

Fenolen in meststof en bodemverbeterende middelen

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Apparatuur en materiaal	4
4	Reagentia en oplossingen	4
5	Monsterbewaring en -voorbehandeling	5
6	Analyseprocedure	5
7	Kwaliteitsparameters	8
8	Prestatiekenmerken	9
BIJLAGE A	Specifieke ionen voor de gederivatiseerde fenolen en toewijzing van de interne standaarden	9
BIJLAGE B	Typische GC/MS werkvoorwaarden	10

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure **vervangt procedure CMA/3/P van mei 2023** en beschrijft de bepaling van fenolen in **meststof en** bodemverbeterende middelen (BVM) met gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS). De lijst van verbindingen is hieronder weergegeven:

fenol
2-methylfenol (o-cresol)
3-methylfenol (m-cresol)
4-methylfenol (p-cresol)
2-chloorfenol
3-chloorfenol
4-chloorfenol
2,6-dichloorfenol
2,5-dichloorfenol
2,4-dichloorfenol
3,5-dichloorfenol
2,3-dichloorfenol
3,4-dichloorfenol
2,4,6-trichloorfenol
2,3,6-trichloorfenol
2,3,5-trichloorfenol
2,4,5-trichloorfenol
2,3,4-trichloorfenol
3,4,5-trichloorfenol
2,3,5,6-tetrachloorfenol
2,3,4,6-tetrachloorfenol
2,3,4,5-tetrachloorfenol
pentachloorfenol
4-chloor-3,5-dimethylfenol (dettol)

Opmerking:

De resultaten van fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol en pentachloorfenol zijn indicatief.

2 PRINCIPE

Stalen met een een droge stof gehalte gelijk aan of groter dan 5% worden verdund met water, stalen met minder dan 5% droge stof worden rechtstreeks ingenomen. De stalen worden na dopering met isotoopgemerkte interne standaarden geëxtraheerd met ethylacetaat in de aanwezigheid van zouten. Na centrifugeren wordt een deel van de organische fase afgezonderd en gezuiverd door middel van dispersieve vaste fase extractie (Quechers) met C18-fase. De fenolen worden vervolgens gederivatiseerd met bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) en gemeten met GC-MS.

3 APPARATUUR EN MATERIAAL

- analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0,1 mg
- bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0,01 g
- schudtoestel
- centrifugetoestel met centrifugebuizen van bv. 15 mL en 50 mL
- ultrasoonbad
- scheitrechters
- injectiespuiten
- eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet
- pipetten (bv. Eppendorf)
- maatcilinders en trechters
- glazen vials en monsterflesjes
- GC-MS bestaande uit een capillaire gaschromatograaf, een autosampler en een lage resolutie massaspectrometer van het quadrupool-type. Alternatief kan een triple quad (MS/MS) gebruikt worden voor de meting.
- fused silica GC-kolom met medium polaire stationaire fase, bv. VF-17, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm

4 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

4.1 Reagentia

- ethylacetaat: pro analyse
- natriumchloride (NaCl): p.a.
- magnesiumsulfaat watervrij (MgSO₄ anh.): p.a.
- natriumsulfaat (Na₂SO₄): pro analyse, poeder, watervrij; wordt bewaard bij 130°C
- blanco water: bv. mineraalwater
- Quechers zoutmengsel: meng 3 g NaCl met 5 g MgSO₄
- Quechers dSPE mengsel: meng 500 mg C18 met 100 mg MgSO₄
- derivatiseringsreagens: bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA): p.a.

4.2 Standaardoplossingen

De hieronder beschreven werkwijze vertrekt van vaste producten waarbij de standaardoplossingen zelf aangemaakt worden. Ook reeds bereide en gecertificeerde oplossingen die in de handel beschikbaar zijn mogen gebruikt worden.

De kalibratiestandaarden moeten de volledige analyse doorlopen. Minstens vier isotoopgemerkte fenolen worden als interne standaard gebruikt waarbij de volgende steeds aanwezig zijn :

13C- of D-fenol, 13C-2,4-dichloorfenol, 13C-2,4,5-trichloorfenol, 13C-2,3,4,5-tetrachloorfenol en 13C-pentachloorfenol.

Als recovery standaard komt elke apolaire verbinding in aanmerking die niet in de stalen aanwezig is en vergelijkbare retentietijd heeft als de fenolderivaten. Voorbeelden zijn :

13C-4,4'-dichloorbifenyyl (= 13C-PCB-15), D10-bifenyyl en 13C-dichloorbenzeen.

Opmerking: het gebruik van gedeuteerde verbindingen zoals D4-dichloorfenol (als interne standaard) of D4-dichloorbenzeen (als recovery standaard) moet vermeden worden wegens interferentie op de ionenclusters door eventueel aanwezige natieve componenten.

- stockstandaarden van natieve fenolen: van elke fenolverbinding wordt vanuit zuiver standaardmateriaal een afzonderlijke hoofdstandaard van bv. 1000 µg/g bereid in iso-octaan
- stockstandaarden van isotoopgemerkte interne standaarden: van elke interne standaard wordt vanuit zuiver standaardmateriaal een afzonderlijke stockstandaard bereid van bv. 200 µg/g in iso-octaan
- doperingsoplossing interne standaarden: uit de bovenstaande stockstandaarden van isotoopgemerkte fenolen wordt een verdunning gemaakt in iso-octaan die elke component bevat in een concentratie van bv. 25 µg/g
- doperingsoplossing kalibratiestandaard: uitgaande van de bovenstaande stockstandaarden van natieve fenolen wordt een verdunning gemaakt in iso-octaan die elke verbinding bevat in een concentratie van bv. 25 µg/g
- doperingsoplossing recoverystandaard: er wordt een doperingsoplossing aangemaakt van bv. 20 µg/g in iso-octaan

5 MONSTERBEWARING EN -VOORBEHANDELING

Voor de monserconservering wordt verwezen naar CMA/1/B.

De monstervoorbehandeling is beschreven in CMA/5/B.

6 ANALYSEPROCEDURE

6.1 Extractie, zuivering en derivatisering

- Een hoeveelheid nat staal wordt ingewogen in een centrifugebuis van 50 mL en een hoeveelheid blanco water wordt toegevoegd. De staalinname en de hoeveelheid water is afhankelijk van het gehalte droge stof van het staal:
 - o stalen met DS tot 2%: 30 g staalinname, geen water toevoegen
 - o stalen met DS van 2% tot 5%: 15 g staalinname, geen water toevoegen
 - o stalen met DS van 5% tot 20%: 5 g staalinname, 5 mL water toevoegen
 - o stalen met DS van 20% tot 50%: 1.5 g staalinname, 10 mL water toevoegen
 - o stalen met DS >50 %: 0.6 g staalinname, 10 mL water toevoegen
- voeg bv. 50 µL van de doperingsoplossing IS toe, schud en laat 15 min equilibreren
- voeg 10 tot 15 mL ethylacetaat toe en schud hevig gedurende 1 min
- vortex gedurende 30 sec
- voeg het zoutmengsel toe (3 g NaCl en 5 g MgSO₄)
- vortex gedurende 1 min
- soniceer 15 min in ultrasoonbad
- centrifugeer 5 min bij 4500 tr/min
- neem de bovenstaande fase af en breng over naar een centrifugebuis van 15 mL met de dSPE adsorbentia (500 mg C18 en 100 mg MgSO₄)
- vortex gedurende 1 min
- soniceer 15 min in ultrasoonbad
- centrifugeer 5 min bij 4500 tr/min
- neem 5 mL van de bovenstaande vloeistof af en damp in tot 1 à 2 mL
- droog het extract over een glazen kolommetje met watervrij Na₂SO₄
- voeg 50 µL BSTFA derivatiseringsreagens toe, schud en derivatiseer de fenolen gedurende 30 min bij 45 °C
- laat afkoelen, voeg de recoverystandaard toe en analyseer het extract met GC/MS

Kalibratiestandaard

- dopeer ongeveer 5 ml blanco water met bv. 50 µL doperingsoplossing kalibratiestandaard en behandel verder als een staal

6.2 GC/MS-analyseMeting

De staaextracten en de extracten van de kalibratiestandaard 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 typisch uitgevoerd op een apolaire capillaire kolom met chemisch gebonden fase.

De detectie van de componenten gebeurt met een lage resolutie MS. Alternatief kan een triple quad (MS/MS) gebruikt 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 opname van het chromatogram gebeurt in SIM met selectie en registratie van de karakteristieke ionen, zie Bijlage A. De typische GC-MS werkvoorwaarden voor de analyse zijn weergegeven in Bijlage B.

Uit het totale geregistreerde signaal worden specifieke ionenchromatogrammen van de te analyseren fenolderivaten, de isotoopgemerkte interne standaarden en de recoverystandaard geëxtraheerd.

Kalibratie

De kwantitatieve bepaling van de verschillende fenolen gebeurt volgens de interne standaardmethode. Hierbij wordt elke verbinding gekwantificeerd t.o.v. een bepaalde isotoopgemerkte verbinding die bij het begin van de extractie aan het monster werd toegevoegd. De toewijzing van de interne standaarden aan elke natieve fenol is weergegeven in Bijlage A.

De kalibratie kan op 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 kalibratieoplossing. Deze werkwijze kan gevolgd worden indien de RRFen binnen bepaalde grenzen constant zijn over het meetgebied. De RRFen voor elke te bepalen component worden 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

C_{is}	=	oplossing 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. De laagste concentratie mag niet hoger zijn dan 2 keer de ondergrens van het meetbereik. Op de X-as en de Y-as worden de verhoudingen uitgezet van resp. de concentraties en de piekoppervlakten van de natieve component en de overeenkomstige interne standaard. Vervolgens wordt dmv kwadratische curve fitting de vergelijking van de curve berekend.

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/μL) van de interne standaard in de kalibratieoplossing
C_{RS}	=	concentratie (in ng/μL) van de recoverystandaard in de kalibratieoplossing
A_{RS}	=	piekoppervlakte van de recoverystandaard bij injectie van de kalibratieoplossing

Identificatie

Identificatie van de natieve fenolen en de interne standaarden is gebaseerd op de retentietijden en op de ionenratio's; deze moeten voldoen aan de criteria vermeld in CMA/6/D.

In bijlage A zijn de karakteristieke m/z van de natieve en isotoopgemerkte fenolen weergegeven, en staat voor elke natieve verbinding de overeenkomstige interne standaard vermeld. Van de geïdentificeerde pieken wordt de oppervlakte bepaald.

Kwantificering

Voor de staalextracten worden de ionenchromatogrammen geregistreerd op identieke wijze als hierboven beschreven voor de kalibratieoplossingen. Van de geïdentificeerde fenolen worden de piekoppervlakten behorende bij het target 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.

7 KWALITEITSPARAMETERS

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

7.1 Responslineariteit

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

Stelt men bij de monsteranalyse een overschrijding van de bovenste lineaire grens vast dan moet de meting hernomen worden met verdund extract. Het extract mag maximum 10 keer verdund worden; indien een groetere verdunning noodzakelijk is dan moet de volledige analyse (vanaf de extractie) hernomen worden met een kleinere staalinname.

7.2 Gaschromatografische scheiding

De kolomkwaliteit wordt geverifieerd aan de hand van de scheiding van een kritisch paar, bijvoorbeeld de derivaten van 2,3,5,6-tetrachloorfenol en 2,3,4,6-tetrachloorfenol in het chromatogram van de kalibratiestandaard. De scheiding dient volledig te zijn tot aan de basislijn. Alternatief kan de kolomkwaliteit geverifieerd worden aan de hand van het aantal theoretische platen, berekend op basis van de piekarakteristieken voor een gekozen verbinding in het chromatogram van de kalibratiestandaard. Het aantal platen N_{th} wordt gegeven door :

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

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

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

8 PRESTATIEKENMERKEN

Voor de prestatiekenmerken wordt verwezen naar CMA deel 6.

BIJLAGE A SPECIFIEKE IONEN VOOR DE GEDERIVATISEERDE FENOLEN EN TOEWIJZING VAN DE INTERNE STANDAARDEN

Komponent	m/z(1)	m/z(2)	m/z(3)	Overeenkomstige IS	m/z(1)	m/z(2)
fenol	151	166		¹³ C ₆ -fenol	157	172
2-methylfenol	165	180		D ₈ -2-methylfenol	172	187
3-methylfenol	165	180		"	"	"
4-methylfenol	165	180		"	"	"
2-chloorfenol	200	187	185	¹³ C-2,4-dichloorfenol	242	227
3-chloorfenol	200	187	185	"	"	"
4-chloorfenol	200	187	185	"	"	"
2,6-dichloorfenol	234	219	93	"	"	"
2,5-dichloorfenol	234	219	93	"	"	"
2,4-dichloorfenol	234	219	93	"	"	"
3,5-dichloorfenol	234	219	93	"	"	"
2,3-dichloorfenol	234	219	93	"	"	"
3,4-dichloorfenol	234	219	93	"	"	"
2,4,6-trichloorfenol	268	255	253	¹³ C-2,4,5-trichloorfenol	276	261
2,3,6-trichloorfenol	268	255	253	"	"	"
2,3,5-trichloorfenol	268	255	253	"	"	"
2,4,5-trichloorfenol	268	255	253	"	"	"
2,3,4-trichloorfenol	268	255	253	"	"	"
3,4,5-trichloorfenol	268	255	253	"	"	"
2,3,5,6-tetrachloorfenol	304	289	287	¹³ C-2,3,4,5-tetrachloorfenol	312	297
2,3,4,6-tetrachloorfenol	304	289	287	"	"	"
2,3,4,5-tetrachloorfenol	304	289	287	"	"	"
pentachloorfenol	338	325	323	¹³ C-pentachloorfenol	346	331
4-chloor-3,5-dimethylfenol	213	228		¹³ C-2,4-dichloorfenol	242	227

Opmerking

De target ionen (die gebruikt moeten worden voor de kwantificering) zijn in vet weergegeven.

BIJLAGE B TYPISCHE GC/MS WERKVOORWAARDEN

Kolomspecificaties : VF-17-MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm

Draaggas en flow : He, 1 mL/min

Injectie :

Modus : splitless
Injectievolume : 1 µL extract
Injectietemperatuur: 250°C

GC-oven programmatie :

70 °C 1 min
70 °C --> 190 °C : 6°C/min
190 °C --> 315 °C : 25°C/min

MS-instellingen :

Interfacetemperatuur : 280°C
Brontemperatuur : 230°C
Ionen : zie bijlage 1