for GC and approx. 32 minutes for HPLC).

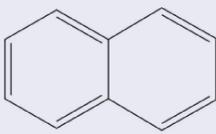
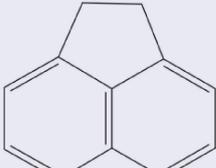
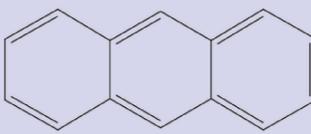
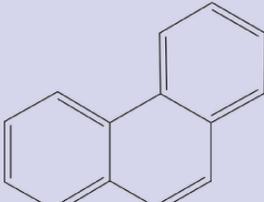
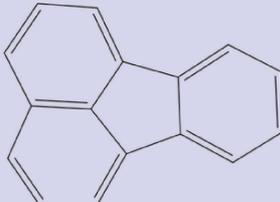
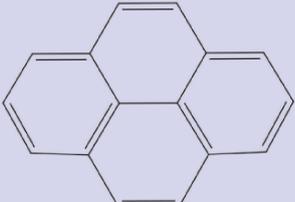
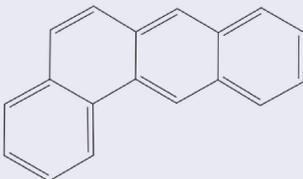
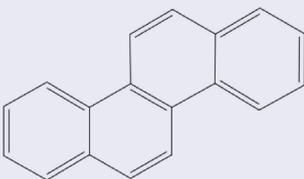
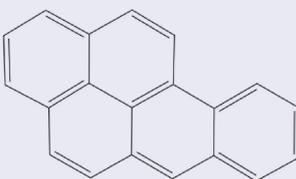
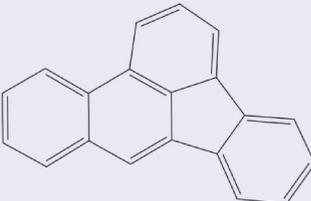
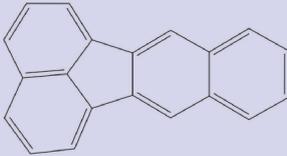
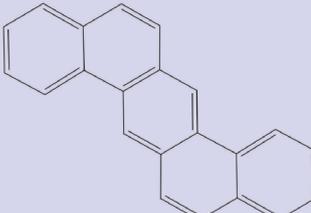
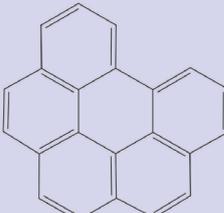
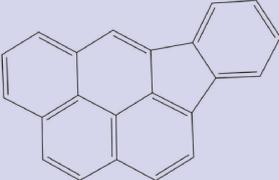
1 Einleitung

Die Analytik von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) ist bereits seit Jahrzehnten in der Routineanalytik von Umwelt- und Lebensmittel Laboren etabliert. Diese Stoffgruppe enthält viele karzinogene, mutagene und genotoxische Substanzen. Sie kommen ubiquitär vor, da sich PAK bei praktisch allen (unvollständigen) Verbrennungsprozessen wie Waldbränden bilden können. Im Alltag wurden PAK z. B. in Zigarettenrauch, Autoabgasen oder verschiedenen Lebensmitteln nachgewiesen [1]. PAK sind darüber hinaus an diversen Arbeitsplätzen zu finden, z. B. in Kokereien, in Teer oder Bitumen verarbeitenden Betrieben oder in der Aluminiumproduktion [2 bis 4]. Da diese Stoffgruppe aus Hunderten verschiedener Substanzen besteht, wurde in den 1970er-Jahren von der US-amerikanischen

Environmental Protection Agency (EPA) eine Liste von 16 zu priorisierenden PAK veröffentlicht [5]. Diese sogenannten EPA-PAK (**Tabelle 1**) werden routinemäßig analysiert. Als wichtigster Vertreter dieser Stoffgruppe ist Benzo[a]pyren (BaP) hervorzuheben, da es als Leitsubstanz herangezogen wird und für das als einziger PAK eine Akzeptanz- und Toleranzkonzentration (AK und TK) nach der Technischen Regel für Gefahrstoffe (TRGS) 910 abgeleitet wurde [6]. Die AK liegt aktuell für ein Risikoniveau von 4:10 000 bei 70 ng/m³ in der einatembaren Fraktion.

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die höhermolekularen (high-molecular weight, HMW) PAK ein größeres karzinogenes Potenzial haben als die niedermolekularen PAK [7]. Da die EPA-PAK mit ihrem hohen Anteil an niedermolekularen PAK somit nicht das gesamte karzinogene

Tabelle 1 Strukturformeln der 16 EPA-PAK.

			
Naphthalin	Acenaphthylen	Acenaphthen	Fluoren
			
Anthracen	Phenanthren	Fluoranthren	Pyren
			
Benzo[a]anthracen	Chrysen	Benzo[a]pyren	Benzo[b]fluoranthren
			
Benzo[k]fluoranthren	Dibenz[a,h]anthracen	Benzo[g,h,i]perylen	Indeno[1,2,3-c,d]pyren

Potenzial einer Probe darstellen, vertreten immer mehr Forschende die Meinung, dass die Liste der EPA-PAK aktualisiert und um alkylierte und HMW-PAK sowie um heterozyklische Verbindungen ergänzt werden sollte [8].

Damit diese Substanzen in der Routineanalytik inkludiert werden können, müssen die vorhandenen analytischen Methoden angepasst werden. Die Analytik der EPA-PAK ist sowohl für Gaschromatographen (GC) in Kopplung mit einem Massenspektrometer (GC-MS) als auch für Flüssigchromatographie-Systeme (high performance liquid chromatography, HPLC) bereits etabliert. Auch ein Vergleich hinsichtlich der Sensitivität und Trennleistung beider Systeme wurde bereits gezogen [9]. Doch inwiefern bereits bestehende Methoden angepasst werden müssen, um eine erweiterte PAK-Liste als mögliche Ergänzung zu den bestehenden EPA-PAK zu analysieren, und welches der beiden Trennsysteme besser geeignet ist, wurde bisher noch nicht untersucht.

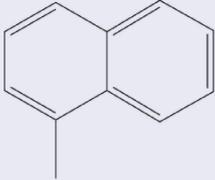
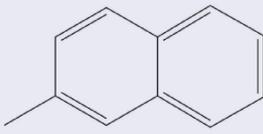
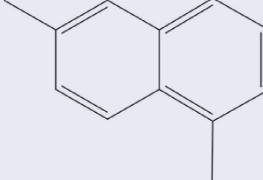
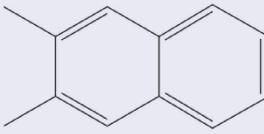
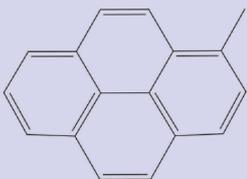
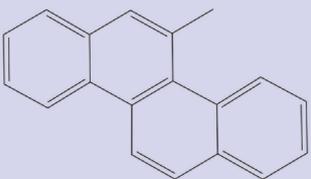
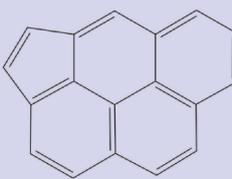
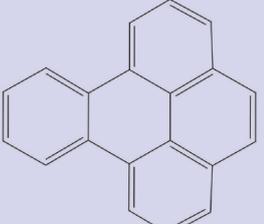
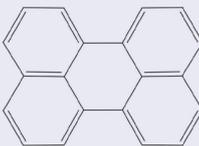
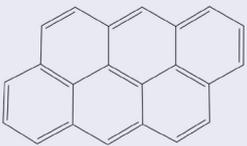
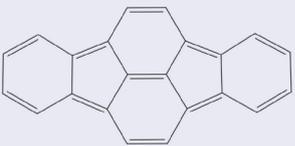
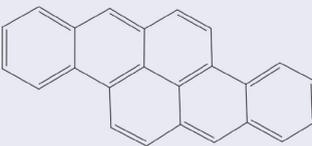
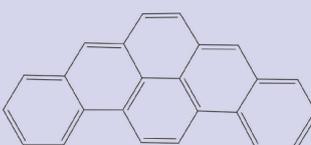
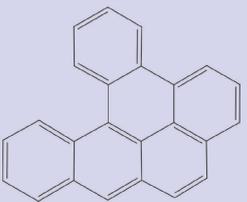
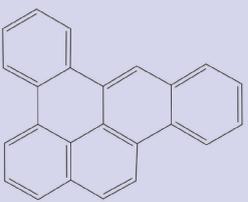
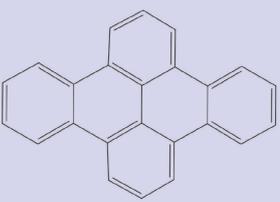
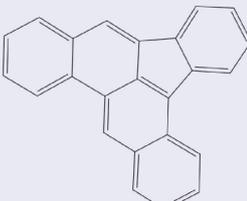
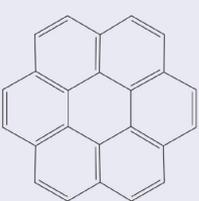
In diesem Projekt wurden daher zwei analytische Methoden entwickelt, jeweils für ein GC-MS und einen HPLC unter Verwendung eines Diodenarraydetektors (DAD) und eines Fluoreszenzdetektors (FLD). Mit beiden Systemen können sowohl die 16 EPA-PAK als auch eine Auswahl von nicht-EPA-PAK analysiert werden. Dabei wurde eine (partielle) Methodenvalidierung durchgeführt, um die beiden Methoden im Hinblick auf Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die Trennleistung miteinander zu vergleichen.

2 Auswahl der PAK und des Messbereichs

In einer Veröffentlichung von *Andersson* und *Achten* aus dem Jahr 2015 [8] wurde bereits eine Liste von nicht-EPA-PAK veröffentlicht, die in die Routineanalytik aufgenommen werden könnten. Basierend auf dieser Liste und auf eigener Recherche wurden 18 PAK für dieses Projekt ausgewählt. Der Fokus lag dabei vor allem auf HMW-PAK, also Kohlenwasserstoffen mit fünf oder mehr Ringen. Außerdem sollten alkylierte und mehrfach alkylierte PAK inkludiert sein. Bevorzugt wurden dabei Substanzen, die von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) bzw. nach dem Global Harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS) als krebserregend bzw. krebverdächtig eingestuft sind. Die Verfügbarkeit von analytischen Standards war ein weiteres Kriterium bei der Auswahl der Analyten. Eine Liste der im Rahmen dieser Studie ausgewählten nicht-EPA-PAK und ihrer Strukturformeln ist in **Tabelle 2** zu finden.

Hinsichtlich des zu untersuchenden Messbereichs wurden die Vorgaben der TRGS 402 herangezogen [10]. Diese geben einen Mindestmessbereich von $0,2 \times AK$ bis $2 \times TK$ vor. Das Standardmessverfahren des Messsystems Gefährdungsermittlung der Unfallversicherungsträger (MGU) verwendet für schwerflüchtige PAK einen GSP10-Probenahmekopf [11]. Geht man von einer zweistündigen Probenahme mit einem Volumenstrom von

Tabelle 2 Strukturformeln der ausgewählten höhermolekularen und alkylierten PAK.

			
1-Methylnaphthalin	2-Methylnaphthalin	1,6-Dimethylnaphthalin	2,3-Dimethylnaphthalin
			
1-Methylpyren	5-Methylchrysen	Cyclopenta[cd]pyren	Benzo[e]pyren
			
Perylen	Anthanthren	Indeno[1,2,3-c,d]fluoranthren	Dibenzo[a,h]pyren
			
Dibenzo[a,i]pyren	Dibenzo[a,l]pyren	Dibenzo[a,e]pyren	Dibenzo[e,l]pyren
			
Dibenzo[a,e]-fluoranthren	Coronen		

10 l/min aus, ergibt sich ein Probeluftvolumen von 1 200 l bzw. 1,2 m³. Bei einem Extraktionsvolumen von 2 ml entspricht dies für BaP einem Bereich von 8,4 bis 840 ng/ml. Demnach muss die Bestimmungsgrenze unterhalb dieses Bereichs liegen, damit die Anforderungen der TRGS 402 erfüllt sind. Da nur für BaP Grenzwerte in Form der AK und TK vorliegen, wird dieser Messbereich auch für alle anderen PAK verwendet.

3 Verwendete Geräte und Chemikalien

Das verwendete GC-System ist ein Agilent 8890 gekoppelt mit einem Agilent 5977B MSD Single Quadrupol-Massenspektrometer. Die wichtigsten Kenndaten der beiden Geräte sind in **Tabelle 3** zusammengefasst.

Für die Identifikation der Analyten werden neben dem Quantifizier-Ion zwei Qualifizier-Ionen pro Analyt herangezogen. Zur Quantifizierung werden interne Standards in Form deuterierter

PAK verwendet: Naphthalin-D8, Chrysen-D12, BaP-D12 und Benzo[g,h,i]perylen-D12.

Das verwendete HPLC-System ist ein Agilent 1260 Infinity II LC-System und verfügt sowohl über einen DAD für die Messung im ultravioletten (UV)-Bereich als auch über einen FLD. Die genauen Methodenparameter sind im nachfolgenden Abschnitt zu finden.

Die Standards, die für die Methodenentwicklung und -validierung verwendet wurden, wiesen eine Reinheit von mindestens 94,2 % auf und wurden von verschiedenen Herstellern beschafft.

4 Methodenoptimierung

4.1 HPLC

Im Zuge der Methodenoptimierung wurde basierend auf der aktuell im Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen

Tabelle 3 Kenndaten des verwendeten GC-MS-Systems.

GC-MS-System	
Agilent 8890 GC-System	
Einlasssystem	Agilent Multimode Inlet (MMI)
Liner	Agilent Ultra Inert Liner für splitless Injektion mit Glaswolle
Säule	Agilent J&W DB-EUPAH, 60 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke
Trärgas	Helium
Agilent 5977B MSD	
Ionenquelle	Elektronenstoßionisation (EI)
Quellentemperatur	325 °C
Ionisierungsenergie	70 eV
Quadrupol-Temperatur	200 °C
Temperatur der MSD-Transferleitung	320 °C

Tabelle 4 Parameter der HPLC-Methoden für die Analytik der EPA-PAK sowie der ausgewählten nicht-EPA-PAK.

	Angepasste Methode	IFA-Routine-Methode
Säule	MZ-PAH C18, 5µm, 250 x 2,1mm	
Säulentemperatur	35 °C	25 °C
Eluent	Wasser (A) und Acetonitril (B)	Acetonitril/Wasser (65/35 v/v) (A) und Acetonitril (B)
Gradient	0 bis 3 min: 35 % A, 65 % B, 0.3 ml/min 3 bis 11 min: à 100 % B 11 bis 20 min: à 1.0 ml/min	0 bis 7 min: 100 % A 7 bis 17 min: à 100 % B 17 bis 32 min: 100 % B 32 min: à 100 % A
Laufzeit	25 + 7 min post run	37 min
Injektionsvolumen	10 µL	18 µL
DAD-Parameter	A: 225 nm B: 296 nm Referenz: 480 nm	Kein DAD
FLD-Parameter	Anregung: 260 nm Emission: A: 320 nm (ab 10 min: 502 nm) B: 405 nm C: 430 nm D: 452 nm PMT-Gain: 11	Anregung: 260 nm Emission: A: 320 nm (ab 16 min: 502 nm) B: 400 nm C: 430 nm D: 452 nm PMT-Gain: 11 (ab 28,5 min: 13)

Unfallversicherung (IFA) verwendeten Methode für die Analyse schwerflüchtiger PAK gearbeitet [12]. Die Parameter dieser Routinemethode sind in **Tabelle 4** zu finden.

Nach Herstellung eines Mischstandards aus den EPA-PAK und den ausgewählten nicht-EPA-PAK wurde die Methode zunächst hinsichtlich der Trennung der einzelnen Analyten optimiert. Dazu wurden sowohl der Laufmittelgradient aus Acetonitril und Wasser als auch der Flussgradient und die Temperatur der Trennsäule verändert. Anschließend wurde für jeden PAK ermittelt, welcher Detektor bzw. welche Wellenlänge am geeignetsten ist. Eine Zusammenfassung dessen sowie die entsprechenden Retentionszeiten sind in **Tabelle 5** zu finden. **Bild 1** zeigt ein

beispielhaftes Chromatogramm mit allen sechs aufgenommenen Wellenlängen.

Bis auf wenige Ausnahmen wurden alle PAK mittels FLD analysiert, da dieser generell eine höhere Sensitivität und Selektivität aufweist als der DAD [13]. Lediglich drei Substanzen, die nicht fluoreszieren bzw. deren Peaks im FLD nicht auswertbar sind, wurden mittels DAD untersucht. Von den Analyten mussten Indeno[1,2,3-c,d]fluoranthren und Dibenzo[e,l]pyren ausgeschlossen werden, da es zu Überlagerungen des Peaks mit dem Rauschen des Detektors kam bzw. da zum Zeitpunkt der Untersuchung kein HPLC-geeigneter Standard kommerziell erhältlich war.

Tabelle 5 Retentionszeiten (RT) der einzelnen PAK für die HPLC-Methode sowie das zur Quantifizierung verwendete Detektorsignal.

Substanz	RT in min	Detektorsignal in nm	Substanz	RT in min	Detektorsignal in nm
Naphthalin	4,6	FLD 320 (C)	Benzo[j]fluoranthen	14,1	FLD 320 (C)
Acenaphthylen	5,3	DAD 225 (A)	Benzo[e]pyren	14,2	FLD 405 (D)
1-Methylnaphthylin	5,9	DAD 225 (A)	Benzo[b]fluoranthen	14,3	FLD 430 (E)
2-Methylnaphthalin	6,3	FLD 320 (C)	Perylen	14,4	FLD 430 (E)
Acenaphthen	6,7	FLD 320 (C)	Benzo[k]fluoranthen	14,7	FLD 430 (E)
Fluoren	7,0	FLD 320 (C)	Benzo[a]pyren	15,0	FLD 405 (D)
2,3-Dimethylnaphthalin	7,9	FLD 405 (B)	Dibenzo[a,l]pyren	15,5	FLD 430 (E)
1,6-Dimethylnaphthalin	8,1	FLD 405 (B)	Dibenzo[a,h]anthracen	15,7	FLD 405 (D)
Phenanthren	8,2	FLD 405 (B)	Benzo[g,h,i]perylene	15,9	FLD 430 (E)
Anthracen	9,4	FLD 405 (B)	Dibenzo[a,e]fluoranthen	16,5	FLD 320 (C)
Fluoranthen	10,4	FLD 452 (F)	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	16,6	FLD 320 (C)
Pyren	11,3	FLD 405 (D)	Dibenzo[a,e]pyren	17,1	DAD 296 (B)
Cyclopenta[c,d]pyren	12,9	FLD 430 (E)	Anthanthren	18,1	FLD 430 (E)
1-Methylpyren	13,1	FLD 452 (F)	Coronen	19,5	FLD 452 (F)
Benzo[a]anthracen	13,2	FLD 452 (F)	Dibenzo[a,i]pyren	21,9	FLD 452 (F)
Chrysen	13,4	FLD 405 (D)	Dibenzo[a,h]pyren	24,4	FLD 452 (F)
5-Methylchrysen	13,7	FLD 405 (D)			

Die finalen Parameter der überarbeiteten und der im IFA bisher etablierten HPLC-Methoden sind in Tabelle 4 zu finden.

4.2 GCMS

Für die Entwicklung der GCMS-Methode wurde zunächst eine Methode der Fa. Agilent für die Analytik von PAK verwendet. Die exakten Parameter für diese Methode sind in der Application Note „Analyse von durch die Europäische Union geregelten polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (EU-PAK) mit dem Agilent 8890 GC-System“ zu finden [14].

Zunächst ist durch die Ergänzung um höhermolekulare PAK eine Verlängerung der Haltedauer der finalen Temperatur notwendig, da insbesondere die Dibenzopyren-Isomere und Coronen erst sehr spät eluieren. Um die Analysenzeit so kurz wie möglich zu halten, wurde die Fließgeschwindigkeit auf 1,5 ml/min erhöht. Auch das Ofenprogramm – also die Geschwindigkeit, mit der der Säulenofen aufgeheizt wird, sowie die Haltedauer – wurde angepasst, um die Analysenzeit zu reduzieren und die Trennung zu verbessern.

Da das verwendete GC-System mit einem programmed temperature vaporizer (PTV)-Inlet ausgestattet ist, wurde statt der gepulsten splitlosen Injektion die Solvent-Vent-Injektion genutzt. Dadurch kann trotz einer Erhöhung des Injektionsvolumens eine saubere Peakform erzielt werden. Denn das Lösemittel, in dem die Analyten vorliegen, wird zunächst verdampft und gelangt nicht auf die Trennsäule. Durch Verwendung des PTV-Inlets ist außerdem die Injektion von acetonitrilhaltigen Proben möglich, die normalerweise nicht mittels GC-MS mit einer unpolaren Trennsäule analysiert werden sollten.

Abschließend wurden die MS-Parameter für die Detektion im selected ion monitoring (SIM)-Modus optimiert. **Tabelle 6** enthält die GC-MS-Parameter der final verwendeten Methode. Die gesamte Analysenzeit setzt sich zusammen aus der Laufzeit und dem abschließenden Abkühlen des Ofens sowie des Inlets auf die Ausgangstemperatur.

In **Bild 2** ist ein beispielhaftes Chromatogramm gezeigt mit dem Gesamtionenstrom einer Messung bei 100 ng/ml. In **Tabelle 7** sind die Retentionszeiten sowie die Quantifizier-Ionen der einzelnen PAK gelistet.

5 Ergebnisse der Methodvalidierung

5.1 Empfindlichkeit

Basierend auf den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, die im Rahmen der Methodvalidierung bestimmt werden, lassen sich Aussagen bezüglich der Empfindlichkeit eines Messsystems treffen. Die beiden Werte wurden durch eine Abschätzung über das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio, S/N) bestimmt. Demnach liegt die Nachweisgrenze bei einem S/N von 3, die Bestimmungsgrenze bei S/N = 10 [15].

Für die Ermittlung der beiden Kenndaten wurden Proben mit Konzentrationen über jeweils eine Zehnerpotenz vermessen (0,1 bis 1 ng/ml in Schritten von 0,1 ng/ml, 1 bis 10 ng/ml in Schritten von 1 ng/ml sowie 10 bis 100 ng/ml in Schritten von 10 ng/ml). Die Bestimmung der S/N-Werte erfolgte über die geräte- bzw. herstellereigene Auswertungssoftware (Agilent ChemStation bzw. OpenLab Software). Die so ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für beide Messsysteme sind in

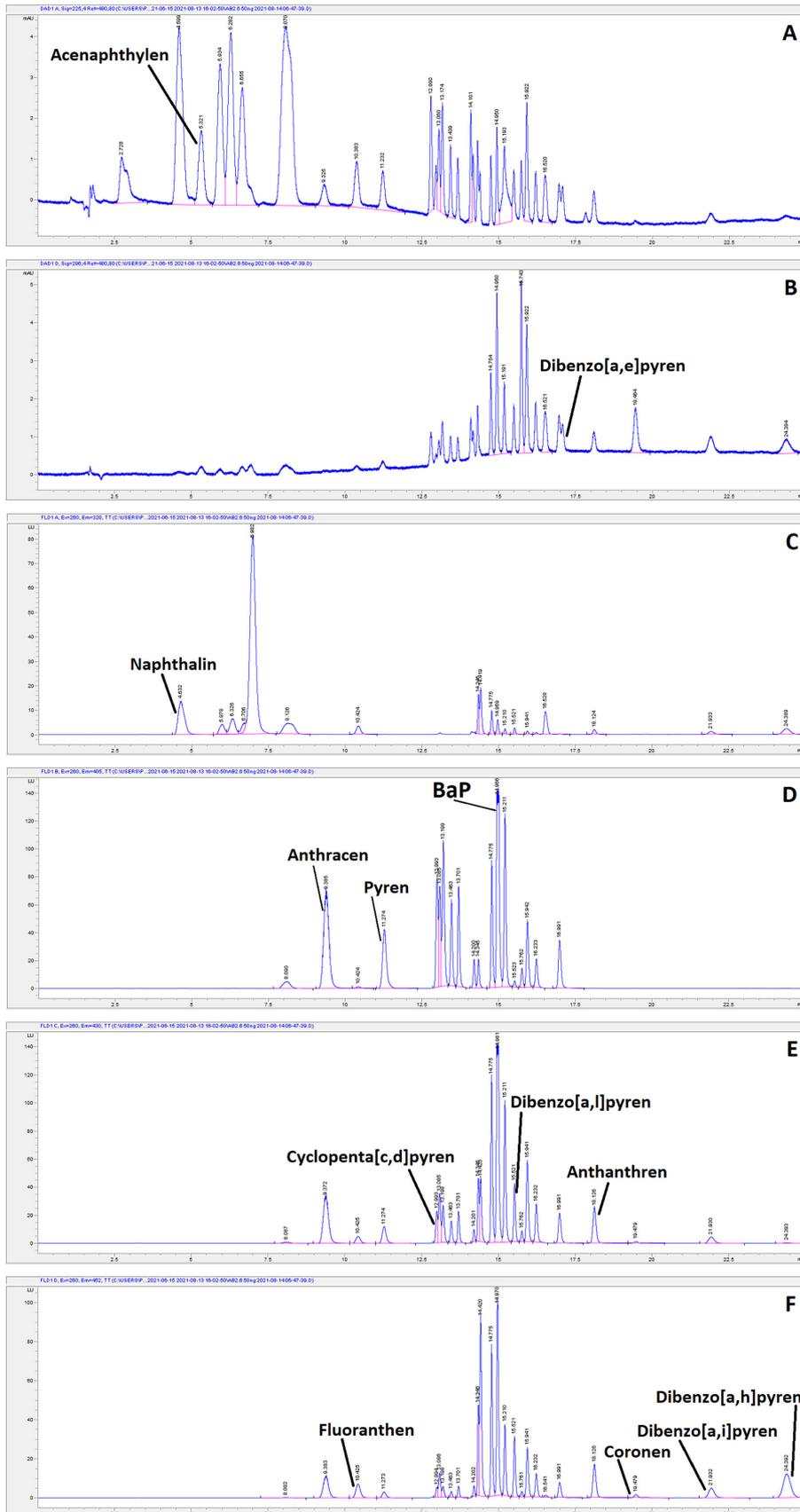


Bild 1 Beispielchromatogramme der HPLC-Methode mit ausgewählten gekennzeichneten PAK; Kanal A: DAD 225 nm, Kanal B: DAD 296 nm, Kanal C: FLD Em. 320 nm, Kanal D: FLD Em. 405 nm, Kanal E: FLD Em. 430 nm, Kanal F: FLD Em. 452 nm. Grafik: Autoren

Tabelle 6 Finale Parameter der optimierten GC-MS-Methode.

Parameter	Wert
Injektionsvolumen	5 µl
Einlassmodus	Solvent-Vent-Injektion, 60 °C für 0,03 min mit 300 °C/min auf 320 °C, für 5 min halten Spülen mit 60 ml/min für 2,53 min Entlüftung mit 100 ml/min bei 5 psi
Septumspülung	3 ml/min
Ofenprogramm	1 min bei 60 °C, 20 °C/min bis 320 °C, halten für 70 min
Laufzeit	84 min
Gesamte Analysenzeit	Ca. 2 h
Modus	SIM

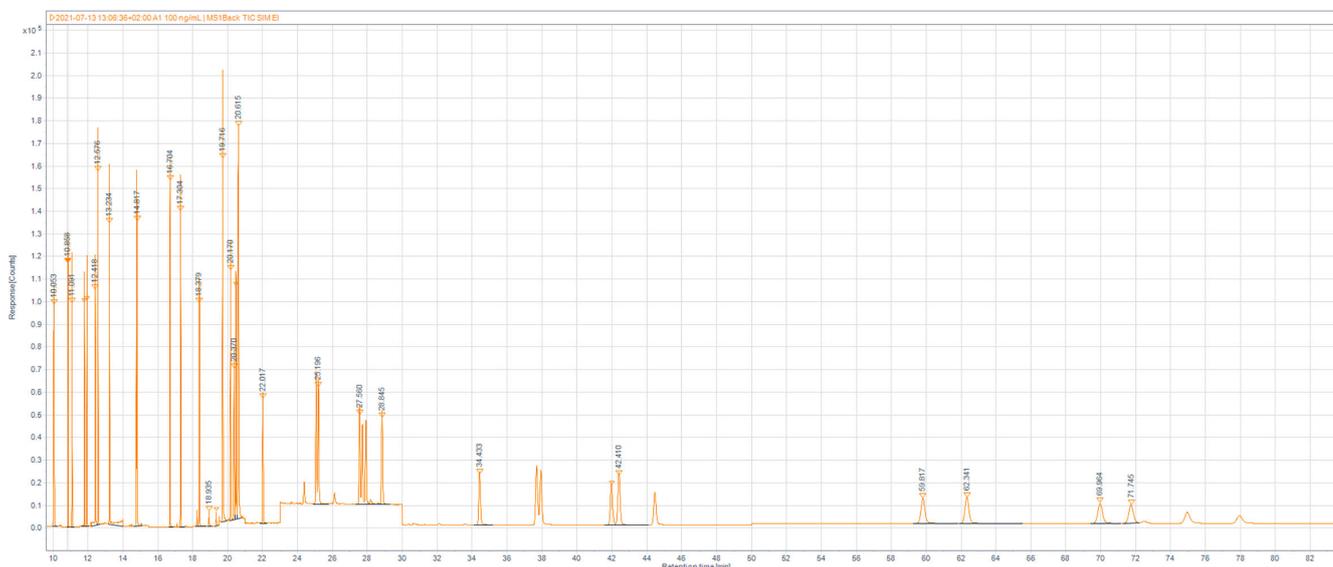


Tabelle 7 Retentionszeiten (RT) der einzelnen PAK für die GC-MS-Methode sowie die zur Quantifizierung verwendeten Massen.

Name	RT in min	Quantifier-Ion	Name	RT in min	Quantifier-Ion
IS Naphthalin-D8	10,03	136	Benzo[b]fluoranthen	25,08	252
Naphthalin	10,05	128	Benzo[k]fluoranthen	25,20	251
2-Methylnaphthalin	10,86	142	Benzo[e]pyren	27,56	252
1-Methylnaphthalin	11,09	142	IS Benzo[a]pyren-D12	27,73	264
1,6-Dimethylnaphthalin	11,80	156	Benzo[a]pyren	27,93	252
2,3-Dimethylnaphthalin	11,94	156	Perylen	28,85	252
Acenaphthylen	12,42	152	Indeno[1,2,3-c,d]fluoranthen	34,43	276
Acenaphthen	12,57	153	Dibenzo[a,h]anthracen	37,72	278
Fluoren	13,23	166	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	37,96	276
Phenanthren	14,78	178	IS Benzo[g,h,i]perylen-D12	42,02	288
Anthracen	14,82	178	Benzo[g,h,i]perylen	42,41	276
Fluoranthen	16,70	202	Anthanthren	44,50	276
Pyren	17,30	202	Dibenzo[a,e]fluoranthen	59,82	302
1-Methylpyren	18,38	216	Dibenzo[a,l]pyren	62,34	302
Benzo[a]anthracen	20,17	228	Dibenzo[a,e]pyren	69,96	302
IS Chrysen-D12	20,37	240	Coronen	71,75	300
Chrysen	20,48	228	Dibenzo[e,l]pyren	72,51	302
Cyclopenta[c,d]pyren	20,61	226	Dibenzo[a,i]pyren	75,00	302
5-Methylchrysen	22,02	242	Dibenzo[a,h]pyren	77,97	302

ren Verhalten ausgegangen werden, da bei den zwei genannten Substanzen nur einzelne Messbereiche betroffen sind. Betrachtet man die mit der HPLC-Methode ermittelten Werte, wird deutlich, dass die Linearität bei höheren Konzentrationen bzw. im Bereich 90 bis 900 ng/ml nicht bei allen Analyten gegeben ist. Hier ist der in der Routine verwendbare Messbereich also deutlich eingeschränkt, zu hoch konzentrierte Proben müssen in einem zusätzlichen Vorbereitungsschritt verdünnt werden.

5.3 Kalibrierung

Für die Messung von in der Routineanalytik anfallenden Proben ist eine Messkalibration notwendig. Diese wurde als 8-Punkt-Kalibration über den gesamten Mindestmessbereich durchgeführt. Bei PAK mit einer etwas höheren Bestimmungsgrenze sollte die Kalibration mindestens sechs Punkte umfassen. Die Kalibrationsproben wurden in einer Dreifachbestimmung gemessen. Zur Bewertung der Güte der Kalibration wurde erneut das Bestimmtheitsmaß R^2 herangezogen. **Bild 5** fasst die jeweils mittels GC und HPLC ermittelten Bestimmtheitsmaße für die Messkalibration sowie den kalibrierten Konzentrationsbereich zusammen. Es wurde dabei die jeweils passendste Regression – linear oder quadratisch – gewählt, basierend auf der Berechnung mittels Mandel-Test.

Die Bestimmtheitsmaße für die HPLC-Methode liegen zwischen 0,8811 und 0,9998, während die Werte für die GC-Methode einen Bereich von 0,9830 bis 0,9999 umfassen. Die Kalibration der GC-Methode weist also eine deutlich bessere Korrelation der Signale mit den jeweiligen Konzentrationen auf. Jedoch ist auch hier der Trend erkennbar, dass die Leistung der

GC-Methode mit steigender molarer Masse der Analyten nachlässt, während die HPLC-Methode für alle PAK in etwa gleich gut geeignet ist.

6 Diskussion und Zusammenfassung

Aus der durchgeführten Methodvalidierung und den dabei ermittelten Kenndaten kann abgeleitet werden, welches der beiden Messsysteme – HPLC oder GCMS – für welche PAK besser geeignet ist.

Die HPLC-Methode bietet den Vorteil, dass die Analysenzeit kürzer im Vergleich zur entwickelten GC-Methode ist. Dieser Aspekt ist insbesondere in der Routineanalytik von Relevanz, wenn ein möglichst großer Probendurchsatz erreicht werden soll. Die Bestimmungsgrenzen der Methode liegen für die meisten Analyten unterhalb des Mindestmessbereichs von 8,4 bis 840 ng/ml und sind somit ausreichend. Bei hohen Konzentrationen ist die HPLC-Methode jedoch aufgrund der fehlenden Linearität eingeschränkt. Die Messkalibration für die Routineanwendung muss entsprechend angepasst und hoch konzentrierte Proben müssen gegebenenfalls verdünnt werden. Die HPLC-Methode ist für ein breites Spektrum an PAK geeignet, auch wenn Einbußen – insbesondere bei niedermolekularen PAK – bei der Empfindlichkeit in Kauf genommen werden müssen.

Die GCMS-Methode erreicht deutlich niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Auch die Linearität der Methode ist über einen großen Konzentrationsbereich besser als die der HPLC-Methode. Die Messkalibration zeigt eine starke Korrelation zwischen Signal und Menge an Analyt. Die Detektion mittels MS bietet zudem den Vorteil der eindeutigen Identifizierung an-

Tabelle 8 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NWG und BG) für die GC- bzw. HPLC-Methode; ein leeres Feld bedeutet, dass diese Substanz nicht quantifiziert werden konnte.

	GC		HPLC	
	NWG in ng/ml	BG in ng/ml	NWG in ng/ml	BG in ng/ml
Naphthalin	<0,1	<0,1	6	8
2-Methylnaphthalin	<0,1	0,2	1	2
1-Methylnaphthalin	<0,1	0,2	8	10
1,6-Dimethylnaphthalin	0,2	2	10	20
2,3-Dimethylnaphthalin	0,3	2	10	20
Acenaphthylen	<0,1	0,2	8	10
Acenaphthen	<0,1	0,3	2	3
Fluoren	<0,1	0,3	0,1	0,2
Phenanthren	<0,1	0,3	1	2
Anthracen	<0,1	0,3	0,1	0,2
Fluoranthren	<0,1	<0,1	1	2
Pyren	<0,1	<0,1	0,2	0,3
1-Methylpyren	<0,1	0,4	1	2
Benzo[a]anthracen	0,2	0,6	0,9	1
Chrysen	0,2	0,4	<0,1	0,1
Cyclopenta[c,d]pyren	6	10	10	20
5-Methylchrysen	0,3	0,9	0,1	0,2
Benzo[b]fluoranthren	<0,1	0,3	0,3	0,4
Benzo[k]fluoranthren	<0,1	0,3	<0,1	0,1
Benzo[j]fluoranthren			9	10
Benzo[e]pyren	<0,1	0,3	<0,1	0,1
Benzo[a]pyren	0,2	0,4	0,1	0,2
Perylen	<0,1	0,4	0,3	0,4
Indeno[1,2,3-c,d]fluoranthren	0,2	0,5		
Dibenzo[a,h]anthracen	0,3	0,9	0,9	1
Indeno[1,2,3-c,d]pyren	<0,1	0,4	0,9	1
Benzo[g,h,i]perylen	<0,1	0,4	0,3	0,4
Anthanthren	0,3	0,8	0,3	0,5
Dibenzo[a,e]fluoranthren	0,4	2	10	20
Dibenzo[a,l]pyren	0,6	2	0,2	0,3
Dibenzo[a,e]pyren	0,7	4	10	20
Coronen	0,5	3	3	8
Dibenzo[e,l]pyren	5	30		
Dibenzo[a,i]pyren	2	9	1	2
Dibenzo[a,h]pyren	2	9	0,6	0,9

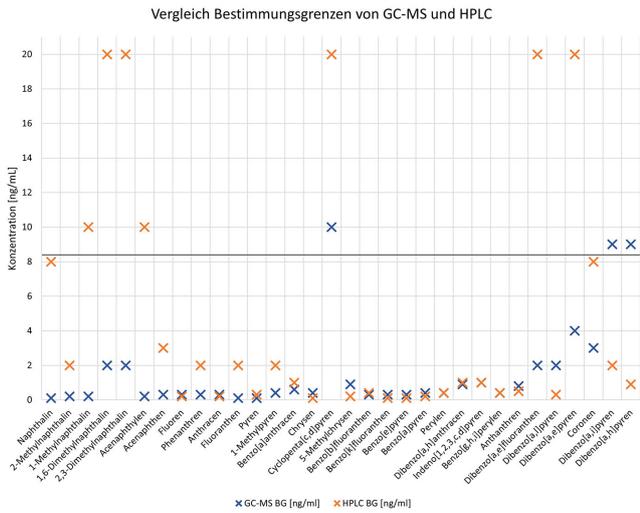


Bild 3 Grafische Darstellung der Bestimmungsgrenzen für GC-MS und HPLC; die schwarze Linie zeigt die untere Grenze des Mindestmessbereichs von 8,4 ng/ml. Grafik: Autoren

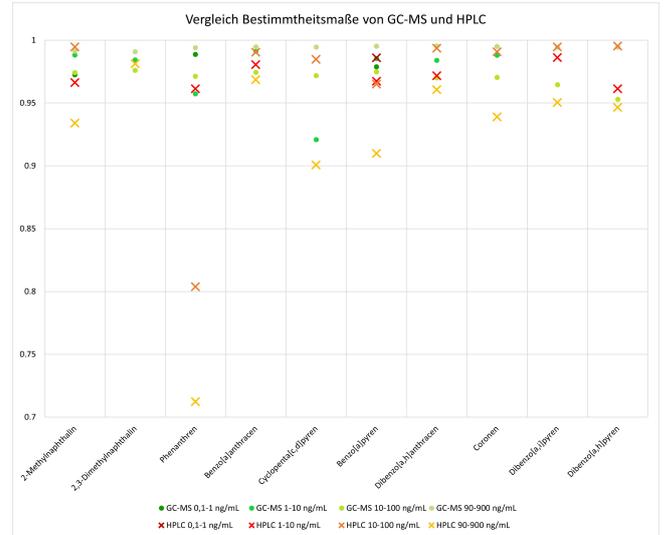


Bild 4 Grafische Darstellung der Bestimmtheitsmaße R^2 für die einzelnen Messbereiche für GC-MS und HPLC für einige ausgewählte PAK; die untersten beiden Messbereiche wurden nur untersucht, wenn die Bestimmungsgrenze ausreichend niedrig ist. Grafik: Autoren

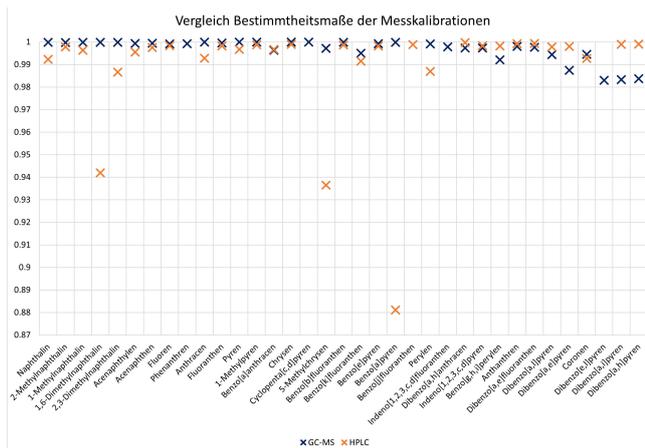


Bild 5 Grafische Darstellung der Bestimmtheitsmaße R^2 für die Messkalibrationen für GC-MS und HPLC. Grafik: Autoren

hand von Qualifier-Ionen, während bei der HPLC-Methode Störungen durch andere fluoreszierende Substanzen möglich sind.

Insgesamt bietet die GCMS-Methode Vorteile für die Analyse PAK-haltiger Proben im Vergleich zur HPLC-Methode. Zu beachten ist jedoch die lange Laufzeit der Methode und die geringfügig schlechtere Leistung bei höhermolekularen PAK. Dies ist vor allem relevant, wenn im Zuge einer Erweiterung der EPA-PAK-Liste sowohl die leicht- als auch die schwerflüchtigen PAK analysiert werden sollen. Soll der Fokus auf HMW PAK liegen, sollte die Verwendung eines HPLC-FLD in jedem Fall in Betracht gezogen werden.

Obwohl dank des PTV auch acetonitrilhaltige Proben im hier verwendeten GCMS-System analysiert werden können, sollte die Aufarbeitung der Proben nach Möglichkeiten in einem besser für die GC geeigneten Lösemittel erfolgen. Hierzu sind weiterführende Experimente zur Bestimmung der Wiederfindung nötig, um die erweiterte Messunsicherheit berechnen und auch diese mit dem für die HPLC-Methode ermittelten Wert vergleichen zu können. Die weitere Planung dieses Projekts sieht vor, beide

Methoden im Rahmen der Etablierung eines neuen Ringversuchs für höhermolekulare PAK zu verwenden, um den Gehalt dotierter Filter zu überprüfen.

Literatur

- [1] Masiol, M.; Hofer, A.; Squizzato, S.; Piazza, R.; Rampazzo, G.; Pavoni, B.: Carcinogenic and mutagenic risk associated to airborne particle-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: A source apportionment. *Atmos Environ* 60 (2012), S. 375-382.
- [2] Zhang, Q.; Meng, J.; Su, G.; Liu, Z.; Shi, B.; Wang, T.: Source apportionment and risk assessment for polycyclic aromatic hydrocarbons in soils at a typical coking plant. *Ecotox Environ Safe* 222 (2021), S. 112509.
- [3] Nilsson, P.; Bergendorf, U. Tinnerberg, H. Nordin, E. Gustavsson, M. Strandberg, B. et al.: Emissions into the Air from Bitumen and Rubber Bitumen-Implications for Asphalt Workers' Exposure. *Ann Work Expo Health* 62 (2018).
- [4] Louro, H.; Gomes, B.C.; Saber, A.T.; Iamceli, A.L.; Göen, T.; Jones, K. et al.: The Use of Human Biomonitoring to Assess Occupational Exposure to PAHs in Europe: A Comprehensive Review. *Toxics* 10 (2022), S. 480.
- [5] Keith, L.H.: The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. *Polycycl Aromat Comp* 35 (2015), S. 147-160.
- [6] Technische Regeln für Gefahrstoffe: Risikobezogenes Maßnahmenkonzept für Tätigkeiten mit krebserzeugenden Gefahrstoffen (TRGS 910). GMBI. (2014) Nr. 12, S. 258-270; zul. geänd. GMBI. (2023), Nr. 30, S. 627.
- [7] Kameda, Y.; Shirai, J.; Komai, T.; Nakanishi, J.; Masunaga, S.: Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: size distribution, estimation of their risk and their depositions to the human respiratory tract. *The Science of the total environment* 340 (2005), S. 71-80.
- [8] Andersson, J. T.; Achten, C.: Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. *Polycycl Aromat Comp* 35 (2015), S. 330-354.
- [9] Wise, S.A.; Hilpert, L.R.; Byrd, G.D.; May, W.E.: Comparison of Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Gas Chromatography/Mass Spectrometry for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Samples. *Polycycl Aromat Comp* 1 (1990), S. 81-98.
- [10] Technische Regeln für Gefahrstoffe: Ermitteln und Beurteilen der Gefährdung bei Tätigkeiten mit Gefahrstoffen: Inhalative Exposition (TRGS 402). GMBI. (2010) Nr. 12, S. 231-253.
- [11] Riediger, G.: Geräte zur Probenahme der einatembaren Staubfraktion (E-Staub). In: IFA-Arbeitsmappe, Lfg. 27/2001. Hrsg.: Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV), Berlin 2001 – Losebl.-Ausg.

- [12] *Assenmacher-Maiworm, B.; Breuer, D.*: Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), schwerer flüchtig. In: IFA-Arbeitsmappe, Lfg. 1/2018. Hrsg.: Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV), Berlin 2018 – Losebl.-Ausg.
- [13] *Ahad, J.M.E.; Macdonald, R.W.; Parrott, J.L.; Yang, Z.; Zhang, Y.; Siddique, T.A. et al.*: Polycyclic aromatic compounds (PACs) in the Canadian environment: A review of sampling techniques, strategies and instrumentation. *Environ Pollut* 266 (2020), S. 114-988.
- [14] *Fausett, A.*: Analyse von durch die Europäische Union geregelten polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (EU-PAK) mit dem Agilent 8890 GC-System. Hrsg.: Agilent Technologies Inc., Santa Clara/USA 2019.
- [15] *Kromidas, S.*: Die Validierungsparameter (oder nach ISO 17025: Verfahrensmerkmale). In: *Handbuch Validierung in der Analytik* (2009), S. 41-204.



**Julia Linke,
Prof. Dr. rer. nat.
Dietmar Breuer**

Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA), Sankt Augustin.