

## Organochloorpesticiden in bagger- en ruimingsspecie

## INHOUD

<b>1</b>	<b>DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>PRINCIPE</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Staalvoorbereiding</i>	3
2.2	<i>Analyse</i>	3
<b>3</b>	<b>APPARATUUR EN MATERIAAL</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>REAGENTIA EN OPLOSSINGEN</b>	<b>4</b>
<b>5</b>	<b>MONSTERBEWARING EN MONSTERVOORBEHANDELING</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>ANALYSEPROCEDURE</b>	<b>5</b>
6.1	<i>Extractie en zuivering</i>	5
6.2	<i>Analyse</i>	6
6.2.1	Meting	6
6.2.2	Identificatie	6
6.2.3	Kalibratie	6
6.2.4	Kwantificering	8
<b>7</b>	<b>KwaliteitsCONTROLE</b>	<b>8</b>
7.1	<i>Responslineariteit</i>	8
7.2	<i>Gaschromatografische scheiding</i>	8
<b>8</b>	<b>Prestatiekenmerken</b>	<b>9</b>
<b>9</b>	<b>RAPPORTERING</b>	<b>9</b>
	<b>BIJLAGE A Voorbeeld van LV-GC/MS GC-MS/MS-instellingen voor de bepaling van OCP in baggerspecie</b>	<b>10</b>
	<b>BIJLAGE B Karakteristieke ionen transities en typische retentietijden van de OCP (DB-XLB kolom, 30m x 0.25mm x 0.25 µm)</b>	<b>11</b>

## 1 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

Deze procedure vervangt de procedure van CMA/3/Y van september 2015.

In deze procedure wordt een methode beschreven voor de extractie, zuivering en analyse van een aantal organochloorpesticiden (OCP's) in bagger- en ruimingsspecie. De methode is eveneens toepasbaar op waterbodems. De lijst van verbindingen is hieronder weergegeven:

alfa-HCH (hexachloorcyclohexaan)	alfa-chloordaan (cis-chloordaan)
beta-HCH	gamma-chloordaan (trans-chloordaan)
gamma-HCH (lindaan)	o,p'-DDD
aldrin	p,p'-DDD
dieldrin	o,p'-DDE
alfa-endosulfan	p,p'-DDE
beta-endosulfan	o,p'-DDT
endosulfansulfaat	p,p'-DDT

De bepalingsgrenzen van de methode zijn afhankelijk van de verbinding en van de graad van verontreiniging van het monster, en kunnen variëren tussen 1 en 50 µg/kg ds per OCP.

*Opmerking* : de resultaten van aldrin die met deze methode bekomen worden zijn meestal een onderschatting.

## 2 PRINCIPE

### 2.1 STAALVOORBEREIDING

De staalopwerking wordt uitgevoerd door middel van QUECHERS. Aan ongeveer 10 gram nat staal wordt interne standaard toegevoegd. Het staal wordt vervolgens geëxtraheerd door te soniceren of te vortexen met acetonitril. Na centrifugatie wordt de bovenstaande fase geschud met zouten (watervrij magnesiumsulfaat en natriumacetaat). De bovenstaande fase wordt vervolgens opgezuiverd met een combinatie van adsorbentia : 'octadecyl' (C18), 'primary/secondary amine exchange material' (PSA) en 'graphitized carbon black' (GCB). Het extract wordt ingedampd en opgezuiverd door middel van fractionering met gelpermeatiechromatografie (GPC), en de relevante fractie wordt geanalyseerd.

### 2.2 ANALYSE

De extracten worden geanalyseerd met een gaschromatograaf uitgerust met een tandem massaspectrometrische detector (~~GC/MS~~ GC-MS/MS). De detectie gebeurt in ~~SIM~~ SRM modus. De identificatie gebeurt aan de hand van de retentietijd en van de ~~relatieve intensiteiten van de karakteristieke ionen verhoudingen van de transities~~. De kwantificering gebeurt door integratie van de piekoppervlakken behorend bij de chromatogrammen van de karakteristieke ionen. Er wordt gebruik gemaakt van de interne standaard methode waarbij de HCHs berekend worden t.o.v. 13C-HCH en de overige OCP t.o.v. 13C-p,p'-DDE.

*Opmerking* : bijkomend kunnen nog andere interne standaarden toegevoegd worden, bv. D4-p,p'-DDT als interne standaard voor de DDTs.

~~Voor de analyse van de extracten mag ook GC-ECD aangewend worden; voor de juiste werkwijze van meting, kalibratie, kwantificatie en kwaliteitscontrole wordt verwezen naar NEN 6980 (2011) en ISO10382:2002 (bodem).~~

### 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 injectiespuiten van 50-250 µl voor het doperen met interne standaard
- 3.4 eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet
- 3.5 maatcilinder (100 ml)
- 3.6 QUECHERS-kit, bestaande uit een zoutrecipiënt met watervrij magnesiumsulfaat en natriumacetaat (bv. Restek Q-Sep Q150) en een adsorbensrecipiënt met een combinatie van magnesiumsulfaat, C18, PSA en GCB (bv. Restek Q-Sep Q352)
- 3.7 een GPC-opstelling voorzien van een fractiecollector. Voor de fractionering wordt bv een Waters Envirogelkolom gebruikt (bestaande uit een prekolommetje, een kolom van 19x150mm en kolom van 19x300mm, in serie aan elkaar gekoppeld). Het injectievolume bedraagt 2 ml. Als eluens wordt dichloormethaan gebruikt met een debiet van 4 ml/min. Het elutievenster van de OCP-fractie dient vooraf bepaald te worden (typisch 16 tot 24 minuten).
- 3.8 ~~GC-MS bestaande uit een capillaire gaschromatograaf, een autosampler, een lage-resolutie massaspectrometer van het quadrupool-type en een PC met sturings- en dataverwerkings-programmatuur~~ GC-MS/MS bestaande uit een capillaire gaschromatograaf, een autosampler, een tandem massaspectrometer en een PC met sturings- en dataverwerkingsprogramma. De GC is eventueel uitgerust met een PTV (programmed temperature vaporiser) of on-column groot-volume injector.
- 3.9 fused silica GC-kolom met apolaire stationaire fase, bv. DB-XLB, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm

### 4 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- 4.1 acetonitrile, dichloormethaan : voor residu-analyse
- 4.2 natriumsulfaat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): poeder, watervrij. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wordt in de droogoven bewaard bij 130°C
- 4.3 hoofdstandaardoplossingen van organochloorpesticiden:
  - van elke bovenstaande chloorpesticide wordt een afzonderlijke hoofdstandaard van **bvb.** 100 µg/g in hexaan of een ander alkaan gemaakt. Deze wordt bereid uit zuiver standaard-materiaal.
- 4.4 hoofdstandaardoplossingen van 13C-p,p'-DDE en 13C-beta-HCH (interne standaarden):
  - deze standaardoplossingen wordt bereid uitgaande van zuiver standaard materiaal. De oplossingen bevatten **bvb.** 100 µg/g in hexaan of een ander alkaan
- 4.5 doperingsstandaardoplossing van 13C-p,p'-DDE en 13C-beta-HCH (interne standaarden):
  - uitgaande van de bovenstaande hoofdstandaardoplossingen 13C-p,p'-DDT en 13C-beta-HCH wordt een verdunning van **ongeveer bvb.** 20 µg/g in hexaan of een ander alkaan gemaakt
- 4.6 doperingsoplossing recoverystandaard : als recoverystandaard kan elke verbinding gebruikt worden die elueert in het gebied van de OCP en die niet interfereert met de natieve OCP of de interne standaarden. De doperingsoplossing bevat **ongeveer bvb.** 20 µg/g recoverystandaard in hexaan.

- 4.7 kalibratiestandaard werkoplossing van OCP's:
- uitgaande van de bovenstaande hoofdstandaardoplossingen van natieve en <sup>13</sup>C-gemerkte verbindingen en van de doperingsoplossing van de recoverystandaard wordt een verdunning in dichloormethaan of hexaan of een ander alkaan gemaakt die elke verbinding in een concentratie van ongeveer bvb. 1 µg/g bevat
- 4.7 standaard werkoplossingen voor lineariteitscontrole:
- uitgaande van de bovenstaande hoofdstandaardoplossingen van natieve en <sup>13</sup>C-gemerkte verbindingen wordt een verdunningsreeks gemaakt, waarbij de concentratie van elke natieve component varieert en de concentratie van de interne standaard constant gehouden wordt op ongeveer bvb. 1 µg/g

Opmerking : de aanmaak van standaarden kan ook gebeuren aan de hand van aangekochte mengstandaarden

## 5 MONSTERBEWARING EN MONSTERVERORBEHANDELING

Voor de monsterconservering en –bewaring wordt verwezen naar CMA/1/B.

Voor de monsterveroorbehandling wordt verwezen naar CMA/5/B.3.

## 6 ANALYSEPROCEDURE

### 6.1 EXTRACTIE EN ZUIVERING

Het monster wordt gehomogeniseerd door omroeren. Eventueel bovenstaand water wordt gedecanteerd. De extractie en zuivering gebeuren aan de hand van QUECHERS :

- weeg ongeveer 10 gram nat staal in een centrifugatiebuisje en dopeer met interne standaard
- voeg 20 ml acetonitrile toe en sluit het recipiënt af
- soniceer gedurende 2 uur, het centrifugatiebuisje wordt af en toe opgeschud. Alternatief kan 3 min gevortext worden.
- centrifugeer (3000 T/min, 5 min)
- breng de bovenstaande fase over in het QUECHERS-buisje met magnesiumsulfaat en natriumacetaat (bv Q-Sep Q150)  
*Opmerking* : indien de hoeveelheid magnesiumsulfaat niet volstaat om het extract te drogen mag een extra hoeveelheid toegevoegd worden
- schud krachtig gedurende 1 minuut
- centrifugeer (3000 T/min, 5 min)
- breng de bovenstaande fase over naar het busje met adsorbentia (bv Q-Sep Q352)
- schud krachtig gedurende 1 minuut
- centrifugeer (3000 T/min, 5 min)
- neem zoveel mogelijk af van de bovenstaande fase, damp in tot bijna droog en voeg 10 ml dichloormethaan toe
- droog het dichloormethaanextract over een busje met natriumsulfaat
- damp in tot 2.2 ml

Het extract wordt vervolgens opgezuiverd over GPC om hoogmoleculaire verbindingen en zwavel te verwijderen. De procedure is in detail beschreven in CMA/3/Z.

- vang de OCP-fractie op en damp in tot 1 ml en dopeer met recoverystandaard

## 6.2 ANALYSE

### 6.2.1 METING

Van de preparaten en van de standaard-werkoplossing voor **GC-MS** kalibratie wordt 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 tandem** massaspectrometer. De opname van het chromatogram gebeurt in **SIM SRM** modus. Typische PTV-GC-MS/MS instellingen zijn gegeven in bijlage A. De **ionen transities** voor kwantificering en confirmatie alsook de retentietijden bekomen met de typische instellingen zijn weergegeven in bijlage B.

### 6.2.2 IDENTIFICATIE

De aanwezigheid van natieve OCP's in de monsters wordt bevestigd op basis van **de onderstaande gegevens en criteria: criteria zoals vermeld in CMA/6/D.**

- **de retentietijd van de piek in de ionenchromatogrammen van het staal ligt binnen een tolerantie van 0.08 min, in vergelijking met de retentietijd van het pesticide in de ionenchromatogrammen van de kalibratieoplossing**
- **SIM: typische ionen zijn weergegeven in bijlage B; de signaal/ruis-verhouding van elk ion dient groter of gelijk te zijn aan 3.**
- **SIM: de relatieve intensiteiten van de gedetecteerde ionen, uitgedrukt als percentage van het ion met de hoogste intensiteit, moeten overeenkomen met de intensiteiten van de kalibratieoplossing, binnen onderstaande marges:**

Relatieve intensiteit (% vd hoofdpijk)	Max. toelaatbare marge (relatief)
>50%	+10%
>20% tot 50%	+15%
>10% tot 20%	+20%
<10%	+50%

De identificatie van de interne standaard is eveneens gebaseerd op **bovenstaande deze** criteria. De geïdentificeerde pieken worden geïntegreerd met de software van het apparaat en manueel geverifieerd.

### 6.2.3 KALIBRATIE

De kwantitatieve bepaling van de verschillende OCP's gebeurt volgens de interne standaard methode. Hierbij wordt elke component, uitgezonderd de HCHs, gekwantificeerd t.o.v. 13C-p,p'-DDE, die bij het begin van de extractie aan het monster werd toegevoegd. De HCHs worden gekwantificeerd t.o.v. 13C-beta-HCH.

De kalibratie kan op een aantal verschillende manieren gebeuren (voor de kwaliteitseisen waaraan de kalibratie moet voldoen wordt verwezen naar CMA/6/D) :

Kalibratierechte

In dit geval worden aan het begin van de analysereeks minimaal 4 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties groter dan 0 en verspreid over het lineair gebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve component en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend.

Gemiddelde RRF

De relatieve responsfactor (RRF) wordt bepaald met minstens één kalibratieoplossing. 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 minstens één kalibratieoplossing geïnjecteerd. De RRFen voor elke te bepalen component worden vervolgens bepaald uit de verhouding van de oppervlakten en concentraties van de natieve componenten en de interne standaard :

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

met

RRF<sub>i</sub> = relatieve responsfactor van het pesticide

A<sub>i</sub> = piekoppervlakte van het pesticide bij injectie van de kalibratieoplossing

C<sub>i</sub> = concentratie (in ng/μl) van het pesticide in de kalibratieoplossing

C<sub>IS</sub> = concentratie (in ng/μl) van de interne standaard in de kalibratieoplossing

A<sub>IS</sub> = piekoppervlakte van de interne standaard in de kalibratieoplossing

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

*Opmerking:*

Voor de berekening van de terugvinding van de interne standaarden wordt doorgaans de RRF-methode toegepast, waarbij de RRF van een interne standaard berekend wordt t.o.v. de overeenkomstige recoverystandaard met onderstaande formule:

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

met

RRF<sub>is</sub> = relatieve responsfactor van de interne standaard

A<sub>is</sub> = piekoppervlakte van de interne standaard bij injectie van de kalibratieoplossing

C<sub>is</sub> = concentratie van de interne standaard in de kalibratieoplossing (μg/ml)

C<sub>RS</sub> = concentratie van de overeenkomstige recoverystandaard in de kalibratieoplossing (μg/ml)

A<sub>RS</sub> = piekoppervlakte van de overeenkomstige recoverystandaard in de kalibratieoplossing

### Bracketing

De kalibratiereeks wordt geïnjecteerd minstens bij het begin en bij het einde van de meetreeks. De berekening van de concentraties in een staal gebeurt aan de hand van de gemiddelde RRF van de 2 injecties van de 2 punten waartussen het staal begrepen is.

### 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 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties verspreid over het meetgebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve component en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend.

#### **6.2.4 KWANTIFICERING**

Voor de monsterextracten worden op identieke wijze als hierboven beschreven voor de standaardoplossingen de ionenchromatogrammen geregistreerd. Van de geïdentificeerde chloorkoolwaterstoffen worden de piekoppervlakten behorende bij het meest intense ion berekend. Uitgaande van de integratiewaarden voor het monster en de relatieve responsfactoren of kalibratierechte/curve bepaald voor de kalibratiestandaard worden de gehalten van de verschillende verbindingen in het monster berekend.

## **7 KWALITEITSCONTROLE**

Voor de kwaliteitseisen ivm kalibratie, procedureblanco, terugvinding van de interne standaard, controle op gevoeligheid, controlestaal en controlestandaard wordt verwezen naar CMA/6/D.

### **7.1 RESPONSLINEARITEIT**

De werkwijze voor de bepaling van lineariteit is beschreven in CMA Deel 6.

Stelt men bij de monsteranalyse een overschrijding van de bovenste lineaire grens vast, d.i. de hoogst geregistreerde oppervlakte in het lineaire gebied, dan moet de analyse hernomen worden startend van een met nonaan verdunde hoeveelheid monsterextract, voor zover het signaal van de inwendige standaard nog voldoende intens is, of startend van een geringere hoeveelheid monster.

### **7.2 GASCHROMATOGRAFISCHE SCHEIDING**

De kolomkwaliteit wordt geverifieerd aan de hand van de scheiding van een kritisch paar in het chromatogram van de kalibratieoplossing. Het chromatografisch scheidingspercentage (gelijk aan hoogte vallei / hoogte laagste piek) dient kleiner te zijn dan een vooraf bepaalde limietwaarde (beide componenten dienen in ongeveer gelijke concentraties aanwezig te zijn in het kalibratiemengsel).

Alternatief kan de kolomkwaliteit geverifieerd worden aan de hand van het aantal theoretische platen, berekend op basis van de piekarakteristieken voor een gekozen verbinding in het chromatogram van de kalibratiestandaard. Het aantal platen  $N_{th}$  wordt gegeven door :



$$N_{th} = 5.54 * \left( \frac{t_{R_i}}{w_{1/2}} \right)^2$$

Hierbij is  $t_{R_i}$  de waargenomen retentietijd voor de verbinding  $i$  en  $w_{1/2}$  de piekbreedte op halve hoogte, uitgedrukt in dezelfde tijdseenheid.

Om een continue controle te hebben over de kolomkwaliteit is het zinvol de scheidingskarakteristieken uit te zetten in een controlekaart.

## 8 PRESTATIEKENMERKEN

Voor de prestatiekenmerken wordt verwezen naar CMA deel 6.

## 9 RAPPORTERING

Vermeld in het analyseverslag het gehalte van de gedetecteerde verbindingen in mg/kg ds. De som van de OCP wordt berekend volgens het "lower bound" principe (concentraties kleiner dan de rapporteergrens worden gelijk gesteld aan nul).

**BIJLAGE A****VOORBEELD VAN ~~LV-GC/MS~~ GC-MS/MS-INSTELLINGEN VOOR DE BEPALING VAN OCP IN BAGGERSPECIE*****Autosampler instellingen***

- injection volume	10 µl
- injection speed	5 µl/s
- pre inject delay	300 ms
- post inject delay	300 ms

***PTV-instellingen***

- injection temperature	45 °C
- injection time	0.3 min
- injection pressure	10 kPa
- evaporation time	0.2 min
- evaporation pressure	10 kPa
- evaporation flow	50 ml/min
- transfer time	6 min
- transfer pressure	100 kPa
- transfer temperature	350 °C @ 5°C/s
- splitless time	3 min

**~~GC/MS-instellingen~~ GC-MS/MS instellingen**

- oventemperatuursprogramma :

<i>initial</i>	40 °C (4 min)
<i>rate 1</i>	15 °C/min
<i>level 1</i>	160 °C (0 min)
<i>rate 2</i>	5 °C/min
<i>level 2</i>	320 °C (6 min)

~~MS source temperature~~ 200 °C  
~~MS modus~~ SIM  
~~MS ionen~~ zie bijlage B

- Mode	tSRM
- Cycle tijd	0.15 s
- Collision gas pressure	1.3 mTorr
- Emissiestroom	50 µA
- Interface temperatuur	310 °C
- Bron temperatuur	230 °C

**BIJLAGE B****KARAKTERISTIEKE IONEN TRANSITIES EN TYPISCHE RETENTIETIJDEN VAN DE OCP (DB-XLB KOLOM, 30M X 0.25MM X 0.25 µM)**

Component	Typische retentietijd (min)	Kwantificeringstransitie		Confirmatietransitie	
		Moederion (m/z)	Dochterion (m/z)	Moederion (m/z)	Dochterion (m/z)
alfa-HCH	16.48	181	145	183	147
beta-HCH	17.84	181	145	183	147
gamma-HCH	17.16	181	145	183	147
aldrin	19.40	263	193	265	193
dieldrin	22.44	263	193	265	193
alfa-endosulfan	21.67	241	206	243	208
beta-endosulfan	24.02	241	206	243	208
endosulfansulfaat	25.34	272	237	274	239
trans-chloordaan	21.60	373	266	375	266
cis-chloordaan	21.47	373	266	375	266
o,p'-DDE	21,12	246	176	248	176
p,p'-DDE	22,23	246	176	248	176
o,p'-DDD	22,49	235	165	237	165
p,p'-DDD	23,43	235	165	237	165
o,p'-DDT	23,86	235	165	237	165
p,p'-DDT	24,83	235	165	237	165
13C-beta-HCH	17.84	187	151	189	153
13C-p,p'-DDE	22.20	258	188	260	188

<b>Component</b>	<b>Retentietijd min.</b>	<b>Kwantificeringsion m/z</b>	<b>Confirmatie-ion m/z</b>
alfa-BHC	16,48	219	217
gamma-BHC	17,16	219	217
beta-BHC	17,84	219	217
aldrin	19.40	263	265
o,p'-DDE	21,12	246	248
p,p'-DDE	22,23	246	248
o,p'-DDD	22,49	235	237
o,p'-DDT	23,43	235	237
p,p'-DDD	23,86	235	237
p,p'-DDT	24,83	235	237
gamma-chloordaan	21,47	373	375
alfa-chloordaan	21,60	373	375
alfa-endosulfaan	21,67	239	241
beta-endosulfaan	24,02	239	241
endosulfansulfaat	25,34	272	274

dieldrin	22,44	79	263
<sup>13</sup> C-beta-HCH (interne std)	17.84	225	223
<sup>13</sup> C-p,p'-DDE (interne std)	22.20	258	260