

RIVM rapport 771402 026

**Ontwikkeling van een analysemethode voor
fenol en cresolen in water middels SPE en
on-column derivatisering**

E.G. van der Velde, M.H. Broekman,
A.I.M. van de Beek, G.S. Groenemeijer en
G. Zomer

April 2001

met medewerking van :
G.H. Stil, M. Koers en A.J. Zaunbrecher

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van het Directoraat-Generaal Milieubeheer Directie Bodem in het kader van project 771402, onderzoeksplan 771402-96/01/00.

This investigation has been performed in order and for the account of the Directorate-General for environmental Protection, Ministry of Housing, Physical Planning and Environment within the framework of project 771402.

ABSTRACT

This report describes the development of an analytical method for the determination of phenol and methylphenols (cresols) in water, especially in leachates. This experimental research was necessary because a standardized method was not available for these compounds in water.

A special concept was developed whereby the free phenols were extracted from the water using SPE-columns, followed by on-column derivatisation of the free phenols with acetylchloride in hexane (5% v/v) using sodiumhydroxide powder and tetrabutylammonium hydrogen stofsulfaat as fase-transfer-catalist, and desorption of the phenylacetates with hexane. Analysis of the phenylacetates was performed with GC-FID or GC-MS. Advantages are the fast and easy to automate method with an unique combination of on-column extraction and derivatisation, which avoids the need of a solvent phase switch.

The method validation showed the following characteristics : no concentration dependence was found over a concentration range of 25 µg/l to 25 mg/l with a limited breakthrough, only 12 % for phenol at a level of 25 mg/l. The longterm reproducibility for phenol, cresols and dimethylphenols was around 80 % with a standard deviation of 2 to 6 % for all matrices. The limit of determination was around 1 µg/l using GC-FID analysis. Analysis of dimethylphenols can be performed with this method as well, or they can be used as internal standards. The stability of the components is 7 days at 4 °C and can be increased by conservation at pH 2 or pH 12. Application of GC-MS improves the limit of determination to 0.1 µg/l for phenol and o- and m-cresol, for p-cresol this is 0.3 µg/l.

INHOUD

SAMENVATTING	5
1. INLEIDING	7
1.1 Achtergronden	7
1.2 Opzet van het onderzoek	7
2. MATERIAAL EN METHODEN	9
2.1 Chemicaliën	9
2.2 Materialen	10
2.3 Methoden	10
2.3.1 Vloeistof extractie volgens PrEN-methode	10
2.3.2 Solid Phase Extractie (SPE)	11
2.3.3 Gaschromatografie met FID	11
2.3.4 GC-MS analyse	11
3. VLOEISTOF EXTRAKTIE EN DERIVATISERING MET AZIJNZUURANHYDRIDE VOLGENS PrEN 12673	13
3.1 Opwerking en analyse volgens PrEN 12673	13
3.2 Variatie in pH	14
3.3 Variatie in overige derivatiserings- en extractie condities	15
3.4 Conclusie	16
4. ON-COLUMN EXTRACTIE EN DERIVATISERING MET ACETYLCHLORIDE	17
4.1 Derivatisering met acetylchloride	17
4.2 Extraktiemethode : SPE versus LLE	18
4.3 Test van verschillende SPE kolommetjes	20
4.4 On-column derivatisering	21
4.4.1 SPE en on-column derivatisering met acetylchloride	21
4.4.2 Optimalisatie van on-column derivatisering	22
4.4.3 Test op doorbraak	24
4.5 Conclusie	25
5. VALIDATIE VAN DE ANALYSEMETHODE	26
5.1 Beschrijving analysemethode	26
5.2 Werkgebied en terugvinding	26
5.3 Aantoonbaarheidsgrens	27
5.4 Matrix invloed	27
5.5 Interne standaarden	28
5.6 Lange termijn reproduceerbaarheid	29
5.7 Houdbaarheid	30

5.8	Invloed temperatuur en pH op de conservering van monsters	31
5.9	Doorslag bij overmaat fenolen	32
5.10	Prestatiekenmerken bij analyse met GC-MS	33
5.10.1	Aantoonbaarheidsgrens	33
5.10.2	Terugvinding	33
5.10.3	Invloed van matrix effecten	34
6	CONCLUSIES	35
	LITERATUUR	37
Bijlage 1.	Verzendlijst	38
Bijlage 2.	Lijst met afkortingen en synoniemen	39
Bijlage 3.	Analysemethode voor fenol en cresolen in water met behulp van SPE on-column derivatisering op en analyse met GC-FID of GC-MS	40
Bijlage 4.	Aanvullende tabellen	44

SAMENVATTING

Dit rapport beschrijft de ontwikkeling van een analysemethode voor de bepaling van fenol, o-cresol, m-cresol en p-cresol in water, met name in eluaten tbv. uitloogonderzoek. Dit onderzoek was noodzakelijk vanwege het ontbreken van een genormaliseerd analysevoorschrift voor deze componenten in water.

Het experimentele onderzoek is gestart met het testen van de analysemethodiek voor chloorfenolen in water volgens het CEN-document van de werkgroep CEN/TC/ 230/WG 1/TG 11. Op basis van de tegenvallende prestaties op het punt van de terugvinding van de vrije fenolen en de grote spreiding hierin is besloten een nieuwe methodiek te ontwikkelen.

Een analysemethode is ontwikkeld volgens een nieuw concept waarbij de vrije fenolen eerst op SPE-kolommetjes uit de waterlaag geëxtraheerd worden; gevolgd door een on-column derivatisering van de vrije fenolen met acetylchloride in hexaan (5% v/v) met gebruik van natronloog-poeder en tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat als fase-transfer-katalysator en desorptie van de gevormde fenylacetaten van het SPE kolommetje met hexaan. Analyse van de fenylacetaten vindt plaats met behulp van GC-FID of GC-MS.

Voordeel van deze methode is dat een snelle, op een aantal stappen mogelijk te automatiseren methode is ontwikkeld, waarbij door de combinatie van extractie en derivatisering op het SPE-kolommetje geen oplosmiddel-switch noodzakelijk is.

Bij de validatie zijn de hiernavolgende prestatiekenmerken gevonden:

- Er bestaat geen concentratie afhankelijkheid van de fenolen over een concentratierange van 25 µg/l tot 25 mg/l en de doorslag is tot op een niveau van 25 mg/l gering (voor fenol is dit 12 % absoluut).
- De lange termijn reproduceerbaarheid van de methode ligt voor fenol, de cresolen en dimethylfenolen rond de 80 % met een standaard deviatie van 2 tot 6 %. Dit geldt zowel voor leidingwater, als bij toepassing van verschillende matrices.
- De aantoonbaarheidsgrens ligt op resp. 1.2, 0.3 en 0.8 µg/l voor o-, m- en p-cresol en op 1.8 µg/l voor fenol bij analyse met GC-FID.
- Analyse van dimethylfenolen is mogelijk met deze methode; eveneens kunnen deze componenten als interne standaard toegepast worden.
- De fenolen blijken tot 3 dagen houdbaar bij 20 °C zonder conservering; koeling tot 4 °C verlengt de houdbaarheid tot 7 dagen. Monsters welke gekoeld zijn tot 4 °C en geconserveerd zijn door de pH vooraf op pH12 of pH2 te brengen, blijken over een periode tot minstens 51 dagen goed houdbaar te zijn.
- Bij toepassing van GC-MS analyse kan de aantoonbaarheidsgrens van de fenolen verlaagd worden tot 0.1 µg/l voor fenol en o- en m-fenol, voor p-cresol is dit 0.3 µg/l. De recoveries zijn vergelijkbaar met de analyse met GC-FID en ook hier bestaat geen matrix-effect. Analyse met GC-MS verhoogt de selectiviteit van de methode.

Gezien de goede prestatiekenmerken van de nieuwe analysemethode kan het onderzoek naar de ontwikkeling van een kolom - en cascadeproef voor deze stofgroep uitgevoerd worden.

In het kader van het Actieprogramma Normalisatie & Validatie van Milieumeetmethoden 1993-1997 kan voor het project 88 van de normcommissie 390 013 88 de informatie uit dit rapport voldoende aanleiding zijn de RIVM-analysemethode voor fenolen in het normalisatietraject op te nemen. Afhankelijk van de toepassing dient de methode op grotere schaal zowel op intra- als interlaboratorium schaal te worden gevalideerd.

1. INLEIDING

1.1 Achtergronden

In het kader van het Taakstellend Plan ter ondersteuning van de normcommissie 390 11 'Uitloog-karakterisering van Bouw- en afvalstoffen' (TSP) voert het RIVM het project 'Uitlooging van organische componenten' uit [1]. Het doel van het project is het ontwikkelen van een set van uitloogproeven voor organische componenten. Binnen de grote verscheidenheid aan organische componenten met betrekking tot polariteit en vluchtigheid worden uitloogproeven voor de volgende groepen opgezet: PAK's, PCB's, EOX, minerale olie, BTEX en fenolen.

Voor de laatstgenoemde stofgroep, te weten de fenolen, wordt het RIVM het onderzoek gestart met de ontwikkeling van een analysemethode voor de bepaling van fenol, o-cresol, m-cresol en p-cresol in eluaten. Dit was noodzakelijk omdat een genormaliseerd analysevoorschrift op dat moment niet beschikbaar was.

In het kader van het "Actieprogramma Normalisatie & Validatie van Milieumeetmethoden 1993-1997" werd binnen projekt 88 van de normcommissie 390 013 88 eveneens gewerkt aan de totstandkoming van een genormaliseerd analysevoorschrift voor niet-gehalogeneerde fenolen in bodem/grond, waterbodem, grondwater, oppervlaktewater, bouw- en afvalstoffen. Het ging hierbij om de methode ontwikkeling en een beperkte intralabvalidatie van de analysemethode van fenolen in de genoemde matrices, waarbij werd uitgegaan van een GC-MS analyse volgens de methode van Boyd [2].

In het kader van de Europese normgeving is op basis van validatieonderzoek een norm vastgesteld voor chloorfenolen in water. Het betreft de PrEN 12673 'Water quality - Gas Chromatographic determination of some selected chlorophenols in water', welke norm door het RIVM gevalideerd werd in het kader van de werkgroep CEN/TC/ 230/WG 1/TG 11 [3,4].

Als op basis van de onderzoeksresultaten een geschikte analysemethode beschikbaar is zal het uitloogonderzoek gecontinueerd worden met een vooronderzoek naar het mogelijk optreden van verlies van fenolen ten gevolge van processen zoals adsorptie, vervluchtiging en/of ontleding. Vervolgens zal gestart worden met de ontwikkeling van kolom- en cascadeproeven waarbij de ontwerpvoornormen 7344 en 7350 in eerste aanzet op geschiktheid worden beoordeeld. Eventuele aanpassingen op de voorgeschreven werkwijze zullen op basis van laboratoriumonderzoek worden voorgesteld [6].

1.2 Opzet van het onderzoek

Doel van dit onderzoek is het opzetten van een analysemethode voor de bepaling van een beperkt aantal fenolen, te weten fenol, ortho-, meta- en para-cresol op een breed concentratieniveau (0.1 µg/l - 0.5 mg/l) in waterige monsters (eluaten).

Als uitgangspunt is gekozen om de fenolen bij voorkeur als de corresponderende fenylacetaten, danwel andere fenol-derivaten, gaschromatografisch te analyseren. Deze keuze is gebaseerd op grond van de relatief grote reactiviteit van de vrije fenolen bij de GC-analyse, waardoor slechte performance van de methode kan optreden.

Fenolen onderscheiden zich van veel andere organische stofgroepen zoals PAK's en PCB's doordat ze goed oplosbaar zijn in water. Een belangrijke invloed op de oplosbaarheid vormt hierbij de pH-waarde van het water. Fenolen opgelost in water kunnen worden gekenmerkt als niet vluchtig [5].

Het RIVM heeft voor de ontwikkeling en validatie van een analysemethode van fenolen in eluaten de voorgeschreven monsteropwerking van PrEN 12673 als uitgangspunt genomen. Het principe van deze analysemethode betreft in het kort een drievoudige extractie met toluen, gevolgd door een drievoudige zuur-base extractie met een kaliumcarbonaat-oplossing. Vervolgens vindt een derivatisering met azijnzuuranhydride plaats in de waterlaag gevolgd door een extractie met hexaan. De gevormde fenylacetaten worden met gaschromatografie met vlamionisatiedetectie geanalyseerd.

Uit eerder onderzoek is gebleken dat met name de opbrengst van de derivatisering problemen kan opleveren. Op basis van de terugvinding van de vier fenolen zullen, indien daartoe aanleiding is, de van belang geachte parameters zoals pH, reagentia, extractie- en derivatiseringscondities worden getest.

Bij onvoldoende resultaat van de optimalisatie van bestaande methoden, zullen nieuwe methodieken worden onderzocht en gevalideerd. Hierbij zal onderzoek verricht worden aan andere extractie en/of derivatiseringsmethoden.

Dit rapport beschrijft in hoofdstuk 2 de gebruikte materialen en methoden. In hoofdstuk 3 wordt het experimentele onderzoek naar de relevante variabelen van de PrEN-methode beschreven. Op basis van de bevindingen in dit hoofdstuk volgt in hoofdstuk 4 en 5 de beschrijving van de ontwikkeling en de validatie van een nieuwe analysemethode. In het afsluitende hoofdstuk worden de conclusies en aanbevelingen gegeven.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Chemicaliën

Alle fenolens en een gedeelte van de fenylacetaten zijn verkregen van Aldrich met een zuiverheid van 98 tot 100 %.

De overige fenylacetaten zijn door het RIVM bereid door een aantal gram van de zuivere stoffen op te lossen in voldoende hexaan (200 ml) en hieraan (2) g gepoederd NaOH en (1) g tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat toe te voegen. Na schudden, eventueel ultrasoon (1 min), wordt hieraan ca. 15 ml acetylchloride in hexaan (1/1) toegevoegd en wordt weer geschud (eventueel ultrasoon gedurende 1 min.). Het geheel wordt afgefiltreerd over Na₂SO₄ en ingedampt mbv. Kuderna Danish en drooggedampt onder stikstof.

Tabel 2.1 *Standaardstoffen*

Standaardstof	CAS nummer	Leverancier	IR resultaat
fenol	108-95-2	Aldrich	zuiver
o-cresol	95-48-7	Aldrich	zuiver
m-cresol	108-39-4	Aldrich	zuiver
p-cresol	106-44-5	Aldrich	zuiver
fenylacetaat	122-79-2	Aldrich	zuiver
o-tolylacetaat	533-18-6	Aldrich	zuiver
m-tolylacetaat	122-46-3	Aldrich	zuiver
p-tolylacetaat	140-39-6	Aldrich	zuiver
2,3 dimethylfenol	526-75-6	Aldrich	zuiver
2,4 dimethylfenol	105-67-9	Aldrich	zuiver
2,5 dimethylfenol	95-87-4	Aldrich	zuiver
2,6 dimethylfenol	576-26-1	Aldrich	zuiver
3,4 dimethylfenol	95-65-8	Aldrich	zuiver
3,5 dimethylfenol	108-68-9	Aldrich	zuiver
ethylfenylacetaat		RIVM	zuiver
2,5 dimethylfenylacetaat		RIVM	zuiver
2,6 dimethylfenylacetaat		RIVM	zuiver
3,5 dimethylfenylacetaat		RIVM	zuiver
3,4 dimethylfenylacetaat		RIVM	zuiver
2 - chloorfenylacetaat			zuiver
3 - chloorfenylacetaat			zuiver
4 - chloorfenylacetaat			zuiver

Alle stoffen zijn met infrarood spectrometrie gecontroleerd op identiteit en zuiverheid. Een confirmatie van de gevonden zuiverheid is uitgevoerd met GC-FID analyse. In tabel 2.1 is een lijst van deze stoffen gegeven met de leverancier en het resultaat van de IR-meting.

Standaard oplossingen van fenolen zijn bereid in aceton en in water; standaardoplossingen van fenylacetaten zijn bereid in hexaan.

Alle overige in dit onderzoek gebruikte chemicaliën als oplosmiddelen, derivatiseringsreagentia en vaste stoffen zijn van analytisch zuivere kwaliteit.

2.2 Materialen

Ter verkrijging van eluaten is onder andere OECD-grond en een door het RIVM bemonsterd praktijk(grond)monster uitgeschud met een hoeveelheid schoon water. De waterfractie is na het schudden gefiltreerd over een 0.45 μm geregenereerd cellulose membraanfilter. Het resulterende eluaat is gebruikt voor het onderzoek naar de invloed van de matrix op het terugvindingspercentage van fenolen. Voor dit doel zijn ook watermonsters genomen uit een vijver.

2.3 Methoden

2.3.1 Vloeistof extractie volgens PrEN-methode

Voor de analyse van fenolen in eluaten is uitgegaan van de methodiek zoals het beschreven is in PrEN 12673. Deze methode kan uitgevoerd worden met een toluen extractie, danwel door een directe derivatisering en extractie in het water. Het principe van deze laatste methode is als volgt. In een scheidrecter van 100 ml wordt 5 ml van een mengstandaardoplossing van een bekende concentratie fenol, o-cresol, m-cresol en p-cresol in water, methanol, aceton of hexaan naar keuze gepipetteerd. Hieraan wordt 60 ml van een 0.5 molair kaliumcarbonaatoplossing toegevoegd. Het geheel wordt gedurende 2 minuten tot een homogeen mengsel geschud. De pH van de kaliumcarbonaatoplossing wordt vooraf gecontroleerd en zonodig met 1 N NaOH-oplossing of verdunde HNO₃-oplossing op pH = 11.6 gebracht. De derivatisering en de extractie van de gevormde fenylacetaten wordt uitgevoerd door aan de waterlaag 0.5 ml azijnzuuranhydride toe te voegen en het geheel 1 minuut te schudden. Vervolgens wordt 5 ml hexaan toegevoegd en gedurende 1 minuut geschud. De hexaanlaag wordt afgescheiden en gedroogd over watervrij natriumsulfaat. Deze procedure wordt nog twee keer met steeds 5 ml hexaan herhaald; de verschillende hexaanextracten worden samengevoegd. De natriumsulfaat wordt met circa 3 ml hexaan nagespoeld. De verzamelde hexaanextracten worden ingedampt tot circa 1 ml waaraan vervolgens 150 μl injectiestandaardoplossing wordt toegevoegd.

In dit onderzoek wordt met nadruk gekeken naar het onderdeel derivatisering met azijnzuuranhydride in de waterlaag (invloed pH) en de daaropvolgende vloeistof-vloeistof

extractie met hexaan. Een beschrijving van de uitgevoerde experimenten en de daarbij behorende resultaten staat vermeld in hoofdstuk 3.

2.3.2 Solid Phase Extractie (SPE)

Voor het onderzoek naar een solid phase extractie methode zijn kolommetjes gebruikt die voorzien zijn van styreendivinybenzeen (SDB) polymeer als adsorbens. De extracties zijn uitgevoerd met een SPE-kolomprocessor van Mallinkrodt-Baker. Voor extracties van meer dan 75 ml watermonster tot maximaal 1000 ml heeft het laboratorium gebruik gemaakt van PTFE-slangetjes en KEL-F koppelstukjes. (Zie voor verdere uitvoering hoofdstuk 5.1)

2.3.3 Gaschromatografie met FID

De fenolderivaten zijn geanalyseerd met behulp van twee verschillende GC-FID systemen, voorzien van een cold on-column injectietechniek (Systeem 1 : HRGC 5300, MFC 500, AS 550, EL 580 van de firma Carlo Erba. Systeem 2 : GC 8000 van Interscience met type 8160-00 en AS 800 van de firma Fisons en EL 480 van Carlo Erba). De GC's waren uitgerust met een monsterwisselaar, on-column injector, vlamionisatie detector en dataverwerkingstation voorzien van het analyse softwarepakket HP-CHEM. De chromatografie is uitgevoerd met een Ultra-1 kolom (50 m * 0,32 mm; $df = 0,52 \mu\text{m}$), gekoppeld aan een retention gap van 1 meter met een inwendige diameter van 0,53 mm.

2.0 μl extract wordt on-column geïnjecteerd, waarbij het volgende oventemperatuur programma wordt toegepast: begintemperatuur is 70°C gedurende 6 minuten, waarna met een stijging van $3^\circ \text{C}/\text{min}$ naar 110°C wordt geprogrammeerd, vervolgens met $5^\circ \text{C}/\text{min}$ naar 150°C en dan met $15^\circ \text{C}/\text{min}$ naar 275°C ; eindtemperatuur gedurende 10 minuten.

De fenolderivaten worden gedetecteerd met een FID welke op een temperatuur van 250°C is ingesteld. De voordruk van de brandstofgassen lucht en waterstof is ingesteld op 100 KPa respectievelijk 70 KPa. De snelheid van het draaggas helium is na meting vastgesteld op 2.1 ml/min, wat overeenkomt met een voordruk van 100 KPa. De data-acquisitie en -verwerking is uitgevoerd met het analysepakket HP-CHEM en het lineaire regressie softwarepakket Calwer [7].

De fenylacetaten worden gekwantificeerd ten opzichte van externe standaardoplossingen van fenylacetaten in hexaan op verschillende concentratieniveaus.

2.3.4 GC-MS analyse

De analyses voor onderzoek naar lagere detectiegrenzen zijn uitgevoerd met behulp van een GC-MS (GC 8000 en GC-TOP; Interscience) voorzien van een cold on-column injectietechniek. De GC is uitgerust met een AS 800 monsterwisselaar, on-column injector en MD 800 (Fisons) massaspectrometrische detector.

De chromatografie is uitgevoerd op een CP Cil-5 capillaire kolom (25 m * 0.25 mm; df = 0.25 μ m) gekoppeld aan een retention gap van 2 meter met een inwendige diameter van 0.53 mm. Helium wordt gebruikt als draaggas met een constant flow van 1 ml/min, overeenkomend met een voordruk van 44 Kpa.

1.5 μ l extract wordt on-column geïnjecteerd, waarbij het volgende oventemperatuur programma wordt toegepast: begintemperatuur is 70° C gedurende 6 minuten, daarna wordt met 3° C/min geprogrammeerd naar 110° C, vervolgens met 5° C/min naar 150° C en dan met 15° C/min naar 270° C, eindtemperatuur gedurende 5 minuten.

Ionisatie is uitgevoerd onder electron impact (EI) condities bij 70 eV. De componenten zijn geanalyseerd in SIM-mode bij een m/z = 94 voor fenol en m/z = 108 voor de cresolen.

De data-acquisitie en -verwerking is uitgevoerd met het analysepakket MASSLAB (Finnigan) en het lineaire regressie softwarepakket Calwer [7].

3. VLOEISTOF EXTRAKTIE EN DERIVATISERING MET AZIJNZUURANHYDRIDE VOLGENS PrEN 12673

In dit hoofdstuk wordt het experimentele onderzoek beschreven naar de invloed van een aantal parameters zoals pH, azijnzuuranhydride concentratie en de derivatisering en extractie omstandigheden op de terugvinding van de vrije fenolen bij de conventionele vloeistof / vloeistof extractiemethode volgens PrEN 12673. Het betreft hierbij steeds de opwerking van waterige oplossingen c.q eluaten met een bekende concentratie aan fenol, o-, m- en p-cresol.

3.1 Opwerking en analyse volgens het PrEN 12673

Uitvoering

Twee verschillende matrices waaronder demiwater en vijverwater zijn na toevoeging van een bekende hoeveelheid fenolen opgewerkt en geanalyseerd conform de werkwijze van PrEN 12673; de voorbereiding is verricht inclusief de zuur-base partitie. De toevoegingen van de vrije fenolen zijn uitgevoerd door aan 200 ml watermonster steeds 1.00 ml van een standaardoplossing van fenol, o-cresol, m-cresol en p-cresol in water met een concentratieniveau van 50 µg/ml of 1.00 ml van een standaardoplossing in hexaan met een concentratie van 13 µg/ml te adderen. Tevens zijn blanco's van beide matrices meegenomen.

Resultaten

In tabel 3.1 staan de terugvindingspercentages vermeld van de analyse van fenolen in twee verschillende watermatrices uitgevoerd volgens PrEN 12673. De getallen zijn opgegeven als het gemiddelde met de daarbij behorende standaarddeviatie.

Tabel 3.1 Terugvindingspercentage van fenolen volgens PrEN 12673 in demi- en vijverwater (incl. zuur-base extractie).

	demiwater 250 µg/l*	demiwater 65 µg/l**	vijverwater 65 µg/l**
component	(n=5)	(n=2)	(n=2)
fenol	26 ± 3	38 ± 3	33 ± 5
o-cresol	32 ± 5	44 ± 5	39 ± 4
m-cresol	41 ± 7	50 ± 6	46 ± 7
p-cresol	38 ± 6	46 ± 5	42 ± 6

De toevoeging is in water (*) en in hexaan (**) uitgevoerd

Uit de resultaten kan worden geconcludeerd dat de terugvinding van de fenolen in demiwater over het gehele analytische proces varieert van 26 % voor fenol tot 50 % voor m-cresol. De terugvinding in vijverwater blijkt hiervan niet significant af te wijken. Dat fenol de minst

gunstige resultaten laat zien lijkt trendmatig. De experimenten van de toevoegingen in hexaan vertonen een iets hogere terugvinding, wat een ook in eerdere experimenten getoond beeld lijkt te bevestigen mogelijk als gevolg van micelvorming van hexaan in water.

3.2 Variatie in pH

Het is voor de derivatisering van belang dat de fenolen zoveel mogelijk in de gedissociëerde vorm in de waterlaag aanwezig zijn. Dit wordt bereikt als de pH minimaal twee pH-eenheden boven de pKa-waarde van de afzonderlijke fenolen ligt. Deze ligt voor fenol en de drie cresolen tussen de 9.8 en 10.2. Het nadelige effect van een te hoge pH-waarde is dat de reactiviteit van azijnzuuranhydride vermindert.

Uitvoering

Het effect van de pH op de terugvinding is onderzocht door de pH na de eerste extractiestap opnieuw op pH = 11.6 te brengen.

De waterige oplossingen zijn gemaakt met toevoegingen van de standaardstoffen in methanol.

Resultaten

In tabel 3.2 staan in de linker kolom de terugvindingspercentages vermeld van de PrEN-methode en in de rechterkolom die van het experiment waarbij na de eerste extractiestap de waterlaag opnieuw naar pH = 11.6 is gebracht. In de tabel staan de resultaten gebaseerd op een toevoeging van 40 µg/l. In bijlage B3.2 staan de resultaten van vier andere toevoegingen te weten 10, 20, 80 en 100 µg/l vermeld.

Tabel 3.2 Terugvinding (in %) na opnieuw aanpassen van de pH op pH = 11.6 na de eerste extractiestap

component	CEN methode 25 µg/l* (n=2)	aanpassing pH 40 µg/l* (n=2)
fenol	38,2 ± 0,4	37 ± 3
o-cresol	34 ± 3	31 ± 1
m-cresol	70 ± 6	28 ± 2
p-cresol	48 ± 2	27 ± 2

* De toevoeging is uitgevoerd als mengseloplossing in methanol

Op basis van de uitkomsten in tabel 3.2 en bijlage B3.2 kan worden vastgesteld dat een pH verhoging na de eerste extractiestap niet een hogere terugvinding van de vrije fenolen tot gevolg heeft. De opvallend hoge terugvinding van m-cresol in dit experiment kan niet worden verklaard.

3.3 Variatie in overige derivatiserings - en extractie condities

Uitvoering

Hieronder is een overzicht gegeven van de verschillende uitgevoerde experimenten, waarbij steeds verschillende variaties met betrekking tot de derivatiseringscondities zijn uitgevoerd ten opzichte van de PrEN. De toevoeging van de fenolen aan het water zijn zowel uitgevoerd met mengseloplossingen in water als hexaan; het niveau van de toevoeging is 100 µg/l. De PrEN methode is hierbij uitgevoerd zonder de zuur/base partitie.

- CEN methode : standaard werkwijze zonder de zuur/base partitie
- gelijktijdige extractie + derivatisering : de derivatiserings- en extractiestap van de PrEN methode worden tegelijkertijd uitgevoerd
- pH = 12.7 : in afwijking van de PrEN methode wordt de pH van de kaliumcarbonaat oplossing op 12.7 gebracht in plaats van 11.6
- verhoogd azijnzuuranhydride : in afwijking van de PrEN methode wordt gederiviseerd met 2*2.0 ml in plaats van 2*0.5ml azijnzuuranhydride

Resultaten

De resultaten van de variaties in de derivatisering en extractie zijn weergegeven in tabel 3.3a en 3.3b. De terugvinding van de fenolen met de PrEN methode, waarbij de toevoegingen in zowel hexaan als water zijn uitgevoerd, blijken enigszins te verschillen. Voor de toevoegingen in hexaan varieert deze tussen 61% voor p-cresol en 79% voor fenol en lijkt in vergelijking met de toevoegingen in water (resp. 44 tot 84 %) iets hoger. De standaard deviaties liggen tussen de 4 % en 12 %. Een toevoeging van de vrije fenolen in water of een met water mengbaar oplosmiddel komt echter beter overeen met het voorkomen van de componenten in praktijkmonsters. Verder wordt de terugvinding nog lager, indien de zuur-base partitie onderdeel uitmaakt van de analysemethodiek (zie tabel 3.1).

Tabel 3.3a Terugvinding van fenolen na variatie in derivatisering en extractie (zonder zuur-base partitie).

component	PrEN methode		gelijktijdige extr.+ der.	pH=12.7	verhoogd azijnzuuranh.
	100 µg/l				
	1 (n=2)	2 (n=2)	100 µg/l (n=2)	100 µg/l (n=2)	100 µg/l (n=2)
fenol	84 ± 5	56 ± 5	46 ± 5	57 ± 18	59 ± 4
o-cresol	70 ± 6	44 ± 4	34 ± 1	45 ± 13	46 ± 4
m-cresol	68 ± 5	49 ± 4	35 ± 3	49 ± 15	51 ± 3
p-cresol	66 ± 6	47 ± 4	34 ± 3	47 ± 13	50 ± 4

De toevoeging van fenolen is uitgevoerd als mengseloplossing in water

Tabel 3.3b Terugvinding van fenolen na variatie in derivatisering en extractie (zonder zuur-base partitie).

component	PrEN methode		gelijktijdige extr.+ der.
	100 µg/l		100 µg/l
	1 (n=2)	2 (n=2)	(n=2)
fenol	79 ± 12	79 ± 7	59 ± 5
o-cresol	66 ± 10	74 ± 5	48 ± 7
m-cresol	63 ± 9	68 ± 5	47 ± 7
p-cresol	61 ± 9	66 ± 5	45 ± 7

De toevoeging van fenolen is uitgevoerd als mengseloplossing in hexaan

De onderzochte variaties op de PrEN methode betreffende de derivatisering, de pH aanpassing en de extractie leiden niet tot een verbetering van de terugvinding van de toegevoegde fenolen. De gemiddelde terugvinding is circa 50%. De spreiding van het experiment met de pH, variërend van 13% tot 18%, is daarbij nog het grootst.

3.4 Conclusie

Op basis van de getoonde resultaten kan worden geconcludeerd dat een vloeistof / vloeistof extractie methode met daaraan voorafgegaan een derivatisering van de vrije fenolen in de waterlaag leidt tot recoveries van 45 tot 70 %. Ook aanpassing aan deze methode met betrekking tot de derivatiseringsomstandigheden geeft geen verbetering van de recovery tot de gewenste terugvinding van 80% of hoger.

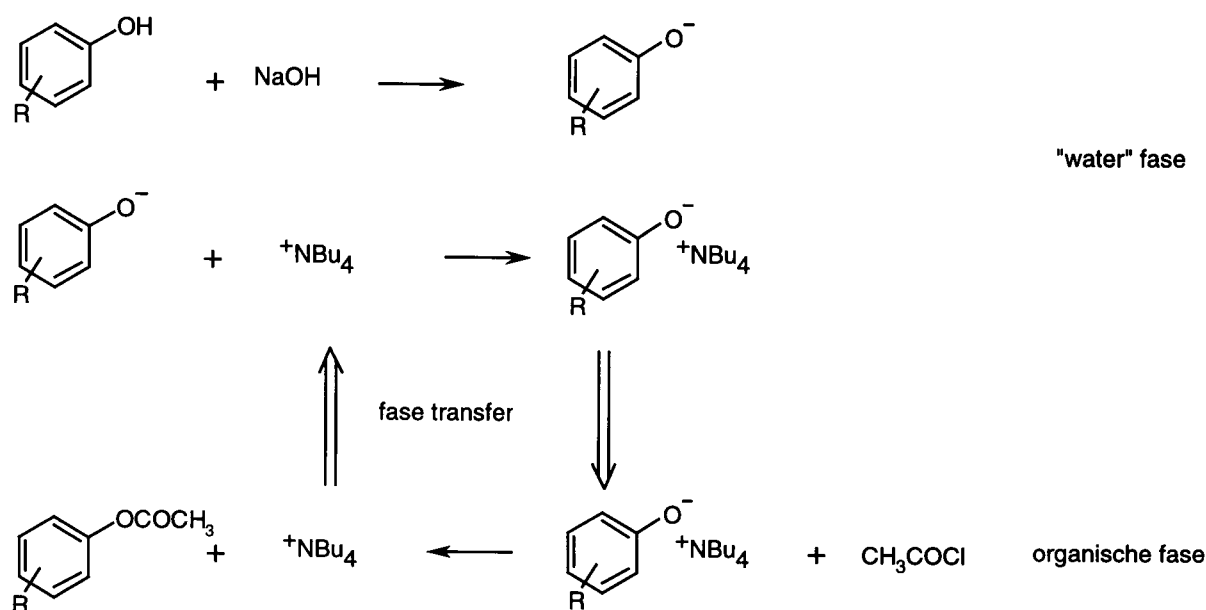
Op grond hiervan is besloten om een nieuwe analysemethode te ontwikkelen, waarbij nieuwe methodieken met betrekking tot de extractie en de derivatisering zullen worden onderzocht.

4 ON-COLUMN EXTRAKTIE EN DERIVATISERING MET ACETYLCHLORIDE

De resultaten uit het vorige hoofdstuk laten zien dat de geschiktheid van de derivatisering van de fenolen met azijnzuuranhydride twijfelachtig is. De condities waaronder de reactie moet plaatsvinden lijken nogal kritisch te liggen. Daarom is besloten onderzoek te verrichten naar een andere selectieve derivatiseringsmethode, waarbij de reactie bij voorkeur in de organische laag zou moeten plaatsvinden, om zodoende het aantal extractiestappen te verminderen.

4.1 Derivatisering met acetylchloride

Een alternatieve methode voor derivatisering van de vrije fenolen in de organische fase met acetylchloride zal worden onderzocht. De reactie betreft een acetylering van de fenolen in aanwezigheid van natriumhydroxide en een fase-transfer-katalysator, te weten tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat (TBAWS). In figuur 4.1 is de reactievergelijking weergegeven.



Figuur 4.1. Derivatisering van de fenolen met acetylchloride in de organische laag.

Het principe van de derivatisering is hierboven schematisch weergegeven: het N-butylammonium ion (de fase transfer katalysator) dient -zoals de naam al aangeeft- om het fenolaat anion over te brengen naar de organische fase; hier vindt de acetylering plaats waarbij het N-butylammonium ion weer vrijkomt en beschikbaar is om een volgend fenolaat

anion over te brengen naar de organische fase. De meest gebruikelijke oplosmiddelen voor deze reactie zijn benzeen, dichloormethaan of dioxaan

Uitvoering

De derivatisering van fenol, o-, m- en p-cresol in de organische laag is getest aan de hand van standaardoplossingen in diverse organische oplosmiddelen, te weten hexaan, ethylacetaat, dichloormethaan, toluen en aceton. De fenolen zijn gederiviseerd door aan 2 ml standaardoplossing, 300 mg natronloog-poeder, 200 mg tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat en 200 µl 50% (v/v) acetylchloride in het overeenkomstige oplosmiddel toe te voegen. Na de reactie is de oplossing gescheiden van de aanwezige vaste stoffen (natronloogpoeder en TBAWS) door deze over een glaswol propje met ca. 1 gram watervrij natriumsulfaat te leiden en in een gekalibreerd glazen 10 ml buisje op te vangen. De oplossing is tot een eindvolume van 2.0 ml aangevuld. Vervolgens is een geschikte injectiestandaard toegevoegd om de variatie in het eindvolume van de meetoplossing en het injectievolume te corrigeren. De corresponderende derivaten zijn geanalyseerd met GC-FID volgens de methode in paragraaf 2.3.3.

De derivatisering is beoordeeld aan de hand van de opbrengst van de gevormde derivaten na een reactietijd van ca. 5 minuten. De opbrengst is kwantitatief bepaald aan de hand van standaardoplossingen van de derivaten met een bekende concentratie in het geteste oplosmiddel.

Voor de gaschromatografie is in verband met het gebruik van de cold on-column injectie techniek rekening gehouden met het temperatuurprogramma in relatie tot het oplosmiddel.

Resultaten

De vrije fenolen opgelost in hexaan, blijken op basis van het experimentele onderzoek volledig te kunnen worden omgezet in de corresponderende fenylacetaten. In toluen verloopt de reactie ook, maar de opbrengst is niet altijd 100 %. De derivatisering van de fenolen in de overige geteste oplosmiddelen zoals aceton, ethylacetaat, en dichloormethaan verloopt niet goed. In deze gevallen vertonen de gaschromatogrammen zeer veel interferenties, waardoor de interpretatie niet mogelijk is.

De onderzochte derivatiseringsmethode geeft qua derivatisering veelbelovende resultaten, vervolgens dient onderzocht te worden of er een methode voor de extractie van de vrije fenolen uit water te ontwikkelen is welke goed aansluit bij deze derivatiseringsmethode en met name het oplosmiddel hexaan.

4.2 Extraktiemethode: SPE versus LLE

In de literatuur worden verschillende methoden beschreven voor de toepassing van solid phase extractie (SPE) van fenolen uit watermatrices [8-10]. Daarnaast zijn er applicaties van leveranciers van SPE-kolommetjes beschikbaar voor de extractie van deze analyt-matrix combinatie. Op basis van deze informatie en de voordelen die een SPE extractiemethode in

vergelijking met een vloeistof-vloeistof extractiemethode heeft op het punt van herhaalbaarheid, gebruikersvriendelijkheid, geschiktheid voor automatisering en verminderd gebruik van oplosmiddelen, is besloten in eerste instantie een analysemethode met SPE te ontwikkelen.

Het principe van deze methode is dat een wateroplossing met fenolen over een SPE-kolommetje wordt geleid waarbij de fenolen tijdens de extractiefase uit het water worden gebonden op een geschikte adsorbens. Na de extractie wordt het adsorbens in het kolommetje gewassen en gedroogd en worden de fenolen vervolgens gedesorbeerd middels een geschikt organisch elutiemiddel.

Uitvoering

De applicatie van Mallinkrodt Baker beschrijft een extractie van vrije fenolen uit water met behulp van styreen divinybenzeen polymeer (afgekort SDB-1) SPE-kolommetjes. Het adsorptie materiaal heeft als groot voordeel dat het vrijwel inert is voor extreme watermatrices zoals een zeer hoge of lage zuurgraad.

Aan circa 100 ml watermonster wordt 0.6 gram natriumchloride toegevoegd en dit wordt met een verdunde salpeterzuuroplossing tot een pH = 2 gebracht. De wateroplossingen met een bekende uitgangskoncentratie fenolen worden gemaakt door additie van 1.00 ml van een standaardoplossing van fenolen in aceton. De wateroplossing wordt alvorens zout en zuur toe te voegen eerst met 1 N natriumhydroxide oplossing op pH = 11.5 gebracht teneinde er zeker van te zijn dat de fenolen volledig zijn opgelost.

Na aanzuring wordt 900 ml wateroplossing met behulp van een SPE-kolomprocessor en toebehoren over een SDB-1 SPE-kolommetje geleid. De kolommetjes worden vooraf geconditioneerd met 2 ml milliQ-water, 2*2 ml methanol, 2 ml milliQ-water en 2 ml aangezuurd milliQ-water (pH < 2) in de genoemde volgorde. De extractie wordt uitgevoerd met een flow van maximaal 10 ml/min. Na de extractie wordt het kolommetje gewassen met circa 5 ml aangezuurd milliQ-water (pH < 2) en met stikstof gedroogd gedurende circa 5 minuten. Na de extractie worden de kolommetjes 20 minuten gecentrifugeerd bij 7500*g en geëluëerd met 5 ml aceton.

De vloeistof / vloeistof extraktiemethode is uitgevoerd door 900 ml wateroplossing met een bekende concentratie fenolen te extraheren met tweemaal 90 ml hexaan.

De fenolen zijn zowel bij de SPE als de LLE extractie niet gederivatiseerd. De acetonextracten met de fenolen zijn geanalyseerd met GC-FID en gekwantificeerd tegen externe standaardoplossingen van fenolen in aceton. De m- en p-cresol konden niet op basislijnniveau gescheiden worden en zijn derhalve als somparameter opgegeven.

Resultaten

De vergelijking van de resultaten van de vloeistof extractie met de SPE extractie staan vermeld in tabel 4.1.

Tabel 4.1 *Vergelijking van LLE en SPE (opwerking van 900 ml water) in termen van de terugvinding in %.*

component	LLE 45 µg/l* (n=2)	LLE 155 µg/l* (n=2)	SPE 45 µg/l* (n=2)	SPE 155 µg/l* (n=1)
fenol	0	0	69 ± 5	71
o-cresol	5.10 ± 0.10	6.90 ± 0.08	99 ± 3	112
m/p cresol	0.80 ± 0.06	3.1 ± 0.2	100 ± 5	113

* De toevoeging van fenolen is met een standaardoplossing in aceton uitgevoerd

De resultaten van de SPE methode voor fenolen laten zien dat deze goed voldoet met als kanttekening dat de component fenol mogelijk ten gevolge van doorbraak een lagere terugvinding te zien geeft. In vervolggexperimenten is om die reden steeds gewerkt met 100 ml wateroplossingen.

De slechte recoveries van de vloeistof extractie methode met hexaan bleken voor een aanzienlijk deel te zijn veroorzaakt door vervluchtiging van de vrije fenolen tijdens de indampfase. Een apart onderzoek naar de indampstap heeft uitgewezen dat fenol en de cresolen in hexaan voor circa 30 % respectievelijk 60 % worden teruggevonden. In aceton zijn de terugvindings-percentages groter dan 90%. De resultaten van dit onderzoek zijn in bijlage B4.1 weergegeven.

Indampverliezen van fenylacetaten mbv. Kuderna Danish danwel zonder stikstof zijn niet geconstateerd; bij indampen mbv. stikstof kunnen kleine verliezen optreden (bijlage B4.1).

4.3 Test van verschillende SPE kolommetjes

Er is onderzoek uitgevoerd naar SPE-kolommetjes, waarmee de vrije fenolen uit de waterlaag kunnen worden geëxtraheerd en vervolgens kunnen worden gedesorbeerd met hexaan, waarin de uiteindelijke derivatisering met acetylchloride kan plaatsvinden. Hiervoor zijn de volgende kolommetjes getest:

- 1) ENVICARB (= koolstof), 6 ml kolommetje van SUPELCO
- 2) C₁₈ high hydrophobic, 3 ml kolommetje van Mallinkrodt-Baker
- 3) C₈, 3 ml kolommetje van Mallinkrodt- Baker
- 4) C₁₈-OH (OH gemodificeerd C₁₈), 3 ml kolommetje van Varian
- 5) SDB-1, 3 ml kolommetje van Mallinkrodt-Baker

Geen van de bovenstaande kolommetjes blijken een positief resultaat op te leveren. De oorzaak kan zijn dat de fenolen niet uit de waterlaag worden gebonden en/of dat de geadsorbeerde fenolen niet gedesorbeerd kunnen worden met hexaan.

De vrije fenolen, opgelost in hexaan, blijken op basis van het onderzoek in paragraaf 4.1 volledig te kunnen worden omgezet in de corresponderende fenylacetaten door een acylering met acetylchloride. Deze reactie verloopt echter niet in een alternatief oplosmiddel zoals aceton, ethylacetaat, en dichloormethaan. Het zijn met name deze oplosmiddelen waarmee de desorptie van de fenolen op een SDB-1 SPE kolommetje wel goed verloopt.

4.4 On-column derivatisering

In het vervolgonderzoek is het gebruik van SDB-1 SPE-kolommetjes als uitgangspunt gekozen voor de extractie van de vrije fenolen uit de waterlaag. Gelet op de doelstelling de fenolen bij voorkeur als de corresponderende fenylacetaten in een (matig) apolair oplosmiddel te kwantificeren is geprobeerd deze twee analysestappen, te weten de desorptie van de vrije fenolen die gebonden zijn aan het SDB-1 adsorbens en de daaropvolgende derivatisering van de stoffen met acetylchloride, in één handeling te integreren.

Uitvoering

Na extractie van 100 ml wateroplossing met een bekende concentratie vrije fenolen, conform paragraaf 4.3, is circa 150 mg natronloog-poeder en circa 75 mg TBAWS op het gedroogde SPE kolommetje gebracht. Daarna is een x-aantal ml acetylchloride in hexaan (5% v/v) door het kolommetje geleid. Het opgevangen eluaat is tot een bekend volume ingedampt en geanalyseerd op het gehalte fenylacetaten. Bij deze methode zijn diverse parameters onderzocht op de invloed van het terugvindingspercentage van de vrije fenolen. De onderzochte parameters zijn:

- 1) hoeveelheid natronloog-poeder en TBAWS en de volgorde van toevoeging,
- 2) hoeveelheid elutiemiddel (acetylchloride in hexaan 5% v/v),
- 3) reactie - of elutietijd en
- 4) volume van de wateroplossing variërend van 100 ml tot 1000 ml.

4.4.1 SPE en on-column derivatisering met acetylchloride

In tabel 4.2 staan de terugvindingspercentages vermeld van de extractie van de vier fenolen in water met SPE gevolgd door een gecombineerde desorptie en derivatisering.

De getallen in de eerste kolom zijn het resultaat van een off-line derivatisering. Hierbij zijn de vrije fenolen geëxtraheerd met 2 * 2 ml toluen. Het verzamelde toluenextract is tot 2 ml ingedampt waarna vervolgens 300 mg natronloog poeder, 200 mg TBAWS en 200 µl acetylchloride oplossing (50% v/v in toluen) is toegevoegd. De gevormde fenylacetaten zijn tegen een standaardoplossing gemeten. De getallen in de overige kolommen geven de resultaten van de on-line derivatisering volgens de methodiek in paragraaf 4.4 weer.

Tabel 4.2 *De invloed van verschillende derivatisering/elutie methoden op de terugvinding in % (concentratie fenolen 500 µg/l)*

derivatisering ml elutiemiddel	off-line deriv. 2*2 ml toluen	on-line deriv. 2*2 ml toluen	on-line deriv. 2*2 ml hexaan	on-line deriv. 2*2 ml hexaan*
component				
fenol	79	78	73	93
o-cresol	73	60	55	79
m-cresol	72	91	75	89
p-cresol	74	84	82	92

* De 1^e 2 ml fractie 10 minuten in het SPE-kolommetje laten intrekken in plaats van 2 minuten

De resultaten tonen aan dat on-line derivatisering met 5% (v/v) acetylchloride in hexaan, waarbij de eerste 2 ml fractie 10 minuten in het SDB-1 adsorbens is ingetrokken, de grootste terugvinding van de vier fenolen afzonderlijk oplevert. De terugvinding ligt tussen 79% voor o-cresol tot 93% voor fenol. Verder blijkt uit de experimenten met toluen dat de desorptie van de fenolen redelijk goed gaat en dat de derivatisering in toluen nagenoeg net zo goed verloopt als in hexaan. Op grond van de hoogte van de terugvinding is in het vervolgonderzoek gekozen voor de condities van het experiment van de laatste kolom in bovenstaande tabel.

4.4.2 Optimalisatie van on-column derivatisering

Voor het onderzoek naar optimale reactieomstandigheden in het SDB-1 SPE-kolommetje is gekeken naar het effect van de hoeveelheid natronloog poeder en TBAWS alsmede de volgorde van de toevoeging van deze stoffen boven op het adsorbens. Hiertoe zijn de condities van het experiment met de hoogste terugvindingspercentages uit de vorige paragraaf als uitgangspunt gekozen.

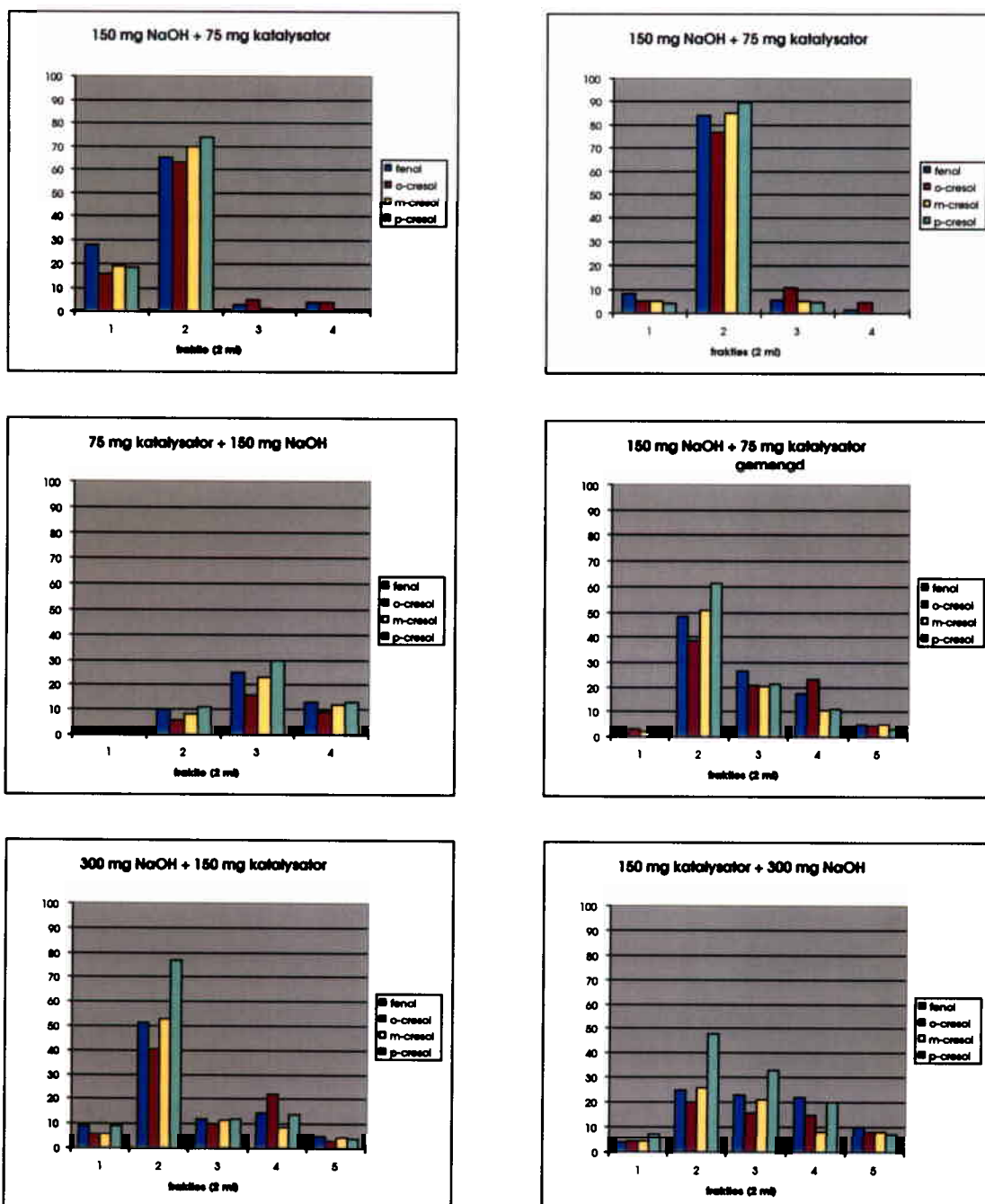
Tabel 4.3 *Optimalisatie van on-column derivatisering uitgedrukt in de terugvinding in % (concentratie fenolen 500 µg/l).*

*) volgorde reagentia	1) 150mg NaOH	1) 75mg TBAWS	150mg NaOH +	1) 300 mg NaOH	1) 150mg TBAWS	
	2) 75 mg TBAWS	2) 150mg NaOH	75mg TBAWS	2)150 mg	2) 300 mg NaOH	
	1	2	gemengd	TBAWS		
component						
fenol	100	100	48	94	87	74
o-cresol	88	98	32	86	78	56
m-cresol	91	96	43	83	79	59
p-cresol	94	99	54	96	112	108

*) De cijfers 1) en 2) impliceren de volgorde van de toevoeging van de hulpstoffen op het SDB-adsorbens

In tabel 4.3 is een overzicht van de terugvinding van de vrije fenolen van het gehele analytische proces weergegeven waarbij de vergelijking is gebaseerd op elutie van in totaal 8 ml 5% (v/v) acetylchloride in hexaan. In figuur 3 (en bijlage B4.3) is het elutiepatroon van de fenylacetaten te zien nadat het eluaat in fracties van 2 ml is opgevangen en afzonderlijk is geanalyseerd.

Tabel 4.3 (en bijlage B4.3) tonen aan dat de terugvinding van de vrije fenolen van het experiment, waarbij allereerst 150 mg NaOH-poeder en vervolgens 75 mg TBAWS is toegevoegd op het SDB-adsorbens van het SPE kolommetje, het grootst is.



Figuur 4.2. Elutieprofielen van fenylacetaten bij on-column derivatisering bij verschillende condities volgens tabel 4.3.

Uit het elutiepatroon (figuur 4.2) blijkt bovendien, dat het merendeel van de gevormde derivaten reeds na circa 4 ml geëlueerd is. Het is klaarblijkelijk van belang, zoals uit de elutiepatronen te zien is, op welke wijze de hulpstoffen worden toegevoegd. Indien de hulpstoffen gemengd worden, smeert de elutie veel verder uit en in omgekeerde volgorde van de hulpstoffen is de opbrengst veel lager (32-48%). Een eenduidige verklaring kan hiervoor niet gegeven worden. Dat de resultaten minder gunstig zijn indien tweemaal zoveel hulpstoffen gebruikt worden, kan mogelijk verklaard worden doordat de weglengte waarover de reactie moet plaatsvinden groter is.

4.4.3 Test op doorbraak

De doorbraak van de te extraheren componenten is onderzocht in een experiment waarbij vier waterige oplossingen met een verschillende volume volgens de aanbevolen werkwijze uit de vorige paragraaf geëxtraheerd zijn over een SDB-SPE kolommetje. Aan de waterige oplossingen zijn vooraf steeds dezelfde hoeveelheden fenolen geaddeerd (de eindconcentratie in de waterige oplossingen zijn hierdoor verschillend). In tabel 4.4 staan de terugvindingspercentages vermeld.

Tabel 4.4 Terugvinding (in %) van de analysemethode in relatie tot extractievolume.

extractievolume	100 ml	500 ml	750 ml	1000 ml	(1000 ml)*
fenolconcentratie	1000 µg/l (n=2)	200 µg/l (n=2)	133 µg/l (n=2)	100 µg/l (n=2)	100 µg/l (n=1)
component					
fenol	89 ± 3	75 ± 2	65 ± 2	61 ± 1	21
o-cresol	84 ± 6	80 ± 0.1	80 ± 1	83 ± 1	0.6
m-cresol	90 ± 5	86 ± 1	87 ± 1	90 ± 0.5	0,0
p-cresol	84 ± 6	81 ± 2	84 ± 5	86 ± 4	1.9

* Extractie over een tweede SPE-kolommetje

De resultaten in tabel 4.4 laten zien dat de drie cresolen na extractie van maximaal 1 liter water niet doorbreken. Voor fenol wordt echter een verlies van circa 20 % gevonden. Dat het hierbij om doorbraak gaat bewijzen de uitkomsten in het laatste kolommetje van de tabel. Hierin staan de terugvindingspercentages van de fenolen van de 1000 ml wateroplossing die voor de tweede keer zijn geëxtraheerd. Deze resultaten bevestigen eerdere resultaten zoals weergegeven in tabel 4.1.

4.5 Conclusie

De integratie van de extractiestap van de vrije fenolen in water met SPE en de derivatiseringstap van deze componenten met acetylchloride in hexaan blijkt door toepassing van een on-column derivatiseringstap mogelijk te zijn. De gehele analyseprocedure levert goede terugvindingspercentages op. Voor de analyten, opgelost in demiwater, worden recoveries van 80% of hoger gevonden. Op grond van deze resultaten is besloten om de methode verder te valideren.

5. VALIDATIE VAN DE ANALYSEMETHODE

In dit hoofdstuk wordt de validatie van de ontwikkelde analysemethode voor de gehaltesbepaling van de fenolen in eluaten nader onderzocht. Hiervoor zijn de volgende prestatiekenmerken getoetst: concentratiewerkgebied, herhaalbaarheid, bepalingsgrens, matrix invloed en de consistentie van één of meerdere interne standaardstoffen.

5.1 Beschrijving analysemethode

De extractie en on-column derivatisering van fenolen in watermonsters wordt als volgt uitgevoerd. 100 ml watermonster wordt, na toevoeging van één of meerdere interne standaardstoffen (3,4-dimethylfenol) en 0.6 gram natriumchloride, aangezuurd to pH <2. Een styreendivinylnbenzeen polymeer (SDB-1) SPE-kolommetje wordt geconditioneerd met methanol, water en aangezuurd water (pH < 2). Het watermonster wordt geëxtraheerd over het SPE-kolommetje en na een wasstap met aangezuurd demiwater wordt het kolommetje gedroogd met stikstof. Vervolgens worden, na toevoeging van natronloogpoeder en tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat als katalysator en elutie met 5% (v/v) acetylchloride in hexaan, de fenolen gederiviseerd op het SPE-kolommetje. Het extract wordt na toevoeging van 2-chloorfenylacetaat als injectie standaard met GC-FID of GC-MS geanalyseerd op de gehalten fenylacetaten. In bijlage 3 is een volledige beschrijving gegeven van de analysemethode.

5.2 Werkgebied en terugvinding

Ter beoordeling van de concentratie afhankelijkheid en de terugvinding van de methode is een aantal 100 ml waterige oplossingen met verschillende toevoegingen van fenolen opgewerkt en geanalyseerd volgens de standaard werkwijze. In tabel 5.1 is de terugvinding van de fenolen zonder correctie voor de interne standaard weergegeven.

Tabel 5.1 Concentratie afhankelijkheid en terugvinding van de analysemethode (terugvinding in %).

component	25 µg/l	50 µg/l	200 µg/l (n=2)	500 µg/l	1000 µg/l	25 mg/l (n=2)
fenol	81	79	84	77	86	73
o-cresol	75	78	85	67	84	83
m-cresol	113	105	85	81	89	81
p-cresol	107	105	87	87	93	86

Op basis van de uitkomsten kan worden vastgesteld dat de terugvinding van de fenolen ligt tussen 70 en 110 % binnen het onderzochte concentratiegebied van 25 µg/l tot 25 mg/l. Er bestaat geen concentratie afhankelijkheid van de fenolen over deze concentratierange en de methode is lineair in dit werkgebied.

5.3 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is vastgesteld op basis van 3x standaarddeviatie van de individuele waarneming uit een analysereeks van vijf blanco 100 ml wateroplossingen. In tabel 5.2 staan de resultaten hiervan weergegeven.

Tabel 5.2 Aantoonbaarheidsgrens (in µg/l) op basis van vijf blanco analyses.

blanco analyse (n=5)	fenol	o-cresol	m-cresol	p-cresol
aantoonbaarheidsgrens (µg/l)	1.8	1.2	0.3	0.8
bepalingsgrens (µg/l)	6.2	4.1	1.0	2.7

De aantoonbaarheidsgrens van de fenolen varieert in bovenstaand tabel van 0.3 µg/l voor m-cresol tot 1.8 µg/l voor fenol. Deze grens kan mogelijk nog verlaagd worden door de toepassing van groot volume (PTV) injectie of massaspektrometrische detectie, afhankelijk of de storingen veroorzaakt worden door interferenties of door contaminatie tijdens de opwerking (zie hoofdstuk 5.10).

5.4 Matrix invloed

Om een indicatie te krijgen van de invloed van de matrix in het eluaat op de terugvinding van de vier fenolen zijn twee verschillende grond-matrices en een schone matrix getest, bij een concentratie van 500 µg/l. In tabel 5.3 is de terugvinding van de fenolen zonder correctie voor de interne standaard weergegeven (in bijlage B5.3 zijn de individuele waarnemingen vermeld).

De terugvinding in OECD- en grondmatrices liggen tussen 70 en 85 % en lijken ten opzichte van de terugvinding in een schone matrix (78 tot 89 %) enigzins lager uit te vallen. Op grond van de statistische beschouwing, waarbij gebruik is gemaakt van de t-toets met gepoolde varianties, kan worden geconcludeerd dat er geen significante verschillen zijn aangetoond ten gevolge van matrix effecten. De terugvinding van de componenten fenol, o- en p-cresol in de OECD-matrix zijn ten opzichte van de schone matrix wel kritiek.

De standaarddeviatie van de duplometing in de schone matrix lijkt wat beter te zijn dan die van de onderzochte grondmatrices.

Tabel 5.3 *Invloed van enkele matrices op de terugvinding van fenolen (in %). (concentratie fenolen 500 µg/l).*

matrix	demi water (n=2)	OECD (n=4)	grond (n=2)
component			
fenol	78.4 ± 0.5	70 ± 7	72 ± 4
o-cresol	80.3 ± 0.6	63 ± 7	72 ± 5
m-cresol	89.0 ± 0.0	77 ± 6	83 ± 4
p-cresol	89.7 ± 0.5	82 ± 3	85 ± 3

5.5 Interne standaarden

De toepasbaarheid van een drietal dimethylfenolen, te weten 2,5-dimethylfenol (2,5-DMF), 3,5-dimethylfenol (3,5-DMF) en 3,4-dimethylfenol (3,4-DMF) als interne standaarden bij deze methode is nader onderzocht. Hiertoe zijn aan drie verschillende matrices, namelijk leidingwater, grondperkolaat en zandperkolaat, naast fenol en de cresolen, deze drie dimethylfenolen toegevoegd.

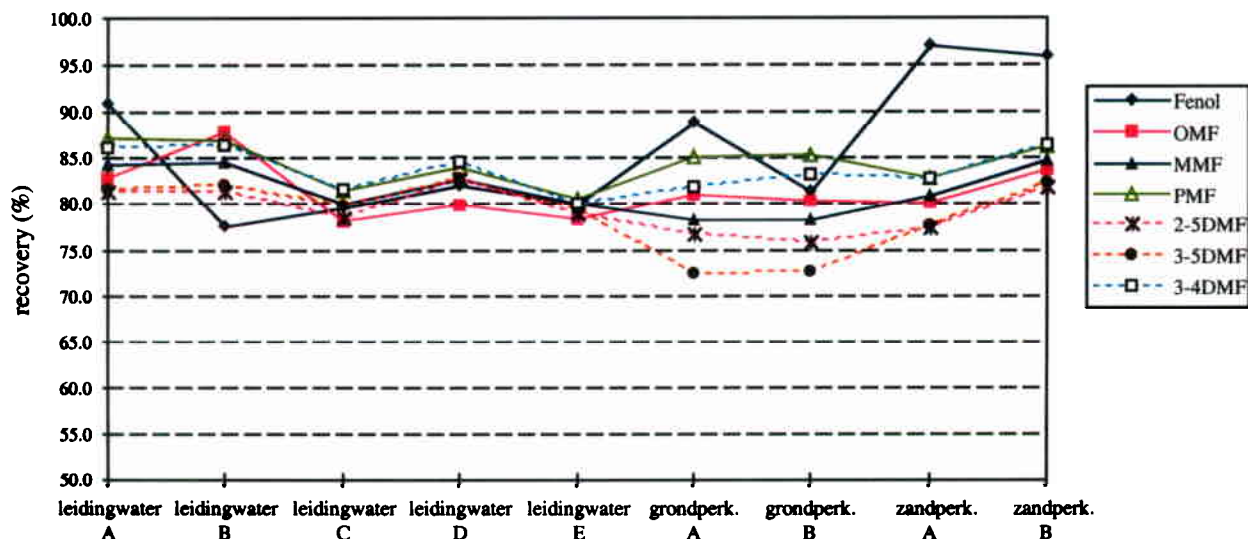
In tabel 5.4 zijn de recoveries van de verschillende componenten weergegeven en in figuur 5.1 zijn de individuele monsters grafisch uitgezet .

Tabel 5.4 *Recovery (in %) van fenol, cresolen en dimethylfenolen in verschillende matrices.*

matrix	fenol	o-cresol	m-cresol	p-cresol	2,5-DMF	3,5-DMF	3,4-DMF
leidingwater (n=5)	82 ± 5	81 ± 4	82 ± 2	84 ± 3	81 ± 2	81 ± 1	84 ± 3
grondperkolaat (n=2)	85 ± 5	81 ± 0.5	78 ± 0.1	85 ± 0.1	76 ± 0.6	72 ± 0.2	82 ± 0.9
zandperkolaat (n=2)	97 ± 1	82 ± 2	83 ± 3	85 ± 2	80 ± 3	80 ± 3	85 ± 2
gemiddelde (n=9)	86 ± 7	81 ± 3	82 ± 3	84 ± 2	79 ± 3	79 ± 4	84 ± 2

De recovery ligt voor alle componenten rond de 80 %. Uit figuur 4 blijkt, dat de beoogde dimethylfenolen als interne standaarden zich vrijwel hetzelfde gedragen als met name de cresolen. Fenol vertoont een in sommige monsters, met name bij de perkolaten soms een wat afwijkend beeld.

Dit betekent dat in principe alle dimethylfenolen bruikbaar zouden zijn als interne standaard. Tevens houdt dit in dat deze methode ook geschikt is voor de analyse van dimethylfenolen.



Figuur 5.1. Onderlinge verhouding van componenten en mogelijke interne standaarden in verschillende monsters.

5.6 Lange termijn reproduceerbaarheid

In vervollexperimenten, zoals beschreven in paragraaf 5.7 en 5.8 zijn fenol, de cresolen en dimethylfenolen steeds toegevoegd, waaruit een indruk verkregen kan worden van de lange termijn reproduceerbaarheid. De resultaten hiervan staan in tabel 5.5 (en bijlage B5.5).

Tabel 5.5 Lange termijn reproduceerbaarheid van fenolen, cresolen en dimethylfenolen (uitgedrukt als recovery in %) in verschillende matrices (uit houdbaarheidsonderzoeken).

N.B. de dimethylfenolen zijn niet onderworpen aan de houdbaarheidsproeven, maar zijn direkt voor analyse toegevoegd.

parameter	fenol (n=22)	o-cresol (n=22)	m-cresol (n=22)	p-cresol (n=22)	2,5-DMF (n=34)	3,5-DMF (n=34)	3,4-DMF (n=34)
gemiddelde recovery	83	80	82	82	79	80	82
stand.dev.	5.6	2.9	2.3	3.3	2.7	3.4	3.2

De lange termijn reproduceerbaarheid voor alle componenten ligt rond de 80 % met een goede standaard deviatie van 2 tot 6 %.

5.7 Houdbaarheid

Ten einde de houdbaarheid van fenolen in verschillende matrices te bepalen zijn de fenolen op een niveau van 200 µg/l gespiked aan leidingwater, grond- en zandperkolaat. Een deel van deze oplossingen is direkt na de spiking, respectievelijk na 7 en na 14 dagen bewaartijd bij 20 °C, in duplo geanalyseerd. Hierna is gecorrigeerd voor de blanco matrix. In tabel 5.6 zijn de terugvinding van de fenolen, na correctie voor blanco matrix en zonder correctie voor de interne standaard, weergegeven.

Tabel 5.6 Recovery (in %) van fenolen in verschillende matrices na een bewaartijd van 0, 7 en 14 dagen bij 20 °C (conc. fenolen 200 µg/l).

	bewaartijd dagen	fenol (n=2)	o-cresol (n=2)	m-cresol (n=2)	p-cresol (n=2)
matrix					
leidingwater	0	84 ± 9	85 ± 4	84 ± 0.3	87 ± 0.2
grondperkolaat	0	85 ± 5	81 ± 0.5	78 ± 0.1	85 ± 0.1
zandperkolaat	0	97 ± 1	82 ± 2	83 ± 3	85 ± 2
leidingwater	7	26 ± 3	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.01
grondperkolaat	7	27 ± 0.6	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.0
zandperkolaat	7	19 ± 3	73 ± 1	35.4 ± 0.1	5.3 ± 0.1
leidingwater	14	1.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.0
grondperkolaat	14	1.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.0
zandperkolaat	14	1.4 ± 0.0	64 ± 2	13.8 ± 0.5	0.4 ± 0.0

Uit tabel 5.6 blijkt dat fenolen in leidingwater en grondperkolaat een houdbaarheid van minder dan 7 dagen hebben bij 20 °C, in de meeste matrices zijn de cresolen vrijwel volledig verdwenen na 7 dagen van ca. 85 % naar 0 % en voor fenol van 84 % naar 26 %.

In percolaten van zand is de afname beduidend geringer voor met name de cresolen, namelijk van 82 naar 73 % voor o-cresol, van 83 % naar 35 % voor m-cresol en van 85 naar 5 % voor p-cresol; voor fenol is de afname groter (van 97 naar 19%). Voor o-cresol is de terugloop in redement in de tweede week van 73 naar 69 % in zandperkolaat, opnieuw 9 % absoluut.

Dit verschil kan niet verklaard worden door een verschil in zuurgraad. De drie matrices hebben allen een pH tussen 6 en 8. De geleidbaarheid, een maat voor de zoutbelasting, is voor zandperkolaat echter 6 tot 9 maal lager dan die van de andere twee matrices.

5.8 Invloed temperatuur en pH op de conservering van monsters

Om inzicht te verkrijgen in mogelijke conserveringsmethoden zijn opnieuw fenolen gespiked aan leidingwater op hetzelfde niveau van 200 µg/l als bij de matrix houdbaarheidsproef en bewaard bij 4 en 20 °C. Van de bij 4 °C bewaarde oplossingen, was er één oplossing pH ongestuurd en één oplossing was vooraf pH gestuurd met HNO₃ tot pH=2; de derde oplossing was vooraf pH gestuurd met NaOH tot pH=12. De pH ongestuurde oplossingen zijn steeds voor een deel na resp. 6 uur en na 1, 2, 3 en 7 dagen geanalyseerd op fenolen; de overigen alleen op 3 en 7 dagen. Doordat bij analyse bleek dat door koeling en mogelijk ook door pH sturing de houdbaarheid verlengd werd, zijn deze oplossingen ook na 51 dagen geanalyseerd op fenolen.

Tabel 5.7 *Recovery (in %) van fenolen na conservering en verschillende bewaartijden bij 20 °C en/of 4 °C (conc. fenolen 200 µg/l).*

condities	bewaartijd dagen	fenol	o-cresol	m-cresol	p-cresol
startpunt t=0	0	80	78	80	82
20 °C en pH ongestuurd	0.25	82	80	83	84
20 °C en pH ongestuurd	1	80	78	82	83
20 °C en pH ongestuurd	2	82	81	83	84
20 °C en pH ongestuurd	3	78	82	80	73
20 °C en pH ongestuurd	7	1	0	0	0
4 °C en pH ongestuurd	0.25	80	78	80	81
4 °C en pH ongestuurd	1	80	77	80	81
4 °C en pH ongestuurd	2	80	77	79	80
4 °C en pH ongestuurd	3	84	80	84	84
4 °C en pH ongestuurd	7	77	76	79	77
4 °C en pH ongestuurd	51	0	0	0	0
4 °C en pH = 2	3	84	80	83	84
4 °C en pH = 2	7	86	84	86	85
4 °C en pH = 2	51	80	78	82	80
4 °C en pH = 12	3	81	77	81	81
4 °C en pH = 12	7	77	76	80	78
4 °C en pH = 12	51	83	80	84	82

Bij alle analyses zijn de gehalten gecorrigeerd voor de blanco matrix . In tabel 5.7 is de terugvinding van de fenolen zonder correctie voor de interne standaard weergegeven.

De fenolen blijken tot 3 dagen houdbaar bij 20 °C zonder conservering; na 7 dagen zijn alle fenolen verdwenen (analoog aan tabel 5.6). Koeling tot 4 °C verlengt de houdbaarheid tot 7 dagen, maar na 51 dagen zijn ook hier alle fenolen verdwenen.

Monsters welke gekoeld zijn op 4 °C en geconserveerd zijn door de pH vooraf op pH12 of pH2 te brengen, blijken over een periode tot minstens 51 dagen goed houdbaar te zijn.

5.9 Doorslag bij overmaat fenolen

Omdat bij uitloogproeven concentraties tot 20 mg/l kunnen voorkomen zijn in matrices van leidingwater, grond- en zandperkolaat fenolen gespiked tot 25 mg/l. Deze zijn opgewerkt over SPE-kolommen. De doorloop van de SPE-kolommen is opgevangen en over een tweede SPE-kolom gebracht. Zowel de eerste als de tweede SPE-kolom zijn vervolgens met behulp van de ontwikkelde methode opgewerkt en geanalyseerd.

In tabel 5.8 is de terugvinding van de fenolen, met correctie voor de blanco matrices en zonder correctie voor de interne standaard, weergegeven.

Tabel 5.8 Doorslagtest bij hoge fenolconcentratie (25 mg/l) over een eerste en een tweede SPE-kolom (recovery in %).

matrix	SPE-kolom	fenol (n=2)	o-cresol (n=2)	m-cresol (n=2)	p-cresol (n=2)
leidingwater	1 ^e	73 ± 1	83 ± 2	81 ± 1	86 ± 2
leidingwater	2 ^e	12 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
grondperkolaat	1 ^e	80 ± 0	87 ± 1	83 ± 1	88 ± 1
grondperkolaat	2 ^e	12 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
zandperkolaat	1 ^e	75 ± 1	85 ± 0	83 ± 1	88 ± 0
zandperkolaat	2 ^e	12 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

De cresolen geven bij deze drie verschillende matrices geen doorslag op een niveau van 25 mg/l per component en bij 100 mg/l fenolen totaal. Fenol geeft voor alle matrices een doorslag van 12 % absoluut.

5.10 Prestatiekenmerken bij analyse met GC-MS

5.10.1 Aantoonbaarheidsgrens

De streefwaarde voor de aantoonbaarheidsgrens voor fenolen is 0.1 µg/l. Analyse met GC-FID geeft een aantoonbaarheidsgrens van 0.3 µg/l voor m-cresol tot 1.8 µg/l voor fenol (tabel 5.2). Theoretisch gezien is het mogelijk om met large volume injectie en/of GC-MS de aantoonbaarheidsgrens te verlagen. Gezien het feit dat verschillende fenolen bij de analyse met GC-FID gestoord worden, is ervoor gekozen om verder onderzoek te doen met GC-MS.

De aantoonbaarheidsgrens voor GC-MS is vastgesteld op basis van de standaarddeviatie van vijf individuele waarneming uit een analysereeks van vijf blanco 100 ml wateroplossingen. In tabel 5.9 staan de resultaten hiervan weergegeven.

Tabel 5.9 Aantoonbaarheidsgrens met GC-MS analyse op basis van vijf blanco watermonsters.

blanco analyse (n=5)	fenol	o-cresol	m-cresol	p-cresol
Aantoonbaarheidsgrens (µg/l)	0.1	0.1	0.1	0.3
Bepalingsgrens (µg/l)	0.3	0.3	0.5	1

De aantoonbaarheidsgrens van de fenolen is 0.1 µg/l, behalve voor p-cresol welke 0.3 µg/l is.

5.10.2 Terugvinding

De terugvinding bij analyse met GC-MS is vastgesteld op basis van een vijfvoudige analyse op drie concentratieniveaus in water en een procedure blanco.

In tabel 5.10 (en bijlage B5.10) staat de terugvinding van de fenolen, met correctie voor de blanco en zonder correctie voor de interne standaard, weergegeven.

Tabel 5.10 Terugvinding (in %) bij GC-MS analyse (n=5).

concentratie fenolen (µg/l)	fenol (%)	o-cresol (%)	m-cresol (%)	p-cresol (%)	2,5-DMF (%)	3,5-DMF (%)	3,4-DMF (%)
0.1	94 ± 61	43 ± 14	1300 ± 50	70 ± 52	43 ± 6	64 ± 13	48 ± 11
1.0	91 ± 9	65 ± 5	200 ± 6	71 ± 9	57 ± 4	69 ± 4	60 ± 6
10	97 ± 5	74 ± 2	89 ± 2	82 ± 4	61 ± 2	72 ± 2	65 ± 5

De terugvinding ligt tussen 65 en 97 % op een concentratieniveau van 1 tot 10 µg/l; bij 0.1 µg/l loopt de terugvinding van o-cresol terug tot 43 %. De hoge terugvinding van m-cresol op laag niveau wordt veroorzaakt door contaminatie.

5.10.3 Invloed van matrix effecten

Om een indicatie te krijgen van de invloed van de matrix in het eluaat op de terugvinding van de fenol, de cresolen en dimethylfenolen zijn eluaten van twee verschillende grondmonsters in vijfvoud onderzocht. De eluaten zijn gespiked op een concentratie van 100 µg/l. In tabel 5.11 (en bijlage B5.11) staat de terugvinding van de fenolen zonder correctie voor de interne standaard weergegeven.

Tabel 5.11 Invloed matrix effecten op recovery (in %) bij GC-MS analyse (n=5).

matrix	fenol (%)	o-cresol (%)	m-cresol (%)	p-cresol (%)	2,5-DMF (%)	3,5-DMF (%)	3,4-DMF (%)
grondperkolaat	91 ± 5	80 ± 4	86 ± 3	88 ± 5	72 ± 4	62 ± 2	79 ± 4
zandperkolaat	100 ± 5	86 ± 4	90 ± 3	72 ± 4	80 ± 4	78 ± 2	82 ± 3

De recoveries liggen voor de twee eluaten voor de verschillende fenolen tussen 72 en 100 %. Opvallend is dat de recovery voor o-cresol beter is dan in leidingwater (tabel 5.10). Er is geen effect van de matrix op de recovery van de fenolen.

6 CONCLUSIES

Vloeistof extractie en derivatisering met azijnzuuranhydride volgens PrEN 12673

De PrEN-methodiek voor de bepaling van chloorfenolen in water via een zuur-base partitie, derivatisering met azijnzuuranhydride en extractie van de gevormde fenylacetaten met hexaan levert onvoldoende rendement op voor fenolen. Ook de onderzochte variaties op de PrEN methode betreffende de derivatisering, de pH aanpassing en de extractie hebben niet geleid tot een verbetering van de terugvinding van de toegevoegde fenolen. De gemiddelde terugvinding is circa 50% (zonder zuur-base partitie). Op grond hiervan is besloten dat deze methode niet geschikt is voor de derivatisering van de fenolen met azijnzuuranhydride, waarschijnlijk omdat de condities waaronder de reactie moet plaatsvinden nogal kritisch te liggen.

On-column derivatisering en extractie met acetylchloride

Een nieuwe analysemethode is ontwikkeld voor fenol, o-cresol, m-cresol en p-cresol in water op basis van extractie en on-column derivatisering met acetylchloride op SPE-kolommetjes. Dit betreft een nieuw concept waarbij de vrije fenolen eerst op SPE-kolommetjes uit de waterlaag geëxtraheerd worden; gevolgd door een on-column derivatisering van de vrije fenolen met acetylchloride in hexaan (5% v/v) met gebruik van natronloog-poeder en tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat als fase-transfer-katalysator en desorptie van de gevormde fenylacetaten van het SPE kolommetje met hexaan. Analyse van de fenylacetaten vindt plaats met behulp van GC-FID of GC-MS.

Voordeel van deze methode is dat een snelle, op een aantal stappen mogelijk te automatiseren methode is ontwikkeld, waarbij door de combinatie van extractie en derivatisering op het SPE-kolommetje geen switch tussen verschillende oplosmiddelen voor extractie, derivatisering en analyse gemaakt hoeft te worden.

Bij de validatie zijn de hiernavolgende prestatiekenmerken gevonden:

- Er bestaat geen concentratie afhankelijkheid van de fenolen over een concentratierange van 25 µg/l tot 25 mg/l en de methode is lineair in dit werkgebied.
- De cresolen geven bij de toepassing op drie verschillende matrices geen doorslag op een niveau van 25 mg/l en bij 100 mg/l fenolen totaal. Fenol geeft voor alle matrices een doorslag van 12 % absoluut.
- De lange termijn reproduceerbaarheid van de methode ligt voor fenol, de cresolen en dimethylfenolen rond de 80 % met een standaard deviatie van 2 tot 6 %.
- De aantoonbaarheidsgrens ligt op resp. 1.2, 0.3 en 0.8 µg/l voor o-, m- en p-cresol en op 1.8 µg/l voor fenol bij analyse met GC-FID.
- Er zijn geen significante verschillen in de terugvinding van de fenolen geconstateerd bij toepassing van een OECD - of grondmatrix.
- Alle drie onderzochte dimethylfenolen (2,5-DMF, 3,5-DMF en 3,4-DMF) gedragen zich in de matrix hetzelfde in vergelijking met de cresolen; fenol vertoont in sommige

monsters afwijkend gedrag. Alle dimethylfenolen zijn in principe te analyseren met deze methode, danwel kunnen als interne standaard toegepast worden.

- De fenolen blijken tot 3 dagen houdbaar bij 20 °C zonder conservering; koeling tot 4 °C verlengt de houdbaarheid tot 7 dagen. Monsters welke gekoeld zijn tot 4 °C en geconserveerd zijn door de pH vooraf op pH12 of pH2 te brengen, blijken over een periode tot minstens 51 dagen goed houdbaar te zijn. In sommige gevallen blijkt de aanwezigheid van matrix in de ongeconserveerde eluaten de houdbaarheid te verbeteren.
- De uitvoerbaarheid van de analysemethode is in vergelijking met de methode van het CEN-document duidelijk beter op het punt van de analysetijd en het aantal handelingen per analyse.
- Bij toepassing van GC-MS analyse kan de aantoonbaarheidsgrens van de fenolen verlaagd worden tot 0.1 µg/l voor fenol en o- en m-fenol, voor p-cresol is dit 0.3 µg/l. De recoveries is vergelijkbaar met de analyse met GC-FID en ook hier bestaat geen matrix-effect.

De verwachting is dat de huidige methode goede mogelijkheden biedt - om met nader onderzoek -uitgebreid te kunnen worden naar andere fenolen en ook andere matrices. Analyse met GC-MS verhoogt de selectiviteit van de methode.

Toepassing voor vaste monsters als grond en sediment behoort tot de mogelijkheid als een goede extraktiemethode voor deze monsters wordt gekoppeld aan de hier beschreven methode. Nadere validatie zowel op intra - als interlaboratorium schaal dient nog plaats te vinden.

LITERATUUR

1. Taakstellend plan ter ondersteuning van de normcommissie 390 11 'Uitloogkarakterisering van bouwmaterialen en afvalstoffen', Deel 1 - Algemeen en Deel 2 - projectenprogramma, Novem (1990)
2. F.R. v. Gaalen. Ontwikkelen en beperkt valideren van één NEN norm voor de bepaling van fenolen in bodem/grond, waterbodem, grond- en oppervlakterwater, bouwstoffen en afvalstoffen in het kader van "Actieprogramma Normalisatie & Validatie van Milieumeetmethoden 1993-1997". Fase 2: Beperkte intralab validatie Concept BCO-rapport, april 1997
3. CEN/TC 230/WG 1/TG 11/N26; Gas chromatographic determination of some selected chlorophenols in water. CEN document, 30 mei 1996
4. R. Hoogerbrugge, M.R. Ramlal, G.H. Stil, S.M. Gort, H.A.G. Heusinkveld, E.G. van der Velde, P. van Zoonen. Interlaboratory validation of PrEN 12673: "Water quality – Gas Chromatographic determination of some selected chlorophenols in water" RIVM Report no. 219101 006, Bilthoven: RIVM, 1997
5. G.A. Rood, A.J. Orbons. Literatuuronderzoek naar uitloogproeven voor vluchtige organische stoffen RIVM rapport nr. 771402 009, Bilthoven: RIVM, 1994
6. M.H. Broekman, A.I.M. van de Beek, E.G. van der Velde. Onderzoek naar de uitloging van fenol en cresolen middels kolom- en cascadetest RIVM rapport nr. 771402 027, Bilthoven: RIVM, 2001
7. S.M. Gort, R. Hoogerbrugge. A user friendly spreadsheet program for calibration using weighed regression. User's Guide RIVM rapport nr. 502501025, Bilthoven: RIVM, 1995
8. L. Renberg, K. Lindstöm. C₁₈ Reversed-Phase trace enrichment of chlorinated phenols, guaiacols and catechols in water Journal of Chromatography, 214 (1981) 327-334
9. V. Janda, H.v. Langenhove. Determination of chlorophenols in water by direct acetylation and solid-phase extraction Journal of Chromatography, 472 (1989) 327-330
10. J. Pawliszyn, K.D. Buchholz. Optimization of Solid-Phase Microextraction Conditions for Determination of Phenols Analytical Chemistry, 66 (1994), 160-167

Bijlage 1 VERZENDLIJST

- 1-6 Directie Bodem, Directoraat-Generaal Milieubeheer, Drs. J.A. Suurland
- 7 Directeur-Generaal Milieubeheer
- 8 Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer, Dr.ir. B.C.J. Zoeteman
- 9 Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer, Mr. G.J.R. Wolters
- 10 Mr. A.B. Holtkamp, Directie Bodem
- 11 Mr.drs. L.J.J. Gravesteijn, Directie Bodem
- 12 Ir. P.A.H. Hermens, Directie Afvalstoffen
- 13 Ir. R.T. Eikelboom, Directie Bodem
- 14-27 Normcommissie 390 11 'Uitloogkarakterisering van bouw- en afvalstoffen'
- 28 Depot van Nederlandse Publicaties en Nederlandse bibliografie
- 29 Directie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
- 30 Dr. ir. G. de Mik
- 31 Dr. Th. G. Aalbers
- 32 Drs. G.A. Rood
- 33 Ir. H. van de Wiel
- 34 Dr. P. van Zoonen
- 35 Drs. A.J. Orbons
- 36-43 Auteurs en medewerkers
- 44 SBD / Voorlichting en Public Relations
- 45 Bureau Projecten- en Rapportenregistratie
- 46 Bibliotheek RIVM
- 47-63 Bureau Rapportenbeheer
- 64-71 Reserve-exemplaren

Bijlage 2 LIJST MET AFKORTINGEN EN SYNONIEMEN

BTEX	Benzeen, toluen, ethylbenzeen en xylenen
CEN	Europese commissie voor normalisatie
Demi-water	Gedemineraliseerd water
DGM	Directoraat-Generaal Milieuhygiëne
DMF	Dimethylfenol
DOC	Dissolved organic carbon
Eluaat	Uitloogvloeistof, uitloogextract
EOX	Niet-vluchtige, met petroleumether extraheerbare organohalogeenvverbindingen, waarbij X staat voor de halogenen chloor, broom en jood.
GC	Gaschromatografie
GC-MS	Gaschromatografie-Massaspectrometrie
KEL-F	Polychloortriflourethyleen (PCTFE)
LLE	Vloeistof-vloeistof extractie (Liquid-Liquid extraction)
NEN	Nederlandse norm
MilliQ-water	Schoon water gezuiverd van organische microverontreinigingen
OCB	Organochloorbestrijdingsmiddelen
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
o-NVN	Ontwerp Nederlandse voornorm
PAK	Polycyclische aromatische koolwaterstoffen
PCB	Polychloorbifenylen; voor het onderscheid tussen de 209 PCB wordt de zogenaamde IUPAC-nummering gehanteerd.
pH	Zuurgraad
Recovery	Terugvindingspercentage
SDB	Styreendivinybenzeen polymeer
SPE	Solid phase extraction
TBAWS	Tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat
TSP	Taakstellend Plan ter ondersteuning van de normcommissie 390 11 'Uitloogkarakterisering van bouw- en afvalstoffen'
VPR	Voorlopige praktijk richtlijnen

Bijlage 3. Analysemethode voor fenol en cresolen in water met behulp van SPE on-column derivatisering op en analyse met GC-FID of GC-MS

1. Beginsel

De te bepalen componenten fenol, ortho-, meta- en para-cresol worden na normalisering van het watermonster geadsorbeerd op een styreendivinybenzeen polymeer adsorbens (SDB) middels solid phase extractie (SPE). Na de extractie worden de vrije fenolen gedesorbeerd en in aanwezigheid van natronloog poeder en tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat in het SPE kolommetje gederiviseerd met 5% acetylchloride in hexaan. De gevormde fenylacetaat worden gekwantificeerd met GC-FID voorzien van on-column injectie of met GC-MS.

2. Chemicaliën

- 2.1 MilliQ-water, gezuiverd van organische microverontreinigingen.
- 2.2 Hexaan.
- 2.3 Aceton.
- 2.4 NaOH-pellets, voor aanvang van de analyse met een mortier fijn malen tot poeder. *Het poeder wordt in een stoof bij 120 °C gedroogd gedurende minimaal 2 uur en wordt verder bewaard in een exsiccator in verband met de hygroscopische eigenschappen van de stof.*
- 2.5 Tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat.
- 2.6 Acetylchloride.
- 2.7 5% (v/v) acetylchloride in hexaan.
- 2.8 HNO₃-oplossing 1 molair.
- 2.9 NaOH-oplossing 1 molair.
- 2.10 Standaardstoffen
 - fenol casnummer 108-95-2
 - o-cresol casnummer 95-48-7
 - m-cresol casnummer 108-39-4
 - p-cresol casnummer 106-44-5
 - 3,4 dimethylfenol casnummer 95-65-8
 - fenylacetaat casnummer 122-79-2
 - o-tolylacetaat casnummer 533-18-6
 - m-tolylacetaat casnummer 122-46-3
 - p-tolylacetaat casnummer 140-39-6
 - 3,4 dimethylfenylacetaat
 - 3,5 dimethylfenylacetaat
- 2.11 Natriumchloride.
- 2.12 Methanol.
- 2.13 Kooksteentjes.

3. Apparatuur en hulpmiddelen

- 3.1 Gaschromatograaf met temperatuurprogrammering, on-column injector, vlamionisatie detector en dataverwerkingstation.
- 3.2 Ultra-1 capillaire kolom (50 m * 0.32 mm ID) of een vergelijkbare analytische kolom en een gedeactiveerde fused silica voorkolom (retention gap) (1m * 0.53 mm ID)
- 3.3 SPE-kolom processor met toebehoren.
- 3.4 Styreendivinybenzeen polymeer (=SDB) 3 ml SPE kolommetjes voorzien van 200 mg adsorbens.
- 3.5 Membraanpomp.
- 3.6 Glazen vacuüm filtratie apparatuur, bij voorkeur 100 mm doorsnede.
- 3.7 Membraanfilter van geregenereerd cellulose 0.45 µm en glasvezel voorfilter 0.8-1.50 µm.
- 3.8 Waterbad.
- 3.9 Gebruikelijk laboratorium glaswerk.

4. Werkwijze

- 4.1 Filtreer met behulp van een glazen vacuümfiltratie apparaat het watermonster over een 0.45 µm membraanfilter eventueel in combinatie met een glasvezel voorfilter. Voeg aan het filtraat op 1 liter basis 6 gram NaCl toe en voeg aan 100 ml hiervan 3,4-dimethylfenol als interne standaard toe. Breng het watermonster vervolgens met 1 molair HNO₃-oplossing 1 op pH = 2.
- 4.2 Conditioneer de SPE-kolom (SDB1) door 2 ml milliQ-water ca. 1 minuut in te laten trekken. Breng vervolgens 2 * 2 ml methanol, 2 ml milliQ-water en 2 ml met HNO₃ aangezuurd milliQ-water (pH<2) over de kolom.
Laat hierbij de kolom niet droog staan.
- 4.3 Breng maximaal 100 ml van het watermonster (4.1) over de kolom bij een flow van ca. 10 ml/min (onderdruk ca 75 mbar).
- 4.4 Was de kolom na de extractie met ca. 2 * 2 ml aangezuurde (pH = 2) schone wateroplossing.
- 4.5 Droog de kolom door nog ca. 1 minuut vacuüm te zuigen. Leid gedurende 5 minuten stikstof door het kolommetje tot zichtbaar droog. Centrifugeer de SPE kolommetjes eventueel vooraf gedurende 10 minuten bij 7500*g.
- 4.6 Breng bovenop het adsorbens van het kolommetje *eerst* 150 mg NaOH poeder en vervolgens 75 mg tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat (=fase transfer katalysator).
- 4.7 Elueer de geadsorbeerde fenolen *druppelsgewijs* met ca 10 ml hexaan waarin het

derivatiseringsreagens, acetylchloride, is opgelost (5 % V/V).

Laat de eerste 1 tot 2 ml eluens 10 minuten in het adsorbens intrekken. Hierbij wordt na 5 minuten ca. 1 ml druppelsgewijs opgevangen waarna de 2e ml gedurende 5 minuten intrekt.

- 4.8 Vang de ca. 10 ml extract op in een gecalibreerde 15 ml indampbuis.
- 4.9 Voeg een paar kooksteentjes toe en damp het extract met behulp van een waterbad (100° C) in tot een eindvolume van ca. 2.0 ml en voeg 100 µl injectiestandaard oplossing (3,5-dimethylfenylacetaat 800 µg/ml in hexaan) toe.

5. Kwantificering met behulp van procedure ijklijn

- 5.1 Maak op een aantal concentratieniveaus schone 100 ml wateroplossingen met bekende gehalten vrije fenolen in een concentratierange van 2.5 µg/l tot 1 mg/l. Neem tevens een blanco mee. Breng na toevoeging van NaCl de wateroplossing met 1 molair NaOH-oplossing op pH ≥ 11,5. Voeg de vrije fenolen in een oplossing van aceton toe. Meng de wateroplossingen met de hand gedurende een halve minuut. Breng vervolgens met 1 molair HNO₃-oplossing de wateroplossing op pH ≤ 2.
- 5.2 Werk de wateroplossingen volgens 4.2 tot en met 4.9 op dezelfde wijze op als de monsters.
- 5.3 Injecteer 2.0 µl van het extract en meet de respons van de fenylacetaten ten opzichte van de interne standaard 3,4-dimethylfenylacetaat en de injectiestandaard 3,5-dimethylfenylacetaat. Bepaal de responsfactoren in termen van de vrije fenolen en bereken de concentratie van de vrije fenolen in de monsters hiermee. *Correctie voor de recovery van het gehele analytische proces vindt automatisch plaats.*

6. Berekening

$$c_i = \frac{\left(\frac{r_{i,m}}{r_{is,m}} \right) \times m_{is,m} \times p_i \times f \times o}{v_{i,m}}$$

waarin:

- c_i = concentratie van de component in het watermonster in µg/l
 $r_{i,m}$ = respons van de component in het watermonster in counts
 $r_{is,m}$ = respons van de interne standaardstof in het watermonster in counts
 $m_{is,m}$ = hoeveelheid van de interne standaardstof in het watermonster µg

- p_i = relatieve responsfactor van de component t.o.v. de interne standaardstof bepaald uit de procedure ijklijn.
- f = verdunningsfactor
- o = omrekeningsfactor naar de juiste eenheden
- $v_{i,m}$ = volume van het watermonster in l

7. **Kwaliteit**

- 7.1 Door het gebruik van een procedure ijklijn wordt automatisch gecorrigeerd voor de terugvinding.
- 7.2 Voor aanvang van de analyse dient allereerst een blanco geanalyseerd te worden ter beoordeling van eventuele aanwezigheid van interferenties.
- 7.3 Het gebruik van 1 of meer interne standaardstoffen alsmede injectie standaarden maakt een correctie voor afwijkingen tijdens het analytische proces mogelijk.

Bijlage 4. Aanvullende tabellen*Tabel B3.2 Terugvinding (in %) na opnieuw aanpassen van de pH op pH = 11.6 na de eerste extractiestap*

component	aanpassing pH 10 µg/l* (n=2)	aanpassing pH 20 µg/l* (n=1)	aanpassing pH 40 µg/l* (n=2)	aanpassing pH 80 µg/l* (n=2)	aanpassing pH 100 µg/l* (n=2)
fenol	38 ± 2	29	37 ± 2	26 ± 12	36 ± 17
o-cresol	34 ± 3	24	31 ± 1	27 ± 4	39 ± 11
m-cresol	29 ± 2	21	28 ± 2	24 ± 5	35 ± 10
p-cresol	28 ± 2	20	27 ± 2	24 ± 5	35 ± 10

* De toevoeging is uitgevoerd als mengseloplossing in methanol

Tabel B4.1 Indampverliezen van fenylderivaten en vrije fenolen bij toepassing van verschillende methoden (uitgedrukt in termen van de terugvinding in %).

methode	fenylderivaten			fenolen		
	Kuderna Danish *)		zonder **)	met **)	Kuderna Danish ***)	
oplosmiddel	hexaan	5% acetylchloride in hexaan	stikstof hexaan	stikstof hexaan	hexaan	aceton
component	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=1)
fenol	103 ± 5	97 ± 0	102 ± 16	82 ± 3	28	95
o-cresol	103 ± 5	93 ± 6			60	107
m-cresol	100 ± 6	92 ± 6	96 ± 4	89 ± 3	57	89
p-cresol	107 ± 4	103 ± 1			58	88

*) van 5 ml hexaan naar 2 ml

**) van 14 ml hexaan naar 2 ml

***) van 50 ml naar 2 ml

Tabel B4.3 *Elutieprofielen van de 2 ml-frakties bij de optimalisatie van on-column derivatisering uitgedrukt in de terugvinding in %.*
(concentratie fenolen 500 µg/l).

nummer	fractie	fenol	o-cresol	m-cresol	p-cresol
150 mg NaOH + 75 mg katalysator					
1	2	28	16	19	18
2	4	65	63	70	74
3	6	3	5	2	1
4	8	4	4	0	0
5	14				
som 8ml		100	88	91	94
150 mg NaOH + 75 mg katalysator					
1	2	8	5	5	4
2	4	84	77	85	90
3	6	6	11	5	5
4	8	2	5		
5	14				
som 8ml		100	98	96	99
75 mg katalysator + 150 mg NaOH					
1	2	0	1	0	0
2	4	10	6	8	11
3	6	25	16	23	30
4	8	13	9	12	13
5	14				
som 8ml		48	32	43	54
150 mg NaOH + 75 mg katalysator gemengd					
1	2	2	3	2	2
2	4	48	39	51	62
3	6	27	21	20	21
4	8	17	23	11	11
5	14	5	5	5	3
som 8ml		94	86	83	96
300 mg NaOH + 150 mg katalysator					
1	2	9	6	6	9
2	4	51	40	53	77
3	6	12	10	11	12
4	8	15	22	9	14
5	14	5	3	4	4
som 8ml		87	78	79	112
150 mg katalysator + 300 mg NaOH					
1	2	4	4	4	7
2	4	25	20	26	48
3	6	23	16	21	33
4	8	22	15	8	20
5	14	10	8	8	7
som 8ml		74	56	59	108

*Tabel B5.3 Invloed van enkele matrices op de terugvinding van fenolen (in %).
(concentratie fenolen 500 µg/l).*

matrix	demi water		EOCD				grond	
	1	2	1	2	3	4	1	2
component								
fenol	79	78	68	78	62	71	75	69
o-cresol	81	80	53	63	64	71	76	69
m-cresol	89	89	71	75	79	84	86	80
p-cresol	89	90	79	85	80	84	87	82

*Tabel B5.5 Lange termijn reproduceerbaarheid van de interne standaarden dimethylfenolen (uitgedrukt als recovery in %) in verschillende matrices (uit houdbaarheidsonderzoeken).
N.B. de dimethylfenolen zijn niet onderworpen aan de houdbaarheidsproeven, maar zijn direct voor analyse toegevoegd.*

	2,5-DMF	3,5-DMF	3,4-DMF
matrix (bewaartijd in dagen)			
leidingwater (0)	81 ± 0.0	82 ± 0.3	86 ± 0.1
grondperkolaat (0)	76 ± 0.6	72 ± 0.2	82 ± 0.9
zandperkolaat (0)	80 ± 3.2	80 ± 3.3	85 ± 2.5
leidingwater (7)	75 ± 4.3	79 ± 3.7	79 ± 4.9
grondperkolaat (7)	78 ± 1.9	75 ± 0.1	82 ± 1.8
zandperkolaat (7)	79 ± 3.0	82 ± 2.5	83 ± 2.9
leidingwater (14)	73	78	75
grondperkolaat (14)	78 ± 1.0	78 ± 1.9	83 ± 2.1
zandperkolaat (14)	78 ± 2.4	81 ± 1.6	83 ± 2.1
blanko	76	79	80
startpunt (0)	79	80	82
20 °C en pH ongestuurd (0.25)	83	83	85
20 °C en pH ongestuurd (1)	81	82	83
20 °C en pH ongestuurd (2)	82	84	84
20 °C en pH ongestuurd (3)	85	86	86
20 °C en pH ongestuurd (7)	77	82	78
4 °C en pH ongestuurd (0.25)	79	79	80
4 °C en pH ongestuurd (1)	80	81	83
4 °C en pH ongestuurd (2)	*	*	*
4 °C en pH ongestuurd (3)	83	84	84
4 °C en pH ongestuurd (7)	77	83	76
4 °C en pH ongestuurd (51)	77	80	78
4 °C en pH = 2 (3)	80	83	83
4 °C en pH = 2 (7)	83	87	83
4 °C en pH = 2 (51)	80	82	79
4 °C en pH = 12 (3)	*	*	*
4 °C en pH = 12 (7)	78	82	77
4 °C en pH = 12 (51)	79	80	79
gemiddelde (n=34)	79 ± 3	80 ± 3	82 ± 3

* geen injectie standaard toegevoegd

Tabel B5.10 Terugvinding (in %) bij GC-MS analyse (n=5).

concentratie fenolen (in µg/l)	fenol (%)	o-crenol (%)	m-crenol (%)	p-crenol (%)	2,5-DMF (%)	3,5-DMF (%)	3-4-DMF (%)
<u>conc. 0.1 µg/l</u>							
1	128.2	38.5	1272.3	7.6	46.4	74.3	42.2
2	114.5	24.9	1214.0	32.3	34.9	64.4	35.6
3	165.8	47.2	1326.9	77.8	51.0	70.3	54.3
4	32.6	63.9	1210.1	139.0	41.0	42.0	43.4
5	28.4	39.4	1257.8	93.1	42.1	66.5	63.2
gemidd.	93.9	42.8	1256.2	70.0	43.1	63.5	47.7
st.dev.	60.9	14.3	47.9	51.6	6.0	12.6	10.9
<u>conc. 1.0 µg/l</u>							
1	103.6	67.7	203.3	79.8	54.5	67.5	56.8
2	90.7	57.8	187.2	56.0	51.8	64.7	53.6
3	92.8	64.3	198.4	67.8	55.8	66.9	55.5
4	82.8	69.9	200.0	75.3	59.8	70.2	63.5
5	82.6	66.5	194.7	75.8	61.3	73.7	67.7
gemidd.	90.5	65.3	196.7	71.0	56.6	68.6	59.4
st.dev.	8.6	4.6	6.2	9.4	3.9	3.5	6.0
<u>conc. 10 µg/l</u>							
1	100.1	73.7	87.4	79.7	61.1	70.9	58.0
2	97.6	74.0	87.7	80.0	57.4	72.3	61.5
3	101.8	72.4	87.7	80.5	59.9	74.0	67.6
4	95.1	77.3	92.6	87.7	62.1	69.8	66.8
5	88.5	71.1	90.8	84.1	62.1	73.0	69.5
gemidd.	96.6	73.7	89.2	82.4	60.5	72.0	64.7
st.dev.	5.2	2.3	2.3	3.5	2.0	1.7	4.8

Tabel B5.11 Invloed matrix effecten op recovery (in %) bij GC-MS analyse (n=5).

matrix	fenol (%)	o-crenol (%)	m-crenol (%)	p-crenol (%)	2,5-DMF (%)	3,5-DMF (%)	3-4-DMF (%)
<u>grondperkolaat</u>							
1	98.4	82.1	80.3	88.6	70.3	61.6	78.4
2	88.7	72.7	71.9	79.1	66.9	59.4	72.6
3	90.3	82.7	78.8	88.8	71.7	61.9	80.0
4	86.6	80.4	80.6	89.7	73.2	61.4	77.8
5	89.7	80.9	83.4	92.4	77.6	63.8	82.0
gemidd.	90.7	79.8	79.0	87.7	71.9	61.6	78.2
st.dev.	4.5	4.1	4.3	5.0	3.9	1.6	3.5
<u>zandperkolaat</u>							
1	100.1	81.0	84.4	87.5	74.1	75.1	77.5
2	105.3	88.8	85.8	89.7	79.0	79.9	83.2
3	103.9	86.8	82.3	86.3	77.6	77.2	80.4
4	97.1	90.5	90.9	94.5	84.1	79.8	85.4
5	93.2	82.9	88.3	91.6	83.2	78.5	81.0
gemidd.	99.9	86.0	86.3	89.9	79.6	78.1	81.5
st.dev.	4.9	4.0	3.4	3.3	4.1	2.0	3.0