

Bepaling van octylfenol, nonylfenol en bisfenol A in afvalwater m.b.v. LC-MS/MS

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	MONSTERCONSERVERING	3
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	3
5	REAGENTIA	4
6	MONSTERVOORBEHANDELING	4
7	LC-MS/MS BEPALING	5
7.1	<i>LC-condities</i>	5
7.2	<i>MS-condities</i>	5
7.3	<i>Identificatie</i>	6
7.4	<i>Kalibratie</i>	6
7.5	<i>Gehalten van de fenolen in het monster</i>	8
8	KWALITEITSCONTROLES	9
8.1	<i>Lineariteit</i>	9
8.2	<i>Chromatografische scheiding</i>	9
8.3	<i>Instrumentele detectielimieten</i>	9
8.4	<i>Procedureblanco</i>	10
8.5	<i>Controlestandaard</i>	10
8.6	<i>Terugvinding van de interne standaarden</i>	10
8.7	<i>Controlemonster</i>	10
8.8	<i>Duplobepaling</i>	11
8.9	<i>Matrixadditie</i>	11
9	REFERENTIES	11
BIJLAGE 1	UPLC-MS/MS chromatogrammen voor OP, NP, DP en BPA	12

1 TOEPASSINGSGBIED

Deze procedure beschrijft een methode voor de kwantitatieve bepaling van 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenol (t-octylfenol, OP), 4-nonylfenol isomerenmengsel (NP) en bisfenol A (BPA) in afvalwater met behulp van vloeistofchromatografie-tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS). De bepalingsgrenzen van de methode bedragen, afhankelijk van toestelgevoeligheid en de verontreinigingsgraad van het afvalwater, ongeveer 100 ng/L voor OP en BPA en 1 µg/L voor NP.

Opmerkingen:

- De methode kan ook gebruikt worden voor de bepaling van dodecylfenol (DP). Deze bepaling is evenwel semikwantitatief.
- Andere bepalingmethoden zoals GC-MS analyse na vloeistof-vloeistofextractie en derivatisatie met azijnzuuranhydride (zie WAC/IV/A/001) of pentafluorobenzoylchloride kunnen ook toegepast worden, mits optimalisatie van de extractie- en derivatiseringscondities.

2 PRINCIPE

De methode is gebaseerd op een directe injectie van het afvalwater in een vloeistofchromatograaf, na verdunning met een gelijke hoeveelheid methanol. De geëluëerde verbindingen worden vervolgens gedetecteerd met een gevoelige massaspectrometer aan de hand van karakteristieke ionen, bekomen na fragmentatie van geselecteerde precursorionen. De verbindingen worden gekwantificeerd met de interne standaardmethode, waardoor gecorrigeerd kan worden voor mogelijke matrixeffecten.

Opmerking:

Bij onvoldoende toestelgevoeligheid of in geval van zwaar verontreinigde afvalwaters is preconcentrerend resp. opzuivering aan de hand van vaste fase extractie (SPE) noodzakelijk. Voor de uitvoering van de SPE stap wordt verwezen naar ISO 24293:2009. ISO 242093 beschrijft een extractie met styreen-divinylbenzeen gevolgd door wassing met aangezuurd water en elutie met aceton

3 MONSTERCONSERVERING

Voor bewaringscondities en –termijnen wordt verwezen naar de algemene procedure voor watermonsters (WAC/I/A/010).

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Gebruikelijk laboratoriumglaswerk
- Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0.1 mg
- Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0.01 g
- Ultracentrifuge
- LC-MS bestaande uit:
 - o een LC-systeem (hoge druk of ultra hoge druk) met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid

- een tandem quadrupool of quadrupool ion trap massaspectrometer met electrospray interface
Opm.: alternatief kan gebruik gemaakt worden van een accurate massa time-of-flight (TOF) of Orbitrap Fourier Transform massaspectrometer
- een datastation voor de instelling van de instrumentele settings, de data-acquisitie en de data-analyse
- LC-kolom: een reversed phase kolom, bv. Acquity UPLC BEH C18, 100*2.1mm ID, 1.7µm, of gelijkwaardig.

5 REAGENTIA

- Methanol: bv. Thermo-Fisher UPLC-grade
- Acetonitrile: bv. ThermoFisher UPLC-grade
- Water: ultrapuur
- Ammoniumacetaat: bv. Aldrich 99,999 %
- Stockstandaarden: de verbindingen kunnen als zuivere stof of in een oplossing aangekocht worden
 - 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenol: pro analyse (CAS nr 140-66-9)
 - 4-nonylfenol (isomerenmengsel): technisch mengsel (CAS nr 84852-15-3)
 - bisfenol A: pro analyse (CAS nr 80-05-7)
 - dodecylfenol: technisch mengsel (CAS nr 27193-86-8)
 - ¹³C₆-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenol: een oplossing van 10 µg/ml in aceton is in de handel verkrijgbaar (CAS nr 1173020-24-0)
 - ¹³C₆-4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)fenol: een oplossing van 10 µg/ml in aceton is in de handel verkrijgbaar (CAS nr 1173020-38-6)
Opm.: aangezien de retentietijd van n-nonylfenol afwijkt van deze van de vertakte nonylfenolen is ¹³C₆-n-nonylfenol geen geschikte interne standaard voor technisch nonylfenol
 - D₁₆-bisfenol A: bv. Aldrich 98% (CAS nr 96210-87-6)
- Stockstandaardoplossingen: maak uitgaande van de bovenstaande zuivere stockstandaarden een verdunning van bv. 300 mg/l in methanol
- Doperingsoplossing interne standaard: met de bovenstaande stockstandaardoplossingen van de interne staarden wordt een mengoplossing gemaakt in methanol. die bv. 1 mg/l ¹³C₆-OP, 1 mg/l ¹³C₆-NP en 1 mg/l D₁₂-BPA bevat
- Kalibratiewerkstandaarden: maak uitgaande van de stockstandaardoplossingen van de natieve fenolen een reeks verdunningen in 50/50 methanol/water in concentraties lopende van bv. 0.1 tot 25 µg/l; aan de werkstandaarden worden de interne standaarden geadderd in een vaste concentratie van bv. 10 µg/l
Opm.: De kalibratiewerkstandaarden zijn maximaal 1 maand houdbaar.

6 MONSTERVERORBEHANDELING

- Homogeniseer het monster door opschudden en breng 2.5 ml over in een centrifugeerbuisje.
- Voeg 2.5 ml methanol toe

- Addeer een geschikte hoeveelheid inwendige standaardoplossing tot een eindconcentratie overeenkomstig met deze van de kalibratiewerkstandaarden (bv. 10 µg/l)
- Centrifugeer en breng een deel (bv. 0.5ml) van de bovenstaande vloeistof over naar een injectievial.

7 LC-MS/MS BEPALING

7.1 LC-CONDITIES

Een voorbeeld van LC-condities zijn hieronder gegeven.

Van de monsterextracten wordt typisch 50 µl in de LC-MS geïnjecteerd. Er wordt geen splitter gebruikt; het volledige injectievolume gaat rechtstreeks naar de massaspectrometer.

De LC-analyse gebeurt op een C18 reversed phase kolom met gradiëntelutie.

Een voorbeeld van een geschikte kolom is Acquity UPLC BEH C18, 100*2,1 mm, 1.7 µm

De kolomtemperatuur bedraagt 40°C.

De samenstelling van de gradiënt is:

A = water + 2 mM NH₄Ac

B = ACN

De gradiënt is als volgt geprogrammeerd:

Tijd (min)	A %	B %	Debiet (ml/min)
0,00	80	20	0,40
8,00	5	95	0,40
10,10	80	95	0,40
12,00	80	20	0,40

Typische retentietijden voor de verschillende fenolen bekomen op een Acquity UPLC BEH C18 kolom zijn weergegeven in bijlage 1.

7.2 MS-CONDITIES

De MS opnamen gebeuren met electrospray ionisatie in negatieve modus. De detectie van de ionen gebeurt in MRM (Multiple Reaction Monitoring) modus.

Voor elke te bepalen verbinding worden 2 ionentransities geregistreerd, één transitie voor de kwantificatie (Q) en één bijkomende transitie voor identificatie (q).

Component	Precursor ion	Product ion	Cone voltage	Collision energy
4-t-octylfenol	205,2	133,3 (Q) 117,1 (q)	46	22 48
4-nonylfenol	219,2	133,0 (Q) 147,2 (q)	40	32 24
bisfenol A	227,1	212,0 (Q) 133,1 (q)	50	18 24
4-dodecylfenol	261,3	133,1 (Q)	58	30

		147,1 (q)		28
¹³ C ₆ -4-t-octylfenol	211,2	139,2	46	22
¹³ C ₆ -4-nonylfenol	225,3	139,3	50	22
D ₁₂ -bisfenol A	241,3	142,1	50	28

De MS opname gebeurt met volgende typische instellingen:

Dwell time: 0.2 sec
 Extractor: 3 V
 Capillary: 3 kV
 Source block temp.: 120°C
 Desolvation temp.: 350°C
 Ion energy: 1.3 V
 Drying gas: N₂, 350 l/h
 Nebulising gas: N₂, 25 l/h

De dataverwerking gebeurt met de software van het apparaat.

7.3 IDENTIFICATIE

De identificatiecriteria zijn:

- het voorkomen van een piek met een signaal-ruisverhouding groter dan drie in het specifieke ionchromatogram behorende bij de verbinding;
- de overeenkomst van de retentietijd met deze van de kalibratiestandaard (+/- 0.1 min)

7.4 KALIBRATIE

~~De kwantificatie gebeurt met de interne standaardmethode, waarbij de gehalten van de gedetecteerde fenolische verbindingen berekend worden aan de hand van de coëfficiënten van de kalibratiecurve voor de respectievelijke verbinding.~~

~~De kalibratie omvat de injectie van minstens 5 standaardoplossingen die de te bepalen fenolen bevatten in oplopende concentraties en de interne standaarden in een constante concentratie (zie voorbeeld in bijlage). De kalibratievergelijking heeft gewoonlijk een lineair verloop. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van te bepalen verbinding en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt d.m.v. lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend (bepaling van de coëfficiënten a en b).~~

$$\frac{A_i}{A_{IS}} = a \frac{C_i}{C_{IS}} + b$$

met

- ~~A_i~~ de piekoppervlakte van de fenolverbinding bij injectie van de kalibratie-oplossing
- ~~C_i~~ de concentratie (in µg/L) van de fenolverbinding in de kalibratie-oplossing
- ~~C_{IS}~~ de concentratie (in µg/L) van de overeenkomstige interne standaard in de kalibratie-oplossing
- ~~A_{IS}~~ de piekoppervlakte van de overeenkomstige interne standaard in de kalibratie-oplossing

De correlatiecoëfficiënt dient groter te zijn dan 0.995 en de afwijking van elk punt tot de rechte mag niet meer dan 15% bedragen, behalve voor de laagste concentratie (25%).

Opmerking:

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. De correlatiecoëfficiënt dient dan groter te zijn dan 0.995 en de afwijking van elk punt tot de curve mag niet meer dan 10% bedragen, behalve voor de laagste concentratie (20%).

De kalibratie kan op 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 één kalibratie-oplossing. Deze werkwijze kan gevolgd worden indien de RRFen binnen bepaalde grenzen constant zijn over het meetgebied. De RRFen voor elke te bepalen component worden 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 natieve component i
A _i	=	piekoppervlakte van natieve component i bij injectie van de kalibratieoplossing
C _i	=	concentratie (in ng/μl) van de natieve component i in de kalibratie oplossing
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'. Daarbij wordt de kalibratiereeks 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. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de

piekoppervlakten van de native component en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend.

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:

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

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 recoverystandaard in de kalibratieoplossing
A_{RS}	=	piekoppervlakte van de recoverystandaard bij injectie van de kalibratieoplossing

7.5 GEHALTEN VAN DE FENOLEN IN HET MONSTER

~~Gebruik makend van de geïntegreerde piekoppervlakte van de fenolverbinding en de overeenkomstige interne standaard in de resp. ionchromatogrammen van het monsterpreparaat kan de concentratie van de verbinding in het monster berekend worden.~~

~~$$C_i = \left(\frac{A_i - b}{a} \right) * \frac{g_{IS}}{V}$$~~

met:

C_i	het gehalte van de fenolverbinding in het monster, in μ g/l
A_i	de piekoppervlakte van de fenolverbinding in het monsterpreparaat
A_{is}	de piekoppervlakte van de interne standaard in het monsterpreparaat
g_{is}	de hoeveelheid van de overeenkomstige interne standaard toegevoegd aan het monster, in μ g
V	het volume monster in liter, waaraan de interne standaard toegevoegd werd
a, b	coëfficiënten van de kalibratierechte

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

Van de berekende gehalten wordt de waarde bekomen voor de procedureblanco afgetrokken. ~~De gehalten worden afgerond tot op twee beduidende cijfers.~~

8 KWALITEITSCONTROLES

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

8.1 LINEARITEIT

~~Voor de werkwijze voor de bepaling van de lineariteit wordt verwezen naar de validatieprocedure van het CMA. 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.~~

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.

8.2 CHROMATOGRAFISCHE SCHEIDING

De kolomkwaliteit kan 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 :

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

Hierbij is t_{Ri} 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.

8.3 ~~INSTRUMENTELE DETECTIELIMIETEN~~

De instrumentele detectielimiet is een maat voor de gevoeligheid van het apparaat. Aan de hand van het chromatogram van de kalibratie-oplossing wordt voor elke verbinding de kleinste meetbare concentratie bepaald, gedefinieerd als:

$$DL(\text{instr}) = 3 \cdot RG \cdot \text{conc} / PH$$

met

DL(instr) = de instrumentele detectielimiet ($\mu\text{g/L}$)

RG = de "peak-to-peak" ruishoogte aan de voet van de chromatogrampiek van de verbinding

PH = de piekhoogte van de verbinding

conc = concentratie van de verbinding in de kalibratieoplossing ($\mu\text{g/L}$)

De instrumentele detectielimieten moeten van die aard zijn dat zonder problemen de gevraagde rapporteergrenzen kunnen gehaald worden.

8.4 PROCEDUREBLANCO

Bij elke analysereeks wordt tenminste één procedureblanco geanalyseerd. Hierbij wordt de volledige analyseprocedure gevolgd, met inname van blanco water als monster.

M.b.t. de blanco bijdrage worden volgende regels gehanteerd:

- voor monsterwaarden groter dan 5 maal de rapporteergrens: de chromatogrammen dienen vrij te zijn van pieken in een concentratie groter dan 10%
- voor monsterwaarden kleiner dan 5 maal de rapporteergrens: de chromatogrammen dienen vrij te zijn van pieken in een concentratie groter dan de helft van de rapporteergrens.

8.5 CONTROLESTANDAARD

Om een welbepaald aantal preparaten (max. 7) wordt een kalibratie-oplossing geïnjecteerd om de geldigheid van de kalibratierechte te controleren. De berekende waarden voor deze standaard mogen maximaal 15% afwijken van de werkelijke waarden.

8.6 TERUGVINDING VAN DE INTERNE STANDAARDEN

Voor elk monster worden de oppervlakten bekomen voor de gemerkte fenolen vergeleken met de gemiddelde waarden bekomen voor de kalibratiestandaarden. Verantwoorde kwantificering is toegestaan vanaf een terugvinding van 30%.

Opmerking:

verminderde terugvinding is het gevolg van ionisatiesuppressie door coëlutie met matrix componenten. De storende invloed van de matrix kan gereduceerd worden door het toepassen van een monsterzuivering a.h.v. vaste fase extractie (zie bv. ISO 24293:2009). Alternatief kan het extract verdund worden.

8.7 CONTROLEMONSTER

Om de terugvinding en de reproduceerbaarheid te controleren wordt op regelmatige basis een controlemonster geanalyseerd. Dit is bij voorkeur een gecertificeerd materiaal (indien beschikbaar), maar er mag ook gebruik gemaakt worden van een geaddeerd monster. De gehalten kunnen opgetekend worden in controlekaarten. De opgetekende waarden moeten voldoen aan de voor controlekaarten geldende criteria.

8.8 **DUPLOBEPALING**

~~Om de herhaalbaarheid te controleren wordt op regelmatige basis een monster opnieuw geanalyseerd. Het verschil tussen de bekomen gehalten mag maximaal 20% bedragen.~~

8.9 **MATRIXADDITIE**

~~Om de terugvinding te controleren wordt op regelmatige basis een monster opnieuw geanalyseerd, na additie van een gekende hoeveelheid fenolen. De terugvindingen moeten gelegen zijn tussen 70% en 130%.~~

9 **REFERENTIES**

ISO 24293:2009 Water quality – Determination of individual isomers of nonylphenol – Method using solid phase extraction (SPE) and gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS)

BIJLAGE 1

UPLC-MS/MS CHROMATOGRAMMEN VOOR OP, NP, DP EN BPA

