

6.2 PENTACHLOORFENOL KALIBRATIESTANDAARD

- breng in een centrifugebuis 10 ml methanol
- voeg met een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de 'doperingsoplossing interne standaard' toe, zodanig dat de concentratie van de gemerkte pentachloorfenol in het eindextract ongeveer 1 µg/g zal bedragen
- voeg met een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de 'doperingsoplossing kalibratiestandaard' toe, zodanig dat de concentratie van pentachloorfenol in het eindextract ongeveer 1 µg/g zal bedragen
- laat 1 uur soniceren
- voeg 10 ml dichloormethaan toe
- voeg 20 ml 0,2 N K₂CO₃-buffer toe aan de methanol/dichloormethaanfractie en schud gedurende 2 minuten
- pipetteer na centrifugeren de dichloormethaanfractie af
- voeg aan de overgebleven methanol/K₂CO₃-buffer 10 ml dichloormethaan toe en schud gedurende 2 minuten
- pipetteer na centrifugeren de dichloormethaan nogmaals af. De dichloormethaanfractie mag telkens verwijderd worden aangezien de kalibratiestandaard enkel opgewerkt wordt voor pentachloorfenol
- de fractie methanol/K₂CO₃-buffer wordt gederivatiseerd voor analyse van pentachloorfenol (zie 6.3)

6.3 DERIVATISERING EN ZUIVERING VAN PENTACHLOORFENOL

- derivatiseer pentachloorfenol door aan de methanol/K₂CO₃-bufferfractie 1 ml azijnzuuranhydride toe te voegen
- schud krachtig gedurende 4 minuten en laat 10 minuten rusten
- extraheer het pentachloorfenolderivaat met 5 ml hexaan, schud krachtig gedurende 4 minuten
- pipetteer de hexaanfase af en was de hexaanfase met enkele ml HPLC-water
- pipetteer de hexaanfase af en droog over een filter gevuld met Na₂SO₄; vang de hexaanfase op in een glazen monsterflesje
- damp in onder een stikstofstroom tot ongeveer 1 ml
- voeg met een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de ¹³C-1,2,4,5-tetrachloorbenzeen 'doperingsoplossing recoverystandaard' toe, zodanig dat de concentratie in het eindextract ongeveer 1 µg/g zal bedragen

6.4 ZUIVERING VOOR BENZO(A)PYREEN

- damp de dichloormethaanfractie in en zet om naar hexaan
- voer om mogelijke interferenties te elimineren een zuivering uit door adsorptiechromatografie over een gecombineerde kolom met silica en alumina zoals hieronder beschreven

Werkwijze voor zuivering over gecombineerde kolom:

- vul een chromatografische kolom (interne diameter 10 mm) met 1 g alumina, 3 g silica en daarboven ongeveer 1 cm Na₂SO₄
- spoel de kolom met n-hexaan
- breng het ingedampt monsterextract boven op de kolom en elueer met 12 ml n-hexaan, waarmee tegelijkertijd het oorspronkelijk recipiënt wordt nagespoeld; deze prefractie mag verwijderd worden, ze bevat eventueel aanwezige alkanen

- elueer daarna met 20 ml n-hexaan/dichloormethaan (50/50 v/v)
- vang deze fractie op in een glazen recipiënt en damp onder stikstofstroom in tot ongeveer 1 ml

Werkwijze voor finale concentrering en toevoeging van de recoverystandaard:

- breng het ingedampt monsterextract over in een amberkleurig monsterflesje, waarin vooraf 1 ml toluëen als 'keeper' is gebracht; spoel de wanden van de erlenmeyer na met enkele ml dichloormethaan en breng deze over naar het extract; damp het extract uiteindelijk verder in naar een eindvolume van ongeveer 1 ml
- voeg met behulp van injectiespuit een gekende hoeveelheid van de D12-peryleen 'doperings-oplossing recoverystandaard' toe aan het eindextract, zodanig dat de concentratie ongeveer 1 µg/g bedraagt

6.5 GC-MS ANALYSE

6.5.1 METING

De beide staaextracten en het extract van de kalibratiestandaard voor pentachloorfenol worden geanalyseerd met GC-MS. Daarbij wordt 1 µl splitless in de gaschromatograaf geïnjecteerd. Alternatieve injectietechnieken zoals *on-column* of *groot-volume injectie* kunnen toegepast worden, eventueel met aanpassing van de concentraties van kalibratiestandaard, recoverystandaard en interne standaarden. De chromatografische scheiding van de componenten wordt in beide gevallen uitgevoerd op een apolaire capillaire kolom met chemisch gebonden fase.

De detectie van de componenten gebeurt met een lage resolutie massaspectrometer. De massaspectrometer wordt ingesteld naar maximale respons voor de ionen 131, 219, 264 en 414 met behulp van het referentiegas PFTBA (perfluorotributylamine).

De opname van het chromatogram gebeurt in SIM:

- voor de bepaling van benzo(a)pyreen met selectie en registratie van het moleculair ion van het te analyseren benzo(a)pyreen, de deuterium-gemerkte interne standaard en de 'recovery' standaard;
- voor de bepaling van pentachloorfenol met selectie en registratie van 2 3 ionen behorende bij de isotoopcluster van het meest intens fragmention van de acetaat ester van pentachloorfenol enerzijds en van ¹³C-pentachloorfenol anderzijds, en met selectie en registratie van 2 ionen behorende bij de isotoopcluster van het moleculaire ion van ¹³C-1,2,4,5-tetrachloorbenzeen.

Uit het totale geregistreerde signaal worden specifieke ionchromatogrammen van de te analyseren verbindingen geëxtraheerd.

In onderstaande tabel zijn de karakteristieke m/z van de natieve en gemerkte pentachloorfenol en benzo(a)pyreen weergegeven, samen met deze van de gekozen recoverystandaarden.

Voor de typische GC-MS werkvoorwaarden van de beide analyses en voorbeelden van ionenchromatogrammen wordt verwezen naar de procedures CMA/3/B (benzo(a)pyreen) en CMA/3/K (pentachloorfenol).

Opmerking: eventueel worden benzo(a)pyreen en pentachloorfenol samen gemeten. In dat geval kunnen van elk staal de eindextracten van benzo(a)pyreen en pentachloorfenol samengevoegd worden tot 1 meetoplossing. Ook de beide procedureblanco's worden dan samengevoegd.

Component	m/z	Kwantificering ten opzichte van
benzo(a)pyreen	252	D12-benzo(a)pyreen
D12-benzo(a)pyreen	264	D12-peryleen
D12-peryleen	264	- (recoverystandaard)
pentachloorfenol	266, 268, 264	¹³ C-pentachloorfenol
¹³ C-pentachloorfenol	274, 276, 272	¹³ C-1,2,4,5-tetrachloorbenzeen
¹³ C-1,2,4,5-tetrachloorbenzeen	222, 224	- (recoverystandaard)

6.5.2 KALIBRATIE

De kwantitatieve bepaling van pentachloorfenol en benzo(a)pyreen gebeurt volgens de zogenaamde interne standaardmethode. Hierbij worden de componenten gekwantificeerd ten opzichte van hun isotoop-gemerkte analoog.

Minstens in het begin en aan het einde van elke analysereeks, en verder om een welbepaald aantal preparaten (max. 10), wordt een kalibratie-oplossing (4.22 voor BaP; de kalibratieoplossing voor pentachloorfenol wordt bereid zoals aangegeven onder 6.2 en 6.3) geïnjecteerd.

Voor pentachloorfenol wordt van elke verbinding, natief of gemerkt, de piekoppervlakte in het overeenkomstige meest intense ionchromatogram gemeten.

Voor benzo(a)pyreen wordt van elke verbinding, natief of gemerkt, de piekoppervlakte in het chromatogram van het moleculaire ion gemeten.

Relatieve responsfactoren voor elke te bepalen component worden vervolgens bepaald uit de verhouding van de oppervlakten van de natieve componenten en de overeenkomstige interne standaarden (zie 7.1).

6.5.3 IDENTIFICATIE

De aanwezigheid van natieve pentachloorfenol en benzo(a)pyreen in de monsters wordt bevestigd op basis van de ~~onderstaande gegevens en criteria: criteria vermeld in CMA/6/D.~~

- ~~de registratie van een piek bij de karakteristieke m/z, met piekhoogte groter dan 3 keer de ruishoogte ('peak-to-peak' ruis);~~
- ~~de retentietijd in monster (RT') ten opzichte van kalibratie-oplossing (RT), waarbij een maximale afwijking van 5 sec, vermeerderd met de waargenomen verschuiving voor de overeenkomstige interne standaard, wordt gehanteerd [RT + ΔRT(IS) - 5 sec ≤ RT' ≤ RT + ΔRT(IS) + 5 sec].~~

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

6.5.4 KWANTIFICERING

Voor de monsterextracten worden de ionchromatogrammen geregistreerd op identieke wijze als hierboven beschreven voor de standaardoplossingen.

Van de geïdentificeerde pentachloorfenol wordt de piekoppervlakte behorende bij het meest intense ion berekend.

Van de geïdentificeerde benzo(a)pyreen wordt de piekoppervlakte behorende bij het karakteristieke ion berekend.

Uitgaande van de integratiewaarden voor het monster en de relatieve responsfactoren bepaald voor de kalibratiestandaard worden de gehalten van de verschillende verbindingen in het monster berekend (zie 7.2).

De terugvindingen van de inwendige standaarden worden berekend aan de hand van hun relatieve responsfactor ten opzichte van de recoverystandaard (zie 7.3).

7 BEREKENINGEN

7.1 RELATIEVE RESPONSFACTOREN

Op basis van de geïntegreerde piekoppervlakken van pentachloorfenol, benzo(a)pyreen en de inwendige standaarden in de respectievelijke ionchromatogrammen van de kalibratiestandaard wordt voor elke natieve component de relatieve responsfactor (RRF) ten opzichte van de interne standaard met behulp van onderstaande formule berekend.

$$RRF_x = \frac{A_x}{C_x} \cdot \frac{C_{IS}}{A_{IS}}$$

met

- A_x = piekoppervlakte van de component x in de kalibratiestandaard
- C_x = hoeveelheid van de component x gedopeerd in de kalibratiestandaard (μg)
- C_{IS} = hoeveelheid van de inwendige standaard gedopeerd in de kalibratiestandaard (μg)
- A_{IS} = piekoppervlakte van de inwendige standaard in de kalibratiestandaard

7.2 GEHALTE VAN DE NATIEVE COMPONENTEN IN HET MONSTER

Gebruik makend van de geïntegreerde piekoppervlakken van de component en de inwendige standaard in de respectievelijke ionchromatogrammen van het monster en rekening houdend met de relatieve responsfactor van de beschouwde component, kan de concentratie van de component in het houtstaal, uitgedrukt in mg/kg ds, als volgt berekend worden :

$$C_x = \frac{1}{RRF_x} \cdot \frac{A_x}{A_{IS}} \cdot \frac{g_{IS}}{G} \cdot \frac{1}{1000}$$

met

- RRF_x = relatieve responsfactor van component x
- A_x = piekoppervlakte van de component in het monster
- A_{IS} = piekoppervlakte van de inwendige standaard in het monster
- g_{IS} = toegevoegde hoeveelheid inwendige standaard aan het staal (ng)
- G = afgewogen hoeveelheid monster (in g droge stof), waaraan de inwendige standaard toegevoegd werd

7.3 RECUPERATIERENDEMENT VAN DE INTERNE STANDAARDEN

De terugvinding van een interne standaard in een staaextract wordt berekend uit de geïntegreerde piekoppervlakken van de interne standaard en 'recovery' standaard in de respectievelijke ionchromatogrammen, aan de hand van de relatieve responsfactor van de beschouwde interne standaard :

$$R_{IS} = \frac{I}{RRF_{IS}} \cdot \frac{A_{IS}}{A_{RS}} \cdot \frac{g_{RS}}{g_{IS}} \cdot 100$$

met

- R_{IS} = terugvinding van interne standaard x in het extract (%)
- RRF_{IS} = relatieve responsfactor van interne standaard ten opzichte van de recoverystandaard
- A_{IS} = piekoppervlakte van interne standaard x in het extract
- A_{RS} = piekoppervlakte van de recoverystandaard in het extract
- g_{RS} = toegevoegde hoeveelheid recoverystandaard aan het extract (ng)
- g_{IS} = toegevoegde hoeveelheid interne standaard aan het extract (ng)

7.4 AANTOONBAARHEIDSGRENZEN VOOR DE NIET-GEDETECTEERDE 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, enzovoort. Voor de niet-gedetectedeerde verbindingen worden '<-waarden gerapporteerd overeenkomend met of groter dan de aantoonbaarheidsgrenzen. De aantoonbaarheidsgrenzen dienen kleiner te zijn dan de gevraagde rapporteergrenzen.

Een inschatting van de laagst detecteerbare concentratie voor de fenolen in het monster kan gebeuren aan de hand van de ruisgrootte en de piekhoogte van de inwendige standaard.

$$AG_x = 3 \cdot \frac{1}{RRF_x} \cdot \frac{RG_x}{PH_{IS}} \cdot \frac{g_{IS}}{G} \cdot \frac{1}{1000}$$

Hierbij zijn, naast de hierboven reeds gespecificeerde parameters :

- RG_x = de 'peak-to-peak' ruisgrootte in het retentietijdsgebied van de component x
- PH_{IS} = de hoogte van de piek van de overeenkomstige inwendige standaard

Bij de berekening van de aantoonbaarheidsgrenzen wordt gebruik gemaakt van piekhoogten in plaats van piekoppervlakten, ook al zijn de RRF_x gedefinieerd op basis van piekoppervlakten. Aangezien aantoonbaarheidsgrenzen in wezen altijd maar schattingen zijn, wordt deze benadering aanvaardbaar geacht.

8 KWALITEITSPARAMETERS

8.1 RESPONSLINEARITEIT

Pentachloorfenol

Het lineaire bereik van de detectorrespons wordt geverifieerd door derivatisering van verschillende standaarden met wisselende hoeveelheden natieve pentachloorfenol en een constante hoeveelheid inwendige standaard. De standaardreeks wordt aangemaakt door verschillende hoeveelheden van de 'doperingsoplossing kalibratiestandaard' toe te voegen aan een mengsel van 10 ml methanol en 10 ml dichloormethaan. De oplossingen worden na extractie met 0,2 N K₂CO₃-buffer gederiviseerd zoals beschreven in 6.2.

Benzo(a)pyreen

Uitgaande van tenminste 5 standaard-werkoplossingen met een vaste concentratie aan interne standaard en elk een verschillende concentratie aan benzo(a)pyreen, startend van ongeveer tienmaal de minimum detecteerbare hoeveelheid en reikend over minimaal 2 decades, wordt periodiek de lineariteit van de MS detectorrespons gecontroleerd.

Bij uitzetten van de verhouding $(A_x \cdot C_{IS}) / (A_{IS} \cdot C_x)$, met A_x de piekoppervlakte behorende bij de concentratie C_x van de natieve component en A_{IS} de piekoppervlakte behorende bij de concentratie C_{IS} van de inwendige standaard, in functie van C_x dient een rechte bekomen te worden, waarbij aan de lineariteit wordt voldaan indien de afwijking ten opzichte van de gemiddelde waarde maximaal 15 % bedraagt.

Indien men bij de monsteranalyse een overschrijding van de bovenste lineaire grens vaststelt, dit is de hoogste geregistreerde oppervlakte in het lineaire gebied, dan moet de analyse hernomen worden startend van een met hexaan respectievelijk toluen verdunde hoeveelheid monsterextract, voor zover het signaal van de inwendige standaarden nog voldoende intens is, of startend van een geringere hoeveelheid monster.

8.2 RELATIEVE RESPONSFACTOREN

Binnen eenzelfde analysereeks mogen de relatieve responsfactoren bekomen voor twee opeenvolgende injecties van de kalibratiestandaard (met tussentijdse analyse van monsterpreparaten) voor pentachloorfenol en benzo(a)pyreen niet meer dan 15 % van mekaar afwijken.

8.3 BLANCO

Bij elke analysereeks wordt tenminste één procedureblanco bepaald. Hierbij wordt de volledige analyseprocedure gevolgd zonder intake van monster. Het geregistreerde chromatogram dient vrij te zijn van interfererende pieken die groter zijn dan 10 % van de pieken geregistreerd voor de monsters in de analysereeks. Voor meetwaarden die kleiner zijn dan 5 maal de gevraagde rapporteergrens mogen de interfererende pieken niet groter zijn dan de helft van de gevraagde rapporteergrens.

8.4 MINIMUM DETECTEERBARE HOEVEELHEDEN (MDH)

Aan de hand van het chromatogram van de kalibratiestandaard kan voor elke verbinding de minimum detecteerbare hoeveelheid, in pg, berekend worden:

$$MDH_x = 3 \cdot \frac{RG_x}{PH_x} \cdot g_x$$

met

RG_x = de *peak-to-peak* ruisgrootte aan de voet van de chromatogrampiek van component x

PH_x = de hoogte van de piek van component x

g_x = de hoeveelheid geïnjecteerde component x in pg

De minimum detecteerbare hoeveelheid moet van die aard zijn dat zonder problemen de gevraagde rapporteergrens kan gehaald worden.

8.5 RECUPERATIERENDEMENT

Verantwoorde kwantificering is slechts dan toegelaten indien het recuperatierendement van de inwendige standaard minstens 50 % bedraagt.

8.6 CONTROLESTAAL

Bij elke meetreeks wordt een controlestaal geanalyseerd. Dit kan een gedopeerd monster zijn of een aangekocht referentiemateriaal. De terugvindingen van pentachloorfenol en benzo(a)pyreen in het controlestaal dienen gelegen te zijn tussen 70% en 130%.

9 RAPPORTAGE

Vermeld in het analyseverslag het gehalte van de gedetecteerde verbindingen in mg/kg ds. Geef voor de niet gedetecteerde verbindingen de waargenomen aantoonbaarheidsgrenzen op ofwel monstertype afhankelijke rapportagegrenzen. Indien door matrixeffecten de terugvinding van de interne standaarden niet voldoet aan de gestelde eis dan moet dit in het verslag vermeld worden.

10 REFERENTIES

- EN 12673 Water Quality - Gas chromatographic determination of some selected chlorophenols in water
- ISO 8165 Water Quality - Determination of selected monovalent phenols