

BEPALING VAN DE BIOGENE / PETROGENE OORSPRONG VAN MINERALE OLIE VERONTREINIGINGEN IN WATERBODEM

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft de analyse en interpretatie van biogene en petrogene indicatoren in waterbodem. Met deze methode kan een uitspraak gedaan worden over het biogeen en/of petrogeen karakter van apolaire koolwaterstoffen gedetecteerd met GC/FID (zie methode CMA/3/R.1).

2 PRINCIPE

De methode is gebaseerd op de GC/MS-meting van bepaalde indicatorcomponenten en de berekening van een aantal ratio's. Aan elk van deze indicatoren en ratio's wordt d.m.v. toetsing aan een referentiewaarde een biogene of petrogene score toegekend. Op basis van de totaalscore kan de verontreiniging getypeerd worden. Een belangrijk gegeven is dat minerale olie in reële waterbodems in praktijk bijna altijd een mengsel is van biogene en petrogene koolwaterstoffen. Vandaar dat 3 types onderscheiden worden : "overwegend biogene verontreiniging", "overwegend petrogene verontreiniging" en "mengsel van biogene en petrogene verontreiniging".

De staalvoorbereiding is conform aan deze van methode CMA/3/R.1, zodat het extract voor de bepaling van minerale olie met GC/FID vervolgens (indien nodig) gebruikt kan worden voor de bepaling van de biogene en petrogene kenmerken met GC/MS. De waterbodemstalen worden na chemische droging soxhlet-geëxtraheerd met een mengsel van aceton en n-hexaan. Na extractie wordt de interne standaard voor de GC/FID-bepaling toegevoegd (n-C40). Het extract wordt vervolgens gewassen met water om de aceton te verwijderen. Na toevoeging van gedeutereerde interne standaarden voor de GC/MS-analyse wordt het extract gezuiverd met florisil. Het aldus verkregen extract is geschikt voor de bepaling van minerale olie met GC/FID. Vervolgens wordt het extract gezuiverd over silica om de aromatische componenten te verwijderen. De indicatorcomponenten (n-alkanen, pristaan, phytaan, hopanen en UCM) worden bepaald d.m.v. een GC/MS-analyse in SIM.

Opmerking : UCM staat voor *Unresolved Complex Mixture*, waarmee de "bult" in het GC-chromatogram bedoeld wordt waarin geen individuele pieken meer zichtbaar zijn.

3 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 3.1 analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0,1 mg
- 3.2 bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0,01 g
- 3.3 mortier en stamper (porcelein)
- 3.4 soxhletapparaat en elektrische verwarmingsmantel met temperatuursregeling
- 3.5 schudapparaat met horizontale beweging, 150 tot 300 slagen per minuut
- 3.6 erlenmeyers van 100 en 250 ml
- 3.7 scheidtrechters van 500 tot 2000 ml
- 3.8 gebruikelijk laboratoriumglaswerk, volgens de gebruikelijke procedure gereinigd en gespoeld met aceton en vervolgens hexaan of petroleumether
- 3.9 glasvezelfilters

- 3.10 glazen chromatografiekolom (met frit en teflon kraan) interne diameter ongeveer 1,5 cm lengte ongeveer 25 cm
- 3.11 injectiespuiten voor het doperen met interne standaard-oplossing
- 3.12 eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet
- 3.13 gaschromatograaf voor capillaire kolommen, voorzien van een niet-discriminerend injectiesysteem (on-column injector), een MS detector en een datastation voorzien van de nodige sturings- en dataverwerkingsprogrammatuur (de GC is ev. uitgerust met een groot volume injector)
- 3.14 injectiespuit voor de autosampler
- 3.15 capillaire kolom met apolaire fase, geschikt voor de scheiding van pristaan en phytaan van resp. n-C17 en n-C18 (poly-95%-dimethyl-5%-difenylsiloxaan, 60 m lengte, met een diameter van 0.25 mm en een filmdikte van 0.25 µm).

4 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- 4.1 n-hexaan, aceton : residu-analyse kwaliteit (opm: i.p.v. n-hexaan kan ook petroleumether (40°-60°C), isohexaan of een ander alkaan gebruikt worden)
- 4.2 natriumsulfaat (Na₂SO₄): granulair en watervrij; een geopende verpakking wordt uitgegoten in een schaal en bewaard bij 130°C in een droogoven
- 4.3 florisil, korrelgrootte 0.15 mm tot 0.25 mm (60-100 mesh), gedurende 16 u verhit bij 140°C en vervolgens bewaard in een exsiccator
- 4.4 silica: een laag van ongeveer 25 mm silica (Merck 'Kieselgel 100' 70-230 mesh of gelijkwaardig) wordt in een glazen schaal geactiveerd gedurende minstens 16 uur bij 130°C en vóór gebruik afgekoeld in een exsiccator tot kamertemperatuur
- 4.5 zoutzuur
- 4.6 magnesiumsulfaat
- 4.7 stockoplossing van even n-alkanen (C₁₀ t.e.m. C₄₀)
- 4.8 pristaan
- 4.9 phytaan
- 4.10 17α(H)-22,29,30-trisnorhopaan (Tm)
- 4.11 22,29,30-trisnorhop-17(21)-een (Te)
- 4.12 17α(H),21β(H)-22S-homohopaan (22S)
- 4.13 17α(H),21β(H)-22R-homohopaan (22R)
- 4.14 RIVM-olie voor het testen van het niet-discriminerend karakter van de GC-injector : mengsel van minerale oliën, bestaande uit een dieselolie en een motorolie, zoals verkrijgbaar bij het Nederlands Meetinstituut, Afdeling Massa&Chemie, Postbus 654, 2600 AR Delft
- 4.15 n-tetracontaan (interne standaard GC/FID)
- 4.16 voor het testen van de florisilkwiteit : n-decaan, 4-cholesten-3-one en tetraline
- 4.17 D50-n-tetracosaan (interne standaard GC/MS)
- 4.18 kalibratie-oplossing van alkanen en hopanen : deze oplossing in n-hexaan bevat de even n-alkanen van C₁₀ tot C₃₈, pristaan, phytaan, de hopanen, en D50-n-C₂₄ (interne standaard) in een concentratie van ongeveer 1 mg/l elk
- 4.19 doperingsoplossing van D50-n-C₂₄ in n-hexaan van ongeveer 20 mg/l
- 4.20 doperingsoplossing van n-tetracontaan in n-hexaan van ongeveer 1000 mg/l; de oplossing wordt bewaard bij kamertemperatuur en wordt vóór gebruik gesoniceerd om eventueel uitgekristalliseerd C₄₀ terug op te lossen
- 4.21 testoplossing voor de bepaling van de kwaliteit van florisil, bevattende ca 15 µg/g tetraline, 15 µg/g decaan en 60 µg/g 4-cholesten-3-one in hexaan

5 MONSTERBEWARING EN –VOORBEHANDELING

Bij de monsternamen wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van glazen flessen, afgesloten met glazen stoppen of plastic stoppen met teflon inlage.

De monstervoorbehandeling van waterbodempogebuurvolgens de procedure CMA/5/B.3.

De stalen zijn maximaal 7 dagen houdbaar. Mits droging door vermenging met natriumsulfaat zijn ze echter gedurende een maand houdbaar in de koelkast (zie NEN 5733).

6 ANALYSEPROCEDURE

6.1 Extractie

- spoel vóór extractie van een monster de soxhletopstelling (inclusief de te gebruiken extractiehuls en glaswolprop) door refluxen van aceton/hexaan (50/50) gedurende minstens een half uur; ledig vervolgens de opstelling en droog de extractiehuls en glaswolprop in een droogstoof;
- indien het staal bovenstaand water bevat, wordt dit verwijderd door decantatie;
- weeg in een mortier ongeveer 10 g natte waterbodempogebuuraf en voeg minstens een equivalente hoeveelheid natriumsulfaat toe; vermeng in de mortier tot een droge massa bekomen wordt;
- weeg, afhankelijk van de verwachte verontreinigingsgraad van het monster, 1 - 30 g van het met droogmiddel vermengde monster af, breng in de extractiehuls van de vooraf gereinigde soxhletopstelling; dicht af met een voorgereinigde glaswolprop;
- extraheer met n-hexaan/aceton mengsel (50/50) gedurende ongeveer 16 uur;
- breng het extract over naar een scheidrecther en spoel 3 maal na met 5 ml hexaan, voeg een hoeveelheid van de GC/FID-interne standaardoplossing toe zodat de concentratie van C40 in het eindextract ongeveer 100 mg/l zal bedragen
- verwijder de aceton door het extract gedurende enkele minuten uit te schudden met 500 ml water dat 40 g MgSO₄ bevat; voeg om de scheiding te bevorderen eventueel een additionele hoeveelheid hexaan toe
- droog het extract over een glasvezelfiltertje met Na₂SO₄
- voeg 50 µl toe van de doperingsoplossing D50-n-C24 (dit komt overeen met 1 µg interne standaard)
- leng, indien geen indampstap voorzien wordt, het hexaanextract aan tot gekend volume of bepaal het exacte gewicht.

6.2 Zuivering met florisil en silica

6.2.1 testen van de florisilkwaliteit

Van elke nieuwe partij florisil wordt het zuiveringsrendement gecontroleerd.

Aan 3.33 g van de testoplossing van decaan, tetraline en 4-cholesten-3-one wordt 0.33 g florisil toegevoegd. Het geheel wordt gedurende 10 min. geschud en de oplossing wordt met GC/MS onderzocht. De terugvindingen van de verschillende verbindingen worden bepaald door vergelijking van de oppervlakten van de pieken in het totaal ionenchromatogram (zie verder) bekomen voor de behandelde en niet behandelde testoplossing:

$$T = (A_b/A_{nb}) * 100$$

met

T = de terugvinding in %

Ab = de piekoppervlakte van de component in de behandelde oplossing

Anb = de piekoppervlakte van de component in de niet-behandelde oplossing

De terugvindingen van de verbindingen moeten aan de volgende criteria voldoen:

tetraline	> 30%
4-cholesten-3-one	< 3%
decaan	> 90%

6.2.2 zuivering met florisil

- voeg aan het volledige extract of aan een deel van het extract een geschikte hoeveelheid florisil toe (3 g florisil per inname van 10 g staal)
- schud het geheel gedurende 10 min;
- de florisil wordt afgescheiden door centrifugatie of filtratie; het gezuiverde geheel wordt ingedampt tot ongeveer 1 ml.

Opmerking : het aldus bekomen extract kan gebruikt worden voor de bepaling van minerale olie met GC/FID volgens procedure CMA/3/R.1.

6.2.3 zuivering over silica

- vul een glazen chromatografiekolom met achtereenvolgens 3 g geactiveerde silica en 0,5 cm Na₂SO₄
- spoel met 20 ml n-hexaan en verwijder het eluaat
- breng het florisil-gezuiverd hexaanextract (ongeveer 1 ml) op de kolom
- spoel na met 3 ml n-hexaan en elueer met 12 ml n-hexaan (dit is de alifatische fractie)
- damp het eluaat in onder een N₂-stroom tot ongeveer 1 ml; breng over in een meetvial voor GC-MS-analyse

6.3 GC-MS analyse

6.3.1 instellingen van de gaschromatograaf

Stel de gaschromatograaf zodanig in dat :

- pristaan en phytaan gescheiden zijn van resp. n-C17 en n-C18
- voor standaardoplossing van RIVM olie de verhouding van de totale oppervlakte van C20 tot C40 t.o.v. van deze van C10 tot C20 gelegen is tussen 1.25 en 1.40 (het midden van de C20 piek wordt genomen als integratiegrens).

Typische GC-instellingen zijn hieronder weergegeven:

kolom	:	DB-5MS, 60m x 0.25mm x 0.25 µm,
draaggas en flow	:	helium, 1.3 ml/min
injectiemodus	:	on column of andere (moet voldoen aan bovenvermelde criteria)
injectievolume	:	1 µl
Ovenprogramma	:	60°C, 4 min, 5°C/min naar 320°C, 40 min

6.3.2 instellingen van de massaspectrometer

Interfacetemperatuur : 280°C

Brontemperatuur : 230°C

Ionisatie : electron energy 70 eV, electron current 150 µA

SIM-ionen : m/z 57 (alkanen), m/z 66 (D50-n-C24), m/z 191 (hopanen)

6.3.3 meting

De volgende indicator-componenten worden kwantitatief bepaald :

- n-alkanen : van n-C10 t.e.m. n-C39
- pristaan en phytaan
- hopanen : 17α(H)-22,29,30-trisnorhopaan (Tm), 18 α(H)-22,29,30-trisnorhopaan (Ts), 17α(H),21β(H)-22S-homohopaan (22S), 17α(H),21β(H)-22R-homohopaan (22R) en 22,29,30-trisnorhop-17(21)-een (Te)
- UCM (*unresolved complex mixture*) : de "bult" in het GC-chromatogram waarin geen individuele pieken meer zichtbaar zijn.

Opmerking 18 α (H)-22,29,30-trisnorhopaan (Ts) is niet opgenomen in het kalibratiemengsel omdat dit product niet commercieel verkrijgbaar is. De identificatie gebeurt door middel van het voorbeeldchromatogram in bijlage 1.

De berekeningen gebeuren volgens de interne standaard methode. Hierbij wordt het gehalte van elke component gekwantificeerd ten opzichte van D50-n-C24 die bij het begin van de opwerking aan het monster werd toegevoegd.

Voor de integratie van de chromatogrammen worden volgende ionen geëxtraheerd :

D50-n-C24	: m/z 66
n-alkanen	: m/z 57
pristaan, phytaan	: m/z 57
UCM	: m/z 57
hopanen	: m/z 191

De piekoppervlakte van de UCM wordt bekomen door van het totale ionenchromatogram (m/z 57 van vlak na n-C10 tot vlak voor n-C40) alle piekoppervlakten van de individuele pieken (geïntegreerd tot op de "bult") af te trekken. In bijlage 1 zijn voorbeeldchromatogrammen gegeven van pristaan/phytaan, UCM en de hopanen.

Kwantificering (zie ook bijlage 2) :

- alkanen : C10 en C11 t.o.v. C10, C12 en C13 t.o.v. C12, C14 en C15 tov C14 etc.
- pristaan tov pristaan
- phytaan tov phytaan
- UCM : tov n-C30
- hopanen : Te tov Te, Tm en Ts tov Tm, 22S tov 22S, 22R tov 22R.

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

7 BEREKENINGEN

7.1 Relatieve responsfactor

De kwantificering is gebaseerd op de bepaling van een relatieve responsfactor (RRF)

$$RRF = \frac{A * C_{is}}{A_{is} * C}$$

met

RRF = relatieve responsfactor voor de component

A = piekoppervlakte van de component in de kalibratiestandaard

C = concentratie van de component in de kalibratiestandaard in $\mu\text{g/g}$

A_{is} = piekoppervlakte van de interne standaard (D50-n-C24)

C_{is} = concentratie van de interne standaard in de kalibratiestandaard in $\mu\text{g/g}$

Voor de bepaling van de concentratie van een component in het monster wordt gebruik gemaakt van de gemiddelde RRF-waarde (<RRF>) bekomen uitgaande van twee injecties van de kalibratiestandaard, nl. de laatste voorafgaand aan en de eerste volgend op het monsterpreparaat.

7.2 Berekening van de concentraties

De concentratie van elke indicator-component het monster wordt berekend met de onderstaande formule:

$$C = \left(\frac{A}{A_{is}} \right) * \frac{g_{is}}{\langle RRF \rangle * G}$$

met

C = de concentratie van de indicator-component in het monster (µg/kg ds)

A = piekoppervlakte van de indicator-component in het monster

A_{is} = de piekoppervlakte van de interne standaard in het monster

<RRF> = de gemiddelde relatieve responsfactor

G = de hoeveelheid in behandeling genomen monster (g ds)

g_{is} = de hoeveelheid inwendige standaard toegevoegd aan het monster (ng)

8 BEREKENINGEN en INTERPRETATIE

8.1 Indicatoren en ratio's

8.1.1 Oneven/even ratio (O/E)

Dit is de verhouding tussen de som van de concentraties van de even n-alkanen en de som van de concentraties van de oneven n-alkanen (van C10 t.e.m. C39). Een O/E-waarde kleiner dan 2 wijst op petrogene oorsprong, hoger dan 8 op biogene oorsprong.

8.1.2 Dominante alkaan (DA)

Dit is het koolstofgetal van het n-alkaan met de hoogste concentratie. In petrogene mengsels is de DA meestal C16, C18 of C20. In wassen van landplanten is de DA meestal oneven en loopt van C23 tot C31. In wassen afkomstig van waterplanten is de DA oneven en kan variëren van C15 tot C21.

8.1.3 Carbon Preference Index (CPI)

De CPI is gedefinieerd als 2 keer de som van C27 en C29 gedeeld door de som van C26, C30 en twee keer C28. Dus $CPI = 2(C27+C29) / (C26 + 2(C28) + C30)$. Deze index bedraagt in zuivere petroleumproducten ongeveer 1. In petroleum verontreinigde riviersedimenten schommelt de waarde doorgaans tussen 1.5 en 4. Plantenwaxen en in niet gecontamineerde sedimenten worden gekenmerkt door een hogere CPI. Waarden kleiner dan 4 wijzen dus op petrogene oorsprong.

8.1.4 Pristaan/phytaan verhouding (Pri/Phy)

Over het algemeen ligt de verhouding Pri/Phy in petroleumproducten rond de 1. Waarden kleiner dan 3 worden geïnterpreteerd als petrogene.

8.1.5 Verhouding van afzonderlijke n-alkanen tot de UCM (Res/UCM)

In puur biogene koolwaterstoffen is de UCM (de "bult" in het chromatogram) afwezig. Dus de aanwezigheid van een UCM is reeds een indicatie voor petrogene oorsprong. Res/UCM is de som van de afzonderlijk waarneembare n-alkanen gedeeld door de concentratie van de UCM. Waarden kleiner dan 0.3 worden in verband gebracht met petrogene oorsprong.

8.1.6 Verhouding Ts / Ts+Tm

Ts staat in bovenstaande ratio voor 18 α (H)-22,29,30-trisnorhopaan en Tm staat voor 17 α (H)-22,29,30-trisnorhopaan. In ruwe olie is de ratio Ts/(Ts+Tm) typisch gelegen tussen 0.3 en 0.6, in smeeroilie tussen 0.4 en 0.7.

8.1.7 Verhouding Te / Ts+Tm

In de Te/(Ts+Tm) ratio staat Te voor 22,29,30-trisnorhop-17(21)-een, een biogene precursor voor Ts en Tm. In ruwe olie is de ratio typisch <0.5; vanaf een waarde >1 wordt biogene oorsprong vermoed.

8.1.8 Verhouding 22S / 22S+22R

Deze ratio wordt berekend aan de hand van 2 stereo-isomeren van homohopanen : 17 α (H),21 β (H)-22R-homohopaan en 17 α (H),21 β (H)-22S-homohopaan. In ruwe olie ligt de ratio tussen 0.5 en 0.6.

8.2 Interpretatie aan de hand van de beslissingstabel

De berekende ratio's worden ingevuld in de eerste kolom van onderstaande beslissingstabel. De bekomen waarden worden getoetst aan het criterium. In de laatste kolom wordt een "1" of een "-1" ingevuld naargelang de toetsing respectievelijk een petrogeen of biogeen resultaat oplevert. Indien de waarde tussen 2 criteria in ligt, wordt "0" ingevuld. Tenslotte wordt de som gemaakt van de getallen in de laatste kolom. Indien deze som groter is dan 3 wordt de verontreiniging gerapporteerd als "overwegend petrogeene verontreiniging". Een som kleiner dan -3 wordt gerapporteerd als "overwegend biogene verontreiniging". Indien de som gelegen is tussen -3 en 3 (grenzen inbegrepen) wordt gerapporteerd "mengsel van biogene en petrogeene verontreiniging".

INDICATOR / RATIO	TOETSINGSWAARDE	RESULTAAT
O/E	< 2 : petrogeen > 8 : biogeen	
DA	n-C16, n-C18 of n-C20 : petrogeen n-C15 - nC31 (oneven) : biogeen	
CPI	< 4 : petrogeen > 4 : biogeen	
Pri / Phy	< 2 : petrogeen > 3 : biogeen	
UCM	aanwezig : petrogeen afwezig : biogeen	
res / UCM	< 0.3 : petrogeen > 0.3 : biogeen	
Ts / Ts + Tm	> 0.3 : petrogeen < 0.3 : biogeen	
Te / Ts + Tm	< 0.5 : petrogeen > 1.0 : biogeen	
22S / 22S + 22R	0.55 - 0.65 : petrogeen < 0.55 of > 0.65 : biogeen	
	SOM	

9 KWALITEITSCONTROLE

9.1 Responslineariteit

Uitgande van minstens 5 oplossingen met oplopende concentraties van n-alkanen, pristaan, phytaan en de hopanen en met een constante concentratie van D50-n-C24 (interne standaard) wordt de lineariteit van de detectorrespons gecontroleerd. In geval van groot volume injectie worden de concentraties aangepast in functie van het geïnjecteerde volume.

Wanneer de piekoppervlakte voor C10-C40 fractie in een geïnjecteerd monster-preparaat hoger is dan de hoogste oppervlakte die bij de recentste lineariteitstest werd bekomen dient een hermeting te gebeuren op het oorspronkelijke preparaat na verdunning, voor zover het signaal van de inwendige standaard integreerbaar blijft, ofwel dient de analyse hernomen te worden na inname van een kleinere hoeveelheid monster.

9.2 Gaschromatografische karakteristieken

Zoals vermeld onder 6.3.1 dient regelmatig een controle op chromatografische scheiding en op het niet-discriminerend gedrag van de injector te gebeuren.

9.3 Procedureblanco

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 die groter zijn dan 10% van de pieken geregistreerd voor het monsters van de analysereeks. Voor meetwaarden die kleiner zijn dan 5 maal de gevraagde rapporteergrens, mogen de interfererende pieken niet groter zijn dan de helft van de gevraagde rapporteergrens.

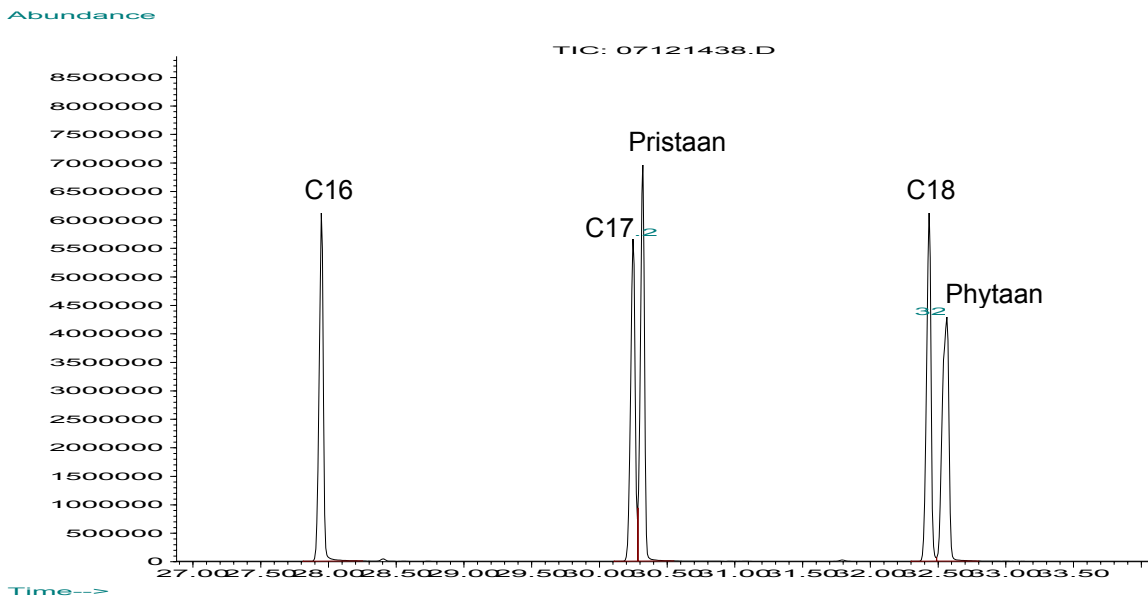
10 RAPPORTERING

Vermeld op het analyseverslag de typering van de verontreiniging als "overwegend petrogene verontreiniging", "overwegend biogene verontreiniging" of "mengsel van biogene en petrogene verontreiniging".

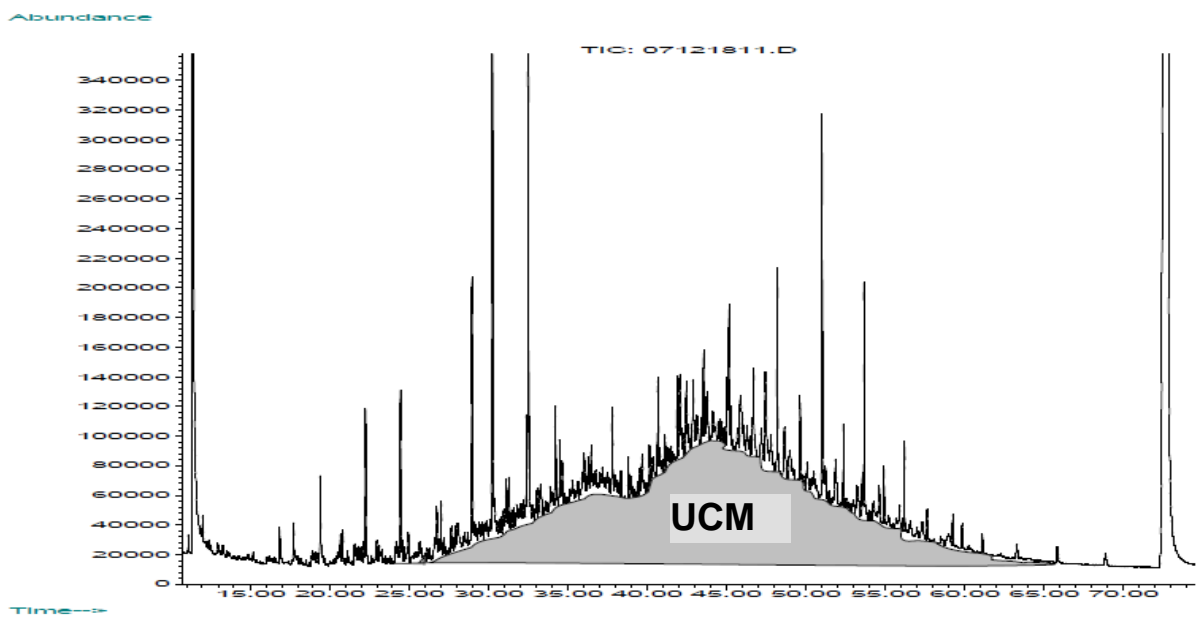
Voeg de ingevulde beslissingstabel (8.2) toe, alsook de ionenchromatogrammen van de alkanen (m/z 57) en van de hopanen (m/z = 191).

BIJLAGE 1 : Voorbeeldchromatogrammen

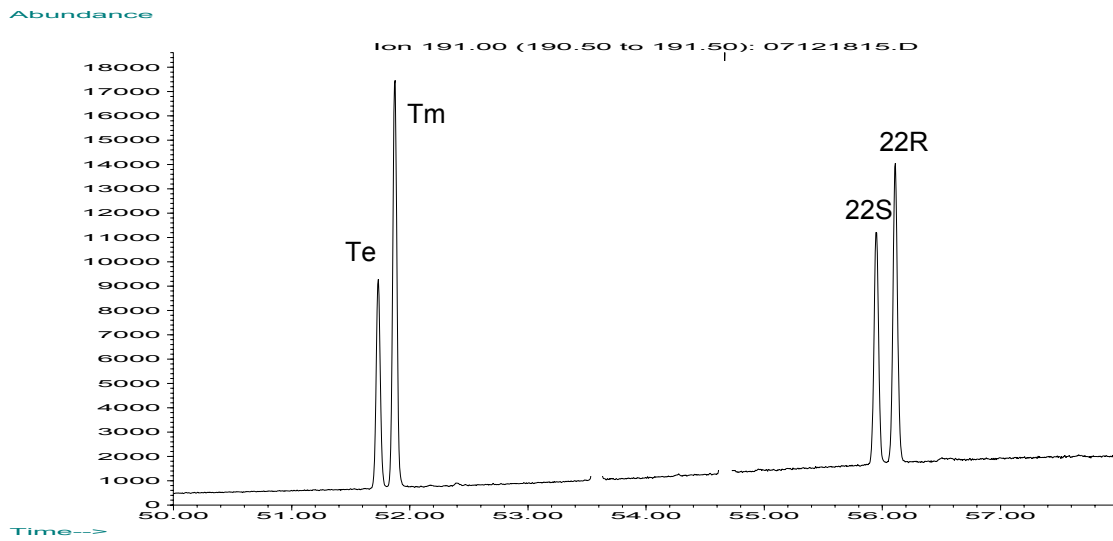
(1) phytaan en pristaan in de standaardoplossing (m/z 57)



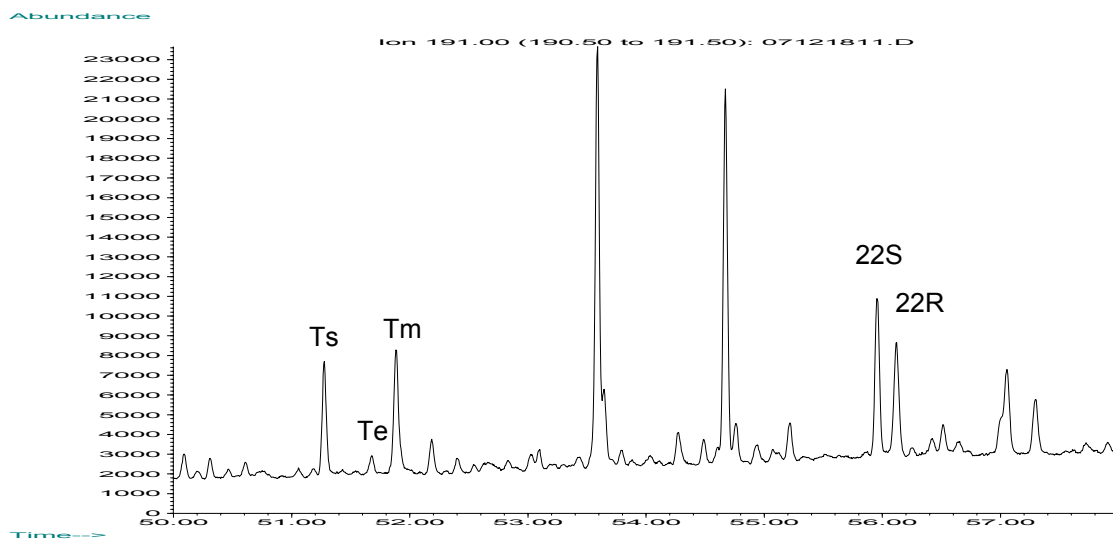
(2) UCM (m/z 57)



(3) hopanen in de standaardoplossing (m/z 191)



(4) hopanen in een reëel waterbodemstaal (m/z/ 191)



Opmerking : Ts, Te en Tm elueren tuseen C28 en C30, en 22S en 22R elueren tussen C32 en C34

BIJLAGE 2 : Kwantificering

Component	Ion	Kalibratiestandaard	Interne standaard
alkanen n-C8 t.e.m. n-C40	57	even alkanen n-C8 t.e.m. n-C40	D50-n-C24
pristaan	57	pristaan	"
phytaan	57	phytaan	"
17 α (H)-22,29,30-trisnorhopaan (Tm)	191	17 α (H)-22,29,30-trisnorhopaan (Tm)	"
18 α (H)-22,29,30-trisnorhopaan (Ts)	191	17 α (H)-22,29,30-trisnorhopaan (Tm)	"
22,29,30-trisnorhop-17(21)-een (Te)	191	22,29,30-trisnorhop-17(21)-een (Te)	"
17 α (H),21 β (H)-22S-homohopaan (22S)	191	17 α (H),21 β (H)-22S-homohopaan (22S)	"
17 α (H),21 β (H)-22R-homohopaan (22R)	191	17 α (H),21 β (H)-22R-homohopaan (22R)	"
UCM (Unresolved Complex Mixture)	57	n-C30	"