

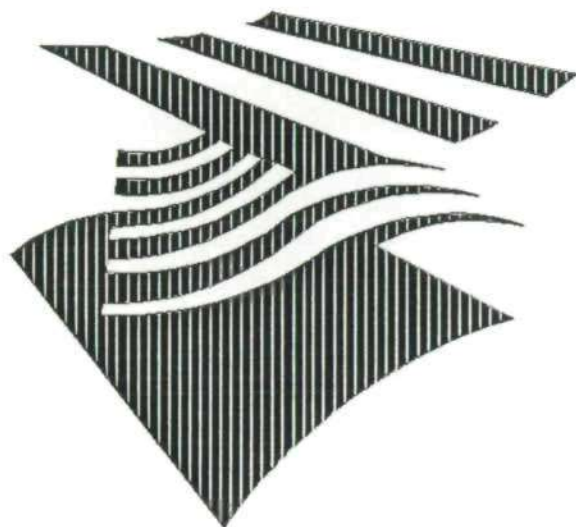
# RIJKSWATERSTAAT

---

Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA)

## Onderzoek naar een HPLC bepalingmethode voor herbiciden op dinitrofenol basis in (oppervlakte)water m.b.v. on-line preconcentratie en UV-detectie.

Werkdocument 94.010X



Stageverslag voor het H.L.O.-chemie, algemene richting, uitgevoerd bij het RIZA, afdeling IOLM, te Lelystad.

Rudolf Mud  
Noordelijke Hogeschool Leeuwarden  
Stagebegeleider : Ing. R.B. Geerdink  
Periode : 30-08-93 - 21-01-94

Lelystad, januari 1994

**Onderzoek naar een HPLC bepalingmethode voor herbiciden  
op dinitrofenol basis in (oppervlakte)water m.b.v.on-line  
preconcentratie en UV-detectie.**

Werkdocument 94.010X

Stageverslag voor het H.L.O.-chemie, algemene richting,  
uitgevoerd bij het RIZA, afdeling IOLM, te Lelystad.

Rudolf Mud  
Noordelijke Hogeschool Leeuwarden  
Stagebegeleider : Ing. R.B. Geerdink  
Periode : 30-08-93 - 21-01-94

Lelystad, januari 1994

*N.B. De inhoud van dit werkdocument hoeft niet noodzakelijkerwijs in overeenstemming te zijn met de visie van het  
Ministerie van Verkeer en Waterstaat.*

## VOORWOORD

Dit stageverslag is tot stand gekomen na een experimenteel onderzoek van vijf maanden. De stageperiode ging uit van de Noordelijke Hogeschool Leeuwarden, afdeling Hoger Laboratorium Onderwijs (HLO) en werd van daaruit begeleid door de Dhr. H.W. Kattenberg.

Ik wil Paul Frintrop en alle medewerkers verspreid over de hele dienst bedanken voor de hulp en opbouwende kritiek die ik gehad heb. Speciaal wil ik René Geerdink bedanken voor de begeleiding en de prettige samenwerking tijdens de stageperiode.

# **INHOUDSOPGAVE**

## **1.1 SAMENVATTING**

## **1.2 SUMMARY**

## **2 INLEIDING**

- 2.1 RIZA
- 2.2 Algemeen
- 2.3 Probleemstelling
- 2.4 Doelstelling

## **3 THEORIE**

- 3.1 Fysisch-chemische stoffeigenschappen
  - 3.1,1 Identificatie
  - 3.1,2 Fysisch-chemische karakterisering
- 3.2 Toepassing van RPLC bij de bepaling van dinitrofenolen
- 3.3 Concentrerend van dinitrofenolen met vaste fase extractie
- 3.4 Gradiëntelutie

## **4 EXPERIMENTEEL**

- 4.1 Chemicaliën
- 4.2 Apparatuur
- 4.3 Oplossingen
- 4.4 Meetopstellingen
- 4.5 Meetomstandigheden
- 4.6 Opzet van het onderzoek

## **5 RESULTATEN EN DISCUSSIE**

- 5.1 Bepaling UV-spectra van een aantal dinitrofenolen
- 5.2 Scheiding van de componenten
- 5.3 Bepaling van het doorbraakvolume
- 5.4 Validatie van de methode
  - 5.4,1 Herhaalbaarheid
  - 5.4,2 Schatting detectiegrenzen
- 5.5 Combinatie chloorfenoxycarbonsuren en dinitrofenolen

## **6 CONCLUSIES**

## **7 AANBEVELINGEN**

## **8 LITERATUUR**

## **9 BIJLAGEN**



## 1.1 SAMENVATTING

Dinitrofenolen zijn verbindingen die o.a. in de land- en tuinbouw worden gebruikt en daardoor voorkomen als microverontreinigingen in grond- en oppervlaktewater. Voor de bepaling van dinitrofenolen op een laag niveau ( $\leq 0,1 \mu\text{g/L}$ ) is nog geen methode beschikbaar.

In dit verslag wordt een HPLC methode beschreven voor 7 dinitrofenolen . De verbindingen zijn: 2,4-dinitrofenol, DNOC, dinoseb, dinoterb, dinobuton, dinoseb acetaat en medinoterb acetaat.

Dinoterb acetaat kan ook met deze methode worden bepaald alleen kan deze component niet gescheiden worden van dinoseb acetaat.

Bij deze methode wordt 60 mL water waaraan de componenten zijn geaddedeerd bij een pH van 2,8 on-line gepreconcentreerd door vaste fase extractie op een polymere prekolom (PLRP-S). Het concentraat wordt vervolgens geanalyseerd bij een pH van 8,3 met een gradiënt HPLC-systeem (20:80 v/v ACN/water tot 80:20 v/v ACN/water). Het eluens bevat een ionpaar reagens voor het vergroten van de selectiviteit. De scheiding vindt plaats op een polymere analytische kolom (PLRP-S) en detectie met een UV-detector bij 265 nm. De totale analyse tijd bedraagt 80 minuten.

Tijdens het onderzoek is het doorbraakvolume voor de verbindingen in Milli-Q water onderzocht. Het doorbraakvolume op de  $10 \times 2$  mm (I.D.) polymere PLRP-S prekolom is voor de verbindingen groter dan 80 mL.

De herhaalbaarheid op het niveau van  $0,25 \mu\text{g/L}$  (Milli-Q water geaddedeerd op  $0,25 \mu\text{g/L}$ , pH 2,8) na preconcentratie van 60 mL is redelijk tot goed te noemen voor alle verbindingen. De relatieve standaarddeviatie bedraagt 1-7% (piekhoogte;  $n=7$ ) en 1-12% (piekoppervlak;  $n=7$ ). De detectiegrenzen van de verbindingen variëren voor de piekhoogte tussen de  $0,01 \mu\text{g/L}$  en  $0,07 \mu\text{g/L}$  en voor het piekoppervlak variëren de detectiegrenzen tussen de  $0,01 \mu\text{g/L}$  en  $0,09 \mu\text{g/L}$ . Bij preconcentrerings van 60 mL Milli-Q water voldoen de verbindingen aan de gestelde normen; voor DNOC  $0,3 \mu\text{g/L}$ , voor dinoseb  $0,02 \mu\text{g/L}$  en voor de overige verbindingen aan een gestelde norm van  $0,1 \mu\text{g/L}$ .

Voor een andere groep verbindingen bestaat er bij het RIZA al een bepalingmethode, het gaat hierbij om 8 chloorfenoxycarbonzuren (CFCZ) en bentazon. Omdat dinitrofenolen en CFCZ verwante eigenschappen hebben is er onderzocht of het mogelijk is deze twee groepen verbindingen in één bepalingmethode in te passen. CFCZ en de dinitrofenolen zijn hierbij aan oppervlaktewater (Maaswater Eysden 93/07/06) geaddedeerd op  $1,0 \mu\text{g/L}$ , pH 2,8. Uit de resultaten blijkt dat de twee groepen verbindingen gecombineerd kunnen worden in één bepalingmethode. De verbinding 2,4,5-T kan echter niet bepaald worden wanneer 2,4-dinitrofenol aanwezig is omdat ze namelijk dezelfde retentie ondervinden. Bij 360 nm kan 2,4-dinitrofenol zonder storing door 2,4,5-T wel selectief worden gemeten. De selectiviteit van de methode kan nog vergroot worden door bij meerdere golflengten te meten (232 nm, 265 nm en 360 nm).

## 1.2 SUMMARY

Dinitrophenols are compounds, used in agricultural industry and thereby are present in ground and surfacewater as micropollutants. A suitable method for low level measurements ( $\leq 0,1 \mu\text{g/L}$ ) of dinitrophenols is not available yet.

This paper describes a HPLC method for the determination of seven dinitrophenols. The compounds are: 2,4-dinitrophenol, DNOC, dinoseb, dinoterb, dinobuton, dinoseb acetate and medinoterb acetate.

Also, dinoterb acetate can be determined with this method but cannot be separated from dinoseb acetate.

With this method 60 mL water containing the dinitrophenols and acidified to pH 2.8 is on-line concentrated by solid phase extraction on a polymeric precolumn (PLRP-S). The concentrate is then analysed using a gradient HPLC-system (20:80 v/v ACN/water to 80:20 v/v ACN/water) adjusted to pH 8.3. The mobile phase contains an ionpair reagent to increase the selectivity. The separation takes place on a polymeric analytical column (PLRP-S) and UV-detection at 265 nm. Total analysis time is 80 minutes.

Breakthrough volumes for the compounds are investigated and determined in Milli-Q water. All compounds can be concentrated on a 10x2 mm (I.D.) precolumn without breakthrough using a volume of 80 mL.

The repeatability in Milli-Q water, spiked at  $0.25 \mu\text{g/L}$ , after concentration of 60 mL for all compounds is reasonable up to good. The relative standard deviation varies for the peakheight from 1-9% ( $n=7$ ) and for the peakarea from 1-12% ( $n=7$ ). The detection limit of the compounds varies for the peakheight from  $0.01 \mu\text{g/L}$  to  $0.07 \mu\text{g/L}$  and for the peakarea from  $0.01 \mu\text{g/L}$  to  $0.09 \mu\text{g/L}$ . Using a preconcentration volume of 60 mL in Milli-Q water all compounds can be determined and meet the requirements; for DNOC  $0.3 \mu\text{g/L}$ , for dinoseb  $0.02 \mu\text{g/L}$  and for the other compounds the level of  $0.1 \mu\text{g/L}$ .

For another group of compounds there is at RIZA already a method available, namely for eight chlorophenoxyacids and bentazone. Dinitrophenols, and the chlorophenoxyacids and bentazone have the same properties. To investigate the possibility to combine all these compounds in one method, a surfacewater sample was spiked at  $1.0 \mu\text{g/L}$  (Meuse Eysden 93/07/06) and acidified to pH 2.8. From the results can be concluded that all compounds can be separated with the exception of 2,4,5-T and 2,4-dinitrophenol. 2,4-Dinitrophenol however can be detected at 360 nm whereas 2,4,5-T shows no absorption at this wavelength. The selectivity of the method can be increased by using several wavelengths (232 nm, 265 nm and 360 nm).



## 2 INLEIDING

### 2.1 RIZA

Goed waterbeheer is een reusachtige taak. De kwaliteit van het water moet voldoen aan steeds strengere nationale en internationale milieu-eisen. Niet alleen flora en fauna hebben een schoon leefmilieu nodig, ook wij hebben het milieu nodig, immers ons eigen drinkwater wordt gemaakt uit het water van onze rivieren en meren en uit het grondwater. Een goed beheer is dus in vele opzichten van levensbelang. Kwaliteit en kwantiteit gaan samen in het waterbeheer. Dit integrale beheer voor de rijkswateren (grote rivieren, kanalen en meren) is de verantwoordelijkheid van rijkswaterstaat.

Het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling RIZA te Lelystad is een technische wetenschappelijke dienst van rijkswaterstaat. Het is haar taak gegevens te verzamelen adviezen te geven en onderzoek te doen met betrekking tot het integrale beheer van het zoete water, plus het brakke water van de Nieuwe Waterweg. Waar het gaat om lozingen van verontreinigende stoffen strekt de zorg zich uit over zowel zoet als zout water.

Het RIZA kent vier belangrijke taakgebieden: inwinnen en verwerken van gegevens over het Nederlandse water, het geven van adviezen, het voorbereiden van het landelijke beleid over waterkwantiteit en -kwaliteit en het doen van onderzoek. Gegevens over de waterkwantiteit en -kwaliteit zijn essentieel voor integraal waterbeheer.

De laboratoria van het RIZA onderzoeken ondermeer monsters oppervlaktewater, afvalwater, zwevende stof, sediment en organismen, die via een bepaald schema door monsternemers worden aangeboden.

Voor het verzamelen en analyseren van deze gegevens is de hoofdafdeling Informatie en Ontwikkeling (IO) verantwoordelijk. De stage wordt uitgevoerd bij een subafdeling van IO namelijk het laboratorium van methode ontwikkeling (IOLM). Hier houden ze zich bezig met het ontwikkelen van nieuwe bepalingmethoden en met de normalisatie en optimalisatie van bestaande bepalingmethoden, verder heeft deze afdeling een adviserende en ondersteunende functie binnen het RIZA.

In Lelystad bevinden zich de centrale analytische laboratoria die onderverdeeld zijn in chemische analyse, chromatografie, spectrometrie, microbiologie, radiochemie en methode ontwikkeling. In 1994 zullen bovengenoemde afdelingen onderverdeeld zijn in twee afdelingen namelijk organische chemie en anorganische chemie. De laboratoria onderzoeken monsters op de aanwezigheid van stoffen die van nature niet of nauwelijks in het oppervlaktewater voorkomen. Het gaat hier met name om stoffen van organische aard (bv PCB's, gechloreerde verbindingen) of van anorganische aard (bv zware metalen).

Verder bevindt zich nog een laboratorium in Dordrecht waar afvalwater- en slibmonsters worden geanalyseerd. Tevens is er een rivierbewakingssysteem ontwikkeld dat bestaat uit vijf meetstations langs Rijn, IJssel en Maas die volautomatisch en continu

de waterkwaliteit registreren.

## 2.2 Algemeen

De waterkwaliteit wordt bij het RIZA getoetst aan de hand van de getalsnormen die staan vermeld in de derde Nota waterhuishouding [1]. Het doel van de derde Nota waterhuishouding is het aangeven van de hoofdlijnen van het beleid voor de landelijke waterhuishouding. In deze Nota zijn getalswaarden opgenomen voor de algemene milieukwaliteit. Deze kan onderverdeeld worden in:

- kwaliteits doelstelling 2000 (voor water en waterbodem)
- toetsingswaarden (voor waterbodem)
- signaleringswaarden (voor waterbodem)

Voor de algemene milieukwaliteit wordt er onderscheid gemaakt tussen een M- en I-lijst met stoffen. Voor de stoffen die zijn ingedeeld in de M-lijst geldt dat ze regelmatig moeten worden gemeten en getoetst (te monitoren stoffen), de stoffen die ingedeeld zijn in de I-lijst zijn voorsnog niet van een routinematige meting voorzien (te inventariseren stoffen). Incidentele metingen worden voor laatst genoemde stoffen gedaan, bijvoorbeeld bij vermeende lozingen. Van de dinitrofenolen ook wel fenolherbiciden genoemd worden alleen DNOC en dinoseb genoemd op de I-lijst.

De normwaarde voor DNOC bedraagt  $0,3 \mu\text{g/L}$  en voor dinoseb bedraagt deze  $0,02 \mu\text{g/L}$ . Voor de overige dinitrofenolen in dit onderzoek wordt een richtwaarde gekozen van  $0,1 \mu\text{g/L}$ . Deze waarde is door een internationaal waterleidingbesluit als norm vastgesteld voor individuele microverontreinigingen.

Dinitrofenolen zijn bestrijdingsmiddelen, ook wel gewasbeschermingsmiddelen of pesticiden genoemd die in de land- en tuinbouw worden toegepast voor loofdoding (pootaardappelen), dit is noodzakelijk om aardappelen machinaal te kunnen rooien, en voor onkruidbestrijding in b.v. aardappel- en graanteelten. Het werkt voornamelijk via contactwerking op bovengrondse delen van de plant, verstoort de ademhaling en remt de fotosynthese.

Het polaire karakter van de dinitrofenolen (zie Bijlage 1) zorgt er voor dat ze matig tot goed oplossen in water. Naarmate de alkylgroep (op de 2- plaats) groter is neemt de oplosbaarheid af. Zo is de oplosbaarheid voor DNOC  $170 \text{ mg/L}$ , voor dinoseb  $63 \text{ mg/L}$  en voor dinoterb  $7 \text{ mg/L}$ . Door uitspoeling van de bodem kunnen ze gemakkelijk in het grond- en oppervlaktewater terecht komen. Daarnaast kunnen ze ook via industriële- en illegale lozingen terecht komen in het grond- en oppervlaktewater. Dit leidt tot milieuhygiënische risico's daar polaire verbindingen moeilijk of tegen hoge kosten zijn te verwijderen bij de bereiding van drinkwater uit grondwater en/of oppervlaktewater.



Dit onderzoek is gericht op de volgende verbindingen.

- |                     |                       |
|---------------------|-----------------------|
| 1. 2,4-Dinitrofenol | 6. Dinoseb acetaat    |
| 2. DNOC             | 7. Dinoterb acetaat   |
| 3. Dinoseb          | 8. Medinoterb acetaat |
| 4. Dinoterb         | 9. Dinobuton          |
| 5. Medinoterb       | 10. Dinocap           |

Aan de eerste 4 verbindingen wordt een hogere prioriteit toegekend dan aan de laatste verbindingen.

Met behulp van reversed phase HPLC kunnen deze verbindingen direct bepaald worden. Omdat de concentraties van deze verbindingen laag zijn moeten ze worden geconcentreerd. Dit gebeurt door een on-line vaste fase extractie (Solid Phase Extraction, SPE).

### 2.3 Probleemstelling

Een methode voor analyse van pesticiden op nitrofenol basis wordt beschreven door Peter Mussmann e.a. [2]. Eigenlijk worden er twee manieren beschreven. De bepaling met behulp van HPLC met UV detectie waarbij off-line wordt geconcentreerd en de bepaling met behulp van GC/MS.

De bepaling van dinitrofenolen in watermonsters is moeilijk om twee redenen:

- 1) Door hun goede oplosbaarheid in water, is het moeilijk dinitrofenolen te extraheren uit het watermonster met behulp van organische oplosmiddelen.
- 2) De bepaling van dinitrofenolen met behulp van GC leidt tot sterk tailende pieken, in het bijzonder wanneer sterk verontreinigde watermonsters worden geanalyseerd. Dit is te wijten aan de adsorptie van de fenolen aan de polaire plaatsen van de GC-kolom. Het toenemen van tailing en de 'leeftijd' van de kolom maakt het bepalen van dinitrofenolen onmogelijk.

Bij de afdeling methode ontwikkeling (IOLM) is er voor een andere groep verbindingen een bepalingsmethode ontwikkeld namelijk voor 8 chloorfenoxy-carbonzuren en bentazon [3]. Deze bepaling vindt plaats met behulp van een isocratisch reversed phase HPLC-systeem. De verbindingen worden gepreconcentreerd bij een pH van 2,8 op een polymere prekolom (PLRP-S). Desorptie gebeurt met een eluens van 30:70 ACN/water waaraan een ionpaar vormer is toegevoegd en die op een pH van 8,3 is gebracht. Bij het onderzoek naar de bepaling van dinitrofenolen wordt er ook gebruik gemaakt van een on-line HPLC-systeem. Daar de dinitrofenolen qua eigenschappen lijken op de chloorfenoxy-carbonzuren (CFCZ) is het misschien mogelijk om deze twee groepen verbindingen in één bepalingsmethode in te passen.

Het is gewenst de vier dinitrofenolen met de hoge prioriteit te meten daar er vóór 1995 een wezenlijke vermindering van deze componenten niet wordt verwacht. De emissies van dinoseb zullen waarschijnlijk afnemen door een gebruiksverbod in Nederland, België, Duitsland en Frankrijk. Op korte termijn is voorkomen van grote risico's voor milieu niet uit te sluiten. Daarentegen zullen de emissies van dinoterb toenemen of gelijk blijven en voor DNOC toenemen.

## 2.4 Doelstelling

Het doel van het onderzoek is het opzetten van een methode voor de bepaling van dinitrofenolen in (oppervlakte)water met behulp van een reversed phase HPLC-systeem waarbij componenten vooraf op een polymere prekolom worden geconcentreerd en worden gescheiden op een polymere analytische kolom. De detectie vindt plaats met een UV detector. Verder wordt er gekeken of de chloorfenoxycarbonsuren en de dinitrofenolen gecombineerd kunnen worden in één bepalingsmethode.

Getracht wordt:

- de dinitrofenolen met de hoge prioriteit te kunnen meten in Milli-Q water op het niveau van de norm: DNOC 0,3  $\mu\text{g/L}$ , dinoseb 0,02  $\mu\text{g/L}$ , 2,4-dinitrofenol en dinoterb 0,1  $\mu\text{g/L}$ .
- de componenten binnen 50 minuten te laten elueren.
- combinatie CFCZ en dinitrofenolen.

## 3 THEORIE

### 3.1 Fysisch-chemische stoffeigenschappen

#### 3.1,1 Identificatie

Het algemene kenmerk van de dinitrofenolen is een fenolgroep in de molekuulstructuur. Zo behoren de stoffen 2,4-dinitrofenol, DNOC, dinoseb en dinoterb tot de dinitrofenolen, ze bezitten twee nitro-groepen ( $-\text{NO}_2$ ) die in de molekuulstructuur op de plaatsen 4 en 6 zijn gesitueerd, voor 2,4-dinitrofenol op plaats 2 en 4. Op plaats 2 van de fenolgroep bevindt zich een restgroep (behalve voor 2,4-dinitrofenol), die voor de verschillende dinitrofenolen varieert. Voor de verbindingen in de acetaat vorm is de OH-groep vervangen door een carbonylgroep. In Bijlage 1 worden de structuurformules van de gebruikte componenten weergegeven.

#### 3.1,2 Fysisch-chemische karakterisering

De fysische en chemische eigenschappen van de dinitrofenolen lopen uiteen als gevolg van de verschillen in de restgroepen aan de specifieke fenolgroep, voor de esters verschillen de eigenschappen door de restgroepen aan de specifieke benzeenring en de carbonylgroep die er aan gebonden is. In Tabel 3.1 worden een aantal belangrijke fysisch-chemische eigenschappen voor de betreffende dinitrofenolen weergegeven:

Tabel 3.1: Fysisch-chemische eigenschappen van de betreffende dinitrofenolen

component	molmassa	verschijningsvorm	smeltpunt/ kookpunt (°C)	oplosbaarheid in water	pKa-waarde
2,4-dinitrofenol	184,11	geelachtige kristallen	112-114*	0,6 g/100g 25°C	3,96
DNOC	198,13	geelachtige kristallen	86*	170 mg/L 20°C	4,32
Dinoseb	240,22	oranje vaste stof	38-42*	63 mg/L 20°C	4,03/4,62
Dinoterb	240,22	gele vaste stof	125,5-126,5*	7 mg/L 20°C	4,62
Dinoseb acetaat	282,26	bruine olie	26-27*/170** 4 mm Hg	2,2 g/L 20°C	n.v.t.
Medinoterb acetaat	296,28	geelachtige witte kristallen	78,3*	weinig in water oplosbaar	n.v.t.
dinobuton	326,31	licht gele kristallen	61-62*	1 mg/L 20°C	n.v.t.
Dinocap	364,41	donker bruine vloeistof	138-140** 0,05mm Hg	4 mg/L	n.v.t.

\* = smeltpunt n.v.t. = niet van toepassing

\*\* = kookpunt

Medinoterb en dinoterb acetaat staan niet in Tabel 3.1 vermeld omdat over deze verbindingen geen gegevens bekend zijn.



### 3.2 Toepassing van RPLC bij de bepaling van dinitrofenolen

De dinitrofenolen worden gescheiden m.b.v. "reversed phase" vloeistofchromatografie. Met deze techniek kunnen polaire of ionogene verbindingen gescheiden worden. De interactie tussen het apolair oppervlak en een component zal worden bepaald door de niet specifieke Van der Waalskrachten; dit type interactie is zwak. Daarentegen kunnen in het polaire eluens sterke specifieke interacties optreden. De affiniteit van een polaire component tot het polaire eluens is groter dan die van een apolaire component; een polaire verbinding wordt in de RPLC minder vertraagd dan een apolaire verbinding. Het polair eluens bestaat meestal uit water of een waterige bufferoplossing gemengd met een geschikt organisch oplosmiddel zoals acetonitril of methanol. In dit onderzoek wordt acetonitril gebruikt voor het maken van eluens. Aan het eluens wordt een ionpaar reagens toegevoegd namelijk tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat (TBAHS) Fig. 3.1. Deze stof wordt aan het oppervlak van het pakkingmateriaal Fig. 3.1 van de analytische kolom geadsorbeerd. De stationaire fase wordt zo veranderd dat de componenten meer worden vertraagd zodat polaire of ionogene componenten beter kunnen worden bepaald.

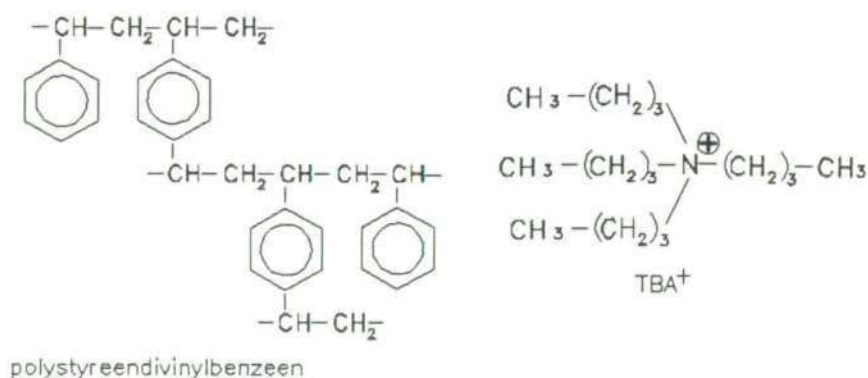
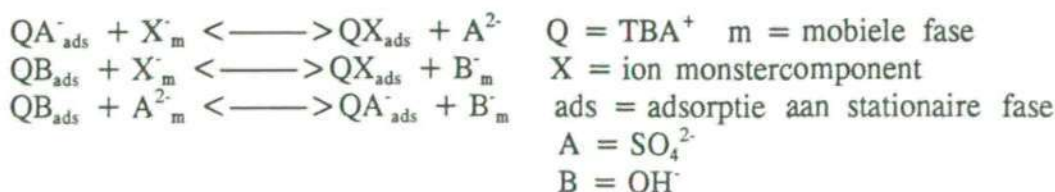


Fig. 3.1: Chemische structuur van polystyreendivinybenzeen en het tetrabutylammoniumion.

De lading van de geadsorbeerde ionen worden geneutraliseerd door anionen die zich in het eluens bevinden. Dit zijn sulfaationen doordat TBAHS wordt toegevoegd en de pH op 8,3 wordt gebracht (geen HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> doordat pH » pK<sub>2</sub> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) Deze anionen kunnen nu worden uitgewisseld tegen ionen afkomstig van een gedissocieerd carbonzuur (het ion van de monstercomponent) Fig. 3.2. De volgende verdringingsreacties kunnen zich nu voordoen;



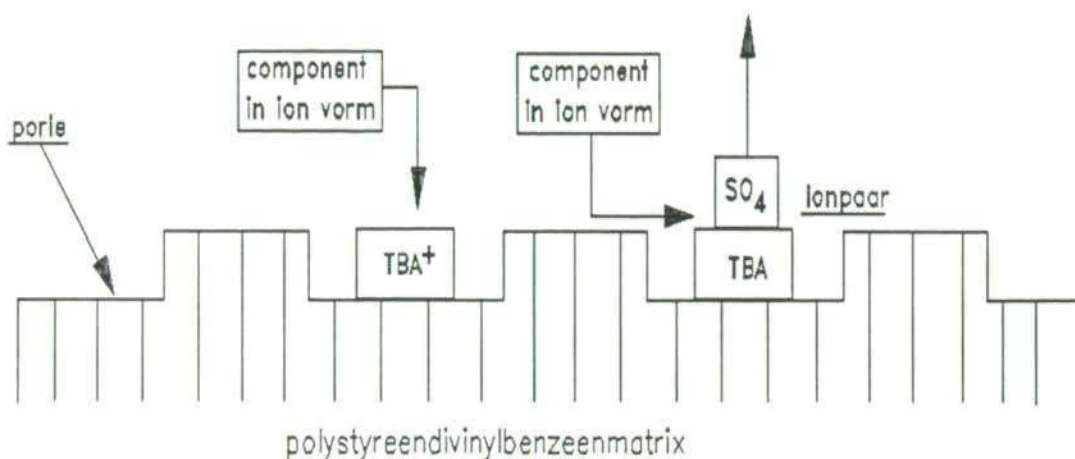


Fig. 3.2: Schematische voorstelling van het ionpaarmechanisme.

### 3.3 Concentrering van dinitrofenolen met vaste fase extractie (SPE)

Bij vaste fase extractie [4] worden de te bepalen spore-componenten op een geschikte vaste fase geïsoleerd en geconcentreerd. Het berust op het principe dat een te analyseren component een meer of minder grote affiniteit heeft voor de vaste fase dan voor de mobiele fase. Op deze wijze is het monster in principe in zuivere vorm te analyseren en daardoor gemakkelijk te identificeren. Als gevolg hiervan zal de onderste analysegrens in het algemeen lager zijn dan met de conventionele technieken als extractie-, verdamping- of destillatietechnieken. Voordelen van SPE ten opzichte van de conventionele methoden zijn a) minder kans op verontreiniging, b) de snelheid van de methode, c) geschikt voor instabiele stoffen, d) alle handelingen bij kamertemperatuur worden uitgevoerd. Een groot nadeel daarentegen is de geringe selectiviteit van de methode. SPE kan op twee manieren gebruikt worden. Enerzijds als isolatietechniek door uit een matrix, bijvoorbeeld een extract verkregen door vloeistof extractie te leiden over een kolom met de bedoeling de verbindingen uit dit extract te isoleren van de matrix (clean-up of monsterbehandeling). Anderzijds kan er ook direct uit een matrix gepreconcentreerd worden. Er wordt bijvoorbeeld 50 mL oppervlaktewater geëlueerd over een vaste fase kolom. Na desorptie blijft er een kleiner volume over. Er wordt nu gesproken van monstervoorbehandeling. Tevens zijn er off-line en on-line methoden te onderscheiden. Bij off-line methoden is de SPE-kolom niet direct gekoppeld aan een chromatografische scheidingstechniek. Een fractie van het eluaat wordt (handmatig) geïnjecteerd in het HPLC-systeem. Bij on-line methoden wordt de gehele monstervoorbereiding uitgevoerd in een directe koppeling aan een chromatografisch systeem en wordt het hele eluaat na de SPE volledig op de HPLC kolom gebracht. De SPE kolommen worden nu ook wel pre-kolommen genoemd.



### 3.4 Gradiëntelutie

De sterkte van het eluens  $\phi$  in de reversed-phase chromatografie kan over grote gebieden worden gevarieerd door gebruik te maken van mengsels. Met isocratische elutie, heeft het eluens in de tijd een constante samenstelling. In de praktijk kan men te maken krijgen met scheidingen waarbij de  $k'$ -waarden (zie blz 17) over een groot gebied variëren, de scheidingen gaan dan lang duren en de componenten van de laatste pieken in het chromatogram zijn sterk verdund waardoor de detectie wordt bemoeilijkt. Daarom kan er beter worden overgegaan op gradiëntelutie. De samenstelling van het eluens wordt tijdens het verloop zodanig gevarieerd dat de  $k'$ -waarden van de componenten afnemen in het laatste gedeelte van het chromatogram terwijl de  $k'$ -waarden in het begin van het chromatogram toenemen. Gradiëntelutie berust op het principe dat de samenstelling van het eluens verandert in de loop van de tijd (de eluentssterkte neemt toe met de tijd)<sup>1</sup>. Het effect van gradiëntelutie in de vloeistofchromatografie is identiek met de temperatuurprogrammering in de gaschromatografie.

## 4 EXPERIMENTEEL

### 4.1 Chemicaliën

Bij dit onderzoek is er gebruik gemaakt van de volgende chemicaliën (zie voor de structuur formules Bijlage 1).

Stofnaam	Leverancier	Code	
2,4-Dinitrofenol	Riedel-de Haën	34334	
DNOC	Riedel-de Haën	35713	
Dinoseb	Riedel-de Haën	35767	
Dinoterb	Riedel-de Haën	80311	
Medinoterb	Dr.S. Ehrenstorfer	L148500	
Dinoseb acetaat	Dr. Ehrenstorfer	E128110	
Dinoterb acetaat	Dr.S. Ehrenstorfer	E128310	
Medinoterb acetaat	Dr.S. Ehrenstorfer	E148510	
Dinobuton	Dr. Ehrenstorfer	E127900	
Dinocap	Dr. Ehrenstorfer	E128000	zuiverheid vlgs fabrikant ca. 80%
Tetrabutylammonium- waterstofsulfaat (TBAHS)	Fluka	86868	
Acetonitril (ACN)	J.T. Baker BV	9017-54	
	Promochem	2856	
Methanol (MeOH)	J.T. Baker BV	8402	

---

$$^1 \phi = \phi_0 + \phi'_t$$

$\phi$  = volumepercentage organisch modifier

$\phi_0$  = waarde van  $\phi$  op het moment van het starten van de gradiënt

$\phi'_t$  = steilheid van de gradiënt



Perchloorzuur (HClO<sub>4</sub>)  
Natronloog (NaOH)  
Water  
Milli-Q  
NANOpure ultra watersystem  
Barnstead

#### 4.2 Apparatuur

Balans: Mettler AT200

UV/VIS spectrofotometer: Varian Caryl  
cuvetlengte: 1,00 cm

Opstelling 1: experimentele opstelling (zie Bijlage 5)

Kolom: PRP-1: 250×4,1 mm (I.D.)  
pakking: (10 μm) (75 Å Polystyreendivinybenzeen)

Pre-kolom: PLRP-S: 10×2 mm (I.D.) (15-25 μm) (100 Å)

Kolomthermostaat: Separations: Spark Holland temp. 50°C

Pompen: preconcentreren: LKB 2150 HPLC pomp  
mobiele fase: Waters 600 E

Schakelsysteem: PROMIS, Spark Holland

Detector: PU 4110 UV/VIS, Philips  
golflengte: 265 nm  
range: 0,500 absorptie eenheden

Vloeistofselectieapparaat: Must s.s.v. multiport streamswitch, Spark Holland

Datastation: Hardware: NEC-Powermate  
Software: Waters Baseline 810 versie 3.3

Opstelling 2: geautomatiseerde opstelling, toegepast bij de bepaling van de herhaalbaarheid en de combinatie van CFCZ en dinitrofenolen. (zie ook Bijlage 6)

Kolom: polymeer PLRP-S: 250×4,6 mm (I.D.)  
pakking: (5 μm) (100 Å)

Pre-kolom: PLRP-S: 10×2 mm (I.D.) (15-25 μm) (100 Å)

Kolomthermostaat: Separations Mistral: temp. 50°C

Pomp:	Waters 600 E	
Detector:	Separations 785 A golflengten: 232 nm, 265 nm en 360 nm (maximaal bereik 360 nm) range: 0,001 absorptie eenheden	
Kolom cartridge schakelsysteem:	PROSPEKT, Spark Holland	
Vloeistofselectieapparaat:	Separations SDU, Spark Holland	
Vacuumontgasser:	Erma Degasser ERC-3612	
Datastation:	Hardware:	NEC-Powermate
	Software:	Waters Baseline 810 versie 3.1

### 4.3 Oplossingen

#### 1) Standaardoplossingen

Van elke component is ca. 5 mg nauwkeurig afgewogen (voor dinocap is ca. 50 mg afgewogen) en opgelost in een afgewogen hoeveelheid acetonitril, zodat iedere component een concentratie heeft van 5 mg per 50 mL acetonitril.

#### 2) Mengstandaarden

Voor de directe loopinjecties worden 1 mg/L oplossingen gemaakt en respectievelijk 0,25 en 1,0 µg/L oplossingen voor het preconcentreren.

#### 3) Eluens

Voor het maken van het eluens wordt acetonitril gebruikt en Milli-Q water.

De afzonderlijke vloeistoffen zijn apart afgemeten in een maatcilinder.

Aan de afgemeten hoeveelheid water wordt  $5 \times 10^{-3}$  mol/L TBAHS<sup>1</sup> toegevoegd als ionpaar vormer en wordt vervolgens op een pH van 8,3 gebracht. Daarna wordt de afgemeten hoeveelheid acetonitril er aan toegevoegd.

---

<sup>1</sup> Tenzij anders vermeld. (Tijdens het onderzoek is gebleken dat voor de eluentsamenstelling (80:20 v/v ACN/water) de hoeveelheid van  $5 \times 10^{-3}$  M TBAHS een kritische hoeveelheid is i.v.m. het oplossen. Daarom is de hoeveelheid TBAHS voor deze eluentsamenstelling gehalveerd.

#### 4.4 Meetopstellingen

Tijdens het onderzoek zijn er twee opstellingen gebruikt. De experimentele opstelling wordt gestuurd door de PROMIS. Bij deze opstelling moet de gradiënt en de software handmatig worden gestart. Op dit systeem is de scheiding en het doorbraakvolume van de componenten bepaald. De geautomatiseerde opstelling wordt gestuurd door de PROSPEKT (Programmable On-line Solid Phase Extraction Technique), een kolom cartridge schakelsysteem. Hier op is de herhaalbaarheid en de combinatie van de dinitrofenolen en de chloorfenoxycarbonsuren uitgevoerd. Voor de schematische opstellingen zie Bijlage 5 en 6.

Beide systemen werken volledig on-line. Bij beide systemen wordt de prekolom "gewet" met MEOH waarna de prekolom wordt geconditioneerd met Milli-Q water (pH 2,8). Vervolgens wordt het monster op de prekolom geconcentreerd (bij opstelling 2 wordt nog een clean-up toegepast met 4 % ACN).

Het monster wordt geëluëerd door middel van gradiëntelutie. Bij de geautomatiseerde opstelling schuift de prekolom door en komt er een andere op zijn plaats voor het volgende monster, met het systeem met de PROMIS wordt telkens dezelfde prekolom gebruikt. De uiteindelijke scheiding gebeurt op de analytische kolom (zie voor kolom specificaties, apparatuur 4.2).

#### 4.5 Meetomstandigheden

##### Opstelling 1

Gradiënt eluens A: (20:80 v/v ACN/water +  $5 \times 10^{-3}$  M TBA) pH 8,3  
eluens B: (80:20 v/v ACN/water +  $2,5 \times 10^{-3}$  M TBA) pH 8,3  
kolomtemperatuur: 50°C preconcentratievolume: 60 mL

tijd (min)	flow (mL/min)	eluens A %	eluens B %
0	1,0	100	0
30	1,0	0	100
45	1,0	0	100
50	1,0	100	0
55	0,1	100	0



## Opstelling 2

Gradiënt eluens A: (20:80 v/v ACN/water +  $5 \times 10^{-3}$  M TBA) pH 8,3  
eluens B: (80:20 v/v ACN/water +  $2,5 \times 10^{-3}$  M TBA) pH 8,3  
kolomtemperatuur: 50°C preconcentratievolumen: 60 mL

tijd (min)	flow (mL/min)	eluens A %	eluens B %
0	1,0	100	0
20	1,0	75	25
35	1,0	0	100
50	1,0	0	100
55	1,0	100	0
60	0,1	100	0

### 4.6 Opzet van het onderzoek

De opzet van dit onderzoek ziet er als volgt uit:

- Bepaling van de absorptie maxima van de componenten door van iedere component een geschikte concentratie te maken en deze in een golflengte gebied van 200 nm tot 400 nm te meten, bij een pH van 2,8 en 8,3.
- Optimalisatie van de scheiding op een PRP-1 kolom door de eluenssamenstelling te variëren tussen 30% en 80% ACN in water en door de kolomtemperatuur te variëren van 30 tot 50 °C.
- Piekidentificatie door vgl. van retentietijden van de afzonderlijk geïnjecteerde componenten met de retentietijden van de componenten in de mengstandaard.
- Bij een normale opzet voor een dergelijk onderzoek hoort voor de bepaling van doorbraakvolumina een calibratie van het analytische systeem plaats te vinden d.m.v. loopinjecties van standaarden. In verband met de beschikbare tijd is deze stap overgeslagen. De ervaring met de CFCZ is dat de calibratielijnen voldoende recht zijn tot 1,0 µg/L.
- Bepaling van het doorbraakvolume van de componenten op de prekolom. Dit gebeurt door na te gaan bij welk preconcentratievolumen de recoveries van de componenten lager zijn dan 100%.
- Bepaling van de herhaalbaarheid op laag niveau. Uit de herhaalbaarheid kan de detectiegrens voor de verbindingen met de methode worden bepaald.
- Combineren van de chloorfenoxy-carbonzuren en dinitrofenolen in één bepalingsmethode.

- Adderen van alle componenten (CFCZ + dinitrofenolen) aan oppervlaktewater en deze vervolgens meten bij meerdere golflengten. (na gaan of de selectiviteit van de methode hierdoor kan worden vergroot).

## 5 RESULTATEN EN DISCUSSIE

### 5.1 Bepaling UV-spectra van een aantal dinitrofenolen

De UV-spectra van 9 pesticiden<sup>1</sup> 2,4-dinitrofenol, DNOC, dinoseb, dinoterb, dinoseb acetaat, dinoterb acetaat, medinoterb acetaat, dinobuton en dinocap zijn opgenomen bij twee verschillende pH-waarden (pH 2,8 en 8,3). De spectra zijn opgenomen in een golflengte gebied van 200 nm t/m 400 nm (zie Bijlage 2).

Voor de 4 dinitrofenolen met de hoge prioriteit geldt dat de UV-spectra afhankelijk zijn van de pH. De component 2,4-dinitrofenol vertoont bij een pH van 2,8 een absorptie maximum rond 260 nm en bij een pH van 8,3 maxima rond de 260 nm en 360 nm. De componenten DNOC, dinoseb en dinoterb geven allen hetzelfde absorptie maximum bij een pH van 2,8 (maximum rond de 270 nm) en bij een pH van 8,3 (maximum rond de 370 nm), qua structuur verschillen ze namelijk weinig in de restgroep. Het blijkt dat de laatste drie verbindingen t.o.v. 2,4-dinitrofenol verschoven zijn naar een grotere golflengte. De moleculen kunnen worden voorgesteld door mesomere structuren. Als mesomere structuren meer aan de aangeslagen toestand bijdragen dan aan de grondtoestand wordt het energie verschil tussen grond- en aangeslagen toestand verkleind wat resulteert in een verschuiving naar een grotere golflengte. Voor de verbindingen in de acetaat vorm geldt dat ze algemeen geen absorptie vertonen rond de 370 nm bij een pH 8,3.

Voor het verdere onderzoek is er gekozen voor een golflengte van 265 nm omdat alle verbindingen hier absorptie vertonen.

### 5.2 Scheiding van de componenten

De scheiding is uitgevoerd via directe loop-injecties van 50  $\mu$ L met de 1 mg/L standaard oplossingen in Milli-Q water. Tijdens de experimenten is de kolomtemperatuur op 45°C gehouden, de scheiding is uitgevoerd op een PRP-1 kolom. Er is gemeten bij een flow van 1,0 mL/min en een golflengte van 265 nm. Er is begonnen met isocratische elutie. Als eluens wordt een ACN/water mengsel gebruikt, waarbij aan de waterfase TBAHS als ionpaar vormer wordt toegevoegd en op een pH van 8,3 wordt gebracht. Vervolgens wordt acetonitril toegevoegd.

Eerst is een (30:70 v/v) ACN/water eluenssamenstelling geprobeerd. De componenten ondervinden hierbij een dusdanige retentie op de analytische kolom dat deze met dit eluens niet binnen 50 min. van de kolom komen. De eluenssamenstelling is vervolgens

---

<sup>1</sup> Medinoterb is getracht mee te nemen in het onderzoek, alleen het was niet mogelijk een geschikte standaardoplossing te bereiden.



aangepast tot een (50:50 v/v) ACN/water mengsel. De dinitrofenolen komen nu gescheiden van de kolom af (2,4-dinitrofenol is niet geïnjecteerd, de stof was op dat moment nog niet aanwezig) terwijl de componenten in de acetaat vorm onder deze omstandigheden niet binnen 50 min. van de kolom komen. Voor de acetaten is het eluens aangepast tot (80:20 v/v) ACN/water. Het blijkt dat bij afzonderlijke injecties alle componenten van de kolom komen. Wanneer ze vervolgens als mengsel worden geïnjecteerd blijken de componenten dinoseb acetaat, dinoterb acetaat en medinoterb acetaat dezelfde retentie te ondervinden.

Om een goede scheiding te bewerkstelligen is er een lineaire gradiënt van (20:80 v/v ACN/water tot 80:20 v/v ACN/water) in 30 min. toegepast. (zie meetomstandigheden 4.5)

Alle verbindingen worden nu basislijn gescheiden behalve dinoseb acetaat en dinoterb acetaat (zie Bijlage 3). Deze twee componenten ondervinden ook onder deze omstandigheden dezelfde retentie. De resolutie voor medinoterb acetaat t.o.v. dinoseb acetaat en dinoterb acetaat bedraagt  $R=1,6^1$ . Bij twee even grote pieken correspondeert een volledige scheiding met  $R=1,25$ . Verschillen de pieken sterk in grootte dan verdwijnt de kleine piek als het ware in de voet van de grote en is er geen goede scheiding en dus een hogere resolutie nodig. De verbinding dinocap geeft twee pieken. Voor dinocap bestaan er namelijk twee structuren (zie Bijlage 1) die allebei in de standaard oplossing voorkomen. De resolutie voor deze verbinding bedraagt  $R = 0,9$ , er is geen sprake van een goede scheiding. Verder blijkt dat om deze component goed te kunnen aantonen er minstens tien keer zoveel moet worden geïnjecteerd t.o.v. de andere verbindingen. Tevens is deze component zeer lichtgevoelig en wordt dus snel omgezet. Waarschijnlijk is er in de standaardoplossing een gedeelte gepolymeriseerd waardoor een groot molecuul (dimeer) ontstaat dat niet valt te bepalen. Om het gedeelte te bepalen wat niet is gepolymeriseerd moet er een hogere concentratie worden geïnjecteerd om dezelfde respons te krijgen als de andere dinitrofenolen. Om deze reden wordt dinocap niet verder bepaald. Omdat dinoseb acetaat en dinoterb acetaat samen vallen kan er voor de andere experimenten (zoals doorbraakvolume en herhaalbaarheid) beide componenten niet in één standaard voorkomen vanwege de beperkte tijd is de keuze gemaakt om alleen dinoseb acetaat in het verdere onderzoek te bepalen.

Om te kijken of de kolomtemperatuur invloed heeft op de respons is er gemeten bij drie verschillende temperaturen namelijk bij 30, 45 en 50°C. De resultaten staan aangegeven in Bijlage 4. Uit de resultaten blijkt dat de respons tussen 45°C en 50°C weinig verschilt. Bij 30°C neemt de respons af. Naarmate de temperatuur toeneemt neemt de retentie tijd af. Voor het verdere onderzoek is er gekozen voor een kolomtemperatuur van 50°C. Deze temperatuur wordt ook toegepast bij de CFCZ bepaling. In Tabel 5.1 staan de retentietijden en capaciteitsfactoren van de verbindin-

---

1

$$R_{j,i} = \frac{\Delta t_{Rj,i}}{2(\sigma_{t,j} + \sigma_{t,i})}$$



verbindingen voor deze temperatuur weergegeven.

Opmerking:

Retentietijden kunnen iets verschuiven bij het vernieuwen van het eluens.

Dit komt o.a. omdat de vloeistoffen worden afgemeten in een maatcilinder en door de pH regeling van het eluens.

Tabel 5.1: Retentietijden en capaciteitsfactoren.

Retentietijden en capaciteitsfactoren van de verbindingen op de PRP-1 kolom  
 Gradiënt eluens A: (20:80 v/v ACN/water  $5 \times 10^{-3}$  M TBA) pH 8,3  
 eluens B: (80:20 v/v ACN/water  $5 \times 10^{-3}$  M TBA) pH 8,3  
 flow: 1,0 mL/min kolomtemperatuur: 50°C

component	retentietijd ( $t_r$ in min)	capaciteitsfactor ( $k'$ )
2,4-dinitrofenol	13,73	4,28
DNOC	15,53	4,97
dinoseb	19,99	6,69
dinoterb	21,00	7,08
dinoseb acetaat	28,92	10,12
dinoterb acetaat	28,92	10,12
medinoterb acetaat	29,97	10,53
dinobuton	32,48	11,49
dinocap	38,99	14,00
	40,60	14,62

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \text{waarin } t_0 = \text{retentietijd van de onvertraagde component} \\ \text{(hier: 2,60 minuten)}$$

In Tabel 5.1 verschilt de retentietijd voor dinoseb en dinoterb ongeveer een minuut terwijl hun acetaten dezelfde retentietijd hebben. Dit kan verklaard worden uit het feit dat de restgroep van dinoseb acetaat en dinoterb acetaat (zie Bijlage 1) nauwelijks verschilt. Voor dinoseb en dinoterb is het anders. Deze componenten komen voor in anionvorm en zullen wel retentie ondervinden via het ionpaarmechanisme. De restgroep voor dinoseb (R = 2-sec-butyl) en voor dinoterb (R = 2-tert-butyl) is vrij draaibaar waardoor bij dinoseb de O-groep gedeeltelijk wordt afgeschermd en dus minder affiniteit heeft voor het TBA<sup>+</sup>. De conformatie voor dinoterb blijft hetzelfde ondanks de vrije draaibaarheid van de restgroep. Het verschil in retentietijd kan hiermee verklaard worden.

### 5.3 Bepaling van het doorbraakvolume

Het doorbraakvolume is nu voor zeven componenten bepaald. Er wordt respectievelijk 30, 60 en 80 mL monstervloeistof (Milli-Q water geaddeerd op  $1,0 \mu\text{g/L}$ ) gepreconcentreerd op een PLRP-S kolom. De oppervlakken van de pieken bij een preconcentratievolume van 30 mL worden hierbij op een recovery van 100 % gesteld. Een verbinding breekt door wanneer het volume dat gepreconcentreerd wordt zo groot is dat die verbinding niet langer op de prekolom wordt vastgehouden, maar er door heen gaat. De resultaten staan vermeld in Fig. 5.1.

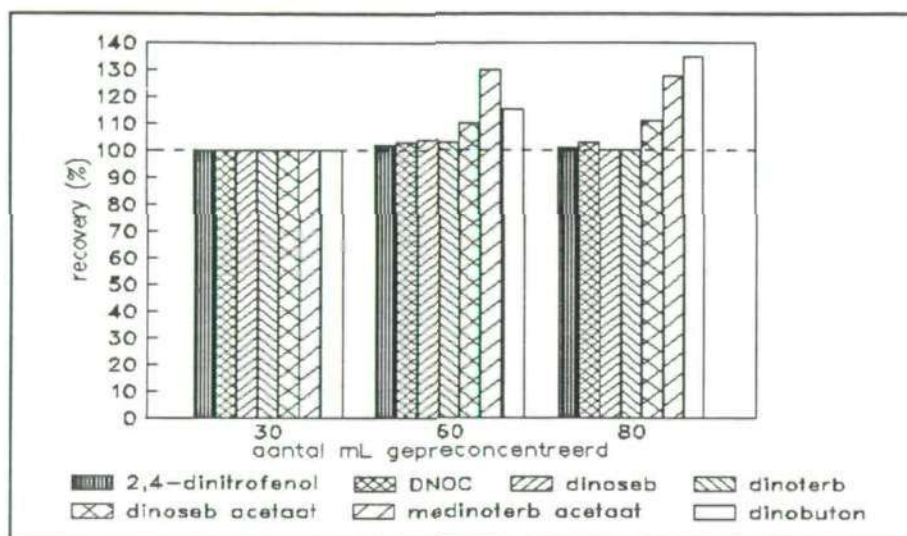


Fig. 5.1: Doorbraakvolume van 7 dinitrofenolen.

Uit de resultaten blijkt dat de recoveries voor de verbindingen 2,4-dinitrofenol, DNOC, dinoseb en dinoterb bij een preconcentratievolume van 60 en 80 mL rond de 100% schommelen. Voor de laat eluerende componenten zijn de recoveries significant te hoog. Dit kan veroorzaakt worden door de manier van integreren. Doordat de verbindingen achter in het chromatogram zitten zijn de pieken breder, bij een laag preconcentratievolume moet het te meten signaal meer versterkt worden om duidelijke pieken te krijgen. De ruis wordt daardoor mee versterkt en is het moeilijk te onderscheiden welk deel bij de piek behoort en wat als ruis beschouwd moet worden. Naarmate het preconcentratievolume toeneemt moet de versterkingsfactor verlaagd worden om de pieken geheel in beeld te krijgen. De ruis draagt nu minder bij en kan er makkelijker worden geïntegreerd. Uit Fig. 5.1 kan geconcludeerd worden dat er bij 80 mL nog geen sprake is van doorbraak. Voor het verdere onderzoek is er gekozen voor een preconcentratievolume van 60 mL. Bij de bepaling van de CFCZ en bentazon wordt ook een preconcentratievolume van 60 mL toegepast.



## 5.4 Validatie van de methode

### 5.4,1 Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid is uitgevoerd met opstelling 2. In de opstelling staat een PROSPEKT, waarmee automatisch van voorkolom wordt gewisseld en 12 monsters geanalyseerd kunnen worden. In deze opstelling wordt een wasstap toegepast met 4 % ACN voor het verwijderen van de humuspiek. Deze wasstap is ook toegepast bij het bepalen van de herhaalbaarheid voor de dinitrofenolen. De herhaalbaarheid is in zeventvoud uitgevoerd (waarbij 60 mL wordt gepreconcentreerd) voor Milli-Q water geaddeerd op 0,25 µg/L. De resultaten voor de piekhoogte en het piekoppervlak staan vermeld in Tabel 5.2.

Tabel 5.2: De herhaalbaarheid en de detectiegrens voor 7 dinitrofenolen.

De herhaalbaarheid in Milli-Q water op het niveau van 0,25 µg/L, berekend voor de piekhoogte ( $X_{gem}$ , hoogte) en het piekoppervlak ( $X_{gem}$ , oppv), de geschatte detectiegrens ( $D$  µg/L) en het minimaal te preconcentreren volume<sup>1</sup>.

component	$X_{gem}$ hoogte	sd	rsd (%)	D (µg/L)	volume (mL)	$X_{gem}$ oppv.	sd	rsd (%)	D (µg/L)	volume (mL)
2,4-dinitrofenol	1198	106	9	0,07	42	9420	538	6	0,05	30
DNOC	2918	53	2	0,02	4	19288	162	1	0,01	2
dinoseb	2819	86	3	0,02	60	19572	431	2	0,02	60
dinoterb	2052	21	1	0,01	6	15729	306	2	0,02	12
dinoseb acetaat	590	46	8	0,06	36	10064	545	5	0,04	24
medinoterb acetaat	265	14	5	0,04	24	4204	484	12	0,09	54
dinobuton	630	34	5	0,04	24	14247	1238	9	0,07	42

De herhaalbaarheid is voor alle componenten goed te noemen, voor de piekhoogte varieert de rsd van 1 t/m 9 % en voor het piekoppervlak van 1 t/m 12 %.

<sup>1</sup> Het minimaal te preconcentreren volume wordt gerelateerd aan de gestelde norm. Voor DNOC bedraagt deze 0,3 µg/L en voor Dinoseb 0,02 µg/L (zie Nota [1]) voor de overige verbindingen wordt de norm gesteld op 0,1 µg/L.



#### 5.4,2 Schatting detectiegrenzen

Uit de resultaten van de herhaalbaarheid kan er ook een schatting worden gemaakt van de detectiegrens van de verbindingen. Volgens IUPAC is een signaal met een redelijke betrouwbaarheid van de ruis te onderscheiden, indien dit signaal tenminste 3  $\sigma$  van de ruis verschilt. De detectiegrens kan nu berekend worden met de volgende formule:

$$D = \text{rsd}/100 \times C \times 3$$

waarbij:

D = detectiegrens

rsd = relatieve standaarddeviatie in %

C = concentratie van de component

In Tabel 5.2 staan de berekende detectiegrenzen vermeld.

De detectiegrenzen bepaald uit de herhaalbaarheid van de piekhoogte liggen tussen de 0,01  $\mu\text{g/L}$  en 0,07  $\mu\text{g/L}$  en de detectiegrenzen van het piekoppervlak liggen tussen de 0,01  $\mu\text{g/L}$  en 0,09  $\mu\text{g/L}$ . Verder zijn in de Tabel 5.2 ook de minimaal te preconcentreren volumina opgenomen om op het niveau van de gestelde normen te kunnen meten. Deze volumina berekend uit de detectiegrenzen van de gem. piekhoogte en het gem. piekoppervlak, variëren tussen de 4 en 60 mL en tussen de 2 en 60 mL. Bij een preconcentratievolume van 60 mL kan er aan de gestelde normen worden voldaan. Uit Tabel 5,2 kan verder worden opgemerkt dat de respons van 2,4-dinitrofenol vergeleken met de respons van DNOC en dinoseb ongeveer een factor 3 verschilt. Hetzelfde geldt voor de detectiegrens. Het blijkt dus dat bij een toenemende respons de detectiegrens verbetert. Voor de andere componenten geldt dit in mindere mate. Voor de componenten waar een hogere prioriteit aan toe is gekend kan beter bij een hogere golflengte worden gemeten namelijk rond de 360 nm.

#### 5.5 Combinatie chloorfenoxycarbonsuren en dinitrofenolen

Alle componenten (CFCZ + dinitrofenolen) zijn geanalyseerd aan oppervlaktewater (Maaswater Eysden 93/07/06) op een niveau van 1,0  $\mu\text{g/L}$ . Metingen zijn verricht bij meerdere golflengten. Zo is er gemeten bij 232, 265 en 360 nm (Bijlage 7).

Uit de resultaten blijkt dat bij een golflengte van 232 nm alle verbindingen basislijn gescheiden zijn alleen vallen 2,4-dinitrofenol en 2,4,5-T samen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat 2,4,5-T niet valt te bepalen als 2,4-dinitrofenol aanwezig is, 2,4-dinitrofenol kan wel worden bepaald omdat deze component ook absorptie vertoont bij 360 nm en 2,4,5-T niet. Bij een golflengte van 265 nm zijn alleen de dinitrofenolen zichtbaar. Bij een golflengte van 360 nm zijn alleen de 2,4-dinitrofenol, DNOC, dinoseb en dinoterb zichtbaar. Voor deze laatste verbindingen neemt de respons sterk toe bij 360 nm. Uit de resultaten blijkt dat de twee groepen verbindingen gecombineerd kunnen worden in één bepalingsmethode. Selectiviteit kan worden ingebouwd door bij verschillende golflengten te meten.

## 6 CONCLUSIES

Met de ontwikkelde methode waarbij 60 mL gepreconcentreerd wordt, is het mogelijk om zeven verbindingen op dinitrofenol basis op het concentratie niveau tussen 0,01 en 0,09  $\mu\text{g/L}$  te meten. De verbindingen dinoseb en DNOC voldoen hiermee aan de norm die staat vermeld in de Nota [1], verder voldoen de overige verbindingen aan de gestelde norm van 0,1  $\mu\text{g/L}$ . Het minimaal te preconcentreren volume voor de verbindingen dat nodig is om aan de normen te voldoen ligt tussen de 2 en 60 mL. De preconcentrerende wordt uitgevoerd d.m.v. vaste fase extractie en wordt on-line toegepast. De scheiding vindt plaats op een polymere PLRP-S kolom, de detectie met een UV-detector bij 265 nm.

De eluenssamenstelling heeft invloed op de scheiding van de componenten en de kolomtemperatuur op de respons. Bij een gradiënt van (20:80 v/v ACN/water tot 80:20 v/v ACN/water) en een kolomtemperatuur van 50°C zijn alle verbindingen basislijn gescheiden, behalve dinoseb acetaat en dinoterb acetaat.

De verbindingen zijn goed te preconcentreren op een polymere prekolom. Dit blijkt uit de doorbraakvolumina die voor de zeven verbindingen is uitgevoerd groter dan 80 mL. Verder is de herhaalbaarheid op het niveau van 0,25  $\mu\text{g/L}$  voor Milli-Q water redelijk tot goed te noemen voor de zeven verbindingen (voor de piekhoogte rsd van 1-9 % en voor het piekoppervlak rsd van 1-12 %).

De combinatie van de CFCZ en dinitrofenolen is mogelijk binnen één bepalingmethode. De verbinding 2,4,5-T kan echter niet bepaald worden wanneer 2,4-dinitrofenol aanwezig is. Andersom is geen probleem omdat 2,4-dinitrofenol bij meerdere golflengten absorptie maxima heeft. Er kan selectief worden gemeten bij 232 nm, 265 nm en 360 nm. Dit wordt mede bevestigd door de UV-spectra die voor alle dinitrofenolen zijn opgenomen (behalve medinoterb).



## 7 AANBEVELINGEN

- 7.1) Tijdens het onderzoek is gebleken dat de standaardoplossing voor dinocap een veel lagere respons gaf dan de andere, qua structuur gelijke, dinitrofenolen. Mogelijk is dinocap gepolymeriseerd. Om meer duidelijkheid te krijgen in welke vorm "dinocap" in de standaard aanwezig was kan er 1) met behulp van massaspectrometrie meer inzicht worden verkregen, 2) een verse oplossing worden gemaakt.
- 7.2) Voor medinoterb is niet gelukt een geschikte standaard te bereiden en is daarom niet bepaald. In het vervolg onderzoek zou deze stof alsnog kunnen worden bepaald.
- 7.3) Voor de dinitrofenolen is het aan te bevelen een calibratiecurve te bepalen via loopinjecties van standaarden ten einde de lineariteit te bepalen.
- 7.4) Bij de bepaling van de herhaalbaarheid in Milli-Q water 5.4,1 is een wasstap uitgevoerd met 4% ACN. Ter controle of er geen verlies is opgetreden moet de herhaalbaarheid zonder deze wasstap nog worden uitgevoerd.
- 7.5) Het is aan te bevelen de recovery en de herhaalbaarheid van de verbindingen in oppervlaktewater te bepalen omdat de matrix van invloed kan zijn op deze parameters.
- 7.6) In het vervolg onderzoek kunnen dinitrofenolen en CFCZ worden gecombineerd in één bepalingsmethode. M. b.v. fotodiode array detectie of tijd geprogrammeerde golflengte detectie kunnen beide groepen specifiek worden bepaald.



## 8 LITERATUUR

- 1 Derde Nota Waterhuishouding (Water voor nu en later), Ministerie van Verkeer en Waterstaat. ISBN 9012063531, 1989
- 2 Method Development for the Analysis of Pesticides on a Nitrophenol Basis.  
P. Mussmann e.a.  
Vom Wasser 79, 145-158 (1992)
- 3 Determination of phenoxyacid herbicides in water  
R.B. Geerdink e.a.  
Journal of Chromatography, 547 (1991) 478-483
- 4 Vaste fase extractie als monstervoorbereidings- en isolatie techniek voor de HPLC, literatuurscriptie RIZA (Lelystad) januari 1990  
J. Viveen
- 5 Reversed-Phase Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography of Nitrophenols.  
H. Roseboom e.a.  
Journal of Chromatography, 208 (1981) 331-337
- 6 Identification of Nitrophenols in Rain-Water by High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection.  
H.B. Bohm e.a.  
Journal of Chromatography, 269 (1983) 208-212
- 7 Determination of priority pollutant nitrophenols in water by High Performance Liquid Chromatography.  
B. Schultz  
Journal of Chromatography, 269 (1983) 208-212
- 8 Fenolherbiciden, oktober 1993  
(Een analyse van problematiek in aquatisch milieu)  
RIZA-nota  
DGW rapport  
H.G.K. Ordelman e.a.
- 9 Chromatografie ISBN 9031310999, 1985  
R.S. Deelder e.a.
- 10 Struktuuropheldering van organische verbindingen met behulp van spectrometrische methoden  
DR.R. Visser ISBN 9010103129, 1980

- 11 The Agrochemicals Handbook  
The Royal Society of Chemistry 1987  
ISBN 0-85186-416-3
- 12 Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln  
Lieferung 1991  
ISSN 0930-4657
- 13 Organic chemistry 5th edition  
Morrison and Boyd  
ISBN 0-205-08453-2
- 14 The Merck Index 11th edition  
ISBN 911910-28-X
- 15 Pesticide manual 9th edition  
A World Compendium  
C.R. Worthing, R.J. Hance

## 9 BIJLAGEN

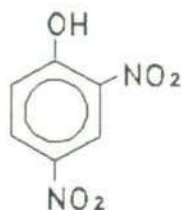
- 1      Strukturformules van de componenten.
- 2      UV-spectra van een aantal dinitrofenolen.
- 3      De scheiding op een polymere kolom.
- 4      De invloed van de kolomtemperatuur op de respons.
- 5      Opstelling 1 (experimentele opstelling en programmering van de PROMIS).
- 6      Opstelling 2 (geautomatiseerde opstelling en programmering van de PROSPEKT).
- 7      Combinatie van de chloorfenoxycarbonsuren en dinitrofenolen in oppervlaktewater. (Maaswater Eysden 93/07/06 geaddeerd op 1,0  $\mu\text{g/L}$ )



## Bijlage 1:    Strukturformules van de componenten

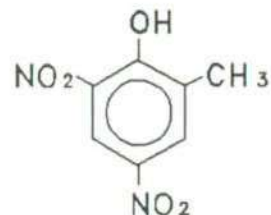
### 2,4-Dinitrofenol

herbicide



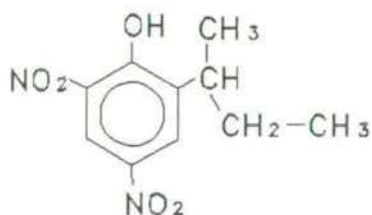
### DNOC

2-methyl-4,6-dinitrofenol  
acaricide, insecticide



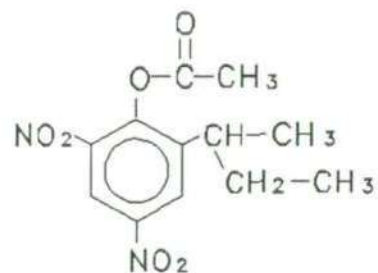
### Dinoseb

2-sec-butyl-4,6-dinitrofenol  
herbicide, fungicide



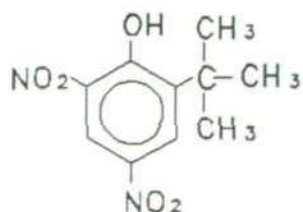
### Dinoseb acetaat

2-sec-butyl-4,6-dinitrofenyl  
acetaat  
herbicide, fungicide



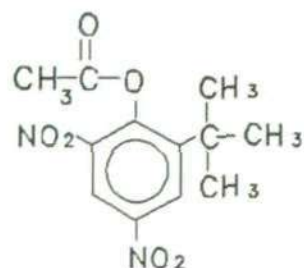
### Dinoterb

2-tert-butyl-4,6-dinitrofenol  
acaricide, herbicide



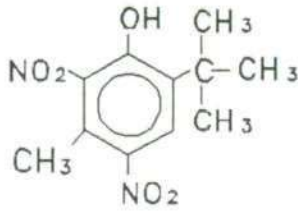
### Dinoterb acetaat

2-tert-butyl-4,6-dinitrofenyl  
acetaat  
acaricide, herbicide



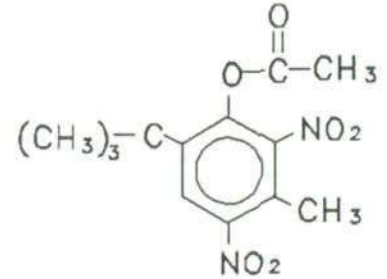
**Medinoterb**

2,2-methylpropan-4,6-dinitro-5-methylfenol  
herbicide



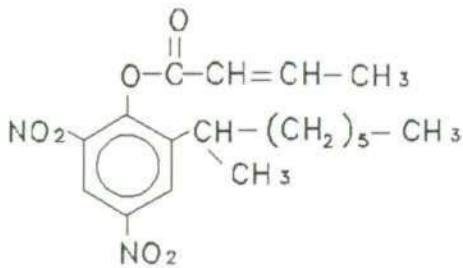
**Medinoterb acetaat**

3-methyl-6-tert-butyl-2,4-dinitrofenyl acetaat  
herbicide



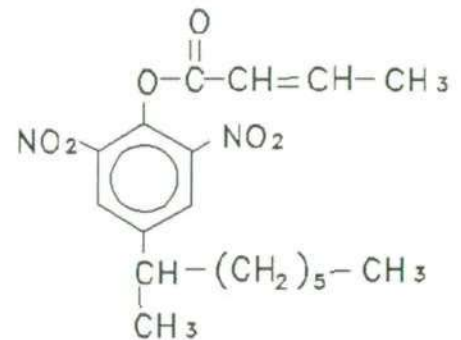
**Dinocap**

2-(1-methylheptyl)-4,6-dinitrofenyl 2-butenoaat  
acaricide, fungicide



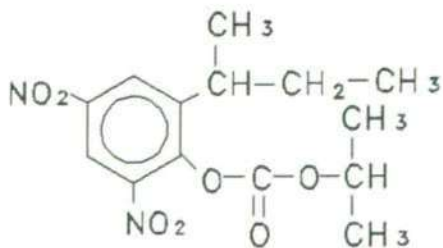
**Dinocap**

4-(1-methylheptyl)-2,6-dinitrofenyl 2-butenoaat



**Dinobuton**

2-sec-butyl-4,6-dinitrofenyl isopropyl carbonaat  
acaricide



Bijlage 2: UV spectra van een aantal dinitrofenolen

Fig. 1: concentratie 1 mg/L, pH = 2,8  
1 = 2,4-Dinitrofenol      3 = Dinoseb  
2 = Dinoterb              4 = DNOC

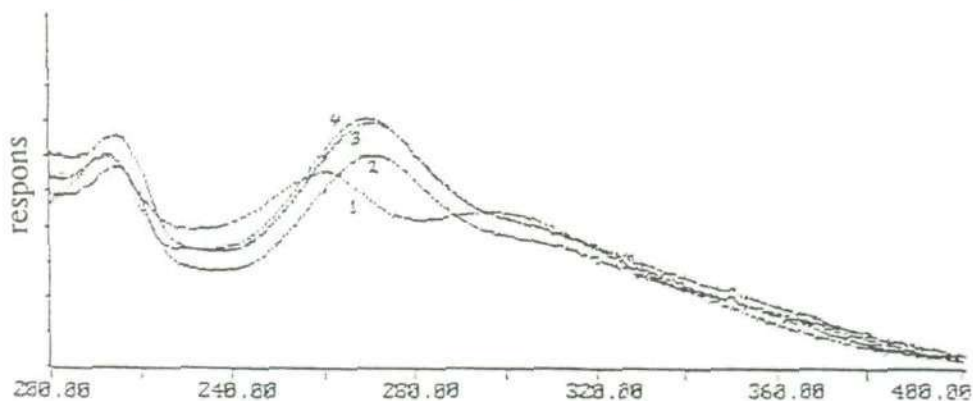


Fig. 2: concentratie 1 mg/L, pH = 8,3  
1 = 2,4-Dinitrofenol      3 = Dinoterb  
2 = DNOC                  4 = Dinoseb

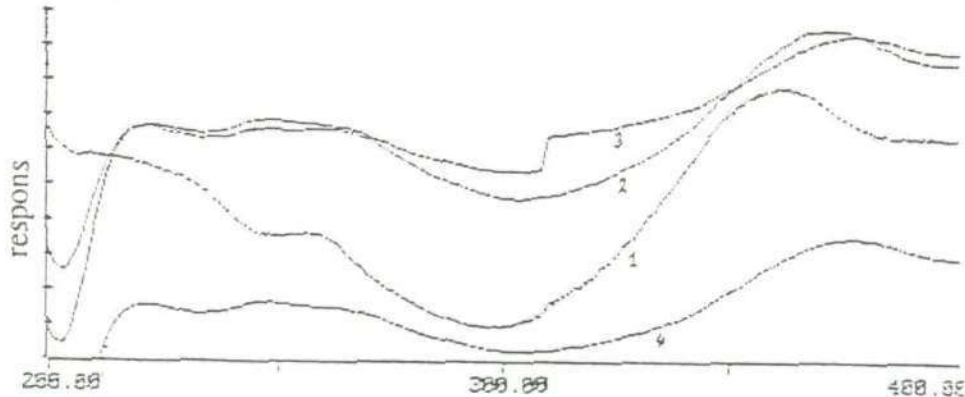


Fig. 3: concentraties 1 mg/L, pH = 2,8  
1 = Medinoterb acetaat      3 = Dinoseb acetaat  
2 = Dinoterb acetaat

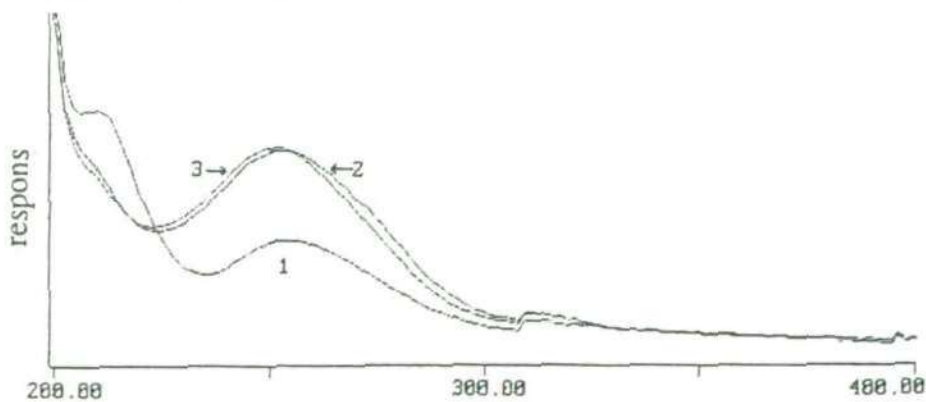




Fig. 4: concentratie 1 mg/L, pH = 8,3  
 1 = Medinoterb acetaat    3 = Dinoseb acetaat  
 2 = Dinoterb acetaat

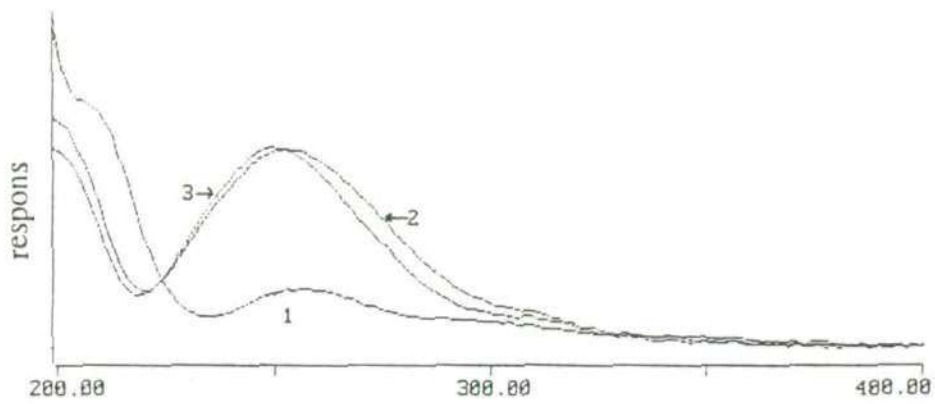


Fig. 5: concentratie 1 mg/L, pH = 2,8 en 8,3  
 Dinobuton

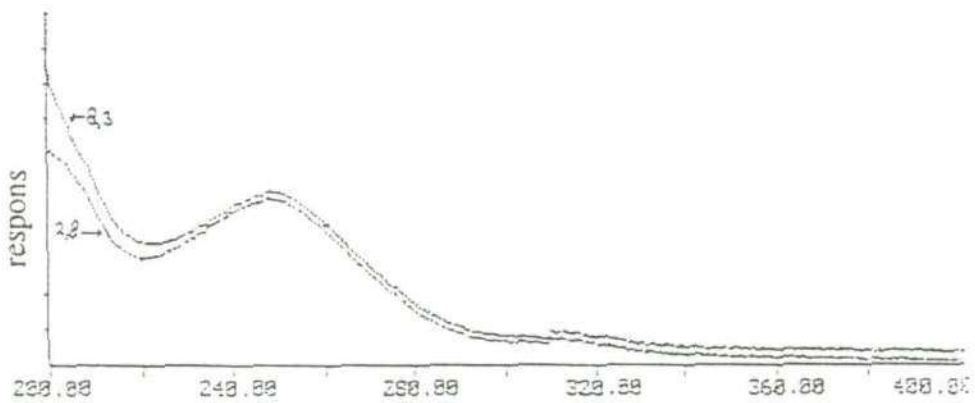
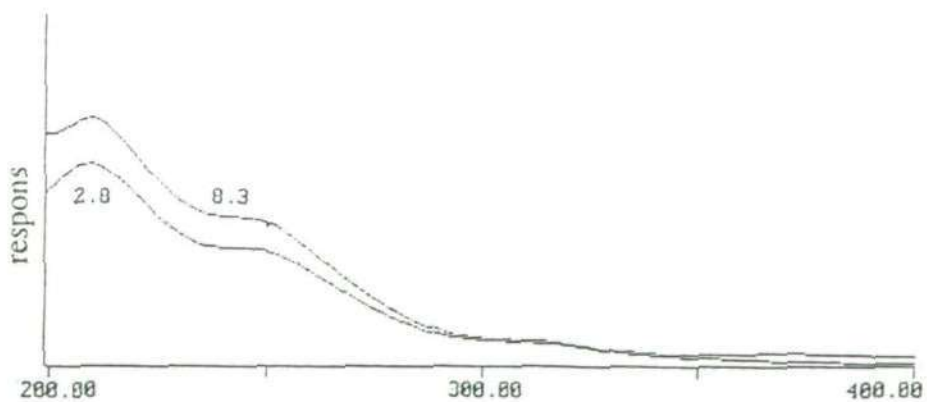
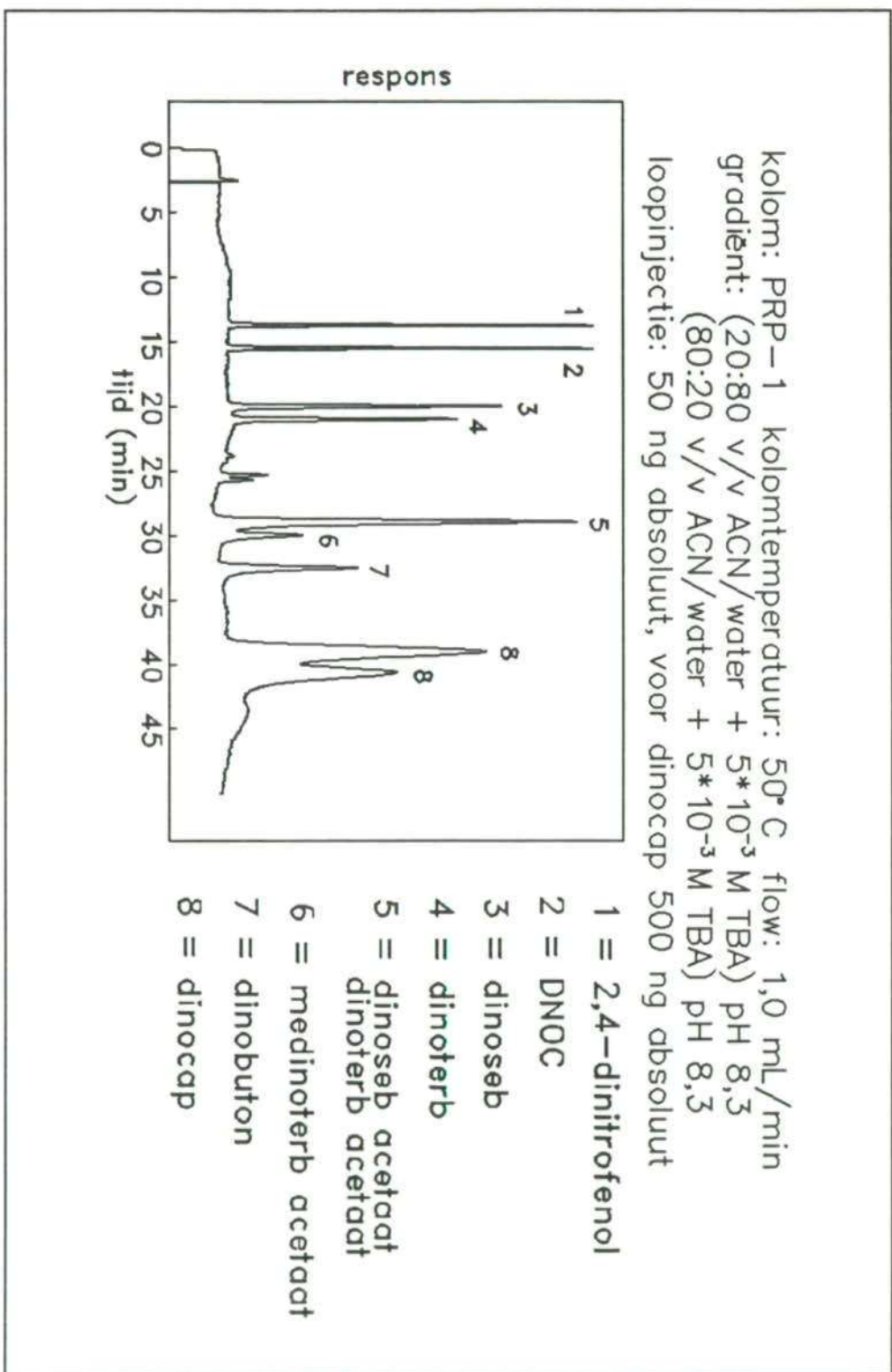


Fig. 6: concentratie 10 mg/L, pH = 2,8 en 8,3  
 Dinocap



Opmerking: De oplossingen zijn gemaakt in een 30:70 v/v ACN/water mengsel.

Bijlage 3: De scheiding op een polymere kolom.



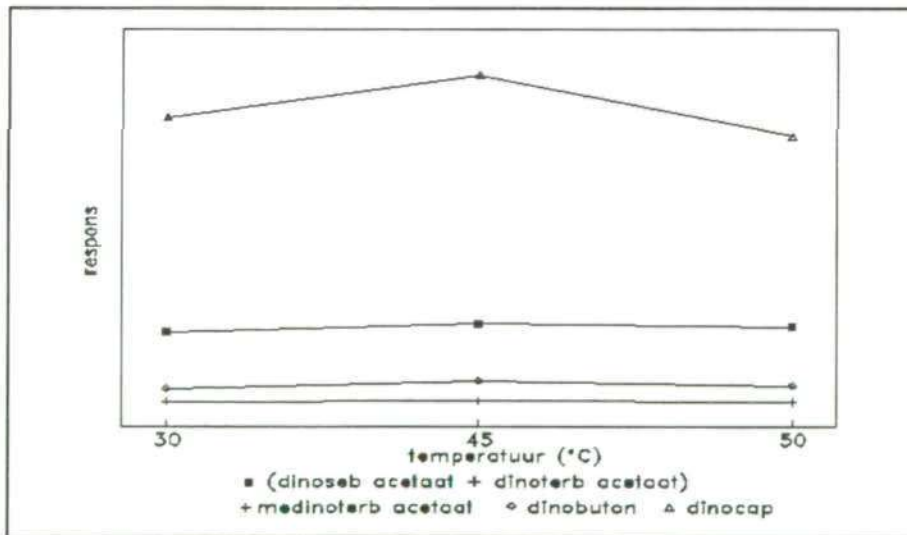
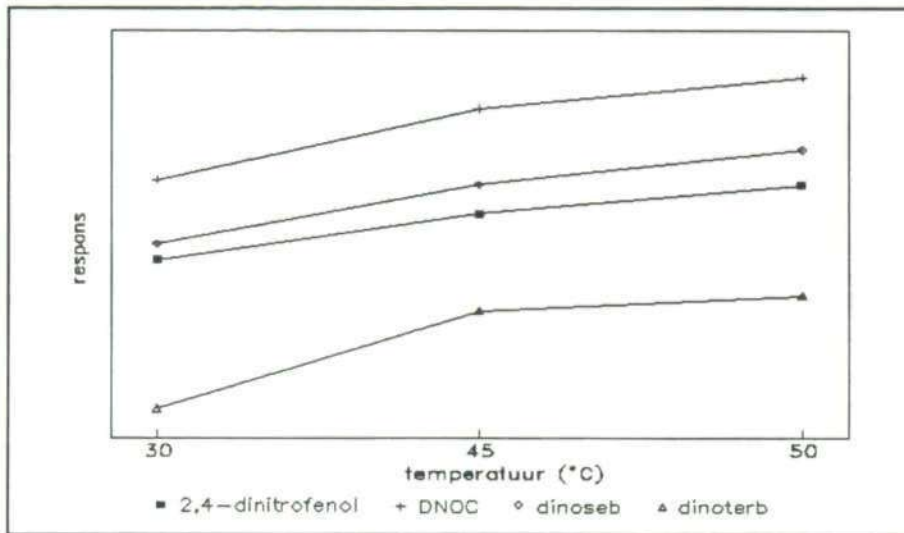
**Bijlage 4: Invloed van de kolomtemperatuur op de respons.**

kolom: PRP-1 flow: 1,0 mL/min

gradiënt: eluens A: (20:80 v/v ACN/water +  $5 \times 10^{-3}$  M TBA) pH 8,3

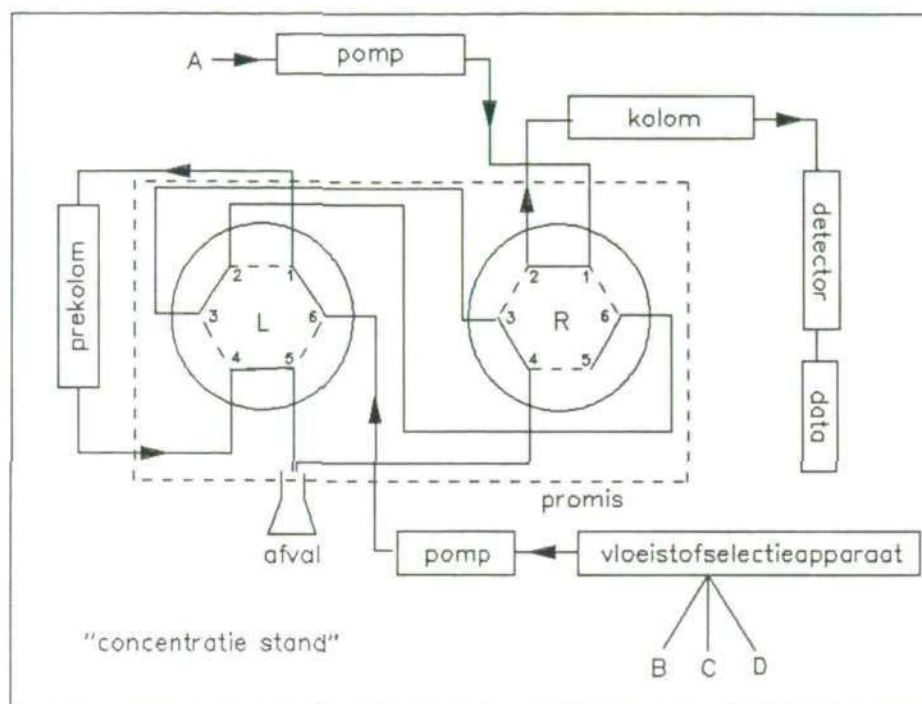
eluens B: (80:20 v/v ACN/water +  $5 \times 10^{-3}$  M TBA) pH 8,3

loopinjectie: 50 ng absoluut, voor dinocap 500 ng absoluut





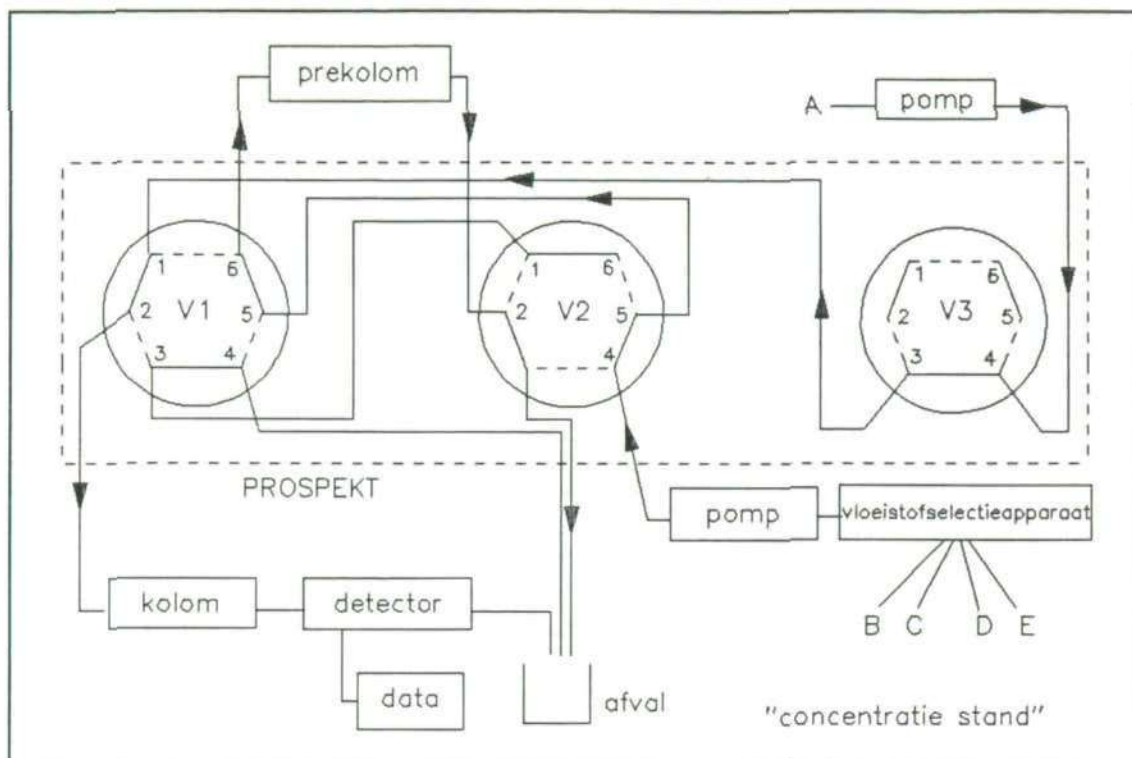
## Bijlage 5: Opstelling 1 (experimentele opstelling en programmering PROMIS)



A = eluens  
B = methanol  
C = water (pH 2,8)  
D = monstervloeistof

tijd	Aux 1	Aux 2	Aux 3	Aux 4	Flow	Component	Notes
0:00:00	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	vloeistof B	Aux 1: stuurt Valve 1 (L) aan
0:00:01	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	vloeistof B	Aux 2: stuurt Valve 2 (R) aan
0:02:00	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	vloeistof B	Aux 3: stuurt vloeistofselectieapparaat aan
0:04:00	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	vloeistof C	Aux 4: stuurt pomp voor vloeistof B, C en D aan
0:04:01	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	vloeistof C	
0:04:02	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	vloeistof C	
0:06:00	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	vloeistof C	
0:08:00	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	vloeistof D	
0:08:01	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	vloeistof D	
0:08:02	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	vloeistof D	
0:10:00	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	vloeistof D	
0:40:00	-----	-----	-----	-----	2,0 mL/min	eluens (mobile fase)	
0:85:00	-----	-----	-----	-----	0,0 mL/min		
	End						

**Bijlage 6: Opstelling 2 (geautomatiseerde opstelling en programmering PROSPEKT)**



V1:   ----- elute  
       — purge

A = eluens    D = monstervloeistof  
 B = methanol E = wasvloeistof (4 % ACN)  
 C = water (pH 2,8)

tijd

0:00:01	change cartridge	
0:00:04	Valve 1: purge	vloeistof B
	Valve 2: -----	
	flow: 2,5 mL/min	
0:01:30	flow: 2,0 mL/min	
0:02:00	Valve 2: —	
0:03:00	Valve 2: -----	vloeistof C
	flow: 2,5 mL/min	
0:04:30	flow: 2,0 mL/min	
0:05:00	Valve 2: —	
0:06:00	Valve 2: -----	vloeistof D
0:08:00	Valve 2: —	
0:38:00	Valve 2: -----	vloeistof E
	flow: 2,5 mL/min	
0:39:30	flow 1,0 mL/min	
0:40:00	Valve 2: —	
0:41:00	Valve 1: elute	eluens (mobiele fase)
	Valve 2: -----	
	Aux port 1: on	
	Aux port 2: on	
0:42:00	Valve 2: -----	
	flow: 0,0 mL/min	
	Aux port 1: off	
	Aux port 2: off	
1:20:00	END	

Bijlage 7: Combinatie van de chloorfenoxycarbonzuren en dinitrofenolen in oppervlaktewater (Maaswater Eysden 93/07/06 geadderd op 1,0 µg/L)

