

Bepaling van pesticiden in water met GC-MS

INHOUD

1	Toepassingsgebied	3
2	Principe	4
3	Apparatuur en materiaal	5
4	Reagentia en standaarden	5
5	Monsterbewaring	6
6	Extractie	6
7	Zuivering	6
8	GC-MS analyse	7
8.1	<i>Meting</i>	7
8.2	<i>Identificatie en integratie</i>	7
8.3	<i>Kalibratie</i>	8
8.4	<i>Kwantificering</i>	9
9	Kwaliteitscontrole	9
9.1	<i>Responslineariteit</i>	10
9.2	<i>Chromatografische scheiding</i>	10
10	Rapportering	10
11	Veiligheid	10
12	Referenties	10
	BIJLAGE A : Typische PTV-GC-MS instellingen	11
	BIJLAGE B : Typische ionen voor kwantificering en confirmatie	12

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure **vervangt procedure WAC/IV/A/028 van september 2015 en** beschrijft een methode voor de extractie, zuivering en analyse van gaschromatografeerbare pesticiden in water. De methode is toepasbaar op drinkwater, grondwater, oppervlaktewater en afvalwater. De bepalingsgrenzen zijn voor de meeste pesticiden lager dan 25 ng/l. Onderstaande tabel toont de verbindingen waarop de methode van toepassing is. Voor de componenten gemerkt met een * is de bepaling minder reproduceerbaar, de bekomen gehalten dienen als indicatief beschouwd te worden.

Organochloorpesticiden

- 2,3,5,6-tetrachloornitrobenzeen (TCNB)
- alfa-hexachloorcyclohexaan (alfa-HCH)
- gamma-hexachloorcyclohexaan (gamma-HCH)
- pentachloornitrobenzeen (PCNB)
- beta-hexachloorcyclohexaan (beta-HCH)
- delta-hexachloorcyclohexaan (delta-HCH)
- heptachloor
- aldrin
- telodrin
- isodrin
- heptachloorepoxide
- o,p'-DDE
- trans-chloordaan
- cis-chloordaan
- alfa-endosulfaan
- p,p'-DDE
- dieldrin
- o,p'-DDD
- endrin
- o,p'-DDT
- p,p'-DDD
- beta-endosulfaan
- p,p'-DDT
- endosulfansulfaat
- p,p'-methoxychloor

Organofosforpesticiden

- dichlorvos
- mevinphos*
- ethoprophos
- dimethoat
- diazinon
- parathion-methyl
- malathion
- fenitrothion
- chlofenvinphos (som van 2 isomeren)
- methidathion
- azinphos-methyl*
- azinphos-ethyl

- terbufos*
- fonofos
- chlorpyrifos-methyl
- pirimiphos-methyl
- chlorpyrifos
- parathion-ethyl
- fenthion
- bromophos-methyl
- bromophos-ethyl

Triazines

- desethylatrazine
- simazine
- propazine
- atrazine
- terbutylazine
- sebutylazine
- prometryn
- terbutryn
- cyanazine
- hexazinon

Andere/bijkomende

- desethylterbutylazine
- trifluralin*
- cumafos*
- demeton*
- triazophos
- hexachloorbenzeen
- chlorprofam
- ethofumesate

Opmerkingen :

- Sommige van bovenstaande pesticiden (bv. **chlorpropham**) zijn ook bepaalbaar met LC en kunnen desgewenst met LC geanalyseerd worden i.p.v. GC (voor de toestelinstellingen wordt verwezen naar WAC/IV/A/027).
- De methode kan uitgebreid worden met andere gaschromatografeerbare pesticiden (bv. alachlor, dichlobenil...)

2 PRINCIPE

Aan het waterstaal wordt een gekende hoeveelheid isotoop gemerkte interne standaard toegevoegd. Het waterstaal worden vervolgens vloeistof/vloeistof geëxtraheerd met dichloormethaan. Het extract wordt ingedampt (solventwissel naar hexaan) en bv. 50 µl wordt geïnjecteerd in een gaschromatograaf met massaspectrometrische detector (GC/MS). Het gehalte van de verschillende pesticiden wordt berekend met de interne standaard methode. Extracten die teveel interferenties bevatten worden gezuiverd over alumina (dit is meestal noodzakelijk in het geval van afvalwater).

Opmerking :

de extractie kan ook gebeuren d.m.v. vaste fase extractie (SPE).

3 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Gebruikelijk laboratoriumglaswerk
- Injectiespuiten van 50 en 100 µl
- Glazen monsterflesjes (bv. 1.5 ml)
- Glazen chromatografische kolommen, i.d. 10-15 mm, met gefritteerde basis en teflonkraan
- Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg
- Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g
- Eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet
- GC-MS bestaande uit:
 - o een gaschromatograaf voorzien van een groot-volume injectiesysteem. De parameterinstellingen die in deze methode beschreven worden gelden voor een PTV (Programmable Temperature Evaporator) van Thermo Electron en dienen enkel als voorbeeld; ook andere groot-volume injectoren kunnen na optimalisatie toegepast worden;
 - o een massaspectrometrische detector
 - o een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse
- GC-kolom: een apolaire kolom, bv. JW DB-XLB, 30 meter lengte, 0.25 mm interne diameter, 0.25 µm filmdikte.

4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- Dichloormethaan: p.a.
- n-Hexaan : p.a.
- Water: zuiver drinkwater, bv. Spa blauw
- Natriumsulfaat (Na₂SO₄): poeder, watervrij
- Aluminiumoxide : activeer basische aluminiumoxide gedurende 16 u bij 150°C; laat vervolgens afkoelen in een exsiccator en voeg per 90 g aluminiumoxide 10 g water toe; schud tot alle klonters verdwenen zijn en laat voor gebruik gedurende tenminste 16 u conditioneren in een van de lucht afgesloten vat
- Stockstandaarden van natieve pesticiden: vaste en vloeibare producten van diverse leveranciers; ook commercieel verkrijgbare mixen kunnen gebruikt worden
- Interne standaard stockoplossingen : individuele oplossingen van 13C-p,p'-DDE en 13C-PCB-101, bereid uit zuivere producten of aangekochte oplossingen. Andere isotoopgemerkte pesticiden kunnen ook gebruikt worden als interne standaard.
- Recoverystandaard additieoplossing : bevat bv. 1 mg/l dibromobifenyl in hexaan
- Kalibratieoplossing : uitgaande van de stockoplossingen wordt een kalibratieoplossing aangemaakt in hexaan die bv. 10 tot 50 µg/l per pesticide bevat, 50 µg/l 13C-p,p'-DDE en 13C-PCB-101, en 50 µg/l dibromobifenyl
- Interne standaard doeringsoplossing voor additie aan stalen : deze oplossing bevat bv. 1 mg/l 13C-DDE en 13C-PCB-101 in isopropanol

5 MONSTERBEWARING

Voor de monsterconservering en –bewaring wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

6 EXTRACTIE

Het watermonster wordt gehomogeniseerd door opschudden en hiervan wordt 200 ml (voor drinkwater : 400 ml) in een scheidrecter gebracht. Aan dit deelmonster wordt bv. 50 µl van de doperingsoplossing interne standaard toegevoegd (dit komt overeen met 50 ng 13C-p,p'-DDE). Voeg 20 ml dichloormethaan toe en schud het geheel krachtig gedurende ca 3 min. Laat de organische fase af over een filter gevuld met Na₂SO₄ en herneem de spoel- en extractiestap tweemaal. Damp de verzamelde extracten in onder een stikstofstroom tot een eindvolume van 1 ml. Voer een solventwissel uit naar n-hexaan (indien de kalibratiestandaarden in hexaan aangemaakt werden) en analyseer met GC/MS.

Opmerkingen :

- Indien een zuivering over alumina uitgevoerd wordt dan is de solventwissel naar n-hexaan overbodig (de aluminakolom wordt geëluëerd met dichloormethaan)
- De houdbaarheid van preparaten, bij bewaring in de koelkast, bedraagt 2 weken
- Als alternatief voor de vloeistof-vloeistof extractie kan ook vaste fase extractie (offline of online met de meetapparatuur) aangewend worden (bv. gebruikmakend van een generische fase zoals Oasis HLB en ethylacetaat als elutiesolvent). Voeg aan het watermonster minstens 5 % methanol of isopropanol toe voorafgaand aan de deelmonsterneming om verlies door adsorptie aan glaswand en gesuspendeerde deeltjes te voorkomen.

7 ZUIVERING

De onderstaande zuivering is in de regel enkel nodig voor extracten van afvalwaterstalen.

Bereid een adsorptiekolom door op de gefritteerde basis van een chromatografiekolom achtereenvolgens 2 g gedeactiveerde alumina en 1 cm Na₂SO₄ te brengen. Spoel de kolom voor met 10 ml dichloormethaan. Breng vervolgens het ingedampde extract op de kolom en laat de vloeistof in de kolom dringen tot de vloeistofspiegel het oppervlak van de kolomvulling heeft bereikt. Elueer met 12 ml dichloormethaan en vang het eluaat op. Het eluaat wordt door voorzichtig afblazen met stikstof geconcentreerd tot 1 ml waarbij een solventwissel naar n-hexaan uitgevoerd wordt. Aan dit eindextract wordt bv. 50 µl van de recoverystandaardoplossing (1 mg/l dibromobifenyyl in hexaan) toegevoegd.

Opmerking :

de volgende pesticiden worden na de aluminazuivering niet meer teruggevonden: dichlorvos, mevinfos, dimethoaat, malathion, chlofenvinphos, cumafos, desethylatrazine, desethylterbutylazine, cyanazine en hexazinon.

8 GC-MS ANALYSE

8.1 METING

Van de monsterextracten wordt bv. 50 µl in de GC-MS geïnjecteerd. De analyse wordt in SIM of in full scan uitgevoerd. Typische PTV-GC-MS instellingen zijn gegeven in bijlage 1. De ionen voor kwantificering en confirmatie alsook de retentietijden bekomen met de typische instellingen zijn weergegeven in bijlage 2.

8.2 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

De aanwezigheid van de pesticiden in de monsters wordt bevestigd op basis van de onderstaande gegevens en criteria:

- 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
- Full scan : het volledige massaspectrum van de piek (gecorrigeerd voor de achtergrond) komt overeen met het massaspectrum van het pesticide bekomen in de kalibratieoplossing. Alle diagnostische ionen die in het referentiespectrum van de kalibratieoplossing gemeten worden (molecuulion, karakteristieke adducten van het molecuulion, karakteristieke fragmentionen en isotoopionen) en die een relatieve intensiteit van meer dan 10% hebben, moeten aanwezig zijn. Er moeten tenminste 4 ionen aanwezig zijn met een relatieve intensiteit van meer dan 10% van de hoofdpijk. Het molecuulion moet worden meegenomen wanneer het in het referentiespectrum een relatieve intensiteit heeft van meer dan 10%. Er moeten tenminste 4 ionen binnen de maximaal toegestane marges voor relatieve ionenintensiteiten liggen (zie onderstaande tabel). Er mag gebruik gemaakt worden van computerondersteunde library searching. In dat geval moet de vergelijking tussen de massaspectrometrische gegevens van de analysemonsters en die van de kalibratieoplossing boven een bepaalde kritische matchfactor liggen (vast te leggen tijdens de validatie).
- SIM : typische ionen zijn weergegeven in bijlage 2; de signaal/ruis-verhouding van elk ion dient groter of gelijk te zijn aan 3.
- SIM en Full scan : 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 criteria. De geïdentificeerde pieken worden geïntegreerd met de software van het apparaat en manueel geverifieerd.

De native pesticiden en de interne standaarden worden geïdentificeerd aan de hand van de criteria voor retentietijden en ionenverhoudingen zoals vastgelegd in procedure WAC/VI/A/003.

8.3 KALIBRATIE

De kwantitatieve bepaling van de verschillende pesticiden gebeurt volgens de zgn. interne standaard-methode. Hierbij wordt elke component gekwantificeerd t.o.v. een bepaalde isotoopgemerkt pesticide dat bij het begin van de extractie aan het monster werd toegevoegd.

De kalibratie kan op een aantal verschillende manieren gebeuren (voor de kwaliteitseisen waaraan de kalibratie moet voldoen wordt verwezen naar WAC/VI/A/003) :

- aan de hand van de relatieve responsfactor (RRF), bepaald met minstens één kalibratieoplossing. Deze werkwijze kan gevolgd worden indien de RRFen binnen bepaalde grenzen constant zijn over het meetgebied. 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 :

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

met

RRF _i	=	relatieve responsfactor van PAK-component i
A _i	=	piekoppervlakte van PAK-component i bij injectie van de kalibratieoplossing
C _i	=	concentratie (in ng/μl) van PAK-component i in de kalibratieoplossing
C _{IS}	=	concentratie (in ng/μl) van de overeenkomstige interne standaard in de kalibratieoplossing
A _{IS}	=	piekoppervlakte van de overeenkomstige interne standaard bij injectie van 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.

- aan de hand van '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.
- aan de hand van kalibratierechten. 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. 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.
- 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 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 PAK en de overeenkomstige interne

standaard. Vervolgens wordt dmv kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend.

Opmerkingen:

- 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:

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

met

RRF_{is}	=	relatieve responsfactor van de interne standaard
A_{is}	=	piekoppervlakte van de interne standaard bij injectie van de kalibratieoplossing
C_{is}	=	concentratie (in ng/ μ l) van de interne standaard in de kalibratieoplossing
C_{RS}	=	concentratie (in ng/ μ l) van de overeenkomstige recoverystandaard in de kalibratieoplossing
A_{RS}	=	piekoppervlakte van de overeenkomstige recoverystandaard bij injectie van de kalibratieoplossing

- in geval van online-SPE is geen additie van recoverystandaard mogelijk; het terugvindingsrendement voor de inwendige standaard wordt dan berekend als verhouding van de gemeten oppervlakte voor het monster en voor de kalibratiestandaard.

8.4 KWANTIFICERING

Voor de monsterextracten worden de ionenchromatogrammen geregistreerd op identieke wijze als hierboven beschreven voor de standaardoplossingen. Van de geïdentificeerde pesticiden 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.

De terugvindingen van de inwendige standaarden worden berekend aan de hand van hun relatieve responsfactor.

9 KWALITEITSCONTROLE

Voor de kwaliteitseisen ivm kalibratie, procedureblanco, terugvinding van de interne standaard, controle op gevoeligheid, controlestaal en controlestandaard wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

9.1 RESPONSLINEARITEIT

De werkwijze voor de bepaling van lineariteit is beschreven in WAC/VI/A/001.

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 verdunde hoeveelheid monsterextract, voor zover het signaal van de interne standaard nog voldoende intens is, of startend van een geringere hoeveelheid monster.

9.2 CHROMATOGRAFISCHE SCHEIDING

De kolomkwaliteit wordt geverifieerd aan de hand van de scheiding van een kritisch paar in het chromatogram van de kalibratie-oplossing. Het chromatografisch scheidingspercentage (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.

10 RAPPORTERING

Vermeld in het analyseverslag het gehalte van elk pesticide in $\mu\text{g/l}$ of in ng/l .

11 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.

12 REFERENTIES

ISO 10695:2000, Water quality – determination of selected organic nitrogen and phosphorus compounds – Gas chromatographic methods

BIJLAGE A: TYPISCHE PTV-GC-MS INSTELLINGEN

Autosampler instellingen

- injection volume 50 µl (hexaan)
- 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

- oventemperatuursprogramma :

initial	40 °C (4 min)
rate 1	15 °C/min
level 1	205 °C (0 min)
rate 2	5 °C/min
level 2	300 °C (0 min)

- MS source temperature 200 °C
- mass range m/z 70 – m/z 380
- scan rate 1000

BIJLAGE B: TYPISCHE IONEN VOOR KWANTIFICERING EN CONFIRMATIE

Component	Retentietijd min.	Kwantificeringsion m/z	Confirmatie-ion m/z
dichlorvos	11,88	109	185
mevinphos	13,66	127	192
2,3,5,6-TCNB	15,50	261	259
ethoprophos	15,51	158	200
trifluralin	15,66	306	264
desethylatrazine	15,85	172	187
desethylterbutylazine	15,98	186	188
demeton	16,39	88	170
alfa-HCH	16,48	219	217
hexachloorbenzeen	16,63	284	286
dimethoat	16,64	87	229
simazine	16,75	201	203
propazine	16,75	214	229
atrazine	16,76	200	215
terbufos	16,81	231	288
diazinon	16,84	179	304
terbutylazine	16,94	214	229
fonofos	17,06	109	246
gamma-HCH	17,16	219	217
PCNB	17,19	237	295
disulfoton	17,23	88	274
sebutylazine	17,60	200	202
beta-HCH	17,84	219	217
chlorpyrifos-methyl	18,25	286	288
prometryn	18,38	241	226
delta-HCH	18,42	219	217
parathion-methyl	18,50	109	125
heptachloor	18,53	272	274
pirimiphos-methyl	18,59	290	305
terbutryn	18,73	241	226
malathion	18,90	173	125
fenitrothion	18,98	277	125
chlorpyrifos	19,29	314	316
aldrin	19,32	263	265
fenthion	19,35	278	280
parathion-ethyl	19,60	291	109
cyanazine	19,61	225	240
telodrin	19,69	311	313

BIJLAGE B: VERVOLG

Component	Retentietijd min.	Kwantificeringsion m/z	Confirmatie-ion m/z
bromophos-methyl	19,86	331	329
isodrin	20,18	193	195
chlorfenvinphos	20,44	323	325
heptachloorepoxide	20,54	353	355
bromophos-ethyl	20,90	359	357
o,p'-DDE	21,12	246	248
methidathion	21,23	145	85
trans-chloordaan	21,47	373	375
cis-chloordaan	21,60	373	375
alfa-endosulfaan	21,67	239	241
p,p'-DDE	22,23	246	248
dieldrin	22,44	79	263
o,p'-DDD	22,49	235	237
endrin	23,12	263	265
o,p'-DDT	23,43	235	237
p,p'-DDD	23,86	235	237
beta-endosulfaan	24,02	239	241
triazophos	24,09	161	162
p,p'-DDT	24,83	235	237
hexazinon	25,16	171	128
endosulfansulfaat	25,34	272	274
p,p'-methoxychlor	26,46	227	228
azinhos-methyl	28,03	160	132
azinhos-ethyl	29,05	160	132
cumafos	30,40	362	364
13C-PCB-101	21,35	338	340
13C-p,p'-DDE	22,20	258	260