

POLYCYCLISCHE AROMATISCHE KOOLWATERSTOFFEN

1 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

Deze procedure vervangt de procedure CMA/3/B van december 2009.

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.

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 grondwater, eluaten en waterig afval;
- in olie en organische solventen.

Deze methode geldt niet voor de bepaling van PAK's in afvalstoffen die in of als meststof of bodemverbeterend middel worden gebruikt zoals compost, digestaten, aanverwante input- en outputstromen van de verwerking van biologisch afval, zuiveringslib. Hiervoor geldt de methode CMA/3/W.

Deze procedure is gericht op de kwantificering van volgende componenten:

- naftaleen
- acenaftyleen
- acenafteen
- 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 PLE-extractie ('pressurized liquid extraction') of soxhletextractie met een n-hexaan/acetone mengsel onderworpen. Oliemonsters worden verdund met n-hexaan.

Waterstalen worden vloeistof/vloeistof geëxtraheerd met dichloormethaan of hexaan. Voor grondwaterstalen kan ook vaste fase extractie (SPE) toegepast worden. De controle van de extractierementen 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. Verdunningen 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 (GC) gebeurt de detectie met een massaspectrometer (MS), in geval van vloeistofchromatografie (HPLC) met een combinatie van een fluorescentie- en UV- of DAD-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-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 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 één of meerdere zgn. 'recovery'-standaarden juist voor de instrumentele meting kan men de terugvindingsrendementen van de afzonderlijke interne standaarden bepalen. Voorbeelden van geschikte recoverystandaarden zijn D10-1-methylnaftaleen, D12-triphenylene, D12-peryleen of een andere niet-coëluerende verbinding.

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.

Aangezien geen inwendige standaarden gebruikt worden dient i.f.v. de van toepassing zijnde matrix gecorrigeerd te worden voor de terugvinding op basis van validatiegegevens. Alternatief kan in geval van wateranalyse gebruik gemaakt worden van kalibratiestandaarden die aangemaakt worden in water en die de volledige analyseprocedure doorlopen; op die manier wordt automatisch gecorrigeerd voor verliezen bij de extractie-, zuivering-, indamp- en injectiestap.

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

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 (porselein)
- 3.4 in geval van PLE extractie: PLE-apparaat, bv. Dionex ASE 200 accelerated solvent extractor met extractiecellen van 11 tot 33 ml en opvangvials van 40 tot 60 ml
- 3.5 in geval van soxhlet extractie: soxhletapparaat van 100-250 ml, extractiehuizen, elektrische verwarmingsmantel met temperatuursregeling
- 3.6 in geval van vloeistof-vloeistofextractie: scheitrechter (500-1000 ml)
- 3.7 injectiespuiten van 50-250 µl voor het doperen met resp. interne standaard, 'recovery' standaard en surrogaat.
- 3.8 eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet
- 3.9 glazen chromatografische kolommen, i.d. 10-15 mm, met gefritteerde basis en teflonkraan; de kolommen zijn voorzien van een slijpstuk bovenaan waarop een broomtrechter geplaatst kan worden
- 3.10 erlenmeyers (100 en 250 ml)
- 3.11 maatcilinder (100 ml)
- 3.12 GC-MS bestaande uit een capillaire gaschromatograaf, een autosampler, een lage resolutie massaspectrometer van het quadrupool-type en een PC met sturings- en dataverwerkingsprogrammatuur. De GC is eventueel uitgerust met een PTV of on-column groot-volume injector
- 3.13 Fused silica GC-kolom met apolaire stationaire fase (5%fenylmethylpolysiloxaan, DB5-MS of gelijkwaardig), bv. 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Opmerking:
op een apolaire kolomfase kunnen benzo(b)fluorantheen, benzo(k)fluorantheen en benzo(j)fluorantheen niet van elkaar gescheiden worden. Ze worden echter meestal in een vaste verhouding waargenomen, zodat de individuele concentraties berekend mogen worden als een vast percentage van hun som (resp. 50%, 25%, 25%).
- 3.14 HPLC uitgerust met gradiënt pomp, ontgassingseenheid, kolomthermostatisatie, fluorescentiedetector, variabele UV-detector of diode array detector, autosampler en een PC met sturings- en dataverwerkingsprogrammatuur
- 3.15 een HPLC-kolom geschikt voor PAK-analyse, bv. 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
- 3.16 injectiespuit van 10 µl
- 3.17 glazen amberkleurige monsterflesjes (penicillineflesjes) van 5 ml
- 3.18 in geval van off-line vaste fase extractie (SPE): afzuigeenheid voor de simultane extractie van waterstalen
- 3.19 in geval van on-line vaste fase extractie: automaat en sturingseenheid voor de automatische percolatie van meerdere waterstalen doorheen adsorbentia, de desorptie van de adsorbentia met mobiele fase en de injectie in de meetapparatuur

4 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- 4.1 n-hexaan, petroleumether (40-60°C), isohexaan of een ander alkaan: residu-analyse (of gelijkwaardig)
- 4.2 aceton, dichloormethaan, nonaan, toluen: residu-analyse (of gelijkwaardig)
- 4.3 methanol, isopropanol, ethylacetaat : residu-analyse (of gelijkwaardig)
- 4.4 acetonitrile: minstens 'gradiënt' kwaliteit
- 4.5 natriumsulfaat (Na₂SO₄): granulair en watervrij; een geopende verpakking wordt uitgegoten in een schaal en bewaard bij 130°C in een droogoven
- 4.6 diatomeeënaarde (celite, kieselguhr, ..): korrelgrootte 0.02-0.1 mm
- 4.7 zeezand: met zuur gereinigd en gegloeid

- 4.8 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
- 4.9 silicagel 3 % H₂O : voeg aan de geactiveerde silica (4.8) 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
- 4.10 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
- 4.11 koperplaatjes
- 4.12 tetrabutylammoniumwaterstofsulfietreagens (TBA-reagens): voeg 5 g natriumsulfiet toe aan een 0,1 M oplossing van tetrabutylammoniumwaterstofsulfiet in isopropanol
- 4.13 HPLC-water : ultrapuur
- 4.14 Brij 35
- 4.15 SPE-kolommetjes of patronen geschikt voor PAK-extractie (bv. C18)

Standaardoplossingen

Opmerkingen:

- 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.
- met betrekking tot de houdbaarheid van de standaarden is nonaan als solvent de beste keuze, maar ook toluen of een ander niet-vluchtig alkaan mag gebruikt worden. In geval van groot-volume injectie kan het gebruik van meer vluchtige alkanen aangewezen zijn.
- wanneer de oplosbaarheid te laag is wordt een minimale hoeveelheid aceton toegevoegd.

Standaardoplossingen voor GC-MS bepaling

Hoofdstandaardoplossingen:

- 4.13 natieve PAK's:
van elk van de te analyseren PAK's wordt, uitgaande van zuiver (min. 98%) vast product een stockoplossing van bv. 100 µg/g in n-nonaan bereid
- 4.14 interne standaarden:
van minstens 5 isotoopgemerkte PAK's, gekozen over het volledige retentietijdsgebied, wordt uitgaande van zuiver (min.98%) vast product een stockoplossing van bv. 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.
- 4.15 recoverystandaard:
van elke recoverystandaard wordt rechtstreeks, uitgaande van zuiver (min.98%) vast product een werkoplossing van bv. 100 µg/g in n-nonaan bereid

Werkoplossingen:

- 4.16 interne standaard-werkoplossing (IS doperingsstandaard):
door menging van de individuele hoofdstandaardoplossingen van de deuterium-gemerkte PAK's wordt een interne standaard-werkoplossing bereid met een concentratie van bv. 10 µg/g van elk van de interne standaarden in n-nonaan
- 4.17 standaard-werkoplossingen:

uitgaande van de hoofdstandaardoplossingen van de natieve en deuterium gemerkte PAK's worden standaard-werkoplossingen in n-nonaan bereid die de te analyseren PAK's bevatten in oplopende concentraties van bv. 0.02 tot 5 µg/g en de interne standaarden in een constante concentratie van bv. 1 µg/g

Standaardoplossingen voor HPLC bepaling

Opmerking:

hieronder wordt een typische werkwijze beschreven. Aanpassingen in functie van het meetbereik zijn mogelijk waarbij het aantal standaard-werkoplossingen kan variëren.

Hoofdstandaardoplossingen:

- 4.18 natieve PAK's
van elk van de te analyseren PAK's wordt, uitgaande van zuiver (min. 98%) vast product een stockoplossing van bv. 100 µg/ml in acetonitrile of een ander geschikt oplosmiddel bereid.
- 4.19 surrogaatoplossing:
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 bv. 100 µg/ml in acetonitrile of een ander geschikt oplosmiddel bereid.

Werkoplossingen:

- 4.20 standaard-werkoplossingen:
uitgaande van de hoofdstandaardoplossingen van de PAK's worden standaard-werkoplossingen in acetonitrile bereid die de te analyseren PAK's bevatten in concentraties van bv. 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)

Opmerking:

in geval van SPE kan gebruik gemaakt worden van standaarden in water die de ganse analyseprocedure doorlopen. Uitgaande van de hoofdstandaardoplossingen van de PAK's worden 1 of meerdere standaard-werkoplossingen in acetonitrile bereid die aan 5 blancowaterstalen worden toegevoegd zodanig dat 0.05 tot 25 ng van elke PAK op de analytische kolom gebracht wordt. Typisch wordt aan 1 l water waarvan 100 ml aan de SPE extractie zal onderworpen worden 1 ml van een 50 ng/ml acetonitrile oplossing toegevoegd om 5 ng op de analytische kolom te brengen.

5 MONSTERBEWARING EN -VOORBEHANDELING

Bij de monsternamen wordt gebruik gemaakt van donkergekleurde glazen recipiënten, afgesloten met glazen stoppen of plastic stoppen met teflon inlage. De stalen worden koel en donker bewaard.

Grondwaterstalen (gewoonlijk bemonsterd in het kader van bodemonderzoek) worden bij aankomst in het labo opgeschud en men laat de stalen gedurende **minstens 4 uur rusten** zodat de deeltjes kunnen uitzakken. Aansluitend worden de stalen voorzichtig gedecanteerd. Niet meer dan de helft van de bovenstaande waterlaag wordt gedecanteerd om zo weinig mogelijk deeltjes in bewerking te nemen. Alle andere types waterstalen worden in de regel niet vooraf gedecanteerd! Waterstalen worden binnen de 7 dagen geëxtraheerd (zie NEN 5731 en EPA 8100). De extracten zijn gedurende 1 maand houdbaar in de koelkast.

Bodem en afvalstoffen worden voorbehandeld zoals beschreven in CMA/5/B.

Bodem en vaste afvalstoffen worden binnen de 30 dagen geëxtraheerd. Mits droging door vermenging met diatomeeënaarde of Na₂SO₄ zijn ze gedurende 1 maand houdbaar in de koelkast.

6. ANALYSEPROCEDURE

6.1 Extractie

6.1.1 Bodem, slib en vast afval

De monsterontsluiting gebeurt standaard met warme ontsluitingstechnieken. Voor stalen met gering watergehalte zoals bodemstalen wordt standaard een PLE-extractie met hexaan/acetone toegepast. Indien de PLE-extractie praktisch moeilijk uitvoerbaar is of onvoldoende monsterinname toelaat wordt gebruik gemaakt van een gewone soxhletextractie met hexaan/acetone.

Voor stalen met hoog watergehalte (bv. waterbodem na decantatie, zuiverings-slib enz.) is PLE geen geschikte extractietechniek: het water wordt onder de PLE condities niet vastgehouden door het droogmiddel en het extractierendement is te laag. In dat geval wordt de extractie met soxhlet uitgevoerd. Alternatief kan het monster gevriesdroogd worden alvorens de PLE-extractie uit te voeren. Ook bij onvoldoende aantoonbaarheid omwille van een te laag droge stof gehalte (bv. slibstalen met minder dan 5% droge stof), kan het monster ingedikt worden door vriesdrogen. Alternatief wordt een meervoudige soxhletextractie uitgevoerd. Worden stalen ingedikt dan dient dit vermeld te worden op het analyseverslag. Shreddermaterialen die plastic componenten bevatten kunnen problemen geven bij warme extractie met acetone/hexaan; shreddermaterialen met plastic worden daarom steeds geëxtraheerd met hexaan alleen.

Werkwijze voor PLE-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 bv. 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 typische PLE instellingen;

HEAT	5 min	PRESSURE	70 bar
STATIC	5 min	TEMPERATURE	100 °C
FLUSH%	60 vol	SOL # 1	acetone 50 %
PURGE	150 sec	SOL # 2	n-hexaan 50 %
CYCLES	1	SOL # 3	- %

- damp het extract (ca. 20-40 ml) in tot 2 à 3 ml (niet in het geval van LV-GC);

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 bv. 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 bv. 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 volumepijl, 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.

Werkwijze voor PAK in shreddermaterialen (soxhletextractie met n-hexaan):

- droog het shreddermateriaal in een oven bij 40°C
- spoel vóór extractie van een monster de soxhletopstelling (inclusief de te gebruiken extractiehuls en glaswolprop) door refluxen met hexaan gedurende minstens een half uur; ledig vervolgens de opstelling en droog de extractiehuls en glaswolprop in een droogstoof
- weeg ongeveer 10g van het gedroogd monster af in de soxhlethuls
- extraheer met n-hexaan gedurende 16 uur
- neem van het soxhletextract een deel af overeenkomend met ongeveer 1 g staal (of minder, afhankelijk van het verwachte PAK-gehalte) en voeg hieraan 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. In geval van groot-volume injectie wordt een in functie van het injectievolume aangepaste hoeveelheid standaard toegevoegd; doorgaans wordt 1 ng van elke standaard geïnjecteerd)
- damp het extract in tot 1 ml
- indien nodig zuiver het extract op (zie 6.2).

Opmerkingen

- indien op het niet ingedampde extract andere bepalingen dienen uitgevoerd te worden (minerale olie, EOX, ...) dan wordt eerst hiervan een hoeveelheid afgenomen;
- indien het extract aan een kolomzuivering onderworpen wordt dan dient vooraf een solventwissel naar hexaan uitgevoerd te worden (bv. door indampen of door wegwassen van de aceton).

6.1.2 Waterstalen

Werkwijze voor vloeistof/vloeistof extractie:

- weeg de monsterfles tot op 0.1 g nauwkeurig;
- breng de volledige inhoud van de monsterfles (typisch 500-1000 ml) over in een geschikte scheidrechter;
- 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 bv. 1 µg/g zal bedragen; breng m.b.v. een pasteurpipet de bovenstaande acetonoplossing met interne standaarden over naar de scheidrechter; spoel het penicillineflesje enkele malen na met DCM of hexaan (of een ander alkaan) en breng de spoelvloeistof over naar de scheidrechter;
- 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 spoelvloeistof over naar de scheitrechter;

Opmerking:

dient op het waterstaal ook een minerale olie bepaling te gebeuren dan wordt als extractievloeistof 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);
- indien het extract aan een kolomzuivering onderworpen wordt dan dient vooraf een solventwissel naar hexaan uitgevoerd te worden (bv. door indampen of door wegwassen van de aceton);
- weeg de lege monsterfles en bepaal het gewicht en hieruit het volume van de oorspronkelijke inhoud.

Werkwijze voor off-line vaste fase extractie met C-18 (voor grondwaterstalen):

- in geval van GC-MS analyse: breng ongeveer 1 ml aceton in een penicillineflesje ;voeg m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de interne standaard-werkoplossing toe aan de aceton; breng m.b.v. een pasteurpipet de bovenstaande acetonoplossing met interne standaarden over naar de scheitrechter; spoel het penicillineflesje enkele malen na met aceton en breng de spoelvloeistof over naar de scheitrechter;
- in geval van HPLC analyse: voeg m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de surrogaat werkoplossing toe aan het staal;aangezien bij vaste fase extractie niet de volledige flesinhoud gebruikt wordt en er dus ook geen mogelijkheid bestaat om de monsterfles na te spoelen dient aan het water een niet-schuimend detergent (bv. 0.05 m/m% Brij 35) of een watermengbaar solvent (bv. isopropanol 15% à 30 % of acetonitrile 25%) toegevoegd te worden om PAK's van de glaswand te verwijderen. Het gebruik van "oplossende" additieven maakt het noodzakelijk dat in functie van het gekozen type, merk en hoeveelheid adsorbens de doorbraakvolumes voor de PAK's (inzonderheid naftaleen) bepaald worden;
- voeg m.b.v. een injectiespuit een hoeveelheid van de surrogaat werkoplossing toe aan de waterstalen, zodanig dat ongeveer 0,5 ng van de surrogaat op de analytische kolom zal gebracht worden;
- schud het geheel krachtig gedurende 60 min;
- breng de monsterflessen of deelmonsters hiervan in het daarvoor voorziene compartiment van het extractie-apparaat;
- indien nodig wordt het monster gefiltreerd over een 0,45 µm filter nadat isopropanol (of een ander "oplossend" additief) in de monsternamefles toegevoegd is.
- *wassen en conditioneren van de SPE-kolommetjes*: het kolommetje achtereenvolgens spoelen met 2 kolomvolumes dichloormethaan, 1 kolomvolume methanol en 1 kolomvolume ultrapuur water zonder vacuüm (niet laten droog komen);
- *extractie*: de geconditioneerde kolommetjes op de vacuümkamer plaatsen en vullen met ultrapuur water;de stalen eventueel overbrengen in een maatcilinder; het uiteinde van de teflonleiding rechtstreeks in de stalen of in de maatcilinders plaatsen en verbinden met de SPE-kolommetjes via een adapter; de vacuümpomp opzetten en de stalen opzuigen; nadat de stalen zijn opgezogen, maatcilinder naspoelen met ultrapuur water en het vacuüm nog gedurende 5 minuten aanhouden; droog de SPE-kolommetjes via vacuüm, doorblazen met N₂ of vacuümcentrifuge;
- *desorptie*: elueer de PAKs van de kolom met 2 kolomvolumes dichloormethaan; blaas de SPE-kolommetjes uit met N₂; damp het extract in onder een stikstofstroom tot een eindvolume van ca 1 ml; weeg de lege monsterfles en bepaal het gewicht en hieruit het volume van de oorspronkelijke inhoud;

Opmerking:

De off-line SPE kan eventueel geautomatiseerd uitgevoerd worden.

Werkwijze voor on-line vaste fase extractie met C-18 (voor grondwaterstalen; enkel HPLC):

- aangezien bij on-line vaste fase extractie niet de volledige flesinhoud gebruikt wordt en er dus ook geen mogelijkheid bestaat om de monsterfles na te spoelen dient aan het water een niet-schuimend detergent (bv. 0.05 m/m% Brij 35) of een watermengbaar solvent (bv. isopropanol 15% à 30 % of acetonitrile 25%) toegevoegd te worden om PAK's van de glaswand te verwijderen. Het gebruik van "oplossende" additieven maakt het noodzakelijk dat in functie van het gekozen type, merk en hoeveelheid adsorbens de doorbraakvolumes voor de PAK's (inzonderheid naftaleen) bepaald worden;
- voeg m.b.v. een injectiespuit een hoeveelheid van de surrogaat werkoplossing toe aan de waterstalen, zodanig dat ongeveer 0,5 ng van de surrogaat op de analytische kolom zal gebracht worden;
- schud het geheel krachtig gedurende 60 min;
- breng de monsterflessen of deelmonsters hiervan in het daarvoor voorziene compartiment van het extractie-apparaat;
- indien nodig wordt het monster gefiltreerd over een 0,45 µm filter nadat isopropanol (of een ander "oplossend" additief) in de monsternamefles toegevoegd is.
- voer de automatische SPE-extractie uit; onderstaand is een typisch voorbeeld gegeven van een SPE-programma met C18 adsorbens:
 - conditioneer de SPE patroon met acetonitrile of methanol (elutie gedurende 2 min met zuiver solvent aan een debiet van 3 ml/min);
 - was de SPE patroon met HPLC-water (elutie gedurende 2 min met aan een debiet van 3 ml/min);
 - pomp max. 200 ml waterstaal (de hoeveelheid is afhankelijk van de verwachte verontreiniging) doorheen de SPE patroon aan een debiet van 3 ml/min;
 - was de SPE patroon met HPLC-water (elutie gedurende 1 min aan een debiet van 3 ml/min)
 - desorbeer de SPE patroon met mobiele fase (50/50 acetonitrile/water) in backflush, start de analyse en herneem de stappen van conditionering en extractie voor een volgend monster.

Opmerking:

verschillende toestellen voor de on-line vaste fase extractie zijn beschikbaar; voor de koppeling met de meetapparatuur en de bediening wordt verwezen naar de instructies van de fabrikant.

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. Alternatief kan een gecombineerde silica/alumina zuivering toegepast worden.
- 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 (in hexaan) 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 (in hexaan) 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 gecombineerde silica/alumina zuivering:

- vul een chromatografische kolom (i.d. 10 mm) met achtereenvolgens 1 g alumina, 3 g silica en ca. 1 cm Na_2SO_4 ;
- spoel de kolom met 12 ml n-hexaan;
- breng het ingedampt monsterextract (in hexaan) boven op de kolom, spoel het oorspronkelijk recipiënt na met 2 ml hexaan en elueer met 10 ml n-hexaan; deze prefractie mag verwijderd worden, ze bevat eventueel aanwezige alkanen;
- elueer daarna met 20 ml n-hexaan/dichloormethaan (50/50 v/v);
- 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 Na_2SO_4 laag) tot 10 ml solvent opgevangen worden; deze fractie bevat de alifatische koolwaterstoffen;
- voeg druppelsgewijs een 1/1 mengsel DCM/acetone toe en laat langzaam doorlopen met een debiet gelijk aan de toevoegsnelheid (het solventniveau bevindt zich steeds 1 mm boven de Na_2SO_4 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.

Opmerking:

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 elutievolume's 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 cm^2 in de nodige hoeveelheid 1N HNO_3 voor activatie gedurende enkele minuten; spoel de plaatjes grondig met acetone 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 Na_2SO_4 .

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 bv. 1 $\mu\text{g/g}$ bedraagt.

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 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.

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.

De kalibratie kan op een aantal verschillende manieren gebeuren:

- aan de hand van de relatieve responsfactor (RRF), bepaald met één kalibratie-oplossing. Deze werkwijze kan gevolgd worden indien de RRFen binnen bepaalde grenzen constant zijn over het meetgebied. Hierbij wordt minstens aan het begin en op het einde van elke analysereeks, en verder om een welbepaald aantal preparaten (max. 10) een kalibratie-oplossing geïnjecteerd. De concentraties van de PAK in deze kalibratie-oplossing liggen ongeveer in het midden van het lineair gebied of zijn representatief voor de verwachte monsterconcentraties. De RRFen voor elke te bepalen component worden vervolgens bepaald uit de verhouding van de oppervlakten en concentraties van de natieve componenten en de overeenkomstige interne standaarden :

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

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

De berekening van de concentraties in een staal gebeurt aan de hand van de gemiddelde RRF van de 2 kalibratie-oplossingen waartussen het staal geïnjecteerd werd. De RRFen van de 2 kalibratie-oplossingen mogen niet meer dan 10 % van dat gemiddelde afwijken.

- aan de hand van kalibratierechten. In dit geval worden aan het begin van de analysereeks minimaal 3 kalibratie-oplossingen geanalyseerd met concentraties verspreid over het lineair gebied. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve PAK en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend. De correlatiecoëfficiënt dient groter te zijn dan 0.995 en de afwijking van elk punt tot de rechte mag niet meer dan 15% bedragen (25% voor het laagste punt indien de concentratie in de buurt van de bepalingsgrens ligt). Om een welbepaald aantal preparaten (max. 10) wordt een kalibratie-oplossing geïnjecteerd om de geldigheid van de kalibratierechte te controleren; deze standaard mag maximaal 15% afwijken van de rechte.
- aan de hand van kwadratische curven. Indien bij de lineariteitstest gebleken is dat er geen lineair maar een kwadratisch verband is tussen concentratie en respons, dan kunnen kwadratische curven gebruikt worden voor de kalibratie. Daartoe worden aan het begin van de analysereeks minimaal 5 kalibratie-oplossingen geanalyseerd met concentraties verspreid over het meetgebied. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve PAK en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend. De correlatiecoëfficiënt dient groter te zijn dan 0.995 en de afwijking van elk punt tot de curve mag niet meer dan 10% bedragen. Om een welbepaald aantal preparaten (max. 10) wordt een kalibratie-oplossing geïnjecteerd om de geldigheid van de kalibratiecurve te controleren; deze standaard mag maximaal 10% afwijken van de curve.

Opmerking:

Voor de berekening van de terugvinding van de interne standaarden wordt doorgaans de RRF-methode toegepast, waarbij de RRF van een interne standaard bepaald wordt t.o.v. de overeenkomstige 'recovery'-standaard met onderstaande formule:

$$RRF_{is} = \frac{A_{is} C_{RS}}{A_{RS} C_{is}}$$

met		
RRF _{is}	=	relatieve responsfactor van de interne standaard

A_{is}	=	piekoppervlakte van de interne standaard bij injectie van de kalibratie-oplossing
C_{is}	=	concentratie (in ng/ μ l) van de interne standaard in de kalibratie-oplossing
C_{RS}	=	concentratie (in ng/ μ l) van de overeenkomstige recoverystandaard in de kalibratie-oplossing
A_{RS}	=	piekoppervlakte van de overeenkomstige recoverystandaard bij injectie van de kalibratie-oplossing

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 ruis hoogte (helpt 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 een typische overeenkomstige interne standaard vermeld.

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

Indien de bovenste lineaire grens van de detector overschreden is, dan wordt het extract verdund en opnieuw gemeten; indien de verdunning tot gevolg zou hebben dat de interne standaarden niet goed meer kunnen gemeten worden dan wordt aan het verdund extract een extra hoeveelheid interne standaard toegevoegd.

6.4 HPLC-analyse

6.4.1 Werkwijze voor finale concentrering (niet van toepassing in geval van on-line SPE):

- breng het ingedampde extract over naar een puntbuis;
- voeg aan het ingedampde 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 μ l, 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. 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.

Wordt een signaal waargenomen groter dan de hoogste concentratie van de kalibratiereeks of van het lineaire bereik (zie hieronder) dan dient het monsterextract (of het monster zelf in geval van on-line SPE) verdund en hermeten 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 analoge UV chromatogram; onduidelijke fluorescentiechromatogrammen dienen dan ook bevestigd te worden met GC-MS ofwel andere fluorescentie-instellingen.

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 standaardmethode. De kalibratie kan op verschillende manieren gebeuren:

- aan de hand van de responsfactor (RF), bepaald met één kalibratie-oplossing. Deze werkwijze kan gevolgd worden indien de RFen binnen bepaalde grenzen constant zijn over het meetgebied. Hierbij wordt minstens aan het begin en op het einde van elke analysereeks, en verder om een welbepaald aantal preparaten (max. 10) een kalibratie-oplossing geïnjecteerd. De concentraties van de PAK in deze kalibratie-oplossing liggen ongeveer in het midden van het lineair gebied of zijn representatief voor de verwachte monsterconcentraties. De RFen voor elke te bepalen component worden vervolgens bepaald uit de oppervlakte en de concentratie van de component :

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

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

De berekening van de staalconcentraties van een meetreeks gebeurt aan de hand van de gemiddelde RFen van de kalibratie-oplossingen aan het begin en op het einde van de meetreeks; de RFen van de 2 kalibratie-oplossingen mogen niet meer dan 10 % van dat gemiddelde afwijken.

- aan de hand van kalibratierechten. In dit geval wordt op regelmatige basis een reeks kalibratie-oplossingen (minstens 3) in oplopende concentratie geïnjecteerd (bv. van 2 tot 1000 ng/ml). 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. Vervolgens wordt dmv lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend. De correlatiecoëfficiënt dient groter te zijn dan 0.995 en de afwijking van elk punt tot de rechte mag maximaal 10% bedragen. De kalibratierechten dienen niet bij elke analysereeks geconstrueerd te worden; in dat geval wordt aan de hand van 2 kalibratie-oplossingen (uit het hoog en laag concentratiegebied) om een welbepaald aantal stalen (max. 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.

7. BEREKENINGEN

7.1 Externe kalibratie (HPLC-methode)

Door middel van de kalibratie (met RF of kalibratierechte) en rekening houdend met de ingenomen staalhoeveelheid en met het volume van het eindextract kan het gehalte van elke verbinding in het monster berekend worden. Bij wijze van voorbeeld worden hieronder de formules gegeven die gebruikt worden in geval van RF-kalibratie:

- Voor water:

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

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.

Opmerking:

indien de kalibratie gebeurt aan de hand van standaardoplossingen in water die de analyse doorlopen, dan vervalt de correctiefactor Q_i .

- Voor bodem en sediment:

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

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,

7.2 Interne kalibratie (GC/MS-methode)

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 staalinname kan de concentratie van de PAK-component in het monster berekend worden. Onderstaande formule geeft de berekening weer in geval de kalibratie gebaseerd is op RRFen :

- Voor bodem, slib, vaste afval en olie:

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

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

$\langle RRF_i \rangle$ = de gemiddelde relatieve responsfactor voor PAK-component i uitgaande van twee injecties van de kalibratieoplossing, voorafgaand aan en volgend op het monsterpreparaat

G = hoeveelheid in g d.s. geëxtraheerd monster,

- Voor water :

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

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

7.3 Aantoonbaarheidsgrenzen voor niet-gedetectedeerde PAK-componenten 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-gedetectedeerde PAK verbindingen worden “<”-waarden gerapporteerd overeenkomend met of groter dan 2 keer de aantoonbaarheidsgrenzen. De aantoonbaarheidsgrenzen dienen kleiner te zijn dan de helft van de gevraagde rapporteergrenzen. Voor de bepalingswijze van de aantoonbaarheidsgrenzen wordt verwezen naar CMA deel 6.

8 KWALITEITSCONTROLE

8.1 Responslineariteit

De werkwijze voor de bepaling van lineariteit is beschreven in CMA Deel 6. Een controle van de lineariteit wordt uitgevoerd bij elke ernstige instrumentele ingreep. Indien niet aan lineariteit is voldaan mag overgeschakeld worden op een andere (bv. kwadratische) functie.

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 laagste piek) dient, bij gebruik van een 30 m apolaire kolom, kleiner te zijn dan 60 % (beide componenten dienen in ongeveer gelijke concentraties aanwezig te zijn in het kalibratiemengsel).

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 laagste piek) dient kleiner te zijn dan 20 % (bij vergelijkbare respons).

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 Controle op de kalibratie

Voor de controle op de kalibratie wordt verwezen naar 6.3.3 (GC/MS) en 6.4.3 (HPLC)..

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

Om de terugvinding en de reproduceerbaarheid te controleren wordt op regelmatige basis een controlemonster geanalyseerd. Dit is bij voorkeur een gecertificeerd materiaal, maar er mag ook gebruik gemaakt worden van een gedopeerd monster. De terugvindingen moeten gelegen zijn tussen 75% en 125%. 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.

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:

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

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} = relatieve responsfactor van de interne standaard t.o.v. de 'recovery'-standaard (zie 6.3.3)

Verantwoorde kwantificering wordt bekomen indien het recuperatierendement van de inwendige standaarden minimaal 50 % en maximaal 130% bedraagt. Voor d8-naftaleen dient de terugvinding 40%-130% te bedragen. Hogere terugvindingen kunnen te wijten zijn aan interferenties op het specifiek ion van de interne standaard; in dat geval wordt een andere interne standaard gebruikt voor de kwantificering (bij voorkeur een interne standaard die qua retentietijd dichtst bij de betreffende PAK ligt). De hoge terugvinding kan echter ook te wijten zijn aan onderdrukking van de overeenkomstige recoverystandaard; in dat geval wordt de terugvinding van de interne standaard berekend t.o.v. een andere recoverystandaard.

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 PRESTATIEKENMERKEN

Voor de prestatiekenmerken wordt verwezen naar CMA deel 6.

10 VEILIGHEID

De scheikundige producten 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 producten tot een minimum te herleiden.

11 REFERENTIES

- Procedure conform Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group, USA en TNRCC method 1006, Texas.

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
 Injectiemodus : Splitless (purge on na 1 min)
 Split vent : 30 ml / min
 Septum purge : 1 ml / min
 Injectievolume : 1 µl
 Injectietemperatuur : 300°C
 Interfacetemperatuur : 275°C

MS-instellingen

Brontemperatuur : 250°C
 Electronenenergie : 70 eV
 SIM-ionen : zie tabel 1

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	"
Acenafteen	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 μ l

Kolomtemperatuur : 35°C

Gradiënt :

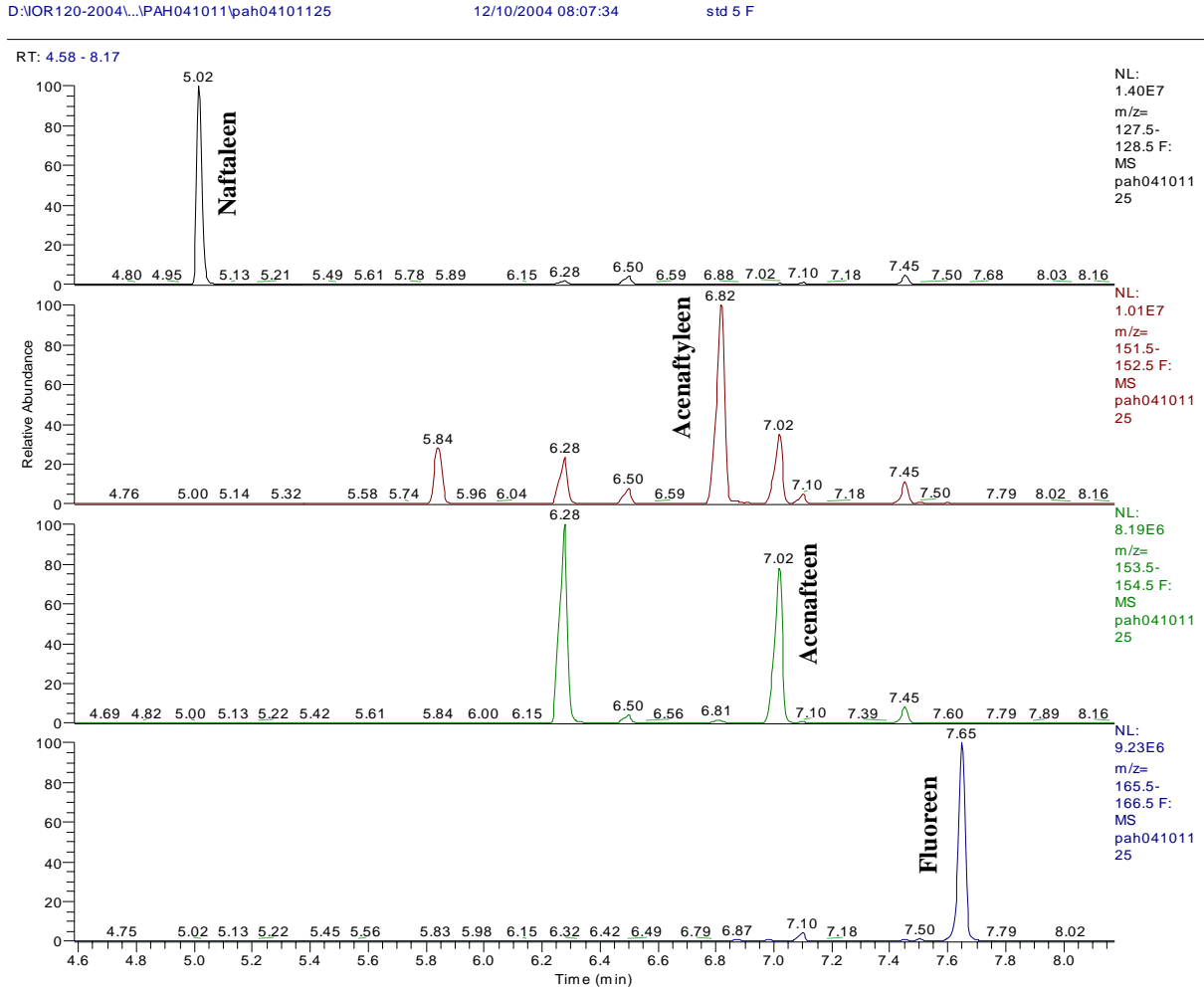
Tijd (min)	Acetonitrile %	Water %
0	50	50
10	50	50
50	100	0
60	50	50
70	50	50

Fluorescentiedetector en DAD programmatie :

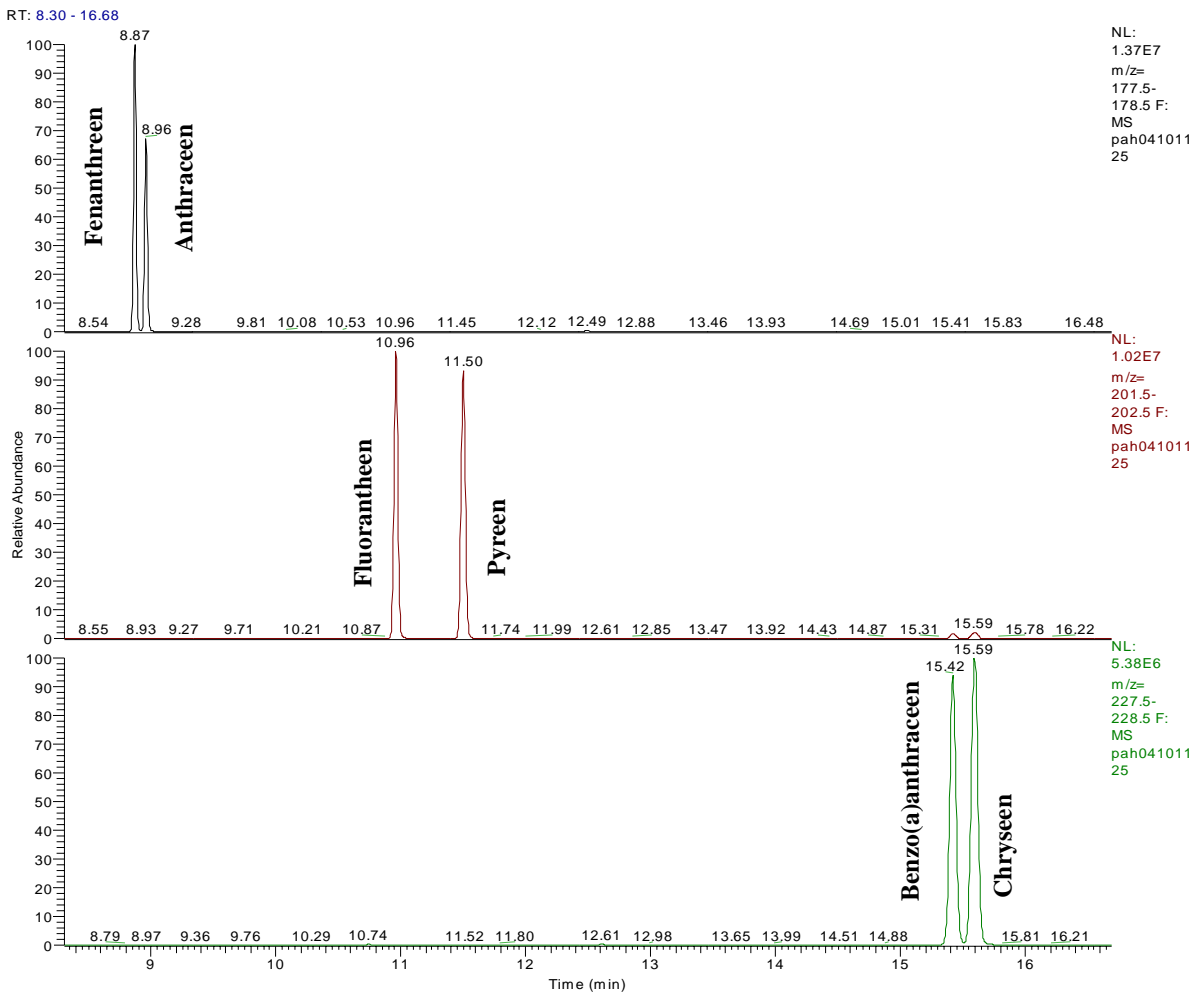
PAK	DAD	Fluorescentie (zie NEN 5771)	
	λ_{\max} voor UV	Aanbevolen $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Geoptimaliseerde $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$
Naftaleen	220	280/340	280/334
Acenaftyleen	227	280/340	292/324
Acenafteen	229		
Fluoreen	261	280/340	268/308
Fenantreen	251	280/340	292/366
Anthraceen	252	305/430	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

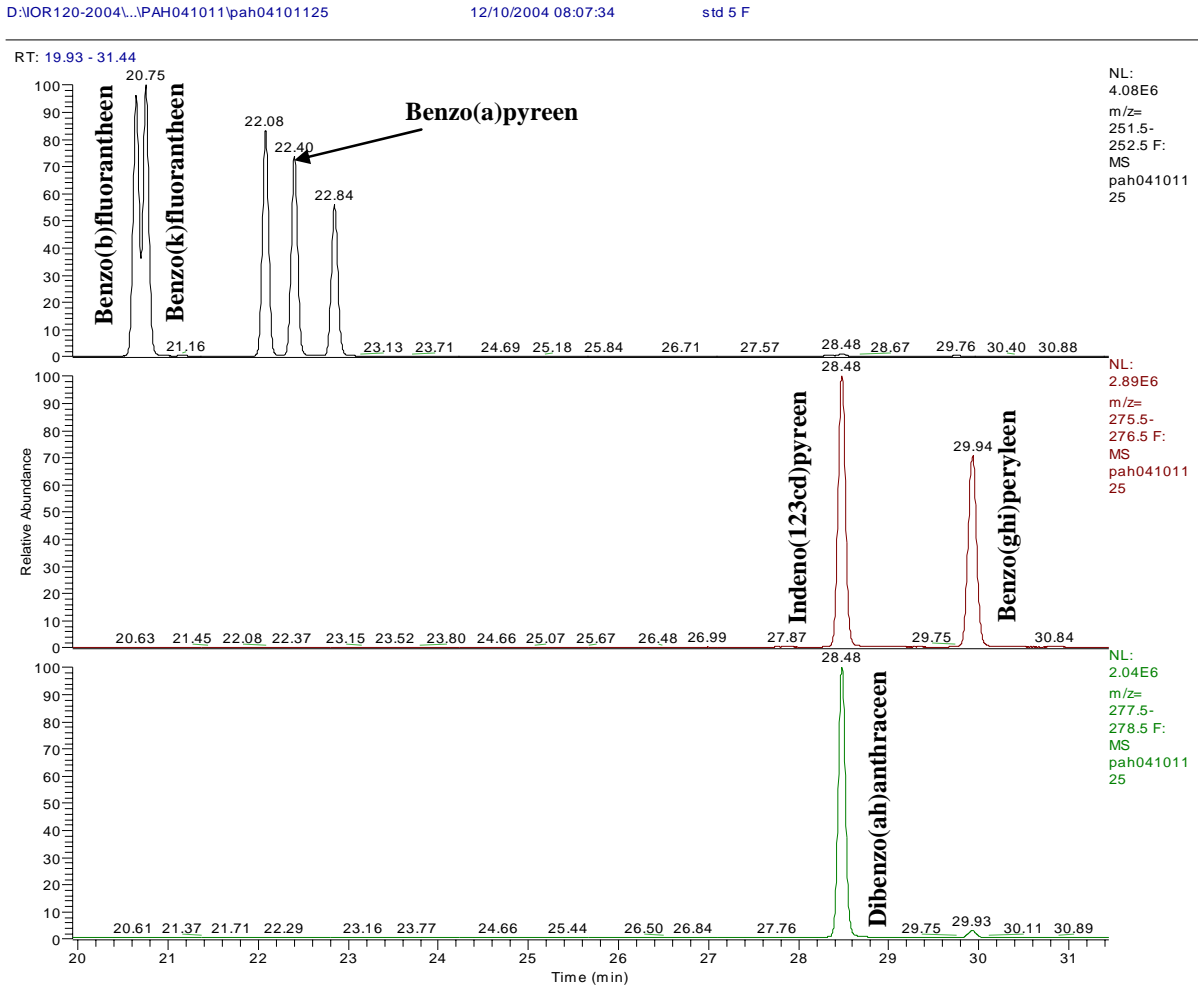
Figuur I : Totaal ionen chromatogram voor een PAK kalibratie-oplossing – deel 1



Figuur I : Totaal ionen chromatogram voor een PAK kalibratie-oplossing – deel 2



Figuur I : Totaal ionen chromatogram voor een PAK kalibratie-oplossing – deel 3



Figuur II : HPLC fluorescentiechromatogram voor een PAK kalibratie-oplossing

