



Projektrapport

Kapacitetsopbygning og udvikling af miljøvenlig ftalat-analysemetode



Susanne Bækgaard

Oktober 2017



Indhold

Problemformulering	1
Baggrund	1
Ftalater og forkortelser	2
Koncentrationsenheder	2
Metoder	2
<i>Konventionel prøveopsamling og analyse</i>	2
<i>Prøveopsamling ved hjælp af SPME</i>	2
Analysen af injicerede opløsninger	3
Udvikling af ftalatanalyser	3
<i>Konventionel analyse med ekstraktion af ftalater fra vandige opløsninger</i>	3
<i>Prøveopsamling ved hjælp af SPME</i>	3
Resultater	3
<i>Injicerede organiske opløsninger</i>	3
<i>Konventionel analyse med ekstraktion af ftalater fra vandige opløsninger</i>	5
<i>SPME</i>	5
<i>Fejlkilder og imødegåelse af disse</i>	6
Konklusioner og perspektivering	7
Referencer	8



Problemformulering

For at undgå den tidskrævende prøvepræparation i konventionel ftalatanalyse, og dermed følgende håndtering af organiske opløsningsmidler i laboratorierne, ønskes det undersøgt, om det er muligt at anvende SPME til at 'opsamle' ftalater og efterfølgende direkte injicere fiberen i GCMS-analyseudstyr.

Desuden ønskes undersøgt, såfremt ovenstående lykkes, om fiberen kan anvendes til at 'opsamle' ftalater direkte fra faste overflader på plastprodukter med efterfølgende analyse direkte fra fiberen.

En forudsætning for ovenstående er, at der forinden er opnået troværdige og reproducerbare resultater med simpel analyse af ftalater på GCMS. Det vil sige med injektion af ftalater opløst i organisk opløsningsmiddel, så analysebilledet af de forskellige ftalater er kendt.

Baggrund

Ftalater anvendes blandt andet som blødgørere i plastprodukter – især i PVC-plast, idet de gør et ellers stift og hårdt materiale blødt og bøjeligt, hvilket er praktisk og ønskværdigt i mange sammenhænge i eksempelvis legetøj, sutter, kabelisolering, vinylgulve og slanger til hospitalsbrug. Ftalat-molekylerne bindes ikke kemisk til de øvrige plastmolekyler, som er bundet sammen i lange kæder og på kryds og tværs. Ftalat-molekylerne befinder sig 'løst' imellem disse plastmolekylekomplekser og dermed også løst på overfladen af plastprodukterne.

Ftalaterne er en stor gruppe af forskellige kemiske forbindelser, som dog har en vis del af deres opbygning til fælles. Fordi de er *næsten* ens, rent kemisk, har de også *næsten* de samme egenskaber blandt andet med hensyn til evnen som blødgørere.

Mange ftalater er imidlertid påvist at have skadelige effekter selv i meget små koncentrationer, idet de er hormonforstyrrende og flere påvirker forplantningsevnen (Fødevarerministeriet, 2017). Derudover er mindst én ftalat påvist at være hormonforstyrrende i miljøet (Fødevarerministeriet, 2017). Det er dog langt fra alle ftalater, der er undersøgt og påvist farlige, men på grund af den ovenfor nævnte ensartede kemiske opbygning, så er de fleste (kendte) ftalater generelt under mistanke for at være skadelige.

Det er dog ikke kun i færdige plastprodukter, at ftalaterne findes. Når plast udsættes for dagligt brug, vejr og vind eller på anden vis bearbejdes, vil det langsomt nedbrydes, og herunder vil en del af ftalaterne frigøres og vil eksempelvis kunne ende i rensningsanlæg eller i grundvandet – afhængigt af, hvor det frigøres.

Dette har øget behovet for analyse af importerede råvarer og færdigprodukter af mange slags, men også af vand til og i rensningsanlæg samt drikkevand.

Ftalater og forkortelser

Ftalater anvendes i rapporten som fælles benævnelse for diestre af phthalsyren.

<i>DEP</i>	Diethylphthalat
<i>DIBP</i>	Diisobutylphthalat
<i>DBP</i>	Dibutylphthalat
<i>DEHP</i>	Di-(2-ethylhexyl)-phthalat

Som intern standard i kvantitative bestemmelser er butylbenzoat anvendt.

Koncentrationsenheder

Analyse af ftalater kan kun ske i analyseopløsninger med meget lave koncentrationer:

- ppm: svarer til g ftalat/1.000 liter analyseopløsning
- ppb: svarer til g ftalat/1.000.000 liter analyseopløsning

Metoder

Konventionel prøveopsamling og analyse

Det er en tidkrævende proces at screene plastprodukter for ftalater. Den konventionelle proces omfatter, at det udvalgte produkt fragtes til et laboratorium, hvor det rives i fine stykker, opløses gennem længere tid i organiske opløsningsmidler, som efterfølgende analyseres ved hjælp af injektion med en kanyle i et GCMS-analyseudstyr (COMMISSION, 2010). Såfremt der er tale om vandige prøver, der skal analyseres, foretages en ekstraktion i cirka et døgn med organisk opløsningsmiddel, hvorved ftalater flytter fra vandfasen til den organiske fase, hvorefter denne kan analyseres.

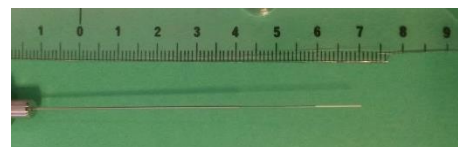
Prøveopsamling ved hjælp af SPME

En anden ekstraktionsmetode, SPME (Solid Phase MicroExtraction) kan anvendes i forbindelse med analyse af blandt andet miljøfarlige stoffer i vandprøver (Wenmin, 2008). Princippet i SPME er, at en tynd fiber - fastholdt i et pencil-lignende skaft - binder kemiske forbindelser i prøven. Hvilke kemiske forbindelser der binder sig til fiberen afhænger af, hvilken type fiber der anvendes. Enhver fiber vil dog kunne binde utallige stoffer, blot fordi de har ensartede kemiske egenskaber.

I Direct Immersed-SPME (DI-SPME) neddyppes fiberen i prøven i minutter/timer eller for eksempel i et vandløb i timer/flere dage.



Fiberholder, hvor fiberen er trukket ind (ikke synlig)



Fiberen (hvid, cirka 1 cm) er skubbet ud

I Head Space-SPME (HS-SPME) befinder prøven sig i en lukket beholder, og fiberen monteres i luften over prøven, som opvarmes. Opvarmningen medfører, at forskellige stoffer i prøven som eksempelvis ftalater, afdampes, og efterfølgende bindes til fiberen.

Når prøveopsamlingen er afsluttet, trækkes fiberen ind i skaftet, så prøven beskyttes, indtil fiberen kan injiceres i GCMS'en. Her opvarmes fiberen, og derved frigøres stofferne, som nu kan analyseres kvalitativt

(med hensyn til sammensætning af forskellige stoffer) og eventuelt også kvantitativt (med hensyn til koncentrationen af de forskellige stoffer).

Analyser af injicerede opløsninger

Indledningsvist, var der brug for at opbygge et indgående kendskab til den konventionelle analyse – især til selve GCMS-udstyret og analysen. Hertil blev der anvendt opløsninger af mange forskellige ftalater, som laboratoriet rådede over, til fremstilling af kendte opløsninger i organiske opløsningsmidler.

Der blev opbygget en såvel kvalitativ som kvantitativ analysemetode – i FullScan og SIM-metode (SIM-metode er en særlig følsom GCMS-metode). Prøverne blev injiceret manuelt med en sprøjte eller via automatisk injektion med en sprøjte (autosampler).

Der blev opnået god erfaring med opmærksomhed på og eliminering af fejlkilder i forbindelse med såvel prøveforberedelse som selve analysen.

En manual til kvalitativ og kvantitativ GCMS-analyse til brug for de studerende er under udarbejdelse.

Udvikling af ftalatanalyser

Konventionel analyse med ekstraktion af ftalater fra vandige opløsninger

Til analyse af ftalat-indholdet i drænvand fra fodboldbaner mv. blev der udført ekstraktion af 200 ml vandprøver med 5 ml cyclohexan under omrystning i et varmeskab. Cyclohexanfasen blev overført til autosampler (automatisk injektion med kanyler). Metoden blev optimeret med hensyn til tidsforbrug.

Prøveopsamling ved hjælp af SPME

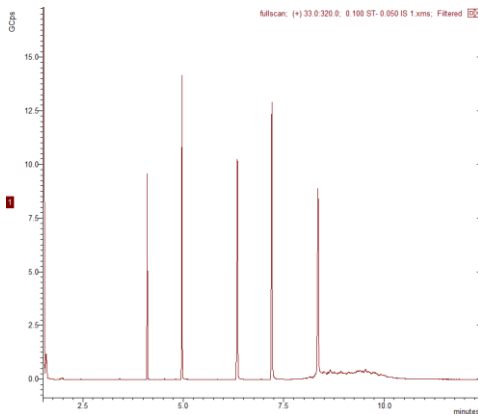
Direct Immersed SPME, DI-SPME: Forskellige fibre (med forskellige kemiske egenskaber) blev afprøvet ved neddykning i såvel organiske som vandige opløsninger af ftalater.

Headspace-SPME, HS-SPME: Udvalgte fibre blev afprøvet sammen med vandige opløsninger af ftalater. Forskellige temperaturer, ekstraktionstid og tilsætning af salt blev afprøvet.

Resultater

Injicerede organiske opløsninger

FullScan er en GCMS-metode, hvor 'alle' stoffer i en prøve bliver målt. På grund af, at der er mange stoffer, der skal måles inden for brøkdele af et sekund, er metoden ikke specielt følsom, og dermed kan der være stoffer i en lav koncentration, som slet ikke bliver målt. Denne metode blev afprøvet på et bredt udvalg af ftalater, der anvendes som blødgørere og med relativt høje koncentrationer, opløst i det organiske opløsningsmiddel cyclohexan, men det var ikke muligt at adskille alle – især ftalater bestående af de største molekyler 'flød sammen'.



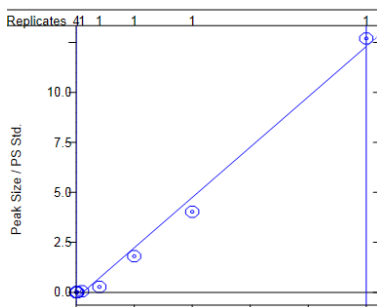
I figuren ses fem adskilte toppe samt en 'bule' til slut i kromatogrammet. Det viser fem forskellige ftalater, der er fint adskilte og derfor kan identificeres og kvantificeres, mens 'bulen' er to ftalater, der ikke kan adskilles og analyseres tilfredsstillende.

Koncentrationen af de forskellige ftalater er 1.000 ppm.

Dette er i god overensstemmelse med, hvad der er vist med to forskellige men lignende metoder (Yun Zou, 2013).

Fullscan-metoden blev også anvendt til en undersøgelse for linearitet (lineær sammenhæng mellem koncentration og respons), der er en forudsætning for kvantitative bestemmelser.

BIS(2-Ethylhexyl)phthalate
Curve Fit: Linear, Ignore, None
Resp. Fact. RSD: 75.22%, Coeff. Det.(r2):0.990490
y = +0.5037x -0.2888

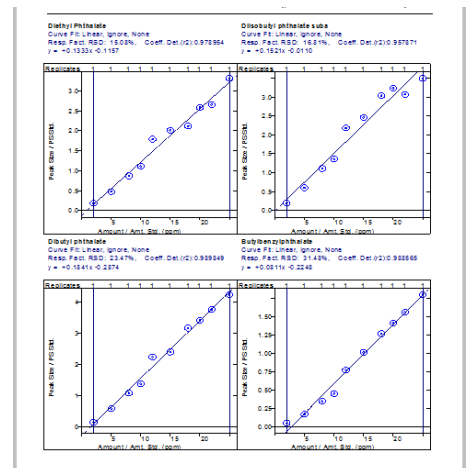


I diagrammet ses en standardkurve for ftalaten DEHP i koncentrationsintervallet 0-300 ppm. DEHP er opløst i cyclohexan.

Kurven tyder på acceptabel linearitet i måleområdet.

For at øge følsomheden i analysen og afprøve metoden, skiftes til SIM-metode på GCMS, hvor der kun måles på udvalgte elementer, og der blev foretaget nye analyser med koncentrationer i området 0-25 ppm.

I figuren ses standardkurver for fire af i alt seks ftalater – alle med acceptabel linearitet i måleområdet. Der kunne ikke opnås linearitet i måleområdet for de to ftalater med de største molekyler.



Der blev konkluderet, at der i projektet skulle fokuseres på fire ftalater, som det umiddelbart er muligt at bestemme kvalitativt og kvantitativt. Det er desuden nogle af de ftalater, der er størst bevågenhed omkring angående skadelige effekter (DEP, DIBP, DBP og DEHP).

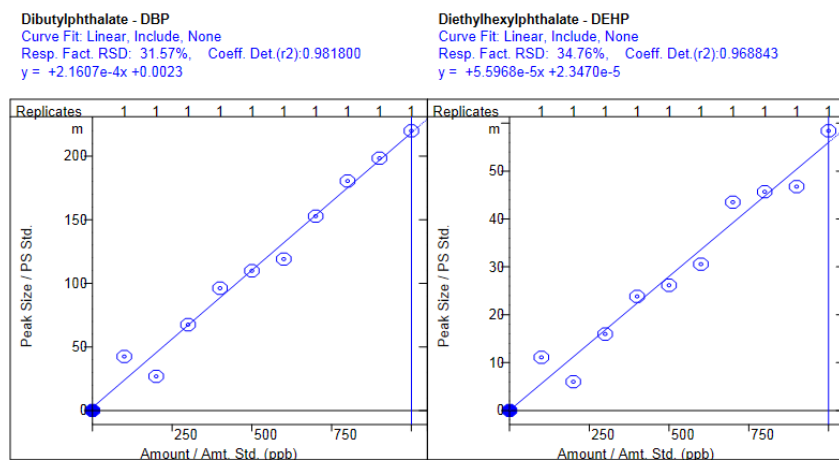
Konventionel analyse med ekstraktion af ftalater fra vandige opløsninger

Som et led i et andet forskningsprojekt (Drænvand fra kunstgræsbaner af Bente Møller Marcussen) blev der analyseret ftalatindehold i vandprøver: drænvand fra kunstgræsbaner og diverse vandprøver fra parallelle laboratorieforsøg. Her blev der kun målt på de fire nævnte ftalater (DEP, DIBP, DBP og DEHP).

Den eneste mulighed for at foretage en reproducerbar analyse på dette tidspunkt i projektet, var den konventionelle analysemetode. Metoden blev dog optimeret, så ekstraktionen med organiske opløsningsmidler blev reduceret fra 20-24 timer til 3 timer.

Resultatet var en god linearitet i koncentrationsintervallet 0-25 ppb i den vandige fase (svarende til 0-1.000 ppb i den organiske fase) af hver af de fire ftalater.

I figuren ses standardkurverne for to af ftalaterne – DBP og DEHP.



Resultaterne af drænvandsundersøgelserne er tidligere rapporteret (Marcussen, 2017).

Når der skal fremstilles kendte analyseopløsninger af ftalater i vand, skal der nødvendigvis anvendes organiske opløsninger med meget lave koncentrationer af ftalater som udgangspunkt. Ved kontrol af disse opløsninger (injektion med en kanyle) blev det vist, at det var meget afgørende, hvilket organisk opløsningsmiddel, der blev anvendt: cyclohexan-opløsninger giver et højere respons end methanol-opløsninger – muligvis fordi ftalat opløst i methanol binder sig til den glasbeholder, som opløsningen befinder sig i, og kun i mindre grad bliver overført til vandprøven.

SPME

Der blev udført utallige forsøg på ekstraktion af ftalater fra vandige opløsninger ved hjælp af en fiber, hvor fiberen neddyppes i prøven (DI-SPME) - herunder forskellige fibertyper, tilsætning af små mængder organiske opløsningsmidler, mekanisk omrøring, omrøring ved hjælp af nitrogen, svag opvarmning, mfl. – uden at opnå brugbare resultater. Den væsentligste forklaring herpå er sandsynligvis, at fibre kun kan opfange en mindre og/eller varierende del af de meget små mængder af ftalat, der overhovedet er opløselige i vand – i løbet af den undersøgte tid (10 min – 1 hr) (Luks-Betlej, et al., 2011).



I stedet blev det forsøgt med headspace-teknik (HS-SPME). Der blev udført enkelte forsøg med forskellige temperaturer under opvarmningen. Resultaterne herfra tydede på, at effektiviteten af fiberen stiger, når temperaturen i prøven stiger fra 50°C til 70°C, men der er ikke en yderligere effekt af at hæve temperaturen til 85°C. Alle øvrige forsøg blev udført ved 70°C.

På billedet ses opvarmningsblokken med prøverør, hvor fiberen er monteret.

Med HS-SPME blev der målt på ganske lave koncentrationer i vandprøver – ned til 1 ppb, men der var til det sidste tvivl om, hvorvidt der var tale om forureninger, som eksempelvis at fiberen bandt ftalater fra luften på laboratoriet, og ikke kun fra prøveopløsningen, da der ikke kunne lukkes helt for beholderen med prøve.



Et gennemgående problem var, at kun tre af de fire ftalater kunne detekteres: om det skyldes, at den sidste ikke frigives fra prøveopløsningen under opvarmning, at den ikke bindes til fiberen, eller at fiberen ikke afgiver den i GCMS'en, er endnu ikke fastslået.

Ifølge en spansk forskergruppe, som har foretaget en grundig undersøgelse på HS-SPME af ftalater i vin med seks forskellige fibre, forskellige temperaturer og tidsrum, skulle dén fiber, der er benyttet i dette projekt være den bedst velegnede, ligesom den benyttede temperatur og tidsrummet skulle være optimal, når der tages hensyn til, at der skal foretages en efterfølgende analyse (Carrillo, et al., 2007).

I den spanske undersøgelse blev effekten af tilsætning af salt til prøven også undersøgt og en optimal koncentration bestemt.

I dette projekt blev der også foretaget forsøg med forskellige tidsrum, med temperatur og med tilsætning af salt, og det gav tydelige effekter: jo højere temperatur og jo længere tid, jo større signal for de tre ftalater (DEP, DIBP og DBP). DEHP-responset blev ikke positivt påvirket af disse ændringer, men var fortsat meget lavt.

Tilsætning af salt (1 g/10 ml prøveopløsning) gav stærkt forøgede respons, men det var nødvendigt, først at 'vaske' saltet med organisk opløsningsmiddel for at fjerne ftalat(lignende) stoffer derfra. De opnåede resultater tyder på, at med salttilsætningen kan det måske blive muligt at måle tre af de fire ftalater kvantitativt i koncentrationsområdet 2 – 10 ppb, men der resterer fortsat mange forsøg med henblik på at opnå reproducerbarhed.

Fejlkilder og imødegåelse af disse

Undervejs i analysearbejdet måtte resultater meget ofte kasseres, da det viste sig, at der var forureninger – sandsynligvis fra opløsningsmidler og udstyr som glas, fiber, magneter og filtre, men ofte var forureningerne periodiske og uforklarlige. Der var mistanke om, at selve luften på laboratoriet kunne give anledning til fejlagtige resultater i GCMS'en, der jo netop analyserer luftformige prøver og kan detektere meget små koncentrationer. Baggrundsstøj af denne karakter er beskrevet i litteraturen (Fankhauser-Noti & Grob, 2007).

Dertil kom, at GCMS'en med jævne mellemrum skulle anvendes i den ordinære undervisning eller i de studerendes projekter, hvilket uvægerligt medførte, at der efterfølgende gik lang tid – ofte flere dage, før udstyret igen var stabilt og resultaterne sammenlignelige med dem, der tidligere var opnået. Dette skyldes primært, at der i undervisningen blev analyseret mange forskellige stoffer og i relativt høje koncentrationer, hvilket nemt fører til 'forurening' af analyseudstyret.



Det har medført, at der kun anvendes de reneste opløsningsmidler (typisk HPLC-grade), som bliver reserveret til dette projekt. Ligeledes, at der kun anvendes frisk tappet, demineraliseret og filtreret vand (Milli-Q-vand beregnet til LC-MS), at glasudstyr kun i sjældne tilfælde bliver sat til almindelig maskinopvask, men bliver skyllet manuelt tre gange med opløsningsmiddel, inden det anvendes, og at det altid opbevares adskilt fra andet glasudstyr på laboratoriet. Endvidere er brug af plast i analysen reduceret til det absolut uundgåelige, nemlig pipettespidser, og disse bliver alle skyllet i organisk opløsningsmiddel tre gange, inden de anvendes til fremstilling af standarder og prøveopløsninger. SPME-forsøg tydede på, at de skyllede pipettespidser ikke udgjorde en fejlkilde.

GCMS'en bliver kontrolleret dagligt med blindprøver, hvor intet injiceres, eller hvor kun den 'rene' fiber injiceres, og udstyret anvendes først til analyser, når blindværdierne er acceptable, hvilke kan tage nogle timer. Desuden er der blevet ændret i vejledningerne, der anvendes i den ordinære undervisning således, at de studerende nu anvender 20 gange svagere opløsninger end tidligere.

Konklusioner og perspektivering

Det er muligt at udføre ftalatbestemmelse på fire ftalater (DEP, DIBP, DBP og DEHP) i vandige opløsninger ud fra den konventionelle metode, hvor ftalat ekstraheres med organisk opløsningsmiddel i tre timer, og den efterfølgende analyse sker ved hjælp af GCMS. Der resterer dog at fastlægge den nedre grænse for koncentrationsområdet, som der kan analyseres på.

Prøveopsamling af ftalater ved hjælp af DI-SPME gav ikke reproducerbare resultater.

Opsamling ved hjælp af HS-SPME gav lovende resultater, hvor det er muligt at analysere på eksempelvis vandprøver med meget lave koncentrationer (få ppb af DEP, DIBP og DBP), fordi ftalaterne opkoncentreres på fiberen, og dermed kan måles på GCMS. Der skal dog arbejdes mere med metoden, så den bliver mere robust og omfatter flere ftalater, hvis den skal have en praktisk anvendelighed.

De største muligheder for at udvikle en ny brugbar analyse ligger helt sikkert i HS-SPME-metoden. Det kunne især være i forbindelse med ftalatbestemmelse i drikkevand, vandløbsvand eller andre svagt-forurenede vandprøver, hvor det med den konventionelle metode kræver enorme prøvemængder at få den nødvendige koncentration i det organiske opløsningsmiddel.

De store muligheder med HS-SPME-metoden, med efterfølgende analyse på GCMS, er den store følsomhed – men det er samtidig den store ulempe: Der skal tages mange forholdsregler i brug mod forurening af prøver, laboratorieudstyr og analyseudstyr. Det optimale vil være et GCMS-udstyr placeret i et separat laboratorium, hvor hverken laboratorium eller GCMS skal anvendes til andet end ftalat-analyser.

På nuværende tidspunkt synes det ikke muligt at udvikle en metode, hvor prøveopsamling på faste overflader sker ved hjælp af en fiber.



Referencer

Carrillo, J., Salazar, C., Moreta, C. & Tena MT., 2007. *Determination of phthalates in wine by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry: fibre comparison and selection.* [Online]

Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644103>

COMMISSION, U. S. C. P. S., 2010. *cpsc.gov: Standard Operating Procedure for Determination of Phtalates.* [Online]

Available at: https://www.cpsc.gov/s3fs-public/pdfs/blk_media_CPSC-CH-C1001-09.3.pdf

[Accessed 14 september 2017].

Fankhauser-Noti, A. & Grob, K., 2007. *Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: investigation of the sources, tips and tricks.* [Online]

Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17386513>

Fødevarerministeriet, M.-. o., 2017. *mst.dk: Faktaark: Ftalater i legetøj og småbørnsartikler.* [Online]

Available at: <http://mst.dk/kemi/kemikalier/regulering-og-regler/faktaark-om-kemikalierreglerne/ftalater/>

[Senest hentet eller vist den 14 september 2017].

Fødevarerministeriet, M.-. o., 2017. *mst.dk: Regulering af ftalater i Danmark og EU.* [Online]

Available at: <http://mst.dk/kemi/kemikalier/fokus-paa-saerlige-stoffer/regulering-af-ftalater-i-danmark-og-eu/>

[Accessed 14 september 2017].

Luks-Betlej, K., Popp, P., Janoszka, B. & Paschke, H., 2011. *Solid-phase microextraction of phthalates from water.* [Online]

Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11771850>

Marcussen, B. M., 2017. *Intern projektrapportering: Kapacitetsopbygning og udvaskning af miljøfremmede stoffer fra kunstgræsbaner i en kombineret laboratorie- og feltundersøgelse, s.l.: Erhvervsakademi Aarhus.*

Wenmin, L., 2008. *Agilent Technologies: Determination of sub-ppb Level of Phthalates in Water by Auto-SPME and GC-MS.* [Online]

Available at: <http://hpst.cz/sites/default/files/attachments/5989-7726en-determination-sub-ppb-level-phthalates-water-auto-spme-and-gc-ms.pdf>

[Accessed 14 september 2017].

Yun Zou, M. C., 2013. *Agilent Technologies: Determination of Phthalate Concentration in Toys and Children's Products.* [Online]

Available at: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-4863EN.pdf>

[Accessed 14 september 2017].