

BEPALING VAN POLYCYCLISCHE AROMATISCHE KOOLWATERSTOFFEN

Deze procedure vervangt de voorgaande versie van december 1994

1. DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's), ook wel polyaromatische koolwaterstoffen of polyaromaten genoemd, ontstaan ondermeer bij het gebruik van synthetische en fossiele brandstof en bij de verbranding van organisch materiaal bij hoge temperatuur. Polyaromatische koolwaterstoffen vormen een wereldverspreid probleem zowel in de derde wereldlanden als in de geïndustrialiseerde gebieden. Zij zijn een belangrijke groep van kankerverwekkende producten.

De hieronder beschreven analysemethode wordt gebruikt voor het bepalen van PAK's:

in *bodem*, met inbegrip van onderwaterbodem of sediment,
in *slib*, voor zover ontwaterd tot een droge stof gehalte van min. 5 %,
in *vaste afvalstoffen*,
in *water*,
in *olie*.

en is gericht op de kwantificering van volgende componenten:

naftaleen
acenaftyleen
acenaftteen
fluoreen
fenantreen
anthraceen
fluorantheen
pyreen
benz(a)anthraceen
chryseen
benzo(b)fluorantheen
benzo(k)fluorantheen
benzo(a)pyreen
indeno(1,2,3,c,d)pyreen
dibenzo(a,h)anthraceen
benzo(g,h,i)peryleen

De bovenstaande lijst omvat de zogenaamde "16 van EPA".

2. PRINCIPE

2.1 Extractie

Vaste monsters en slibmonsters met voldoende hoge droge stof gehalte worden eerst vermengd met diatomeeënaarde of Na₂SO₄ als droogmiddel en nadien aan een ASE-extractie ('accelerated solvent extraction') of soxhletextractie met een n-hexaan/acetone mengsel onderworpen. Indien de ASE-extractie praktisch moeilijk uitvoerbaar is of onvoldoende monsterinname toelaat wordt een soxhletextractie uitgevoerd.

Oliemonsters worden verdund met n-hexaan.

Waterstalen worden geëxtraheerd met dichloormethaan of hexaan.

De controle van de extractierendementen wordt uitgevoerd door voorafgaandelijke additie van deuterium gemerkte PAK's in geval van GC-MS detectie of van een surrogaatverbinding, bv. 6-methylchryseen, in geval van HPLC detectie.

2.2 Zuivering

Indien nodig wordt een zuiveringsprocedure toegepast om interferenties te elimineren. Deze bestaat uit adsorptiechromatografie over silica en/of alumina.

Extracten van waterstalen worden in de regel niet gezuiverd.

Verduunningen van oliestalen worden gezuiverd door fractionatie over silica.

2.3 Identificatie en kwantificering van de PAK's

PAK's kunnen zowel gaschromatografisch als vloeistofchromatografisch bepaald worden. In geval van gaschromatografische analyse gebeurt de detectie met een massaspectrometer, in geval van vloeistofchromatografie met een combinatie van een fluorescentie- en UV-detector. In geval van afvalstoffenanalyse wordt het gebruik van GC-MS aanbevolen.

2.3.1 GC-MS

De eigenlijke meting vindt plaats m.b.v. een gaschromatograaf (GC), uitgerust met een massaspectrometrische detector (MS), volgens de 'selected ion monitoring' (SIM) methode. Alternatief kan, mits voldoende detecteerbaarheid en mits aanpassing van de hieronder gegeven concentraties van kalibratie- en doperingsstandaarden, in "full scan" modus gewerkt worden uitgaande van geëxtraheerde ionchromatogrammen.

De identificatie van een te bepalen polyaromaat steunt op de vergelijking van de retentietijd in het specifieke ionchromatogram van staal en kalibratie-oplossing. De kwantificering verloopt volgens de interne standaard-methode, waarbij gekende hoeveelheden van deuterium-gemerkte componenten als interne standaarden vóór de extractie aan het staal worden toegevoegd. Minstens 5 deuterium-gemerkte polyaromaten worden als interne standaarden gebruikt. Voorbeelden zijn : D8-naftaleen, D10-anthracen, D10-fluorantheen, D10-pyreen, D12-benzo(b)fluorantheen, D12-benzo(k)fluorantheen, D12-benzo(a)pyreen, D12-indeno(1,2,3,c,d)-pyreen en D12-benzo(g,h,i)peryleen. D8-naftaleen is in de gekozen reeks inwendige standaarden steeds aanwezig. Gehalten worden berekend gebruik makend van de geïntegreerde piekoppervlakken van de meest karakteristieke ionen voor de PAK's en de interne standaarden.

De kwantificering volgens de interne standaard-methode laat toe automatisch en accuraat de verliezen in rekening te brengen die in de extractie-, zuiverings-, indamp- en injectiestap van de analyse kunnen optreden. Door toevoegen van een zgn. 'recovery'-standaard, bv. D12-chryseen of een andere niet-coëluerende verbinding, juist voor de instrumentele meting kan men de recuperatierendementen van de afzonderlijke interne standaarden bepalen.

2.3.2 HPLC

De vloeistofchromatograaf (HPLC) is uitgerust met een fluorescentie detector (FD) en een UV of een diode array detector (DAD). De identificatie van een te bepalen polyaromaat steunt op vergelijking van zijn retentietijd in staal en kalibratie-oplossing. Het simultaan gebruik van beide detectoren laat toe om interferentie uit te sluiten. Kwantificatie gebeurt volgens de externe standaardmethode.

Controle van het goede verloop van de analyse gebeurt aan de hand van de terugvinding van een surrogaatverbinding, bv. 6-methylchryseen.

Aangezien geen inwendige standaarden gebruikt worden dient i.f.v. de van toepassing zijnde matrix gecorrigeerd te worden voor de extractierendementen bekomen op basis van validatiegegevens.

3. APPARATUUR EN MATERIAAL

- Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg.
- Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g.
- Mortier en stamper (porcelein).
- In geval van ASE extractie: *Dionex ASE 200 accelerated solvent extractor* met extractiecellen van 11 tot 33 ml en opvangvials van 40 tot 60 ml.
- In geval van soxhlet extractie: soxhletapparaat van 100-250 ml, extractiehulsen, elektrische verwarmingsmantel met temperatuurs-regeling.
- In geval van vloeistof-vloeistofextractie: scheidtrechter (500-1000 ml).
- Injectiespuiten van 50-250 μ l voor het doperen met resp. interne standaard, 'recovery' standaard en surrogaat.
- Eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet.
- Glazen chromatografische kolommen, i.d. 10-15 mm, met gefritteerde basis en teflonkraan; de kolommen zijn voorzien van een slijpstuk bovenaan waarop een broomtrecther geplaatst kan worden.
- Erlenmeyers (100 en 250 ml).
- Maatcilinder (100 ml).
- Voor de filtratie van peilputwaters: borosilicaatglasvezelfilters conform de specificaties opgelegd in EN 872, d.w.z. vrij van bindmiddel, met een gewicht van 50 tot 100 g/m² en getest met 200 ml van een referentiesuspensie van 50mg/l microkristallijn cellulose (TLC grade of equivalent), waarbij de weerhouden hoeveelheid gesuspendeerde deeltjes tussen 90 en 110% moet gelegen zijn.
- GC-MS bestaande uit een capillaire gaschromatograaf, een autosampler, een lage resolutie massaspectrometer van het quadropool-type en een PC met sturings- en dataverwerkingsprogrammatuur. De GC is eventueel uitgerust met een PTV of on-column groot-volume injector.
- Fused silica GC-kolom met apolaire stationaire fase (5%fenylmethylpolysiloxaan, DB5-MS of gelijkwaardig), bv. 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m.

Opmerking :

Op een apolaire fase coëlueren benzo(b)fluorantheen en benzo(j)fluorantheen enerzijds en dibenzo(a,c)anthraceen en dibenzo(a,h)anthraceen anderzijds. Alternatief kan een semipolaire kolom gebruikt worden (bv. een 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm DB-1701 of gelijkwaardig). In dat geval coëluert benzo(j)fluorantheen met benzo(k)fluorantheen, wat een interferentievrije bepaling van benzo(b)fluorantheen toelaat. Op basis van de simultane analyse van reële stalen op beide kolommen kan afgeleid worden dat benzo(j)fluorantheen steeds aanwezig is in een concentratie die ongeveer 40% bedraagt van de concentratie van benzo(b)fluorantheen.

- HPLC uitgerust met gradiënt pomp, ontgassingseenheid, kolomthermostatisatie, fluorescentiedetector, variabele UV-detector of diode array detector, autosampler en een PC met sturings- en dataverwerkingsprogrammatuur.
- Een reversed phase C18 kolom, van 100 tot 250 mm lengte, met een diameter van 2 tot 4.6 mm en een deeltjesgrootte van 3 tot 10 µm.
- Injectiepuits van 10 µl.
- Glazen amberkleurige monsterflesjes (penicillineflesjes) van 5 ml.

4. REAGENTIA EN STANDAARDEN**4.1 Chemische producten**

- n-Hexaan, petroleumether (40-60°C), isohexaan of een ander alkaan: residu-analyse;
- aceton, dichloormethaan: residu-analyse;
- n-nonaan : 'pro synthese' of gelijkwaardig;
- acetonitrile: 'gradiënt';
- natriumsulfaat (Na₂SO₄): granulair en watervrij; een geopende verpakking wordt uitgegoten in een schaal en bewaard bij 130°C in een droogoven;
- diatomeeënaarde (celite, kieselguhr, ..): korrelgrootte 0.02-0.1 mm;
- zeezand: met zuur gereinigd en gegloeid;
- silica, geactiveerd: een laag van ongeveer 25 mm silica (70-230 mesh) wordt in een schaal verwarmd gedurende minstens 16 u op 130°C en vervolgens bewaard bij 130°C in de droogoven; voor gebruik laat men de schaal in een exsiccator tot kamertemperatuur afkoelen;
- silicagel 3 % H₂O : voeg aan geactiveerde silica in een erlenmeyer gravimetrisch 3 % H₂O toe, sluit de erlenmeyer af en schud het geheel tot alle agglomeraten verdwenen zijn; de aldus bereide silica kan een week bewaard worden;
- alumina, geactiveerd, basisch of neutraal, 70-230 mesh: aluminiumoxide wordt geactiveerd door verhitten gedurende minstens 15 u bij 450°C en wordt nadien bewaard bij 130°C in een droogoven; de bewaartermijn is op max. 1 maand gesteld; voor gebruik laat men de schaal in een exsiccator tot kamertemperatuur afkoelen;
- koperplaatjes;
- tetrabutylammoniumwaterstofsulfietreagens (TBA-reagens): voeg 5 g natriumsulfiet toe aan een 0.1M oplossing van tetrabutylammoniumwaterstofsulfiet in isopropanol.

4.2 Standaardoplossingen

Opm.: de hieronder beschreven werkwijze vertrekt van vaste producten waarbij de hoofdstandaarden zelf aangemaakt worden. In de handel zijn echter reeds bereide en gecertificeerde PAK mengsels verkrijgbaar.

4.2.1 Standaardoplossingen voor GC-MS bepaling

Hoofdstandaardoplossingen:

- natieve PAK's :
Van elk van de te analyseren PAK's wordt, uitgaande van zuiver (min. 98%) vast product gravimetrisch een stockoplossing van ongeveer 100 µg/g in n-nonaan of een ander alkaan bereid.
- Interne standaarden :
Van minstens 5 isotoop-gemerkte PAK's, gekozen over het volledige retentietijdsgebied, wordt uitgaande van zuiver (min.98%) vast product, gravimetrisch een stockoplossing van ongeveer 100 µg/g in n-nonaan bereid. Voorbeelden zijn:
D8-naftaleen
D10-anthraceen
D10-fluorantheen
D10-pyreen
D12-benzo(b)fluorantheen
D12-benzo(k)fluorantheen
D12-benzo(a)pyreen
D12-indeno(1,2,3,c,d)pyreen
D12-benzo(g,h,i)peryleen.
- Recovery standaard :
van D12-chryseen of een andere isotoop gemerkte PAK wordt rechtstreeks, uitgaande van zuiver (min.98%) vast product, gravimetrisch een werkoplossing van ongeveer 100 µg/g in n-nonaan of een ander alkaan bereid.

Opmerkingen:

- Wanneer de oplosbaarheid te laag is wordt een minimale hoeveelheid aceton toegevoegd.
- Met betrekking tot de houdbaarheid van de standaarden is nonaan als solvent de beste keuze. In geval van groot-volume injectie kan het gebruik van meer vluchtige alkanen echter meer aangewezen zijn.

Werkoplossingen:

- interne standaard-werkoplossing (IS doeringsstandaard):
door menging van de individuele hoofdstandaardoplossingen van de deuterium-gemerkte PAK's wordt gravimetrisch een interne standaard-werkoplossing bereid met een concentratie van ongeveer 10 µg/g van elk van de interne standaarden in n-nonaan of een ander alkaan.
- Standaard-werkoplossingen voor controle van de responslineariteit:
uitgaande van de hoofdstandaardoplossingen van de natieve en deuterium gemerkte PAK's worden gravimetrisch minstens 5 standaard-werkoplossingen in n-nonaan of een ander alkaan bereid die de te analyseren PAK's bevatten in oplopende concentraties van 0.02 tot 5 µg/g en de interne standaarden in een constante concentratie van ongeveer 1 µg/g.
- Standaard-werkoplossing voor GC-MS kalibratie:
voor de bepaling van de relatieve responsfactoren wordt gebruik gemaakt van een standaard-werkoplossing in n-nonaan of een ander alkaan die de te analyseren PAK's en de deuterium-gemerkte PAK's (interne standaarden en 'recovery'-standaard) bevat in een concentratie van ongeveer 1 µg/g.

4.2.2 Standaardoplossingen voor HPLC bepaling

Hoofdstandaardoplossingen:

van elk van de te analyseren PAK's wordt, uitgaande van zuiver (min. 98%) vast product een stockoplossing van ongeveer 100 µg/ml in acetonitrile bereid.

Van 6-methylchryseen of een andere niet-coëluerende en niet in de te analyseren monsters voorkomende PAK wordt, uitgaande van zuiver (min. 98%) vast product, een stockoplossing van ongeveer 100 µg/ml in acetonitrile bereid.

Werkoplossingen:

- standaard-werkoplossingen voor kalibratie:
uitgaande van de hoofdstandaardoplossingen van de PAK's worden minstens 5 standaard-werkoplossingen in acetonitrile bereid die de te analyseren PAK's bevatten in concentraties van resp. ongeveer 2 tot 1000 ng/ml, waarbij de laagste concentraties bedoeld zijn voor het opstellen van de fluorescentie-kalibratierechte en de hoogste voor het opstellen van de UV-kalibratierechte (inzonderheid deze van acenaftyleen).
- Werkoplossingen voor de controle van de kalibratierechte:
uitgaande van de hoofdstandaardoplossingen van de PAK's wordt een standaard-werkoplossing in acetonitrile bereid die de te analyseren PAK's bevat in een concentratie overeenkomend met het middengebied van de lineaire reeks.

5. MONSTERBEWARING EN -VOORBEHANDELING

Bij de monsternamen wordt gebruik gemaakt van donkergekleurde glazen flessen, afgesloten met glazen stoppen of plastic stoppen met teflon inlage. Stalen worden koel bewaard (max. 7°C).

Grondwaterstalen (gewoonlijk bemonsterd in het kader van bodemonderzoek) worden onmiddellijk na aankomst gefiltreerd over een geschikte glasvezelfilter met specificaties zoals vermeld onder 3. Alle andere types waterstalen worden in de regel niet vooraf gefiltreerd!

Waterstalen worden binnen de 7 dagen geëxtraheerd (zie NEN 5731 en EPA 8100). De extracten zijn gedurende 1 maand houdbaar in de koelkast.

Van bodemstalen worden deeltjes (hout, keien, ...) met een diameter groter dan 5 mm voorafgaandelijk door zeven verwijderd. Dit geldt niet voor afvalresten zoals bv. asfaltdeeltjes.

Bodem en vaste afvalstoffen worden binnen de 30 dagen geanalyseerd. Mits droging door vermenging met diatomeeënaarde of Na₂SO₄ zijn ze echter gedurende maanden houdbaar in de koelkast.

Slibstalen dienen minstens 5 % droge stof te bevatten. Indien dit niet het geval is dient dit op het verslag vermeld te worden samen met de vermelding dat de resultaten onder voorbehoud zijn. Bij onvoldoende aantoonbaarheid, afhankelijk van het droge stof gehalte, dienen de slibstalen ingedikt te worden door centrifugatie. Het bovenstaande water wordt afgescheiden en de analyse wordt enkel uitgevoerd op de "vaste" fractie.

6. ANALYSEPROCEDURE

6.1 Extractie

6.1.1 Bodem, slib en vast afval

Werkwijze voor ASE-extractie:

- weeg in een mortier een hoeveelheid (bv. 10 g) van het homogene monster af, tot op 0.01 g nauwkeurig;
- weeg een hoeveelheid diatomeeënaarde af, tot op 0.01 g nauwkeurig; vermeng met het monster in de mortier tot een droge massa bekomen wordt;
- breng in de extractiecel een cellulosefiltertje en weeg vervolgens in de extractiecel, afhankelijk van de verwachte verontreinigingsgraad van het monster, een hoeveelheid van het met diatomeeënaarde vermengde monster af, tot op 0.01 g nauwkeurig; vul de extractiecel verder op met zeezand;
- voeg in geval van GC-MS analyse m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de interne standaard werkoplossing toe, zodanig dat de concentratie van elke gemerkte PAK in het eindextract ca. 1 µg/g zal bedragen (*opm.*: in geval van groot-volume injectie wordt een i.f.v. het injectievolume aangepaste hoeveelheid standaard toegevoegd; typisch wordt 1 ng van elke PAK geïnjecteerd);
voeg in geval van HPLC analyse m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de surrogaat werkoplossing toe, zodanig dat de concentratie van de surrogaat in het eindextract ca. 25 ng/ml zal bedragen;
- sluit de bovenkant van de extractiecel handdicht af met een 'cap';
- voer de extractie uit met onderstaande ASE instellingen.

HEAT	5 min	PRESSURE	140 bar
STATIC	5 min	TEMPERATURE	100 °C
FLUSH%	60 vol	SOL # 1	aceton 50 %
PURGE	150 sec	SOL # 2	n-hexaan 50 %
CYCLES	1	SOL # 3	- %

- damp het extract (ca. 20-40 ml) in onder stikstofstroom tot 2 à 3 ml (niet in het geval van LV-GC)
Opn.: indien op het niet ingedampde extract andere bepalingen dienen uitgevoerd te worden (minerale olie, EOX, ...) dan wordt eerst hiervan een hoeveelheid afgenomen.

Werkwijze voor soxhletextractie:

- spoel vóór extractie van een monster de soxhletopstelling (inclusief de te gebruiken extractiehuls en glaswolprop) door refluxen van dichloormethaan gedurende minstens een half uur; ledig vervolgens de opstelling en droog de extractiehuls en glaswolprop in een droogstoof;
- voer, in geval van een slibmonster of soortgelijk vrij nat monster, eerst een chemische droging van het monster met natriumsulfaat uit door afwegen in een mortier van een hoeveelheid (ca. 10 g) van het homogene monster tot op 0.01 g nauwkeurig, afwegen van minstens een equivalente hoeveelheid natriumsulfaat tot op 0.01 g nauwkeurig, en vermengen met het monster in de mortier tot een droge massa bekomen wordt;
- weeg, afhankelijk van de verwachte verontreinigingsgraad van het monster, 1 - 30 g van het (desgevallend vooraf met natriumsulfaat vermengde) monster af tot op 0.01 g nauwkeurig, breng in de extractiehuls van de vooraf gereinigde soxhlet-opstelling, en dicht af met een voorgereinigde glaswolprop;

- voeg in geval van GC-MS analyse m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de interne standaard werkoplossing toe, zodanig dat de concentratie van elke gemerkte PAK in het eindextract ca. 1 µg/g zal bedragen (*opm.*: in geval van groot-volume injectie wordt een i.f.v. het injectievolume aangepaste hoeveelheid standaard toegevoegd; typisch wordt 1 ng van elke standaard geïnjecteerd); voeg in geval van HPLC analyse m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de surrogaat werkoplossing toe, zodanig dat de concentratie van de surrogaat in het eindextract ca. 25 ng/ml zal bedragen;
- extraheer met aceton gedurende ca. 3 uur;
- damp de acetonoplossing in tot ongeveer de helft van het oorspronkelijk volume;
- voeg n-hexaan toe aan de rondbodemkolf tot het oorspronkelijk volumepil, zodat een verhouding n-hexaan/aceton van 50/50 (v/v) bekomen wordt;
- extraheer met het n-hexaan/aceton mengsel gedurende ca. 16 uur;
- vervang de koeler van de soxhletopstelling door een destillatie-opstelling en damp het extract in tot ca. 20 ml; damp het extract daarna verder in onder stikstofstroom tot ca. 2-3 ml.

Opn.: indien op het niet ingedampde extract andere bepalingen dienen uitgevoerd te worden (minerale olie, EOX, ...) dan wordt eerst hiervan een hoeveelheid afgenomen.

6.1.2 Waterstalen

- weeg de monsterfles tot op 0.1 g nauwkeurig;
- breng de volledige inhoud van de monsterfles (typisch 500-1000 ml) over in een geschikte scheitrechter;
- *in geval van GC-MS analyse*: breng ca 1 ml aceton in een penicillineflesje; voeg m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de interne standaard-werkoplossing toe aan de aceton, zodanig dat de concentratie van elke gemerkte PAK in het eindextract ca. 1 µg/g zal bedragen; breng m.b.v. een pasteurpipet de bovenstaande acetonoplossing met interne standaarden over naar de scheitrechter; spoel het penicillineflesje enkele malen na met DCM of hexaan (of een ander alkaan) en breng de spoelvoelstof over naar de scheitrechter;
- *in geval van HPLC analyse*: voeg m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de surrogaat werkoplossing toe, zodanig dat de concentratie van de surrogaat in het eindextract ca. 25 ng/ml zal bedragen;
- spoel de monsterfles na met 25-50 ml DCM of hexaan en breng de spoelvoelstof over naar de scheitrechter;

Opn.: dient op het waterstaal ook een minerale olie bepaling te gebeuren dan wordt als extractievoelstof hexaan (of een ander alkaan) gebruikt; ook wordt het waterstaal in dat geval aangezuurd tot pH 2 en wordt aan het waterstaal de nodige hoeveelheid zout toegevoegd conform de procedure voor minerale olie;

- schud het geheel krachtig gedurende ca 3 min;
- laat de organische fase af over een filter gevuld met Na₂SO₄;
- herneem de spoel- en extractiestap tweemaal;
- damp de verzamelde extracten in onder een stikstofstroom tot een eindvolume van ca 2-3 ml (niet in geval van LV-GC);
- weeg de lege monsterfles en bepaal het gewicht en hieruit het volume van de oorspronkelijke inhoud.

6.1.3 Oliestalen

- weeg ca 0.1 g oliestaal af en los op in 1 ml hexaan;
- voeg m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de interne standaard-werkoplossing toe aan het monster, zodanig dat de concentratie van elke gemerkte PAK in het eindextract ca. 1 µg/g zal bedragen.

6.2 Zuivering

Indien nodig (bij onzuivere chromatogrammen) worden de bekomen extracten aan de volgende zuiveringsprocedures onderworpen:

- *bodem, sediment en vaste afvalstoffen:*
een eerste zuivering gebeurt door elutie van het extract doorheen een kolom gevuld met silica. In weinige gevallen is nadien nog een bijkomende zuivering nodig over alumina.
- *Waterstalen:*
in de regel wordt geen zuivering toegepast tenzij het zwaar belaste afvalwaters betreft. In het laatste geval worden bovenstaande zuiveringsprocedures toegepast.
- *Oliestalen:*
verduunningen van oliestalen en ook extracten van milieumonsters met een belangrijk oliegehalte worden aan een fractionatie over silicagel onderworpen, waarbij door een geschikte keuze van elutiesolventen de alifatische minerale oliecomponenten van de aromatische kunnen gescheiden worden. De fractie die de PAK's bevat wordt indien nodig verder gezuiverd over alumina.

Extracten die specifiek met zwavel verontreinigd zijn kunnen zonodig verder gezuiverd worden door behandeling met koper of tetrabutylammoniumwaterstofsulfiet (TBA reagens).

Bij het einde van de zuiveringsprocedure dient het extract tenslotte klaargemaakt te worden voor de GC-MS of HPLC meting.

Werkwijze voor zuivering over silica:

- vul een chromatografische kolom met 5 g silicagel/3% H_2O en daarboven 2 cm Na_2SO_4 ;
- breng het ingedampt monsterextract boven op de kolom en elueer met 60 ml n-hexaan/dichloormethaan (80/20 v/v), waarmee tegelijkertijd het oorspronkelijk recipiënt wordt nagespoeld;
- damp het eluaat onder stikstofstroom in tot 2 à 3 ml.

Werkwijze voor zuivering over alumina (bij onvoldoende zuivering over silica):

- vul een chromatografische kolom met 5 g geactiveerde alumina en daarboven 2 cm Na_2SO_4 ;
- breng het ingedampt monsterextract boven op de kolom en elueer met 50 ml n-hexaan/dichloormethaan (50/50 v/v), waarmee tegelijkertijd het oorspronkelijk recipiënt wordt nagespoeld;
- damp het eluaat onder stikstofstroom in tot een volume van 2-3 ml.

Werkwijze voor de fractionatie van olieverbindingen over silica ¹:

- vul een chromatografische kolom (i.d. 10 mm) met 3 g geactiveerde silica en daarboven 0.5 cm Na_2SO_4 ;
- breng 10 ml DCM op de kolom en laat doorlopen tot het solventniveau zich 1 mm boven de Na_2SO_4 laag bevindt;
- breng 10-20 ml hexaan op de kolom en laat doorlopen tot het solventniveau zich 1 mm boven de Na_2SO_4 laag bevindt;
- breng 1 ml olieverbinding (of extract) op de kolom en laat doorlopen tot het solventniveau zich 1 mm boven de Na_2SO_4 laag bevindt;

- voeg druppelsgewijs hexaan toe en laat langzaam doorlopen met een debiet gelijk aan de toevoegsnelheid (het solventniveau bevindt zich steeds 1 mm boven de Na₂SO₄ laag) tot 10 ml solvent opgevangen worden; deze fractie bevat de alifatische koolwaterstoffen;
- voeg druppelsgewijs een 1/1 mengsel DCM/aceton toe en laat langzaam doorlopen met een debiet gelijk aan de toevoegsnelheid (het solventniveau bevindt zich steeds 1 mm boven de Na₂SO₄ laag) tot minstens 10 ml solvent opgevangen worden; deze fractie bevat de aromatische koolwaterstoffen;
- damp het eluaat van de aromatische koolwaterstoffen onder stikstofstroom in tot een volume van 2-3 ml;
- voer desnoods een bijkomende zuivering uit over alumina.

Opmerkingen:

- de kolom is mits tussentijds reinigen met DCM en hexaan herbruikbaar voor een volgend staal
- de activiteit van silica is afhankelijk van het lot, de luchtvochtigheid en de activeringstemperatuur; aanpassing van de elutievolumes kan nodig zijn; er wordt best vooraf uitgetest in welke mate de alifatische koolwaterstoffen nog voorkomen in de aromatische fractie en omgekeerd en of de aromatische koolwaterstoffen kwantitatief teruggevonden worden.

Werkwijze voor zuivering met koper (enkel indien resterende zwavelinterferentie):

- breng een 20-tal dunne koperplaatjes van ongeveer 1 à 2 cm² in de nodige hoeveelheid 1N HNO₃ voor activatie gedurende enkele minuten; spoel de plaatjes grondig met aceton en laat drogen aan de lucht;
- voeg aan het tot 5-10 ml ingedampt extract geleidelijk koperplaatjes toe tot geen onmiddellijke zwartverkleuring door reactie met het aanwezige zwavel meer optreedt;
- breng aansluitend het extract over naar een amberkleurig monsterflesje voor verdere behandeling (langdurig contact met koper dient vermeden te worden).

Werkwijze voor zuivering met TBA-reagens (enkel indien resterende zwavelinterferentie):

- voeg aan het ingedampte extract achtereenvolgens 1 ml isopropanol, 1 ml TBA reagens en een spatelpunt natriumsulfiet toe;
- sluit af en schud gedurende 1 min;
- voeg 5 ml water toe en schud gedurende 2 min;
- scheid de organische fase af en was de waterfase tweemaal na met 1 ml hexaan;
- voeg de hexaanfasen samen en droog met Na₂SO₄.

6.3. GC-MS analyse**6.3.1 Werkwijze voor finale concentrering en toevoeging van de 'recovery'-standaard**

- breng het ingedampt monsterextract over in een amberkleurig monsterflesje, waarin ev. vooraf 1 ml n-nonaan als 'keeper' is gebracht;
- spoel de wanden van de erlenmeyer tenminste driemaal na met enkele ml dichloormethaan, en breng deze eveneens over;
- damp het extract in naar een eindvolume van ongeveer 1 ml;
- voeg m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de 'recovery' standaard-werkoplossing toe aan het eindextract, zodanig dat de concentratie ca. 1 µg/g bedraagt.

Opn.: in geval van groot-volume injectie zijn de 3 eerste stappen niet van toepassing en wordt een i.f.v. het injectievolume aangepaste hoeveelheid recovery standaard toegevoegd (typisch wordt 1 ng recovery standaard geïnjecteerd).

6.3.2 Meting

Van de preparaten en van de standaard-werkoplossing voor GC-MS kalibratie wordt standaard 1 µl splitless of on-column in de gaschromatograaf geïnjecteerd. Alternatief kan groot-volume injectie met een PTV injector of een *on-column* injector met *solvent vapour exit* toegepast worden. De chromatografische scheiding van de componenten wordt normaal uitgevoerd op een apolaire capillaire kolom met chemisch gebonden fase. De detectie van de componenten gebeurt met een lage resolutie massaspectrometer in de SIM-mode, met selectie en registratie van het moleculair ion van de te analyseren PAK's, de deuterium-gemerkte interne standaarden en de 'recovery'-standaard. Alternatief kan gebruik gemaakt worden van de full scan modus, met extractie van de voor de PAK's specifieke ionchromatogrammen. Gezien de verminderde detecteerbaarheid in full scan modus dienen de concentraties van de kalibratiestandaard en de doperingshoeveelheden van inwendige standaarden en recoverystandaard met een factor 10 verhoogd te worden.

De massaspectrometer wordt ingesteld naar maximale respons voor de ionen 131, 219, 264 en 414 m.b.v. het referentiegas PFTBA.

De typische GC-MS werkvoorwaarden voor PAK-analyse zijn weergegeven in tabel I in bijlage. Een typisch totaal ionchromatogram van de kalibratie-oplossing is weergegeven in figuur I in bijlage.

Opm.: wordt een signaal waargenomen groter dan de hoogste concentratie van het lineaire bereik (zie hieronder) dan dient de oplossing verdund te worden.

6.3.3 Kalibratie

De kwantitatieve bepaling van de verschillende PAK's gebeurt volgens de zgn. interne standaard-methode. Hierbij wordt elke component gekwantificeerd t.o.v. een bepaalde deuterium-gemerkte PAK die bij het begin van de extractie aan het monster werd toegevoegd.

Minstens in het begin en aan het einde van elke analysereeks, en verder om een welbepaald aantal preparaten (bv. 5), wordt de kalibratie-oplossing geïnjecteerd. Van elke PAK, natief of gemerkt, wordt de piekoppervlakte in het ionchromatogram van het karakteristieke ion gemeten, en dit zowel voor de kalibratie-oplossingen als voor de monsterpreparaten. Relatieve responsfactoren voor elke te bepalen component worden vervolgens bepaald uit de verhouding van de oppervlakten van de natieve componenten en de overeenkomstige interne standaarden (zie verder, 7.2). Voor de interne standaarden worden relatieve responsfactoren bepaald t.o.v. de 'recovery'-standaard.

6.3.4 Identificatie

De aanwezigheid van natieve PAK's in de monsters wordt bevestigd op basis van de onderstaande gegevens en criteria:

- de registratie van een piek bij de karakteristieke m/z, met piekhoogte groter dan 3 keer de ruishoogte (helft van de 'peak-to-peak' ruis);
- de retentietijd in monster (RT') t.o.v. kalibratie-oplossing (RT), waarbij een maximale afwijking van 5 sec, vermeerderd met de waargenomen verschuiving voor de overeenkomstige interne standaard, wordt gehanteerd [$RT + \Delta RT(IS) - 5 \text{ sec} \leq RT' \leq RT + \Delta RT(IS) + 5 \text{ sec}$].

De identificatie van interne standaarden is eveneens gebaseerd op de karakteristieke m/z en de signaal/ruis verhouding, en verder op de elutievolgorde zoals experimenteel vastgelegd (zie figuur I in bijlage).

In tabel I van de bijlage zijn de karakteristieke m/z van de natieve en gemerkte PAK's weergegeven, en staat voor elke natieve PAK de overeenkomstige interne standaard vermeld.

Van de geïdentificeerde pieken wordt de oppervlakte of alternatief de piekhoogte bepaald.

6.4 HPLC-analyse

6.4.1 Werkwijze voor finale concentrering:

- breng het ingedampte extract over naar een puntbuis;
- voeg aan het ingedampte extract 1 ml acetonitrile toe;
- damp in tot ca 0.8 ml;
- leng aan met acetonitrile tot een welbepaald volume, bv. 1 ml

6.4.2 Meting

Van de preparaten en van de standaard-werkoplossingen voor HPLC kalibratie wordt een welbepaalde hoeveelheid, bv. 20 µl, in de vloeistofchromatograaf geïnjecteerd. De chromatografische scheiding van de componenten wordt uitgevoerd op een C18 kolom. De detectie van de componenten gebeurt met een fluorescentiedetector gecombineerd met een DAD of UV detector.

Opmerkingen:

- wordt een signaal waargenomen groter dan de hoogste concentratie van de kalibratiereeks of van het lineaire bereik (zie hieronder) dan dient de oplossing verdund te worden;
- voor acenaftyleen wordt geen fluorescentiesignaal waargenomen, zodat de bepaling van deze verbinding aan de hand van het UV absorptie chromatogram dient te gebeuren;
- de fluorescentiedetector is, mits juiste programmering, aanzienlijk gevoeliger dan de UV of DAD detector; voor zeer lage concentraties kan het fluorescentiechromatogram niet bevestigd worden door een analoog UV chromatogram; onduidelijke fluorescentiechromatogrammen dienen dan ook bevestigd te worden met GC-MS ofwel andere fluorescentie-instellingen.

De typische HPLC werkvoorwaarden voor PAK-analyse zijn weergegeven in tabel II in bijlage. Een typisch fluorescentiechromatogram van de kalibratie-oplossing is weergegeven in figuur II in bijlage.

Opmerking: de optimale instelling van de fluorescentiedetector is sterk afhankelijk van het type toestel. De in bijlage weergegeven programmering is dan ook bij wijze van voorbeeld opgenomen.

6.4.3 Kalibratie

De kwantitatieve bepaling van de verschillende PAK's gebeurt volgens de externe standaard-methode. Hierbij wordt elke te bepalen component gekwantificeerd aan de hand van een kalibratierechte.

Op regelmatige basis wordt een reeks kalibratie-oplossingen in oplopende concentratie, van 2 tot 1000 ng/ml, geïnjecteerd. Van elke PAK worden de piekoppervlakten (of alternatief de piekhoogten) in de chromatogrammen van de verschillende kalibratie-oplossingen gemeten. De oppervlakten (of – hoogten) worden voor elke te bepalen component uitgezet i.f.v. de concentratie. Uit de helling van de rechten worden resp. responsfactoren berekend op basis waarvan de gehalten bepaald worden (zie hieronder).

De kalibratierechten dienen niet bij elke analysereeks geconstrueerd te worden. Wel wordt aan de hand van een kalibratie-oplossing uit het middengebied van de kalibratiereeks om een welbepaald aantal stalen, bv. 10, nagegaan of het bekomen signaal niet te sterk afwijkt van de te bekomen waarde. Een maximale afwijking van 10% t.o.v. de kalibratierechte is toegelaten. Is de afwijking groter dan dient de kalibratierechte opnieuw bepaald te worden.

6.4.4 Identificatie

De aanwezigheid van PAK's in de monsters wordt bevestigd op basis van de onderstaande gegevens:

- de retentietijd in monster (RT') t.o.v. kalibratie-oplossing (RT), waarbij een maximale afwijking van 0.2 min wordt toegestaan, vermeerderd met de waargenomen verschuiving voor de surrogaat;
- de simultane aanwezigheid van pieken in zowel het fluorescentiechromatogram als het UV chromatogram op de juiste retentietijden, voor zover het aanwezige concentratieniveau dit toelaat;
- in geval van onzuivere chromatogrammen dient de aanwezigheid van PAK's bevestigd te worden door een GC-MS analyse.

Gezien de hogere specificiteit van de fluorescentiedetector gebeurt, met uitzondering van acenaftyleen, de kwantificatie op basis van de piekoppervlakten of –hoogten bekomen in het fluorescentiechromatogram. Bij hoge concentraties, waarbij de bovenste lineaire grens voor de fluorescentiedetector overschreden is (zie verder), kan gebruik gemaakt worden van de piekoppervlakten of –hoogten bekomen in het UV-chromatogram, op voorwaarde dat voldoende zuivere chromatogrammen bekomen worden. Bij voorkeur wordt echter overgegaan tot een heranalyse na verdunning van het extract.

7. BEREKENINGEN

7.1 Externe kalibratie (HPLC-methode)

7.1.1 Responsfactoren

De externe standaardmethode is gebaseerd op de bepaling van een respons- of gevoeligheidsfactor (RF) van elke PAK verbinding. Gebruikmakend van de samenstelling van het kalibratiemengsel en de geïntegreerde piekoppervlakken van de respectievelijke PAK verbindingen worden de verschillende gevoeligheidsfactoren als volgt berekend (*opm.: alternatief kan men gebruikmaken van piekhoogten*):

$$RF_i = \frac{A_i}{C_i}$$

met

RF_i = gevoeligheids- of responsfactor, in ml/μg

A_i = piekoppervlak van de PAK-verbinding in de kalibratiestandaard

C_i = concentratie van de PAK-verbinding in de kalibratiestandaard, in μg/ml

In de praktijk wordt gebruik gemaakt van een kalibratiereeks. Voor elke PAK verbinding worden de gemeten A_i-waarden uitgezet i.f.v. de C_i-waarden en na lineaire regressie wordt uit de helling van de rechte de RF_i-waarde bekomen.

7.1.2 Gehalten van de PAK verbindingen in de monsters

Het gehalte van de verbindingen wordt gegeven door de onderstaande formule:

Voor water:

$$C_i = \frac{A_i \cdot v \cdot f \cdot 1000}{RF_i \cdot V \cdot Q_i}$$

met

- C_i = de concentratie van verbinding i in $\mu\text{g/l}$
 A_i = de piekoppervlakte voor verbinding i in het monster
 RF_i = de responsfactor in $\text{ml}/\mu\text{g}$
 v = het volume van het eindextract in ml
 V = het volume van de in behandeling genomen hoeveelheid monster in ml
 f = de verdunningsfactor
 Q_i = de gemiddelde terugvinding voor de verbinding i zoals waargenomen bij de validatie voor de van toepassing zijnde matrix en berekend als de verhouding van de gemeten waarde en de referentiewaarde.

Voor bodem en sediment:

$$C_i = \frac{A_i \cdot v \cdot f}{RF_i \cdot G \cdot Q_i}$$

met

- C_i = het gehalte in mg/kg d.s. van PAK-component i in het monster
 G = hoeveelheid in g d.s. geëxtraheerd monster, verrekend naar drooggewicht

7.1.3 Aantoonbaarheidsgrenzen voor niet-gedetecteerde PAK verbindingen in het monster

De laagst aantoonbare concentratie die voor de verbindingen in een monster kan gemeten worden is afhankelijk van de gevoeligheid van de detector, de aard van de matrix, de hoeveelheid monster die in behandeling genomen werd, het extractierendement, de efficiëntie van de monsterzuivering, de kwaliteit van de gebruikte reagentia, enz. . Voor de niet-gedetecteerde PAK verbindingen worden “<”-waarden gerapporteerd overeenkomend met of groter dan de aantoonbaarheidsgrenzen. De aantoonbaarheidsgrenzen dienen kleiner te zijn dan de gevraagde rapporteergrenzen.

Een inschatting van de laagst detecteerbare concentratie voor de PAK verbindingen in het monster kan gebeuren aan de hand van de oppervlakte of hoogte van een chromatogrampiek die net van de ruis kan onderscheiden worden. Uitgaande van deze oppervlakte kan met bovenstaande formules de laagst aantoonbare concentratie berekend worden.

7.2 Interne kalibratie

7.2.1 Relatieve responsfactoren

Op basis van de geïntegreerde piekoppervlakken van de natieve PAK component en de overeenkomstige interne standaard in de resp. ionchromatogrammen van de kalibratie-oplossing wordt voor elke PAK-component de relatieve responsfactor (RRF) op de volgende wijze berekend :

$$RRF_i = \frac{A_i \cdot C_{IS}}{A_{IS} \cdot C_i}$$

met

- RRF_i = relatieve responsfactor van PAK-component i
 A_i = piekoppervlakte van PAK-component i bij injectie van de kalibratie-oplossing
 C_i = concentratie (in ng/μl) van PAK-component i in de kalibratie-oplossing
 C_{IS} = concentratie (in ng/μl) van de overeenkomstige interne standaard in de kalibratie-oplossing
 A_{IS} = piekoppervlakte van de overeenkomstige interne standaard bij injectie van de kalibratie-oplossing

Voor de bepaling van de PAK-gehalten in een monster wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van de gemiddelde RRF-waarden bekomen uitgaande van twee injecties van de kalibratie-oplossing, nl. de laatste voorafgaand aan en de eerste volgend op het monsterpreparaat.

7.2.2 Gehalte van de PAK-componenten in het monster

Gebruik makend van de geïntegreerde piekoppervlakten van de PAK-component en de overeenkomstige interne standaard in de resp. ionchromatogrammen van het monsterpreparaat en rekening houdend met de relatieve responsfactor van de beschouwde PAK-component, kan de concentratie van de PAK-component in het monster als volgt berekend worden :

Voor bodem, slib, vaste afval en olie:

$$C_i = \frac{A_i \cdot g_{IS}}{A_{IS} \cdot \langle RRF_i \rangle \cdot G \cdot 1000}$$

met

- C_i = het gehalte in mg/kg d.s. van PAK-component i in het monster
 A_i = piekoppervlakte van de PAK-component i bij injectie van het preparaat
 A_{IS} = piekoppervlakte van de overeenkomstige interne standaard bij injectie van het preparaat
 g_{IS} = hoeveelheid in ng van de overeenkomstige interne standaard toegevoegd aan het monster
 <RRF_i> = de gemiddelde relatieve responsfactor voor PAK-component i uitgaande van twee injecties van de kalibratie-oplossing, voorafgaand aan en volgend op het monsterpreparaat
 G = hoeveelheid in g d.s. geëxtraheerd monster, verrekend naar drooggewicht

Voor water :

$$C_i = \frac{A_i \cdot g_{IS}}{A_{IS} \cdot \langle RRF_i \rangle \cdot V}$$

met A_i , A_{IS} , g_{IS} en $\langle RRF_i \rangle$ zoals hierboven en

C_i = het gehalte in $\mu\text{g/l}$ van PAK-component i in het monster
 V = het volume aan extractie onderworpen waterstaal in ml

Opmerking: Zoals hierboven vermeld coëluceert op apolaire kolommen benzo(j)fluorantheen met benzo(b)fluorantheen en worden beide verbindingen dus samen gemeten. Men rapporteert de som van beide verbindingen evenwel als *benzo(b)fluorantheen*. Toxicologisch is er immers geen verschil.

7.2.3 Aantoonbaarheidsgrenzen voor niet-gedetectedeerde PAK-componenten in het monster

De aantoonbaarheidsgrenzen worden bepaald uitgaande van de "peak-to-peak" ruishoogte in het retentietijdsgebied van de betreffende component en de piekhoogte van de interne standaard:

Voor bodem, slib, vaste afval en olie:

$$DG_i = \frac{3 \cdot RG_i \cdot g_{IS}}{PH_{IS} \cdot \langle RRF_i \rangle \cdot G \cdot 1000}$$

met g_{IS} , G en $\langle RRF_i \rangle$ cfr. hierboven en

DG_i = aantoonbaarheidsgrens in mg/kg d.s. van PAK-component i in het monster
 RG_i = de "peak-to-peak" ruishoogte in het retentietijdsgebied van PAK-component i bij injectie van het preparaat
 PH_{IS} = piekhoogte van de overeenkomstige interne standaard bij injectie van het preparaat

Voor water:

$$DG_i = \frac{3 \cdot RG_i \cdot g_{IS}}{PH_{IS} \cdot \langle RRF_i \rangle \cdot V}$$

met g_{IS} , V , RG_i , PH_{IS} en $\langle RRF_i \rangle$ cfr. hierboven en

DG_i = aantoonbaarheidsgrens in $\mu\text{g/l}$ van PAK-component i in het monster

Opmerking: Bij de berekening van de aantoonbaarheidsgrenzen wordt gebruik gemaakt van piekhoogten i.p.v. piekoppervlakten, ook al zijn de RRF_i gedefinieerd op basis van piekoppervlakten; aangezien aantoonbaarheidsgrenzen in wezen altijd maar schattingen zijn wordt deze benadering aanvaardbaar geacht.

8. KWALITEITSCONTROLE

8.1 Responslineariteit

Uitgaande van minimaal 5 standaardoplossingen met verschillende concentraties aan PAK-verbindingen, en in geval van interne kwantificatie met een vaste concentratie aan inwendige standaarden, en vertrekkend van tienmaal de minimum detecteerbare hoeveelheid (zie hieronder), wordt de lineariteit van de detectorrespons gecontroleerd.

In geval van externe kwantificatie wordt voor elke PAK verbinding de detectorrespons uitgezet i.f.v. de concentratie; de helling van de rechte is RF_i .

In geval van interne kwantificatie wordt de verhouding van de detectorrespons van de PAK-component en de overeenkomstige inwendige standaard uitgezet i.f.v. de verhouding van de concentratie van de PAK-componenten en de inwendige standaard; de helling van de rechte is RRF_i .

Voor elke PAK-verbinding dient een rechte bekomen te worden waarvan de variatiecoëfficiënt V_{xo} (zie ISO-8466-1990:1) kleiner is dan of de correlatiecoëfficiënt groter is dan een vooropgestelde waarde (bv $V_{xo} < 15\%$, $r_2 > 0.995$).

Bijkomend dient men C_i/A_i uit te zetten i.f.v. C_i of $(A_i \cdot C_{IS})/(A_{IS} \cdot C_i)$ i.f.v. C_i . Het lineair bereik wordt gedefinieerd als dat gebied waarvoor de afwijking van C_i/A_i of $(A_i \cdot C_{IS})/(A_{IS} \cdot C_i)$ t.o.v. de gemiddelde waarde maximaal 15 % bedraagt.

Een controle van de lineariteit wordt uitgevoerd bij elke ernstige instrumentele ingreep.

Wanneer de piekoppervlakte voor een bepaalde component in een geïnjecteerd monster-preparaat hoger is dan de hoogste oppervlakte die bij de recentste lineariteitstest of bij de opstelling van de kalibratierechte werd bekomen dient een hermeting te gebeuren op het oorspronkelijke preparaat na verdunning.

8.2 Chromatografische scheiding

In geval van GC-MS analyse wordt de kolomkwaliteit geverifieerd aan de hand van de scheiding van het kritische paar benzo(b)fluorantheen en benzo(k)fluorantheen in het chromatogram van de kalibratie-oplossing. Het gaschromatografisch scheidingspercentage (hoogte vallei / hoogte hoogste piek) dient, bij gebruik van een 30 m apolaire kolom, kleiner te zijn dan 60 %.

In geval van HPLC-analyse kan de kolomkwaliteit geverifieerd worden aan de hand van de scheiding van bv. het kritische paar acenafteen en fluoreen in het fluorescentiechromatogram van de kalibratie-oplossing. Het chromatografisch scheidingspercentage (hoogte vallei / hoogte hoogste piek) dient kleiner te zijn dan 20 %.

8.3 Minimum detecteerbare hoeveelheden (MDH)

De minimum detecteerbare hoeveelheid is een maat voor de gevoeligheid van het apparaat. Aan de hand van de signaal-ruisverhouding geregistreerd voor de PAK verbindingen in het chromatogram van de kalibratiestandaardoplossing kan de gevoeligheid van het toestel geverifieerd te worden. Deze moet van die aard zijn dat zonder problemen de gevraagde rapporteergrens kan gehaald worden.

8.4 Responsfactoren en relatieve responsfactoren

In geval van externe kalibratie worden de responsfactoren bepaald aan de hand van een kalibratierechte. Om een welbepaald aantal monsters, bv. 10, wordt de geldigheid van de kalibratierechte geverifieerd door injectie van een kalibratie-controlestandaard (zie hierboven).

In geval van interne kalibratie worden relatieve responsfactoren bepaald aan de hand van een kalibratie-oplossing uit het middengebied van het lineair bereik. Binnen eenzelfde analysereeks dient gecontroleerd te worden in hoeverre de relatieve responsfactoren bekomen voor twee opeenvolgende injecties van de kalibratie-oplossing, met tussentijdse injectie van tenminste één monsterextract, van elkaar afwijken. Voor elke PAK moet de verhouding RRF1/RRF2 tussen 0.8 en 1.2 liggen. In geval van interne kalibratie wordt bij voorkeur het gemiddelde van 2 relatieve responsfactoren genomen voor de berekening van de gehalten van een tussenliggende reeks monsters.

8.5 Blanco

Bij elke analysereeks wordt tenminste één procedureblanco bepaald. Hierbij wordt de volledige analyseprocedure gevolgd, doch zonder inname van monster. Het geregistreerde chromatogram dient vrij te zijn van interfererende pieken groter dan 10% van de pieken geregistreerd voor het monster met uitzondering van monsterwaarden kleiner dan 5 maal de gevraagde rapporteergrens, waarvoor de interfererende pieken niet groter mogen zijn dan de helft van de gevraagde rapporteergrens.

8.6 Controlemonster

Op regelmatige basis wordt een controlemonster meegenomen.

Van minstens 3 PAKs verspreid over het ganse retentietijdsgebied worden de gehalten opgetekend in controlekaarten, samen met de som van het gehalte van alle PAKs. De opgetekende waarden moeten voldoen aan de voor controlekaarten geldende criteria.

Opn.: bij de validatie wordt i.f.v. de matrix gebruik gemaakt van een gecertificeerd referentiemateriaal (tenzij dit niet beschikbaar zou zijn). Voor de controle van de juistheid en reproduceerbaarheid van de dagdagelijkse analyses mag gebruik gemaakt worden van een gedopeerd monster of in het slechtste geval een onafhankelijke controlestandaard.

8.7 Recuperatierendement van de interne standaarden

Wordt gebruik gemaakt van de inwendige kwantificatiemethode dan kunnen aan de hand van het signaal geregistreerd voor de inwendige standaarden en de recovery standaard voor elk monster de recuperatierendementen van de inwendige standaarden bepaald worden:

$$R\% = \frac{A_{IS} \cdot g_{RS} \cdot 100}{A_{RS} \cdot g_{IS} \cdot RRF_{IS}}$$

met

R% = recuperatierendement (in %)

A_{IS} = piekoppervlakte van de interne standaard bij injectie van het preparaat

A_{RS} = piekoppervlakte van de 'recovery' standaard bij injectie van het preparaat

g_{RS} = hoeveelheid (in ng) van de 'recovery'-standaard toegevoegd aan het preparaat bij het einde van de opwerking

g_{IS} = hoeveelheid (in ng) van de interne standaard toegevoegd aan het monster

RRF_{IS} = gemiddelde relatieve responsfactor van de interne standaard t.o.v. de 'recovery'-standaard, uitgaande van twee injecties van de kalibratie-oplossing, voorafgaand volgend op het monsterpreparaat

Verantwoorde kwantificering is slechts dan toegelaten indien het recuperatierendement van de minder vluchtige inwendige standaarden minimaal 50 % bedraagt. Voor d8-naftaleen dient de terugvinding minimaal 40% te bedragen.

8.8 Terugvinding van de surrogaat

Bij HPLC bepalingen wordt het goede verloop van de analyse geverifieerd aan de hand van het teruggevonden gehalte van de surrogaat. Deze moet voor elk preparaat gelegen zijn tussen 80% en 120%.

9. ANALYSEGANG

De typische analysegang is schematisch weergegeven in figuur 1.

10. METHODEKARAKTERISTIEKEN

Wordt gebruik gemaakt van de externe kwantificatiemethode dan dient uit de methodevalidatie op basis van een matrixspike aangetoond te worden dat het recuperatierendement van naftaleen, acenaftyleen en acenaften minstens 50% en van de andere PAK's minstens 80% bedraagt. Voor naftaleen, acenaften en acenaftyleen worden lagere extractierendementen bekomen als gevolg van verliezen tijdens de indampstap. Bij de GC-MS bepaling worden deze verliezen gecorrigeerd door het gebruik van d8-naftaleen als inwendige standaard.

De juistheden voor een gedopeerd waterstaal in een concentratie van 1 µg/l zijn, na correctie met de recuperatierendementen bekomen bij de validatie (HPLC benadering) of na correctie door het gebruik van inwendige standaarden (GC-MS benadering), gelegen tussen 80 en 120%.

De herhaalbaarheden zijn kleiner dan 10%, behalve voor naftaleen waarvoor deze 15% kan bedragen. Voor het sedimentmonster CRM535 dienen voor de gecertificeerde PAKs juistheden bekomen te worden gelegen tussen 80% en 120% met herhaalbaarheden die kleiner zijn dan 10%.

De aantoonbaarheidsgrenzen zijn bij een inname van 1 g bodem kleiner dan 0.01 mg/kg ds.

Voor waterstalen bedragen de aantoonbaarheidsgrenzen, vertrekkend van 500 ml water, 5 tot 50 ng/l afhankelijk van matrixinterferentie en polyaromaat.

Voor oliestalen bedragen de aantoonbaarheidsgrenzen 0.05 tot 0.5 mg/kg.

11. VEILIGHEID

De scheikundige produkten die bij deze analysemethode gebruikt worden, zijn ondergebracht bij de potentieel giftige en kankerverwekkende stoffen. Dit maakt het noodzakelijk de voorziene maatregelen in het laboratorium toe te passen om blootstelling aan of contact met deze produkten tot een minimum te herleiden.

12. REFERENTIES

¹ *Procedure conform Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group, USA en TNRCC method 1006, Texas*

² *Deze procedure is het resultaat van besprekingen binnen de schoot van de Werkgroep Afvalstoffenanalyse waaraan de onderstaande laboratoria en instanties deelnamen:*

*OVAM
LISEC
Laboratoria Van Vooren
PCM
PIH
ECCA
SGS
SERVACO
BECEWA
VITO*

Figuur 1: Typische analysegang

Bij elke ernstige instrumentele ingreep (bijv. reiniging van de detector) of op regelmatige basis:

Injecteer standaard-werkoplossingen van verschillende concentratie
 Bepaal V_{xo} van de regressierechte $V_{xo} \leq 15\%$?
 Bepaal lineair bereik
 Bereken in geval van externe kalibratie voor elke PAK $\langle RF \rangle$

Per analysereeks:

Injecteer kalibratie-oplossing: bepaal voor elke PAK $RF(i)$ of $RRF(i)$
 verifieer ligging $RF(i)$ tov $\langle RF \rangle$

Verifieer de chromatografische scheiding

Injecteer procedureblanco

Injecteer monsterpreparaten (max. 5)

Injecteer kalibratie-oplossing en bepaal voor elke PAK $RF(i+1)$ of $RRF(i+1)$
 verifieer ligging $RF(i+1)$ tov $\langle RF \rangle$
 of $0.8 \leq RRF(i)/RRF(i+1) \leq 1.2$?

Injecteer monsterpreparaten (max. 5)

Bepaal de piekoppervlakten voor het monsterpreparaat en verifieer m.b.t. lineariteit
 binnen lineair gebied?
 herinjecteer zonodig na verdunning

Verifieer de blancobijdrage $A_i(\text{blanco}) < 0.1 \cdot A_i(\text{monster})?$

Verifieer de recuperatierendementen voor de IS (GC-MS)
 of de terugvinding van de surrogaat (HPLC) $R\%(IS) > 50\%$ (naft. 40%)?
 $R\%(surrogaat) > 80\%$

Bereken de gehalten voor het monster

Op regelmatige basis:

Bepaal de MDH-waarden (kalibratie-oplossing)

Injecteer controlemonster

Bereken en verifieer de gehalten in het controlemonster

BIJLAGE**Tabel I: Typische GC-MS werkvoorwaarden voor de bepaling van PAK's**

Kolomspecificaties : DB-5MS of equivalent, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm

GC-instellingen

Draaggas en druk : Helium, 75 kPa
250°C

Injectiemodus : Splitless (purge on na 1 min)
Split vent : 30 ml / min
tabel 1

Septum purge : 1 ml / min

Injectievolume : 1 µl

Injectietemperatuur : 300°C

Interfacetemperatuur : 275°C

MS-instellingen

Brontemperatuur :

Electronenenergie : 70 eV

SIM-ionen : zie

Temperatuursprogrammatie GC-oven

125°C : isotherm gedurende 1 min

125°C → 205°C : 20°C / min

205°C → 305°C : 10°C / min

305°C : isotherm gedurende 15 min

totale duur : 30 min

PAK-component	m/z	Kwantificering t.o.v.
Naftaleen	128	D8-naftaleen
Acenaftyleen	152	"
Acenaftteen	153	"
Fluoreen	166	D10-anthraceen
Fenantreen	178	"
Anthraceen	178	"
Fluorantheen	202	D10-fluorantheen
Pyreen	202	D10-pyreen
Benz(a)anthraceen	228	"
Chryseen	228	"
Benzo(b)fluorantheen	252	D12-benzo(b)fluorantheen
Benzo(k)fluorantheen	252	D12-benzo(k)fluorantheen
Benzo(a)pyreen	252	D12-benzo(a)pyreen
Indeno(1,2,3,c,d)pyreen	276	D12-indeno(1,2,3,c,d)pyreen
Dibenzo(a,h)anthraceen	278	D12-benzo(g,h,i)peryleen
Benzo(g,h,i)peryleen	276	"
D8-naftaleen	136	
D10-anthraceen	188	
D10-fluorantheen	212	
D10-pyreen	212	
D12-benzo(b)fluorantheen	264	
D12-benzo(k)fluorantheen	264	
D12-benzo(a)pyreen	264	
D12-indeno(1,2,3,c,d)pyreen	288	
D12-benzo(g,h,i)peryleen	288	
D12-chryseen	240	

BIJLAGE

Tabel II: Typische HPLC werkvoorwaarden voor de bepaling van PAK's

Kolomspecificaties : VYDAC C18 201TP54 250x4mm

HPLC-instellingen

Injectievolume : 20 µl

Kolomtemperatuur : 35°C

Gradiënt :

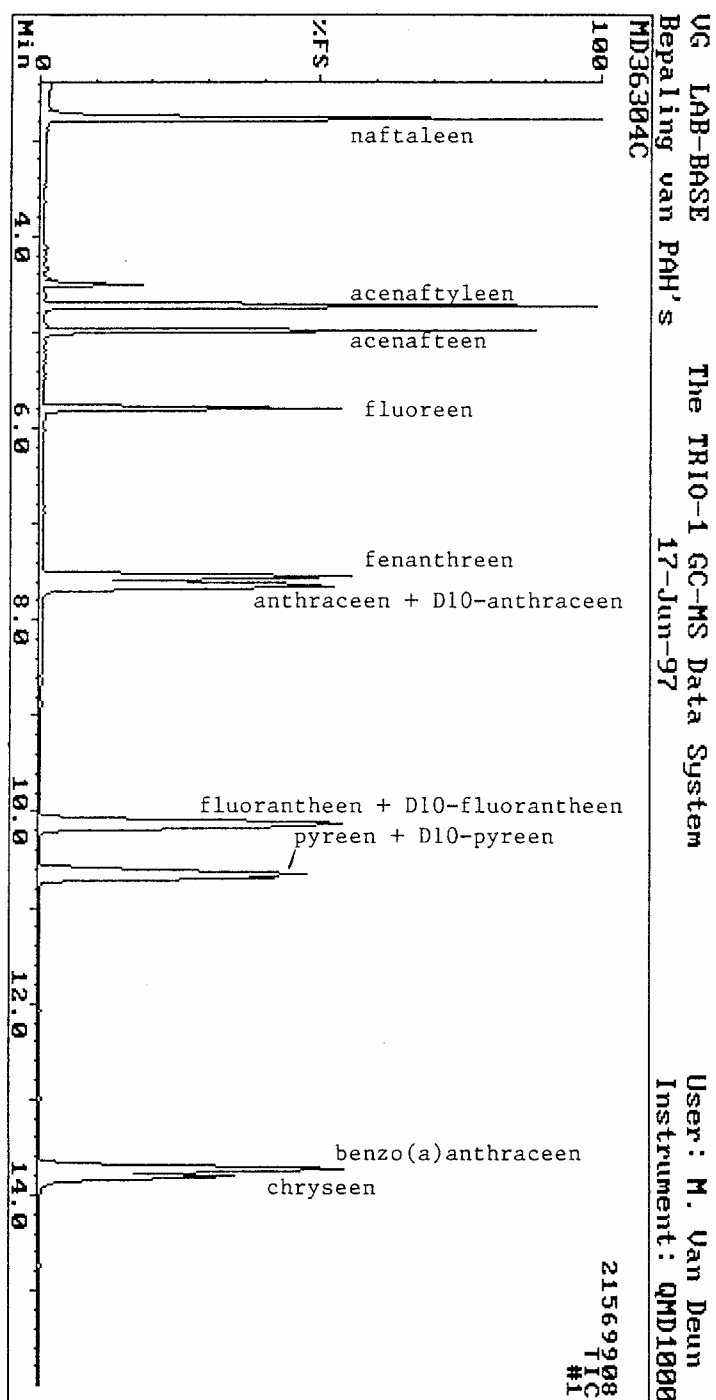
Tijd (min)	Acetonitrile %	Water %
0	50	50
10	50	50
50	100	0
60	50	50
70	50	50

Fluorescentiedetector en DAD programmatie :

PAK	DAD	Fluorescentie (zie NEN 5771)	
	λ _{max} voor UV	Aanbevolen λ _{ex} /λ _{em}	Geoptimaliseerde λ _{ex} /λ _{em}
Naftaleen	220	280/340	280/334
Acenaftyleen	227	280/340	292/324
Acenaftteen	229		
Fluoreen	261	280/340	268/308
Fenantreen	251	280/340	292/366
Anthraceen	252	305/430	253/402
Fluorantheen	236	305/430	360/460
Pyreen	240	305/430	336/376
Benz(a)anthraceen	287	305/430	288/390
Chryseen	267	305/430	268/383
Benzo(b)fluorantheen	256	305/430	300/436
Benzo(k)fluorantheen	307	305/430	308/414
Benzo(a)pyreen	296	305/430	296/408
Benzo(g,h,i)peryleen	299	305/430	300/410
Dibenzo(a,h)anthraceen	297	305/430	297/398
Indeno(1,2,3,c,d)pyreen	250	305/500	302/506

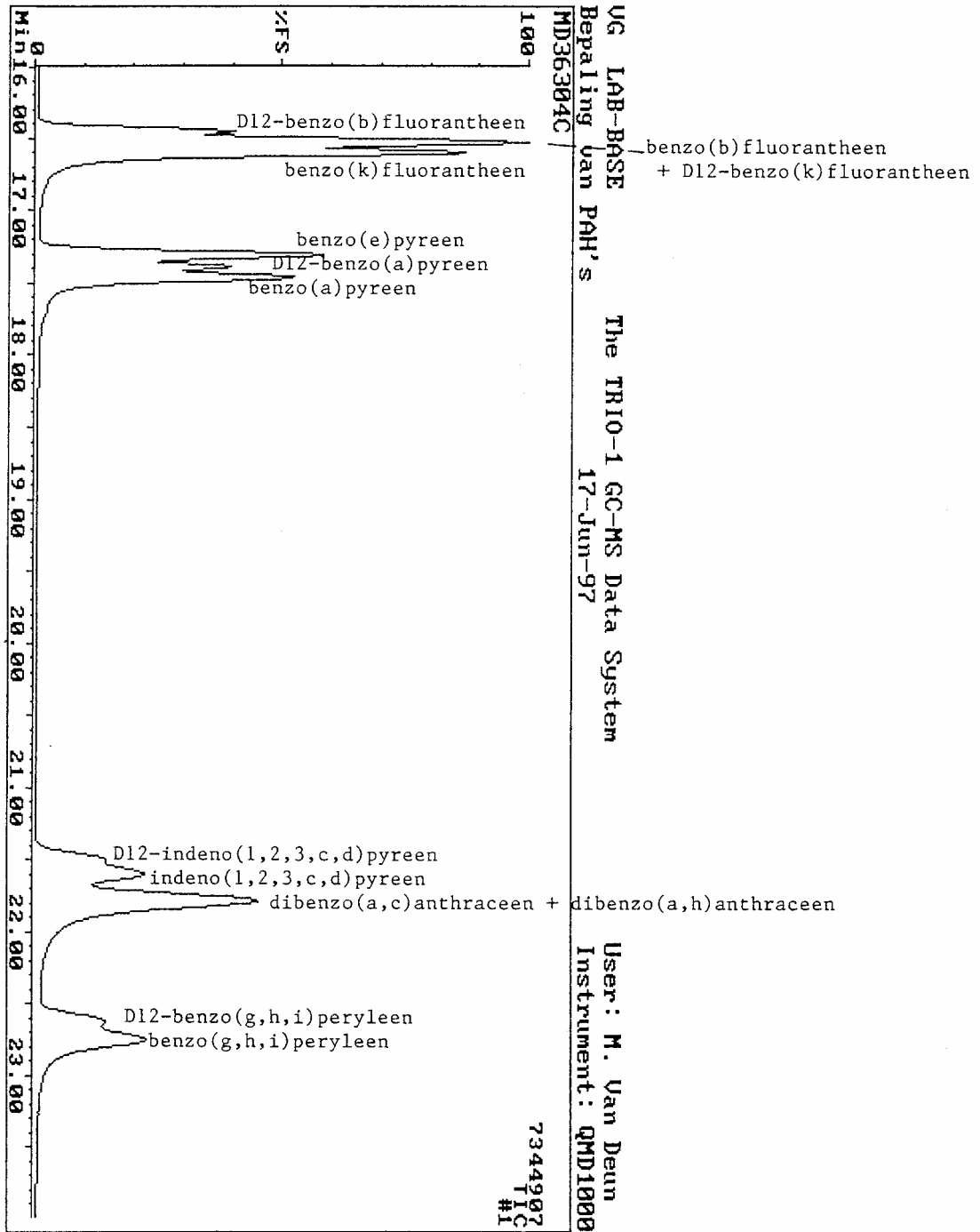
BIJLAGE

Figuur I : Totaal ionen chromatogram voor een PAK kalibratie-oplossing - eerste deel



BIJLAGE

Figuur I : Totaal ionen chromatogram voor een PAK kalibratie-oplossing – tweede deel



Figuur II : HPLC fluorescentiechromatogram voor een PAK kalibratie-oplossing

