

BEPALING VAN ORGANOFOSFORPESTICIDEN IN WATER

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	4
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	4
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.2	<i>Materiaal</i>	4
5	REAGENTIA en OPLOSSINGEN	4
5.1	<i>Reagentia</i>	4
5.2	<i>Oplossingen</i>	5
6	PROCEDURE	5
6.1	<i>Extractie</i>	5
6.2	<i>GC-MS analyse</i>	6
6.2.1	Instellingen van de GC-MS	6
6.2.2	Meting en kalibratie	7
6.2.3	Identificatie	9
6.2.4	Kwantificering	9
7	KWALITEITSCONTROLE	9
7.1	<i>Lineariteit</i>	9
7.2	<i>Chromatografische scheiding</i>	9
8	RAPPORTERING	10
9	REFERENTIES	10
	BIJLAGE A : TIC van organofosforpesticiden	11

1 TOEPASSINGSGBIED

Deze procedure **vervangt procedure WAC/IV/A/010 van november 2016 en** beschrijft een methode voor de kwantitatieve bepaling van organofosforpesticiden (OPP) in water met behulp van gaschromatografie-massaspectrometrie. Deze meer stabiele pesticiden zijn gaschromatografeerbaar in tegenstelling tot de meeste andere polaire pesticiden die thermolabiel zijn.

De organofosforpesticiden zijn weergegeven in tabel 1. De samenstelling van de lijst is gebeurd op basis van de pesticiden die voorkomen in normmethoden en in prioriteitslijsten van de EU en LNE.

Tabel 1: Lijst organofosforpesticiden.

Azinfos-ethyl	Azinfos-methyl*
Bromophos	Bromophos-ethyl
Chlorfenvinphos	Chlorpyrifos
Chlorpyrifos-methyl	Diazinon
Dichloorvos	Dimethoat
	Ethoprofos
Fenitrothion	Fenthion
Fonofos	Malathion
Methidathion	Mevinfos*
Parathion-ethyl	Parathion-methyl
Pirimiphos-methyl	Terbufos*

Opmerkingen:

- ~~Voor de componenten gemerkt met een * is de bepaling minder reproduceerbaar, de bekomen gehalten dienen als indicatief beschouwd te worden.~~
- Voor de componenten gemerkt met een * kunnen minder betrouwbare gehalten bekomen worden. De gemeten gehalten kunnen in dat geval enkel gerapporteerd worden als indicatief.
- Chlorfenvinphos : de som van de 2 isomeren.

2 PRINCIPE

Watermonsters worden vloeistof/vloeistof geëxtraheerd met dichloormethaan; extractie d.m.v. vaste fase extractie (SPE) is ook mogelijk. Het extract wordt geconcentreerd en geanalyseerd met GC/MS. Interferenties in sterk verontreinigde waterstalen kunnen een verhoogde aantoonbaarheidsgrens tot gevolg hebben.

Voor de kwantificering wordt gebruik gemaakt worden van de interne standaardmethode. Het gebruik van de MS detector laat toe isotoopgemerkte interne standaarden aan te wenden, waardoor gecorrigeerd kan worden voor mogelijke verliezen tijdens de opwerking.

3 OPMERKINGEN

- Voor monsterconservering en -bewaring wordt verwezen naar WAC/I/A/010.
- Sommige fosforpesticiden zijn zeer toxisch, ook bij huidcontact en inademing. Neem bij het aanmaken van stockoplossingen de nodige voorzorgen.

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 APPARATUUR

- 4.1.1 bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0,01 g;
- 4.1.2 analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0,1 mg;
- 4.1.3 vacuum-extractie eenheid (+ randmateriaal);
- 4.1.4 schudapparaat
- 4.1.5 eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet;
- 4.1.6 gaschromatograaf voor capillaire kolommen, voorzien van een PTV of on-column injector, een MS-detector en een datastation voorzien van de nodige sturings- en dataverwerkingsprogrammatuur.

4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 scheitrechter 500-1000 ml voor de vloeistof-vloeistofextractie;
- 4.2.2 gebruikelijk laboratoriumglaswerk, gereinigd en gespoeld met aceton;
- 4.2.3 injectiespuiten van 50 tot 250 µl voor het doperen met interne standaard en recoverystandaard;
- 4.2.4 penicillineflesjes;
- 4.2.5 pasteurpipetten;
- 4.2.6 papierfilters;
- 4.2.7 capillaire kolom met apolaire of medium-polaire fase van 30 m lengte, met een diameter van 0,10 tot 0,32 mm en een filmdikte van 0,1 tot 0,25 µm

5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

5.1 REAGENTIA

- 5.1.1 aceton: residu-analyse kwaliteit
- 5.1.2 dichloormethaan : residu-analyse kwaliteit
- 5.1.3 natriumsulfaat, Na₂SO₄: granulair en watervrij; een geopende verpakking wordt uitgegoten in een schaal en bewaard bij 130°C in een droogoven
- 5.1.4 toluen: residu-analyse kwaliteit
- 5.1.5 natieve fosforpesticiden (tabel 1): pro analyse (p.a.)
- 5.1.6 ¹³C –hexachloorbenzeen (interne standaard voor de fosforpesticiden): p.a.
- 5.1.7 PCB-112 (recoverystandaard): p.a.

5.2 OPLOSSINGEN

Opmerking:

Standaardoplossingen worden bereid uitgaande van zuiver standaard materiaal; alternatief kunnen reeds bereide standaardoplossingen in de handel aangekocht worden. Naast ^{13}C - hexachloorbenzeen kunnen bijkomende isotoopgemerkte pesticiden als interne standaard gebruikt worden.

- 5.2.1. Stockoplossingen van fosforpesticiden:
van elke bovenstaande fosforpesticide wordt een afzonderlijke hoofdstandaard van bv. 500 $\mu\text{g/ml}$ in aceton of tolueen gemaakt. Deze wordt bereid uit zuiver standaard materiaal
- 5.2.2. Stockoplossing van ^{13}C -hexachloorbenzeen (interne standaard):
deze standaardoplossing wordt bereid uitgaande van zuiver standaard materiaal en bevat bv. 100 $\mu\text{g/ml}$ ^{13}C -hexachloorbenzeen in tolueen
- 5.2.3. Stockoplossing van PCB-112 (recoverystandaard):
deze standaardoplossing wordt bereid uitgaande van zuiver standaard materiaal en bevat bv. 100 $\mu\text{g/ml}$ PCB-112 in tolueen
- 5.2.4. Standaard werkoplossingen voor lineariteitscontrole:
deze worden uitgaande van de bovenstaande stockoplossingen gemaakt in tolueen. De oplossingen bevatten:
 - natieve componenten variërend in concentratie van bijvoorbeeld 0,2 tot 20 $\mu\text{g/ml}$;
 - ^{13}C -hexachloorbenzeen met een constante concentratie van bijvoorbeeld 1 $\mu\text{g/ml}$;
 - PCB-112 met een constante concentratie van bijvoorbeeld 1 $\mu\text{g/ml}$.
- 5.2.5. Doperingsoplossing van natieve fosforpesticiden:
deze wordt bereid in aceton uitgaande van zuiver standaardmateriaal ; de eindconcentratie bedraagt bv. 25 $\mu\text{g/ml}$ per pesticide.
- 5.2.6. Doperingsoplossing van ^{13}C –hexachloorbenzeen:
uitgaande van de bovenstaande stockoplossingen van ^{13}C –hexachloorbenzeen wordt een verdunning gemaakt in aceton die bv. 25 $\mu\text{g/ml}$ bevat van elke interne standaard.
- 5.2.7. Kalibratie-werkoplossing:
deze worden uitgaande van de bovenstaande stockoplossingen gemaakt in tolueen. De oplossing bevat:
 - natieve componenten in een concentratie van bijvoorbeeld 1 $\mu\text{g/ml}$;
 - ^{13}C -hexachloorbenzeen in een concentratie van bijvoorbeeld 1 $\mu\text{g/ml}$;
 - PCB-112 in een concentratie van bijvoorbeeld 1 $\mu\text{g/ml}$.

6 PROCEDURE

6.1 EXTRACTIE

- Weeg de monsterfles tot op 0,1 g nauwkeurig.
- Breng de volledige inhoud van de monsterfles over in een geschikte scheitrechter
- Breng ongeveer 1 ml aceton in een penicillineflesje

- Voeg m.b.v. een injectiespuit een gekende hoeveelheid van de interne standaarden toe aan de aceton, zodanig dat de concentratie van elke gemerkte verbinding in het eindextract bijvoorbeeld 1 µg/ml 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 dichloormethaan en breng de spoelvloeistof over naar de scheitrechter.
- Spoel de monsterfles na met 25-50 ml dichloormethaan en breng de spoelvloeistof over naar de scheitrechter.
- Schud het geheel krachtig gedurende ongeveer 3 min.
- Laat de organische fase af over een filter gevuld met Na₂SO₄
- Herneem de spoel- en extractiestap nog minstens 1 keer
- Damp de verzamelde extracten in onder een stikstofstroom tot een eindvolume van ongeveer 1 ml en voer een solventwissel uit naar 500 µl toluen
- Dopeer het extract met een gekende hoeveelheid recoverystandaardoplossing zodanig dat de concentratie van de recoverystandaard in het eindextract bijvoorbeeld 1 µg/ml zal bedragen.
- Meet het extract met GC/MS (zie 6.2).

Opmerking

Als alternatief voor de vloeistof-vloeistof extractie kan ook vaste fase extractie (offline of online met de meetapparatuur) aangewend worden (bv. gebruikmakend van een generische fase zoals Oasis HLB en ethylacetaat als elutiesolvent). Voeg (voor zover dit bij de monsternamen nog niet gebeurd is) aan het watermonster 0.5% tot 5% methanol of isopropanol toe voorafgaand aan de deelmonsterneming om verlies door adsorptie aan glaswand en gesuspendeerde deeltjes te voorkomen.

6.2 GC-MS ANALYSE

Typische instellingen voor de GC-MS bepaling van organofosforpesticiden zijn hieronder weergegeven.

6.2.1 INSTELLINGEN VAN DE GC-MS

- Kolomtype: DB5-XLB 30m X 0,25mm X 0,25 µm; apolaire voorkolom 1,5 m X 0,53 mm
- Draaggas: helium
- Injectievolume: 1 µl (on-column)
- Oventemperatuursprogramma: begintemperatuur: 115 °C; dan 10 °C/min naar 315 °C
- Interfacetemperatuur: 275°C
- MS-brontemperatuur: 250°C
- MS-ionisatie: electron impact (70 eV)
- MS-SIM ionen: zie onderstaande tabellen

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).**

In de onderstaande tabel zijn de massa's van de karakteristieke ionen weergegeven; het kwantificeringsion is vetgedrukt. De nummering van de componenten verwijst naar het chromatogram in bijlage A.

Tabel 2: Ionen (m/z) voor de fosforpesticiden

Nummer	Component	Massa 1	Massa 2
1	Dichloorvos	79	109
2	Mevinfos	109	127
3	Ethoprofos	97	158
4	¹³ C-HCB (Interne standaard)	290	292
5	Dimethoaat	87	93
7	Terbufos	231	233
8	Diazinon	137	179
9	Fonofos	109	137
10	Disulfoton	88	97
11	Chlorpyrifos-methyl	286	288
12	Parathion-methyl	125	263
13	Pirimifos-methyl	276	290
14	Malathion	125	173
15	Fenitrothion	125	277
16	Chlorpyrifos-ethyl	314	316
17	Fenthion	125	278
18	Parathion-ethyl	291	292
19	Bromofos-methyl	329	331
20	Chlorfenvinfos	267	269
21	Bromofos-ethyl	357	359
22	Methidathion	85	145
23	PCB-112	326	328
25	Azinfos-methyl	77	160
26	Azinfos-ethyl	77	160

6.2.2 METING EN KALIBRATIE

De kwantitatieve bepaling van de verschillende pesticiden gebeurt volgens de interne standaard methode. Hierbij wordt elke pesticide verbinding gekwantificeerd ten opzichte van een isotoopgemerkte interne standaard die bij het begin van de opwerking aan het te analyseren monster werd toegevoegd.

Opmerking :

in geval van SPE kunnen de kalibratiestandaarden de volledige staalopwerking doorlopen.

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

- aan de hand van de relatieve responsfactor (RRF), bepaald met minstens één kalibratieoplossing. Deze werkwijze kan gevolgd worden indien de RRFen binnen bepaalde

grenzen constant zijn over het meetgebied. De RRFen voor elke te bepalen component worden vervolgens bepaald uit de verhouding van de oppervlakten en concentraties van de natieve componenten en de overeenkomstige interne standaarden :

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

met

RRF_i	=	relatieve responsfactor van component i
A_i	=	piekoppervlakte van component i bij injectie van de kalibratie-oplossing
C_i	=	concentratie (in ng/μl) van 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 het natieve pesticide 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 overeenkomstige recoverystandaard in de kalibratieoplossing
A_{RS}	=	piekoppervlakte van de overeenkomstige recoverystandaard bij injectie van de kalibratieoplossing

6.2.3 IDENTIFICATIE

De aanwezigheid van organofosforpesticiden in de stalen wordt bevestigd aan de hand van de criteria voor retentietijden en ionenratio's zoals vermeld in procedure WAC/VI/A/003.

6.2.4 KWANTIFICERING

Voor de monsterextracten worden de ionenchromatogrammen geregistreerd op identieke wijze als hierboven beschreven voor de standaardoplossingen. Van de geïdentificeerde pesticiden worden de piekoppervlakten behorende bij het meest intense ion berekend. Uitgaande van de integratiewaarden voor het monster en de relatieve responsfactoren of kalibratierechte/curve bepaald voor de kalibratiestandaard worden de gehalten van de verschillende verbindingen in het monster berekend.

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

7 KWALITEITSCONTROLE

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

7.1 LINEARITEIT

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 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

De kolomkwaliteit wordt geverifieerd aan de hand van de scheiding van een kritische paar in het chromatogram van de kalibratieoplossing.

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 RAPPORTERING

Vermeld in het analyseverslag het gehalte van elke component in $\mu\text{g/l}$.

9 REFERENTIES

- EPA 8141B: 1999; Organophosphorous Compounds by GC; SW 846
- ISO 8466: 1990; Water Quality – Calibration and Evaluation of Analytical Methods and Estimation of Performance Characteristics, Part 1: Statistical Evaluation of the Linear Calibration Function
- ISO 10695: 2000; Water Quality – Determination of Selected Organic Nitrogen and Phosphorus Compounds – Gas Chromatographic Methods

BIJLAGE A: TIC VAN ORGANOFOSFORPESTICIDEN

