

Inhaltsverzeichnis

1	Umweltprobenbank des Bundes	2
2	Allgemeine Angaben	2
3	Anwendungsbereich	2
4	Begriffe	2
	4.1 Aufschluss	2
	4.2 Mikrowellengerät	2
	4.3 Wassergehalt	2
5	Sicherheitshinweise	3
6	Beschreibung der Methodik	3
7	Geräte	3
	7.1 Gefäße für Elementlösungen	3
	7.2 Gefriertrocknungsanlage.....	3
	7.3 Mikrowellenaufschlussgerät.....	3
	7.4 Analysenwaage.....	3
8	Reagenzien	3
	8.1 Allgemeines.....	3
	8.2 Reagenzienliste.....	4
9	Aufschluss	4
	9.1 Allgemeine Hinweise.....	4
	9.2 Sicherheitshinweis	4
	9.3 Reinigung der Geräte.....	4
	9.4 Gefriertrocknung des Probenmaterials	4
	9.5 Aufschluss gefriergetrockneter Proben.....	5
	9.6 Aufschluss von frischem Probenmaterial.....	5
	9.7 Belüften der Aufschlussgefäße	5
	9.8 Vorgehen bei nicht vollständigem Aufschluss	5
	9.9 Aufbewahrung der Proben	5
	9.10 Haltbarkeit	6
	9.11 Qualitätssicherung	6
10	Berechnung des Wassergehalts	6
11	Ergebnisbericht	6
12	Literatur	6

**Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung
von Umwelt- und Humanproben**

März 2011, V 2.0.2

1 Umweltprobenbank des Bundes

Die Umweltprobenbank des Bundes (UPB) ist ein Instrument der Umweltbeobachtung im Bereich des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) unter fachlicher und administrativer Koordinierung des Umweltbundesamtes (UBA). Für die UPB werden ökologisch repräsentative Umweltproben sowie Humanproben gesammelt, auf umweltrelevante Stoffe analysiert und eingelagert.

Die Langzeitlagerung erfolgt unter Bedingungen, die eine Zustandsveränderung oder einen Verlust chemischer Eigenschaften über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten weitestgehend ausschließen. Damit stellt das Archiv Proben bereit, die bei unvorhersehbaren Fragestellungen für spätere retrospektive Untersuchungen genutzt werden können.

Umfassende Informationen zur UPB sind unter www.umweltprobenbank.de verfügbar.

2 Allgemeine Angaben

Gegenstand dieser Richtlinie zum „Aufschluss von Umweltproben“ ist die Mineralisierung pflanzlichen bzw. tierischen Probenmaterials mittels Säure bei hoher Temperatur ($\geq 180^{\circ}\text{C}$) und unter hohem Druck (≥ 30 bar) in einem Mikrowellengerät. Die Aufschlusslösungen können zur Elementbestimmung mittels atomspektrometrischer und massenspektrometrischer Methoden eingesetzt werden. Diese Richtlinie ist die Fortschreibung einer Standardarbeitsanweisung, die im Rahmen der Umweltprobenbank des Bundes eingesetzt wird (UMWELTBUNDESAMT 1996). Zusätzlich wurden Hinweise aus der Vorschrift zur Bestimmung von Elementspuren in Lebensmitteln L 00.00 19/1 „Druckaufschluss“ (DIN EN 13805: 06.2002) entnommen.

3 Anwendungsbereich

Für den Aufschluss folgender Probenarten der Umweltprobenbank wird diese Richtlinie routinemäßig eingesetzt: Blasentang, Miesmuschel, Aalmutter (Muskulatur und Leber), Silbermöweneinhalt, Dreikantmuscheln, Brassen (Muskulatur und Leber), Fichtentriebe, Kiefertriebe, Pappelblätter, Buchenblätter, Regenwurm, Rehleber,

Stadtaubeneinhalt. Die Methodik ist prinzipiell auf andere biologische Proben übertragbar. Wenn Proben eingesetzt werden, für die bislang keine Erfahrungen vorliegen, ist insbesondere die Vollständigkeit des Aufschlusses zu prüfen.

Nach den vorliegenden Erfahrungen sind die nach dieser Richtlinie präparierten Aufschlusslösungen für die Bestimmung folgender Elemente geeignet: As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Tl (mittels ICP-MS; Se in Blasentang sowie niedrige Gehalte von As und Se in pflanzlichen Proben mittels Hydrid-ICP-MS); Ba, Cu, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, S, Zn (mittels ICP-OES); Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb (mittels ET-AAS); Hg (mittels DMA - direct mercury analyzer bzw. CV-AAS).

4 Begriffe

Für die Anwendung dieser Richtlinie gelten die folgenden Begriffe:

4.1 Aufschluss

Lösen einer Probe in Säure bzw. Säuregemischen oder in anderen Reagenzien, üblicherweise durchgeführt bei erhöhten Temperaturen unter Druck ($\geq 180^{\circ}\text{C}$, ≥ 30 bar). Die organischen Bestandteile der Probe werden dabei mineralisiert.

4.2 Mikrowellengerät

Ein Mikrowellengerät besteht aus der eigentlichen Mikrowellenkammer, dem Steuerungssystem einschließlich Software sowie speziellen, für die Mikrowellenkammer geeigneten, geschlossenen Aufschlussgefäßen aus säurefestem, hitze- und druckbeständigem Material.

4.3 Wassergehalt

Der Wassergehalt einer Probe ergibt sich aus der Differenz zwischen Frischmasse und Trockenmasse und wird in % angegeben. Gemäß dieser Richtlinie wird der Trockenmasseanteil in % aus dem Trockenrückstand nach der Gefriertrocknung über mehrere Tage bestimmt (bis zur Massenkonstanz).

5 Sicherheitshinweise

Sämtliche Arbeiten sind von qualifiziertem Personal durchzuführen.

Die nach dieser Richtlinie verwendeten Säuren haben eine stark ätzende Wirkung und sind teilweise toxisch. Da sie bei hohen Temperaturen und unter Druck verwendet werden, sind besondere Sicherheitsvorkehrungen zu treffen. Das Befüllen und Entleeren der Aufschlussgefäße erfolgt zweckmäßigerweise in einem Abzug, wobei die Gefäße erst nach dem Abkühlen geöffnet werden dürfen. Das Mikrowellengerät muss an eine geeignete Absaugungsvorrichtung angeschlossen sein oder direkt in einem Abzug stehen.

6 Beschreibung der Methodik

Feste Proben müssen vor der Untersuchung mittels atomspektroskopischer oder massenspektroskopischer Verfahren in Lösung gebracht werden, sofern nicht spezielle Feststoffanalysensysteme verwendet werden. In den meisten Fällen wird für die Probenvorbereitung biologischer Proben ein Säureaufschluss eingesetzt, der am zeiteffektivsten und vollständigsten unter erhöhtem Druck und bei hohen Temperaturen durchgeführt wird. Als Energiequelle zum Aufheizen der Proben wird zunehmend die Mikrowelleneinstrahlung verwendet. Hierbei finden spezialisierte Geräte Anwendung, die programmierbar sind, teilweise über Temperatur- und Drucküberwachungen verfügen und in denen jeweils eine größere Menge an Proben in Gefäßen aus geeignetem Material bearbeitet werden kann. Nach dem Aufschluss liegen die Proben im Allgemeinen als klare Lösungen vor.

7 Geräte

7.1 Gefäße für Elementlösungen

Die Stabilität der Aufschlusslösungen bis zur nachfolgenden Elementbestimmung wird wesentlich vom verwendeten Gefäßmaterial beeinflusst. Die Eignung des jeweiligen Gefäßmaterials für den vorgesehenen Anwendungszweck ist zu prüfen. Für die Elementbestimmung im Spurenbereich sollten keine Geräte aus Glas oder Polyvinylchlorid (PVC) verwendet werden.

Geeignet sind Gefäße aus Perfluoralkoxy-Kunststoff (PFA), Hexafluorethylenpropylen (FEP) oder Quarz. In vielen Fällen sind auch hochdichtes Polyethylen (z.B. HDPE-Gefäße, die für Szintillationsmessungen angeboten werden) und Polypropylen als Material geeignet.

Insbesondere bei Wiederverwendung sind die Gefäße vor Gebrauch gründlich mit Salpetersäure zu spülen oder mit siedender konzentrierter Salpetersäure im geschlossenen System auszu-dampfen.

7.2 Gefriertrocknungsanlage

Komplettsystem bestehend aus Gefriertrocknungskammer, Kühlaggregat und Vakuumpumpe.

7.3 Mikrowellenaufschlussgerät

Es muss ein geschlossenes Mikrowellengerät mit einer programmierbaren Leistungsaufnahme sowie mit einem Temperatur- und Drucküberwachungseinrichtung eingesetzt werden. Es sind die vom Hersteller empfohlenen Aufschlussgefäßen aus PFA oder Quarz zu verwenden, die gegen die verwendeten Reagenzien beständig sind.

ANMERKUNG 1: Die speziellen Sicherheitshinweise des Herstellers zur Bedienung des Mikrowellengeräts sind zu beachten.

ANMERKUNG 2: Für Aufschlüsse von UPB-Proben wird ein UltraClave II (Fa. MLS GmbH, Leutkirch) eingesetzt.

7.4 Analysenwaage

Analysenwaage, zur Einwaage mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ mg.

8 Reagenzien

8.1 Allgemeines

Die eingesetzten Aufschlussreagenzien müssen für die Spurenanalytik geeignet sein und sollten mindestens eine hochreine Qualität haben. Für die Ultrapurenanalytik sind auch noch bessere Qualitäten kommerziell erhältlich.

ANMERKUNG: Für die Elementanalytik im Rahmen der Umweltprobenbank werden Reagenzien (z.B. Säuren) der Qualität „suprapur“ oder „ultrapur“ eingesetzt (Fa. Merck, Darmstadt). Alternativ wird Salpetersäure verwendet, die mittels dem sub-boiling-Verfahren aufgereinigt und auf mögliche Verunreinigungen überprüft wird.

8.2 Reagenzienliste

8.2.1 Wasser aus einem Reinstwassersystem, Qualität: spezifischer Widerstand > 18,2 M Ω cm.

8.2.2 Salpetersäure, ρ (HNO₃) > 1,39 g/mL (\geq 65 %).

8.2.3 Salpetersäure, verdünnt (20 %), c (HNO₃) = 3,5 mol/L.

8.2.4 Salpetersäure, verdünnt (13 %), c (HNO₃) = 2,2 mol/L.

8.2.5 Fluorwasserstoffsäure (Flusssäure), ρ (HF) = 1,13 g/mL.

8.2.6 Borsäurelösung, hergestellt durch Lösen von 4 g B(OH)₃ in 100 mL Wasser (nach 8.2.1).

9 Aufschluss

9.1 Allgemeine Hinweise

Der Betrieb des Mikrowellengeräts erfolgt gemäß den entsprechenden Bedienungsanleitungen und eventuell vorhandener zusätzlicher laborinterner Betriebsanweisungen.

9.2 Sicherheitshinweis

Beim Aufschluss von kohlenstoffhaltigen, organischen Proben entstehen unter den Aufschlussbedingungen große Mengen Kohlendioxid. Dabei steigt der Druck in den geschlossenen Aufschlussgefäßen stark an. Das Belüften und Öffnen der Druckgefäße muss im Abzug bzw. unter einer geeigneten Absaugvorrichtung erfolgen. Die Sicherheitshinweise der benutzten Aufschlussgeräte sind strikt zu beachten.

9.3 Reinigung der Geräte

Da in den Aufschlüssen auch Elemente bestimmt werden sollen, die nur in Spuren vorkommen (Konzentrationsbereich in der Aufschlusslösung: ng/L bis μ g/L), ist jede Verunreinigung der Proben zu vermeiden.

Alle verwendeten Geräte sind vor Gebrauch zu reinigen (z.B. durch Ausdämpfen mit Salpetersäure nach 8.2.2 sowie durch Spülen mit verdünnter Salpetersäure nach 8.2.4 und Reinstwasser nach 8.2.1).

9.4 Gefriertrocknung des Probenmaterials

In vielen Fällen ist es sinnvoll, biologisches Material vor dem Aufschluss für die Elementanalytik gefrierzutrocknen. Zudem kann dabei auch eine Bestimmung des Trockenmasseanteils erfolgen (bzw. die Bestimmung des Wassergehalts der Frischprobe). Das Probenmaterial muss dazu bei Temperaturen tiefer als -20°C eingefroren werden. Falls Lösungen gefriergetrocknet werden, sollten sie in Kolben, die in einem Kühlmittel gedreht werden, eingefroren werden (Verteilung der Lösung über eine möglichst große Oberfläche, Verhinderung von Glasbrüchen durch Volumenvergrößerung). Tiefgefrorene Proben und Material, das über Flüssig-Stickstoff gelagert wird, kann direkt gefriergetrocknet werden.

ANMERKUNG: Die Gefriertrocknungsapparatur wird mit Vakuum betrieben. Es besteht die Gefahr der Implosion. Besonders das Evakuieren der Anlage ist kritisch und muss sehr vorsichtig erfolgen.

Solange eine Eisbildung durch kondensiertes Wasser an den Gefäßen zu sehen ist, ist die Trocknung noch nicht abgeschlossen. Die Gefriertrocknung dauert je nach Wassergehalt und Schichtdicke des zu trocknenden Materials von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen. Es ist zu überprüfen, ob eine verlängerte Trocknungszeit noch zu weiteren Gewichtsabnahmen führt (Unterbrechung der Gefriertrocknung, Auswiegen der Probe, weiter Gefrier-trocknen, erneut Auswiegen). Bei Änderungen des Nettoprobengewichts von weniger als 0,5 % zwischen zwei Wägungen an verschiedenen Tagen ist die Probe als trocken anzusehen.

ANMERKUNG: Umweltprobenbank-Proben werden im Allgemeinen direkt in den Glasgefäßen gefriergetrocknet, in denen sie routinemäßig abgefüllt werden (20 mL-Glasfläschchen aus hochwertigem Glas mit Kunststoffdeckeln, üblicherweise eingesetzt für Szintillationsmessungen). Die Deckel werden vor dem Gefrier-trocknen eine viertel Umdrehung gelöst, aber nicht abgenommen. Eine Querkontamination von Proben, die gemeinsam gefriergetrocknet werden, wird damit vermieden. Das Gewicht der leeren Glasfläschchen wird vor dem Abfüllen der Teilproben dokumentiert.

9.5 Aufschluss gefriergetrockneter Proben

Falls die Proben gefriergetrocknet vorliegen, werden 100-500 mg des Materials auf einer Analysenwaage (nach 7.4) genau eingewogen. Die Einwaage erfolgt direkt in das Aufschlussgefäß.

ANMERKUNG 1: Unter Umständen ist es sinnvoll, zuvor das Aufschlussgefäß mit einem Antistatikgebläse zu behandeln.

Zur eingewogenen Probenmenge werden geeignete Aufschlussreagenzien gegeben. In vielen Fällen ist für organisches Material Salpetersäure (nach 8.2.2) ausreichend. Eventuelle spontane Reaktionen lässt man Abklingen. Nach dem Verschließen und Einbringen der Aufschlussgefäße in das Aufschlussystem erfolgt die Programmierung bzw. der Aufruf eines gespeicherten Programms gemäß der entsprechenden Herstellerangaben. Die Aufschlussparameter sind probenspezifisch anzupassen. Die gewählten Bedingungen (Mikrowellenenergie, Aufschlussdauer, Temperatur, Druck) sind in den Rohdaten zu dokumentieren.

ANMERKUNG: Für die Untersuchung von Umweltprobenbank-Proben werden die folgenden Einwaagen und Geräteeinstellungen an der UltraClave II (MLS GmbH) verwendet: ca. 200 mg gefriergetrocknetes Material, 5 mL Salpetersäure nach 8.2.2, in Quarzgefäßen. Programm: 25 min Aufheizen auf maximale Temperatur von 220 °C, für 30 min 220 °C halten, ca. 60 min Abkühlen; Anfangsdruck: 40 bar, Anstieg während des Aufschlusses je nach Matrix auf 60 - 100 bar, maximal möglicher Druck: 200 bar; Gesamtdauer: ca. 2 h.

9.6 Aufschluss von frischem Probenmaterial

Für einige Fragestellungen kann es sinnvoll sein, frisches biologisches Probenmaterial direkt aufzuschließen. In diesem Fall richtet sich die Einwaage nach dem Trockenmasseanteil der Probe. Die Einwaage darf maximal einem Trockenmasseanteil von 500 mg entsprechen. Das weitere Vorgehen entspricht dem beim Aufschluss von gefriergetrocknetem Material.

9.7 Belüften der Aufschlussgefäße

Nach dem Abkühlen werden die Aufschlussgefäße vorsichtig belüftet. Dabei wird auch überprüft, ob sich das Überdruck-Sicherheitsventil während des Aufschlusses geöffnet hat und somit bei flüchtigen Elemente Verluste aufgetreten sein können. Eventuelle Fehlermeldungen des Mikrowellenaufschlussgerätes sind im Ergebnisbericht zu dokumentieren.

9.8 Vorgehen bei nicht vollständigem Aufschluss

Falls die Aufschlusslösung nicht klar ist, wird nach erneuter Zugabe von einigen mL Aufschlussreagenz der Aufschluss wiederholt. Gegebenenfalls kann es auch sinnvoll sein, den Aufschluss mit einer kleineren Einwaage zu wiederholen. Falls es sich bei den ungelösten Rückständen um anorganisches Material handelt (z.B. Sandreste beim Aufschluss von Blasentang), kann die Zugabe von 1 mL Flusssäure (nach 8.2.5) sinnvoll sein.

ANMERKUNG 1: Achtung, beim Umgang mit Flusssäure besteht Verätzungsgefahr.

Nach dem Aufschluss ist die überschüssige Flusssäure durch Zugabe von 10 mL Borsäure-Lösung (nach 8.2.6) zu Tetrafluoroborat zu komplexieren.

ANMERKUNG 2: Nach der Komplexierung mit Borsäure kann in den Proben keine Bor-Bestimmung mehr erfolgen.

9.9 Aufbewahrung der Proben

Nach dem Aufschluss werden die Aufschlusslösungen in Messkolben überführt, um auf ein definiertes Volumen aufgefüllt werden zu können (je

nach Elementgehalt und Messmethode, z.B. 10 mL, 20 mL oder 25 mL). Das Aufschlussgefäß wird mit Reinstwasser (nach 8.2.1) nachgespült. Dann wird der Messkolben mit Reinstwasser auf das Nennvolumen aufgefüllt. Die Lösungen werden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

9.10 Haltbarkeit

Die Messung der interessierenden Elementgehalte sollte möglichst kurzfristig nach dem Aufschluss erfolgen. Zwar ist davon auszugehen, dass die Aufschlusslösungen längere Zeit stabil sind (erfahrungsgemäß mindestens bis zu zwei Monate), doch kann es bei längerer Lagerzeit zu Störungen durch Adsorption an die Gefäßwände und Ausfällungen kommen. Bei Verwendung länger gelagerter Proben ist die Eignung zu prüfen.

9.11 Qualitätssicherung

Folgende Qualitätssicherungsproben werden regelmäßig mit den zu untersuchenden Proben aufgeschlossen:

- Blindproben;
- Zertifiziertes Referenzmaterial, dem Untersuchungsmaterial möglichst ähnlich hinsichtlich Matrixzusammensetzung sowie Elementgehalten von wichtigen Ziel- und Störelementen;
- vom Anwender charakterisiertes laborinternes Referenzmaterial.

ANMERKUNG: Bei der Untersuchung von Umweltprobenbank-Proben beträgt das Verhältnis von Proben zu Qualitätssicherungsproben immer höchstens 2:1. Als laborinternes Referenzmaterial werden Umweltprobenbank-Proben älterer Jahrgänge verwendet, für die entsprechende Elementanalysedaten vorliegen.

10 Berechnung des Wassergehalts

Der Wassergehalt in der Frischmasse einer Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$WG = (M_F - M_T) / M_F * 100$$

mit

WG Wassergehalt

M_F Frischmasse der Probe

M_T Trockenrückstand nach Gefriertrocknung

Falls die Frischprobe in einem Gefäß bekannter Masse eingewogen wurde, kann auch folgende Gleichung verwendet werden:

$$WG = (G_F - G_T) / (G_F - G_L) * 100$$

mit

G_F Leermasse Gefäß plus Frischmasse der Probe

G_T Leermasse Gefäß plus Trockenrückstand nach Gefriertrocknung

G_L Leermasse Gefäß

11 Ergebnisbericht

Folgende Angaben zum Aufschluss sind zu dokumentieren:

- Verweis auf diese Richtlinie;
- Probenidentität;
- Beschreibung einer eventuell durchgeführten Probenvorbehandlung (z.B. Gefriertrocknung);
- Menge an Probe, die für den Aufschluss eingesetzt wurde;
- Wassergehalt in %, sofern nach dieser Richtlinie bestimmt;
- Volumen an Lösung, auf das die Aufschlusslösung aufgefüllt wurde;
- ungefähre Säuregehalt der Aufschlusslösung;
- Hinweis auf eventuelle Färbungen oder Trübungen der Aufschlusslösung und auf eventuelle enthaltene Partikel bzw. Reste nicht aufgeschlossenen Materials;
- Angaben (Reinheitsgrad, Konzentration) zur verwendeten Säure und zu eventuell weiteren, für den Aufschluss verwendeten Reagenzien;
- Angaben zu mitgeführten Qualitätssicherungsproben.

12 Literatur

DIN EN 13805 (2002): Lebensmittel - Bestimmung von Elementspuren - Druckaufschluss. Beuth-Verlag, Berlin.

UMWELTBUNDESAMT (1996): "Analytische Vorschriften für Elemente und Spezies in Umweltproben, Matrixgruppe 1", Fassung vom Mai 1993, in: Umweltprobenbank des Bundes (UPB) - Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung von Umwelt- und Human-Organproben, Herausgeber: Umweltbundesamt, Berlin. Erich Schmidt Verlag, Berlin.