

Polycyclische aromatische koolwaterstoffen

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	4
2	Principe	5
2.1	Extractie	5
2.2	Zuivering	5
2.3	Identificatie en kwantificering van de PAK's	5
2.3.1	GC-MS	5
2.3.2	HPLC	6
3	Apparatuur en materiaal	6
4	Reagentia en oplossingen	7
5	Monsterbewaring en -voorbehandeling	9
6	Analyseprocedure	10
6.1	Extractie	10
6.1.1	Bodem, slib en vast afval	10
6.1.2	Waterstalen	13
6.1.3	Oliestalen	15
6.2	Zuivering	15
6.3	GC-MS analyse	17
6.3.1	Werkwijze voor finale concentrering en toevoeging van de 'recovery'-standaard	17
6.3.2	Meting	17
6.3.3	Kalibratie	18
6.3.4	Identificatie	19
6.3.5	Kwantificering	19
6.4	HPLC-analyse	19
6.4.1	Werkwijze voor finale concentrering (niet van toepassing in geval van on-line SPE):	19
6.4.2	Meting	20
6.4.3	Kalibratie	20
6.4.4	Identificatie	21
6.4.5	Kwantificering	21
7	Kwaliteitscontrole	21
7.1	Responslineariteit	21
7.2	Chromatografische scheiding	22
7.3	Recuperatierendement van de interne standaarden	22
8	Prestatiekenmerken	22
9	Rapportering	22
10	Referenties	23

BIJLAGE A	24
BIJLAGE B	25
BIJLAGE C	26

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure vervangt de procedure CMA/3/B van september 2019.

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 met gaschromatografie (GC) of met vloeistofchromatografie :

- 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, zuiveringsslib. 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 Na_2SO_4 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 extractierendementen wordt uitgevoerd door voorafgaandelijke additie van deuterium gemerkte PAK's in geval van GC-MS detectie of van een surrogaatverbinding in geval van HPLC detectie.

Opmerking:

voor bodemstalen is ook extractie dmv microgolven toegestaan mits een verklaring van gelijkwaardigheid door OVAM.

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.

Verduunningen 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. Ook LC/MS en GC-MS/MS kunnen toegepast worden. In geval van afvalstoffenanalyse wordt het gebruik van GC-MS of GC-MS/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 doeringsstandaarden, in "full scan" modus gewerkt worden uitgaande van geëxtraheerde ionchromatogrammen. De meting mag ook met GC-MS/MS uitgevoerd worden (SRM).

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 ofwel uitgerust met een MS detector, ofwel met een combinatie van fluorescentie detector (FD) en een UV of een diode array detector (DAD).

De identificatie van een te bepalen polyaromaat steunt op de vergelijking van zijn retentietijd in het staal en in de kalibratieoplossing.

In geval van gecombineerde fluorescentie/UV-detectie kan de kwantificering zowel volgens de interne of de externe standaard methode gebeuren.

- Interne standaard : aan het staal wordt vóór de extractie minstens één geschikte interne standaard toegevoegd, bv. 6-methylchryseen. De correctie voor terugvinding gebeurt aan de hand van deze interne standaard. Aan alle stalen wordt ook minstens één surrogaatverbinding toegevoegd;
- Externe standaard : in dit geval wordt gecorrigeerd voor terugvinding aan de hand van factoren die bepaald werden bij de validatie. Aan de stalen wordt minstens één surrogaatverbinding toegevoegd. Alternatief kan 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-, en injectiestap. Controle van het goede verloop van de analyse gebeurt aan de hand van de terugvinding van een surrogaatverbinding.
- In geval van online-SPE kan i.p.v. de additie van een surrogaatverbinding gekozen worden om in elke meetreeks aan minstens 1 staal een matrixadditie van de 16 PAK uit te voeren.

In geval van MS-detectie verloopt de kwantificering volgens de interne standaard methode (zie 2.3.1).

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, extractiehulzen, elektrische verwarmingsmantel met temperatuursregeling
- 3.6 in geval van vloeistof-vloeistofextractie: scheidrecther (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. Indien deze componenten op de gebruikte kolom niet gescheiden kunnen worden, moeten ze berekend 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. Alternatief kan een MS-detector gebruikt worden.
- 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, cyclohexaan 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 koperpoeder (grof)
- 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 (Polyoxyethylene(23)lauryl ether), bv. 30% oplossing
- 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:

- 4.16 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
- 4.17 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.
- 4.18 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:

- 4.19 interne standaard-werkoplossing (IS doeringsstandaard):

- 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
- 4.20 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:

- 4.21 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.
- 4.22 surrogaatoplossing:
van een 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:

- 4.23 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 blankowaterstalen 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

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

Voor de monstervoorbehandeling wordt verwezen naar CMA/5/B.

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!

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 een watergehalte van meer dan 30% (bv. waterbodem na decantatie, zuiveringsslib enz.) is enkelvoudige 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. In geval van baggerspecie en waterbodem kan het monster ingedikt worden door te drogen aan de lucht bij 40°C alvorens de PLE-extractie uit te voeren. Voor bodemstalen met een watergehalte van minder dan 40% kan ook een dubbele PLE-extractie uitgevoerd worden. 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 te drogen aan de lucht bij 40°C. Alternatief wordt een meervoudige soxhletextractie uitgevoerd.

Voor waterbodem, en bagger- en ruimingsspecie is het eveneens toegestaan om de stalen in te dikken of te drogen door middel van vriesdrogen. 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.

Opmerking:

voor bodemstalen is ook extractie dmv microgolven toegestaan mits een verklaring van gelijkwaardigheid door OVAM.

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 (ipv hexaan mag ook petroleumether, isohexaan, cyclohexaan of een ander alkaan gebruikt worden)

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

- damp het extract (ca. 20-40 ml) in tot 2 à 3 ml; in geval van LV-GC wordt het extract niet ingedampt en wordt de aceton uit het extract weggewassen met water.

Werkwijze voor dubbele 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 droogmiddel (diatomeeënaarde of natriumsulfaat) 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 (indien nodig wordt het monster verdeeld over 2 cellen); 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 een eerste extractie uit met aceton, met onderstaande typische PLE instellingen (ipv hexaan mag ook petroleumether, isohexaan, cyclohexaan of een ander alkaan gebruikt worden)

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

- voer een tweede extractie uit met aceton/hexaan, met onderstaande typische PLE instellingen;

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

- Voeg beide extracten samen en homogeniseer
- Was de aceton uit het extract weg met water
- Droog het extract met natriumsulfaat en damp in tot 2-3ml (niet in geval van LV-GC)

Werkwijze voor soxhletextractie:

- spoel vóór extractie van een monster de soxhletopstelling (inclusief de te gebruiken extractiehuls en glaswolprop) door refluxen met aceton/hexaan (50/50) 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 een gekende hoeveelheid aceton gedurende ca. 3 uur;
- voeg n-hexaan toe aan de rondbodemkolf (evenveel als er aceton toegevoegd werd)
- 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; in geval van LV-GC wordt het extract niet ingedampt en wordt de aceton uit het extract weggewassen met water.

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 (niet in geval van LV-GC)
- indien nodig zuiver het extract op (zie 6.2).

Opmerkingen

- indien op het niet ingedampte 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

Hieronder zijn de volgende extractiemethoden beschreven:

- vloeistof-vloeistof (met hexaan of een ander alkaan of dichloormethaan)
- off-line vaste fase extractie met C18
- on-line vaste fase extractie met C18

Voor de bovenstaande extractiemethoden werden kwantitatieve en herhaalbare terugvindingen aangetoond.

Opmerking:

Deelmonstername (waarbij slechts een deel van de flesinhoud gebruikt wordt) is toegestaan, zowel bij vloeistof/vloeistof-extractie als bij vaste-fase extractie, op voorwaarde dat aan het waterstaal een niet-schuimend detergent (bv. 0.05% Brij35) of een watermengbaar solvent (methanol >5% of isopropanol >15%) als additief toegevoegd wordt om de componenten van de glaswand en van de eventueel aanwezige gesuspendeerde deeltjes te verwijderen. Indien Brij35 gebruikt wordt, wordt aanbevolen om een 'backflush' injectie toe te passen bij de GC-meting, om vervuiling van de chromatografische kolom te voorkomen. Belangrijk bij deelstaalname is dat de toegepaste werkwijze vooraf gevalideerd wordt; de terugvinding van de componenten kan immers beïnvloed worden door o.a. de contacttijd tussen staal en additief, het volume ingenomen staal, het aantal extracties, etc. Bij de SPE-extractie dient in het bijzonder het doorbraakvolume gecontroleerd te worden, aangezien dit varieert in functie van het gekozen additief en het type, merk en hoeveelheid adsorbens.

Werkwijze voor vloeistof/vloeistof extractie:

- weeg de monsterfles tot op 0.1 g nauwkeurig;
- breng de volledige inhoud van de monsterfles over in een geschikte scheitrechter; in geval van decantatie (cfr supra) wordt maximum de helft van de bovenstaande fase overgebracht in de scheitrechter.
- in geval van analyse met interne standaard : 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 scheitrechter; spoel het penicillineflesje enkele malen na met DCM of hexaan (of een ander alkaan) 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, zodanig dat de concentratie van de surrogaat in het eindextract ca. 25 ng/ml zal bedragen;
- spoel de monsterfles na met extractiemiddel (dichloormethaan, petroleumether, hexaan, iso-hexaan, cyclohexaan of een ander alkaan) en breng de spoelvloeistof over naar de scheitrechter; de hoeveelheid extractiesolvent dient minstens 1/20 van de staalhoeveelheid te bedragen

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 minstens nog 1 keer;
- damp de verzamelde extracten in onder een stikstofstroom tot een eindvolume van ca 2-3 ml (niet in geval van LV-GC);
- Indien geen opzuivering toegepast wordt dan wordt het extract verder behandeld volgens 6.3 (voor GC/MS) of 6.4 (voor HPLC);
- voor sterk verontreinigde extracten kan een zuivering over silica, alumina of een combinatie van silica en alumina uitgevoerd worden. Het extract wordt dan verder behandeld volgens 6.2. Extracten die specifiek met zwavel verontreinigd zijn kunnen zonodig verder gezuiverd worden

door behandeling met koper of tetrabutylammoniumwaterstofsulfiet (TBA reagens). 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 analyse met interne standaard : 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 acetoplossing 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;
- 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):

- 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. In geval van de interne standaard methode wordt een hoeveelheid van de interne standaardoplossing toegevoegd;
- 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 of HPLC meting.

Opmerking:

In geval van deelmonsternamen kunnen de hieronder beschreven zuiveringen uitgevoerd worden met kleinere hoeveelheden reagentia.

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 olieverdunningen 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 olieverdunning (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/aceton 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 elutievolumes 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):

- activeer het koperpoeder: breng een hoeveelheid koperpoeder in een glazen recipiënt, voeg 1N HNO_3 toe tot het poeder onder staat en laat enkele minuten inwerken. Spoel het poeder

overvloedig met water en vervolgens met aceton, laat drogen aan de lucht. Geactiveerd koperpoeder kan 2 maanden bewaard worden onder een apolair solvent.

- voeg aan het tot 5-10 ml ingedampt extract geleidelijk koperpoeder 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-gemerke 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. Alternatief wordt een automatische tuning uitgevoerd (afhankelijk van de gebruikte software).

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.

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 (voor de kwaliteitseisen waaraan de kalibratie moet voldoen wordt verwezen naar CMA/6/D) :

- aan de hand van de relatieve responsfactor (RRF), bepaald met minstens 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 minstens één kalibratie-oplossing 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 overeenkomstige interne standaarden :

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

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.

- 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 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. 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.
- 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. 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.

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:

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

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/μl) van de interne standaard in de kalibratie-oplossing
C_{RS}	=	concentratie (in ng/μl) 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 criteria voor retentietijd zoals vermeld in CMA/6/D. Aangezien er voor de PAK slechts 1 ion gemeten kan worden, is er geen criterium voor de ionenratio's.

De identificatie van interne standaarden is eveneens gebaseerd op de karakteristieke m/z en 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.

6.3.5 KWANTIFICERING

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

6.4 HPLC-ANALYSE

6.4.1 WERKWIJZE VOOR FINALE CONCENTRERING (NIET VAN TOEPASSING IN GEVAL VAN ON-LINE SPE):

- breng het ingedampte extract over naar een puntbuis;
- voeg aan het ingedampte 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 µl, 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.

Opmerking :

HPLC kan ook gecombineerd worden met MS-detectie. De kwantificering gebeurt dan aan de hand van interne standaarden. Voor de kalibratie wordt verwezen naar 6.3.3; voor de berekening wordt verwezen naar 7.2.

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 analoog UV chromatogram; onduidelijke fluorescentiechromatogrammen dienen dan ook bevestigd te worden met GC-MS.

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 kan zowel met interne als met externe standaard gebeuren. Voor interne standaard wordt verwezen naar 6.3.3. Voor externe standaard kan de kalibratie 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 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;

- aan de hand van kalibratierechten. In dit geval worden minstens 4 kalibratieoplossingen geanalyseerd met concentraties groter dan nul en verspreid over het lineair gebied. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Vervolgens wordt dmv lineaire regressie de vergelijking van de kalibratierechte berekend. Daarbij mag

maximum 1 punt verwijderd worden en er dienen minstens 4 punten (verschillend van de oorsprong) behouden te worden. Indien het laagste punt weggelaten wordt dient de rapportagegrens aangepast te worden. Indien het hoogste punt weggelaten wordt, wordt het meetbereik bovenaan ingeperkt. De correlatiecoëfficiënt dient groter te zijn dan 0.995 en de afwijking van elk punt tot de rechte mag niet meer dan 10% bedragen. Als de kalibratiestandaarden de staalopwerking doorlopen mogen de punten 15% afwijken. 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 (15% indien de kalibratiestandaarden de volledige staalopwerking doorlopen). 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 dient te voldoen aan de criteria in CMA/6/D;
- 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.

6.4.5 KWANTIFICERING

Voor de monsterextracten worden de chromatogrammen geregistreerd op identieke wijze als hierboven beschreven voor de standaardoplossingen. Van de geïdentificeerde PAK worden de piekoppervlakten berekend. Uitgaande van de integratiewaarden voor het monster en de responsfactoren of kalibratierechte bepaald voor de kalibratiestandaard worden de gehalten van de verschillende verbindingen in het monster berekend.

7 KWALITEITSCONTROLE

Voor de kwaliteitseisen ivm kalibratie (GC), 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 geregistreeerde 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.

7.2 CHROMATOGRAFISCHE SCHEIDING

In geval van GC-MS analyse wordt de kolomkwaliteit geverifieerd aan de hand van de scheiding van een kritische paar, bv. benzo(b)fluorantheen en benzo(k)fluorantheen in het chromatogram van de kalibratie-oplossing.

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.

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.

7.3 RECUPERATIERENDEMENT VAN DE INTERNE STANDAARDEN

Voor de eisen aan de terugvindingen van de interne standaarden wordt verwezen naar CMA/6/D.

Opmerkingen :

- 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.
- Een te lage terugvinding van de interne standaarden kan wijzen op de aanwezigheid van een adsorbens, bv. actieve kool of vliegias. Dit dient vermeld te worden op het analyseverslag; op verzoek van de klant kan de extractie hernomen worden met tolueen als extractiemiddel.

8 PRESTATIEKENMERKEN

Voor de prestatiekenmerken wordt verwezen naar CMA deel 6.

9 RAPPORTERING

Voor stalen geanalyseerd onder erkenning wordt voor de rapportering (eenheden en maximale rapportagegrenzen) verwezen naar CMA/6/A.

10 REFERENTIES

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

BIJLAGE A

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	
<u>GC-instellingen</u>		<u>MS-instellingen</u>
Draaggas en druk	: Helium, 75 kPa	Brontemperatuur : 250°C
Injectiemodus	: Splitless (purge on na 1 min)	Electronenenergie : 70 eV
Split vent	: 30 ml / min	SIM-ionen : zie tabel 1
Septum purge	: 1 ml / min	
Injectievolume	: 1 µl	
Injectietemperatuur	: 300°C	
Interfacetemperatuur	: 275°C	

<u>Temperatuursprogrammatie GC-oven</u>	
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 B**Tabel II: Typische HPLC werkvoorwaarden voor de bepaling van PAK's**

Kolomspecificaties : VYDAC C18 201TP54 250x4mm

HPLC-instellingen

Injectievolume : 20 µl

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 :

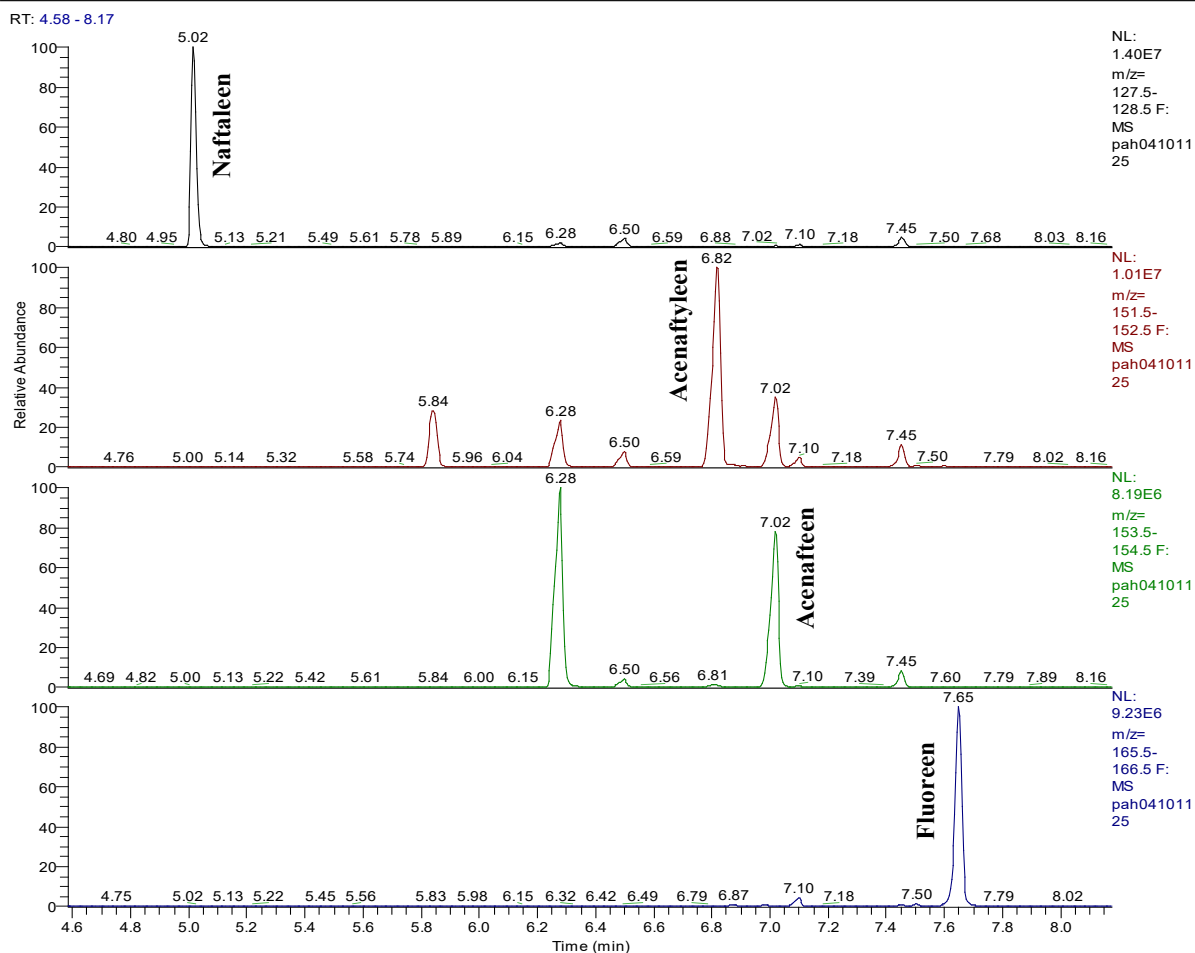
PAK	DAD	Fluorescentie (zie NEN 5771)	
		Aanbevolen $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Geoptimaliseerde $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$
Naftaleen	220	280/340	280/334
Acenaftyleen	227	280/340	292/324
Acenafteen	229		
Fluoreen	261	280/340	268/308
Fenantreen	251	280/340	292/366
Anthraceen	252	305/430	253/402
Fluorantheen	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

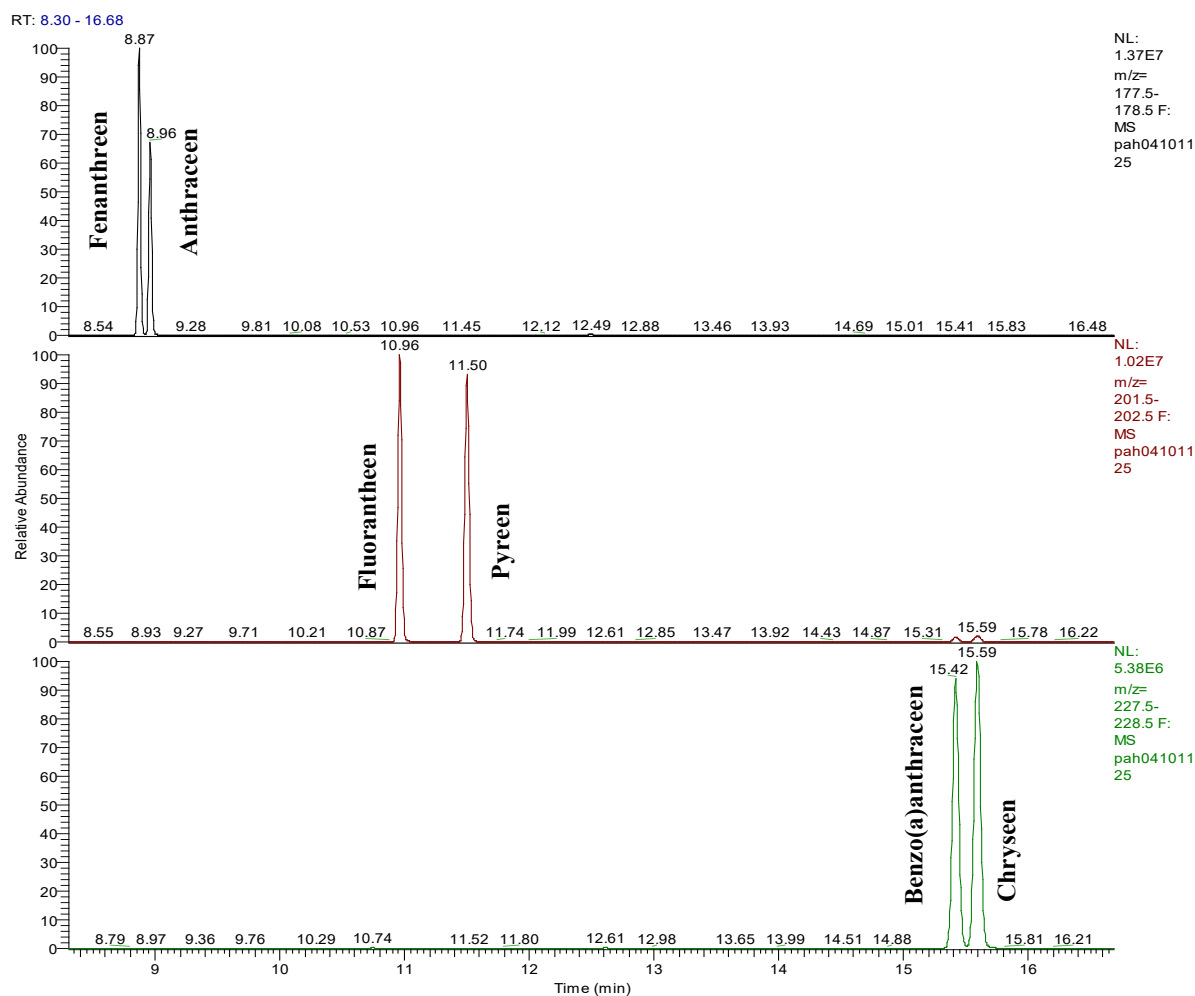
BIJLAGE C

D:\IOR120-2004\...PAH041011\pah04101125

12/10/2004 08:07:34

std 5 F

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

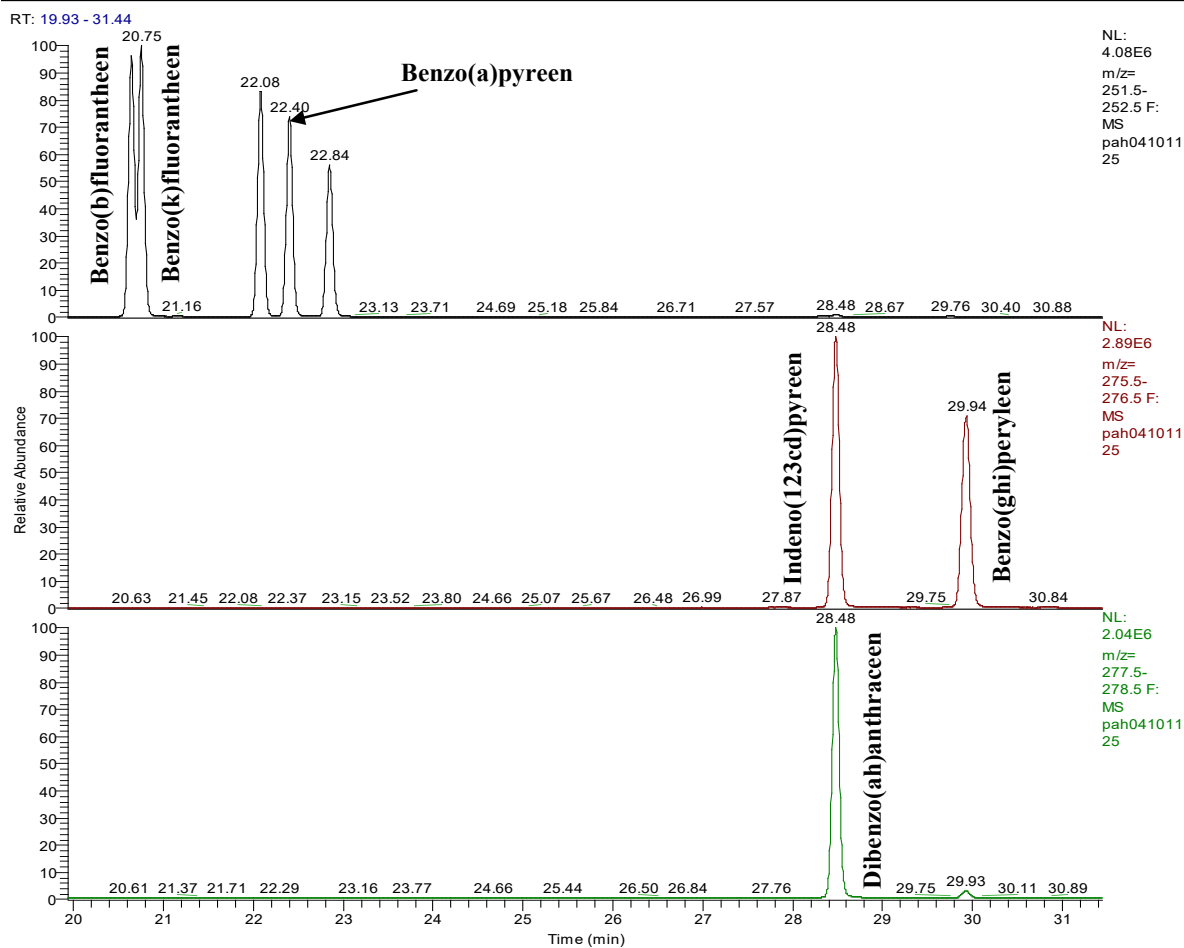


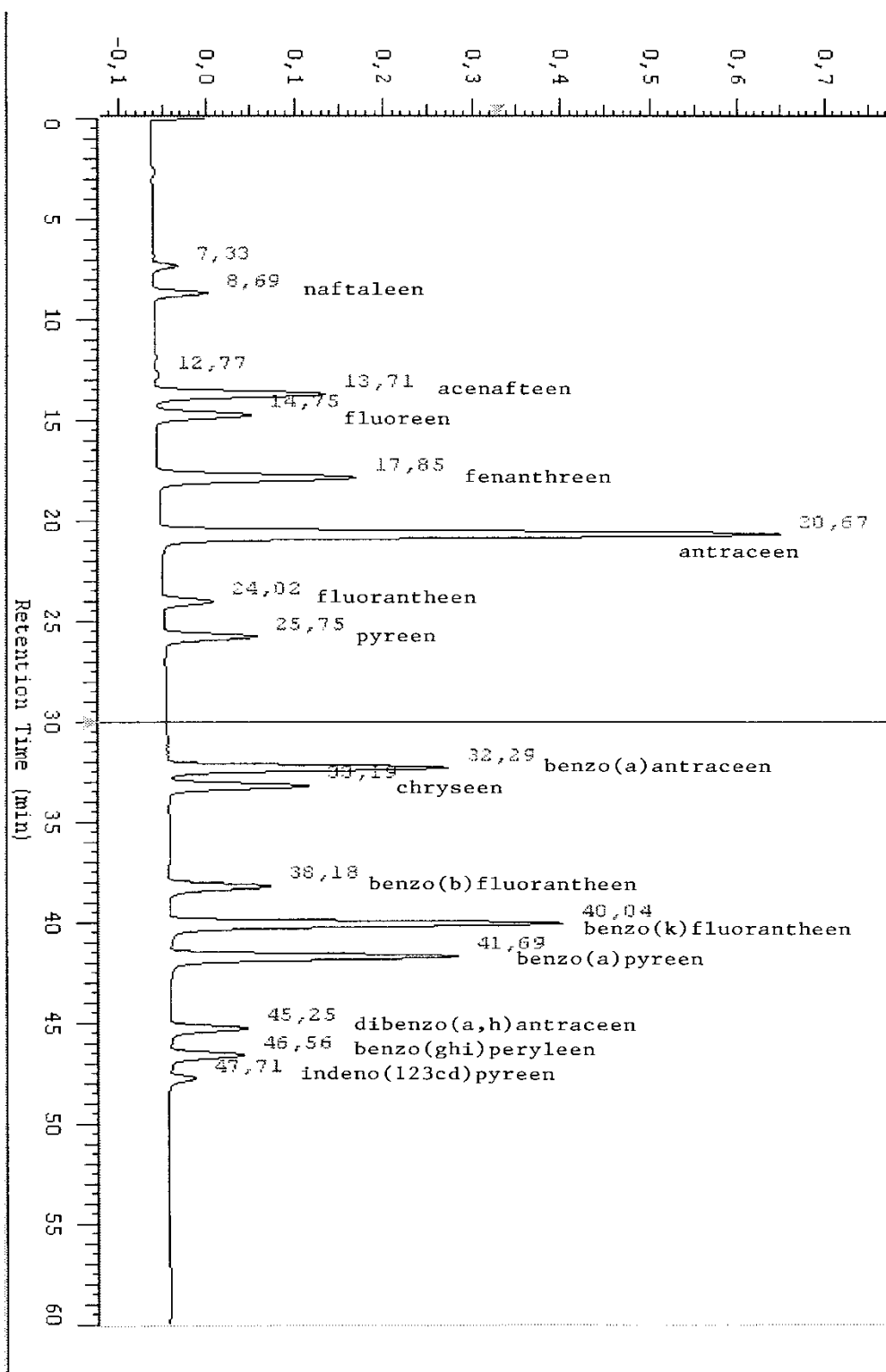
Figuur I : Totaal ionen chromatogram voor een PAK kalibratie-oplossing – deel 2

D:\IOR120-2004\...\PAH041011\pah04101125

12/10/2004 08:07:34

std 5 F

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



Figuur II : HPLC fluorescentiechromatogram voor een PAK kalibratie-oplossing