

# **DIONEX**

***HPLC milieu-analyses***

***KVCV studiedag***

# Introductie



- ◆ Milieu-analyses worden steeds belangrijker door toenemende regelgeving en bewustwording.
- ◆ Normen en controles worden regelmatig aangescherpt door overheid
- ◆ Dionex ontwikkelt technologie voor het efficient en betrouwbaar "analyseren" van zowel an-organische en organische verbindingen
- ◆ Door de vaak complexe sample matrix is het monstervoorbewerkingstraject bepalend voor het slagen van de analyse !

# Presentatieoverzicht

De volgende aspecten en applicaties zullen besproken worden

- ◆ HPLC SPE technologie
- ◆ PAK's in grondmonsters
- ◆ PAK's in plantaardige olieën
- ◆ OCB-PCB in grond
- ◆ Glyfosaat/Ampa (round-up) in water

# Techniek

Om de gevraagde detectiegrens te bereiken en de matrix-effecten te elimineren wordt gebruik gemaakt van:

SPE in combinatie met HPLC of GC

Solid Phase Extraction



# Online SPE

- ◆ Solid Phase Extractie (SPE) is een extractie methode die gebruik maakt van een vaste fase (sorbent) waarop de te bepalen componenten worden "getrapt".
- ◆ Met behulp van een HPLC pomp worden de componenten op een cartridge gebracht waarna deze met verschillende vloeistoffen onder hoge druk LC condities gewassen wordt. Verschillen in oplosbaarheid spelen hier een belangrijke rol.
- ◆ Daarna volgt elutie met mobiele fase in een analytische HPLC run

# WPS 3000 SPE unit

- ◆ WPS 3000 SPE voert volledig automatisch de SPE en HPLC analyse uit
- ◆ SPE en HPLC analyse worden gelijktijdig uitgevoerd waardoor de analysetijd beperkt blijft tot de runtijd van de HPLC
- ◆ Minimale sample handling waardoor de reproduceerbaarheid wordt verhoogd en "analistijd" wordt verkort



# Summit Dual-Gradient HPLC and LC-MS Systems



## Physical - CHEMICAL

Surface area ( $A$ )  $m^2/g$

Carbon loading ( $C$ )  $\%$

Ligand density ( $\Gamma$ )  $\%$

Particle size ( $d_p$ )  $\mu m$

Pore size ( $R_p$ )  $\mu m$

## Chromatographic

Retention ( $k'$ )

Relative retention

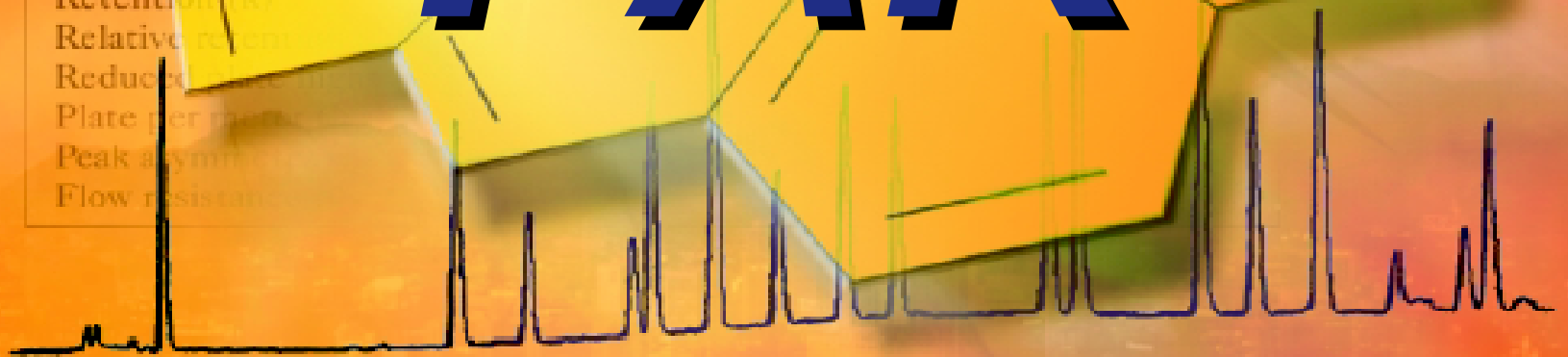
Reduced

Plate per meter

Peak asymmetry

Flow resistance

# PAK



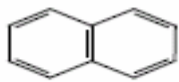


# PAK introductie

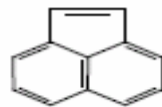


- ◆ HPLC wordt gebruikt voor de bepaling van diverse componenten PAK staat voor polycyclische aromatische koolwaterstoffen opgebouwd uit twee of meer aromatische zesringen (benzeenringen), soms in combinatie met een aromatische vijfring. PAK zijn persistent: ze worden in de natuur slechts langzaam afgebroken. PAK ontstaan door thermische pyrolyse van organisch materiaal. Pyrolyse vindt plaats bij temperaturen vanaf ongeveer 300°C en levert een gas en een koolstofrijk product op.
- ◆ De meeste PAK zijn giftig en kankerverwekkend, al is de kans op kanker door blootstelling aan PAK klein (roken uitgezonderd). Slechts lichte verbindingen als naftaleen zijn wateroplosbaar. De overige verbindingen lossen slecht op in water, maar goed op in vet. De oplosbaarheid in water neemt toe als de watertemperatuur stijgt en daalt als de hoeveelheid zout toe neemt. Over het algemeen zijn alle PAK componenten oplosbaar organische oplosmiddelen.

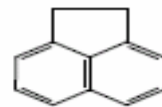
# Componenten en structuren:



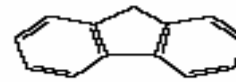
1. Naphthalene



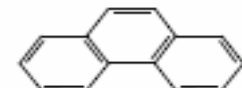
2. Acenaphthylene



3. Acenaphthene



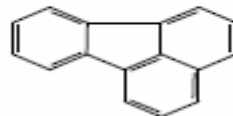
4. Fluorene



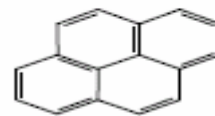
5. Phenanthrene



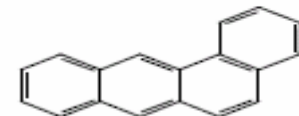
6. Anthracene



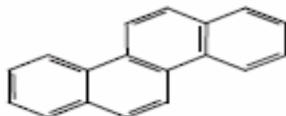
7. Fluoranthene



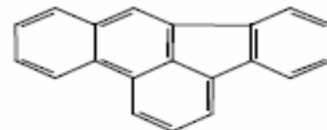
8. Pyrene



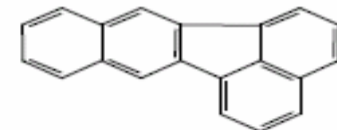
9. Benz(a)anthracene



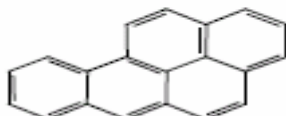
10. Chrysene



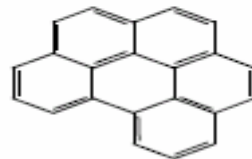
11. Benzo(b)fluoranthene



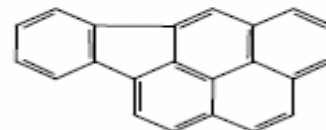
12. Benzo(k)fluoranthene



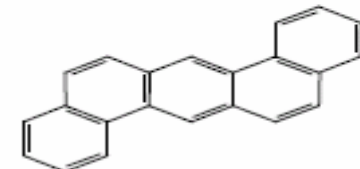
13. Benzo(a)pyrene



14. Benzo(g,h,i)perylene



15. Indeno(1,2,3,c,d)pyrene



16. Dibenz(a,h)anthracene

# Diverse lijsten met de bepaalde componenten:

## **EPA (16):**

Naftaleen – Acenaftyleen – Acenaften – Fluoreen – Fenanthreen – Antraceen - Fluorantheen – Pyreen – Benzo(a)anthraceen – Chryseen – Benzo(b)fluorantheen – Benzo(k)fluorantheen – Benzo(a)pyreen – di-Benzo(a,h)anthraceen - Benzo(ghi)peryleen – Indeno(1,2,3-cd)pyreen

## **VROM (10):**

Naftaleen – Fenanthreen – Anthraceen – Fluorantheen – Benzo(a)anthraceen - Chryseen – Benzo(k)fluorantheen – Benzo(a)pyreen – Benzo(ghi)peryleen – Indeno(1,2,3-cd)pyreen

## **Borneff (6):**

Fluorantheen – Benzo(b)fluorantheen – Benzo(k)fluorantheen – Benzo(a)pyreen – Benzo(ghi)peryleen – Indeno(1,2,3-cd)pyreen

## **OVAM (16):**

Naftaleen – Acenaftyleen – Acenaften – Fluoreen – Fenanthreen – Antraceen - Fluorantheen – Pyreen – Benzo(a)anthraceen – Chryseen – Benzo(b)fluorantheen – Benzo(k)fluorantheen – Benzo(a)pyreen – di-Benzo(a,h)anthraceen - Benzo(ghi)peryleen – Indeno(1,2,3-cd)pyreen

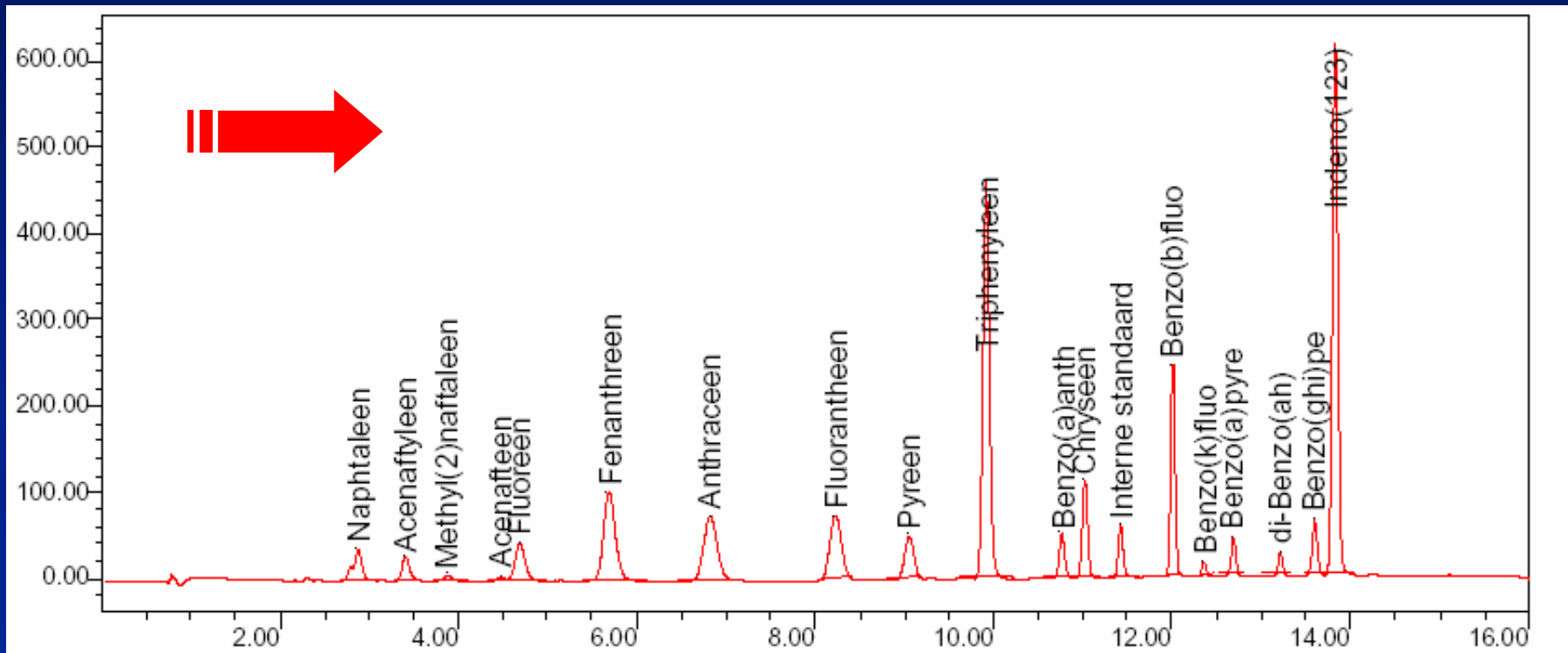
# SPE procedure (geautomatiseerd in WPS 3000 SPE) PAK's in grond

Na aceton\* extractie van de grond wordt het sample in de WPS 3000 SPE geplaatst. De SPE cartridge ondergaat de volgende behandelingen;

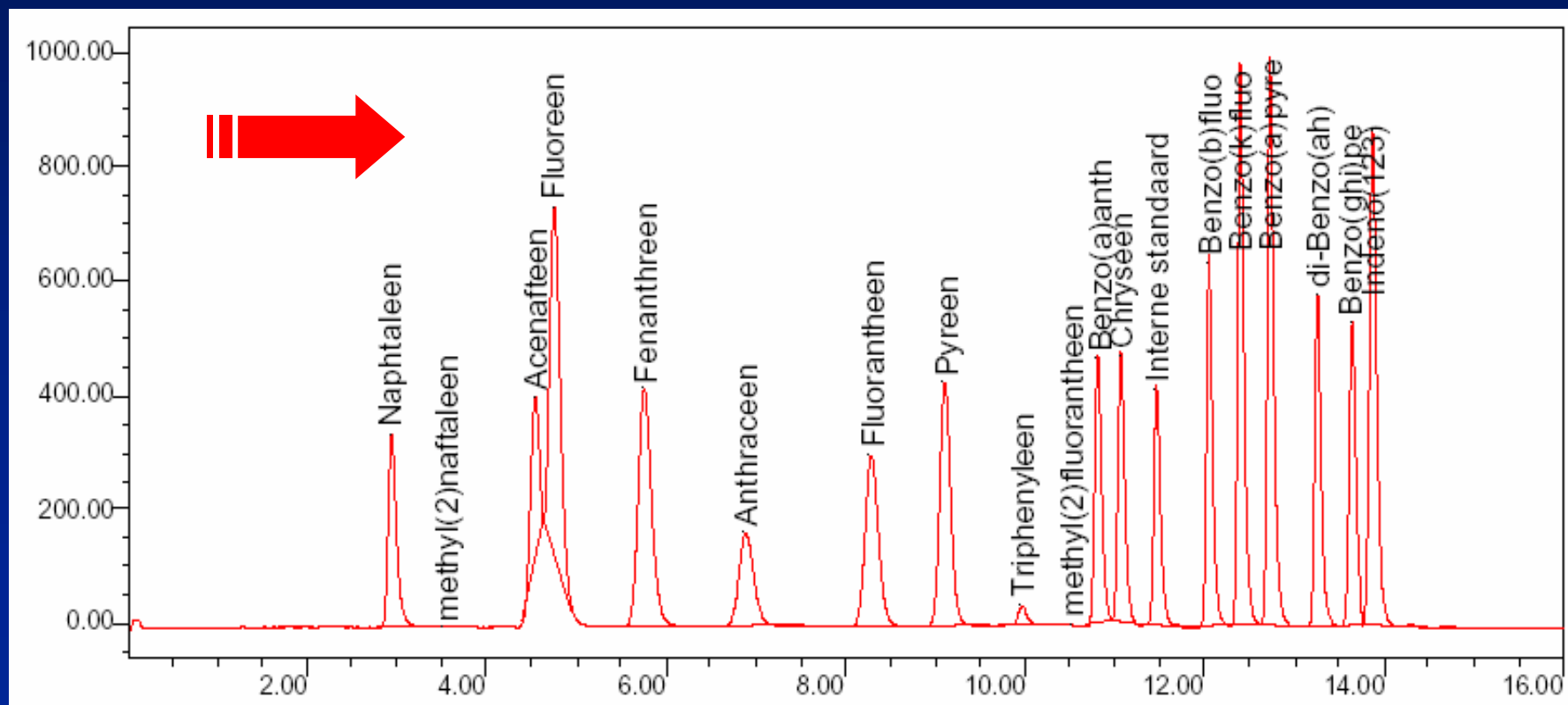
- ◆ Activering met 3 ml acetonitril
- ◆ Conditioneren met 3 ml water
- ◆ 200 µl monster opbrengen
- ◆ Wassen met 1 ml water
- ◆ Elutie van de cartridge met mobile HPLC phase

\* NEN 5710 in België leveren wij warme extractie met ASE

# UV-detectie van de EPA (16) lijst



# Fluorescentie detectie van de EPA (16) lijst



# Resultaten: PAK GROND

◆ $VC_r$	=	3.4 %
◆ $VC_w$	=	12.0 %
◆ Terugvinding	=	89 %
◆ Detectie limiet	=	0.0001 - 0.0030 mg/kg.ds

$VC_r$  = Variatie Coefficient herhaalbaarheid

$VC_w$  = Variatie Coefficient reproduceerbaarheid

# Resultaten: PAK Waterbodem

◆ $VC_r$	=	2.1 %
◆ $VC_w$	=	10.0 %
◆ Terugvinding	=	96 %
◆ Detectie limiet	=	0.004 - 0.02 mg/kg.ds



# Bepaling van PAK in plantaardige olieën en Cacaoboter – Traditionele methode

- ◆ Diverse manuele stappen
  - Verzeping met KOH
  - Vloeistof extractie
  - Handmatige kolomopzuivering
- ◆ HPLC of GC analyse van de geconcentreerde PAK's
- ◆ Typische analysetijd van 8-10 uur

# Dionex SPE HPLC methode

## Van handmatige monstervoorbereiding naar geautomatiseerde procedure

### ◆ Chemie

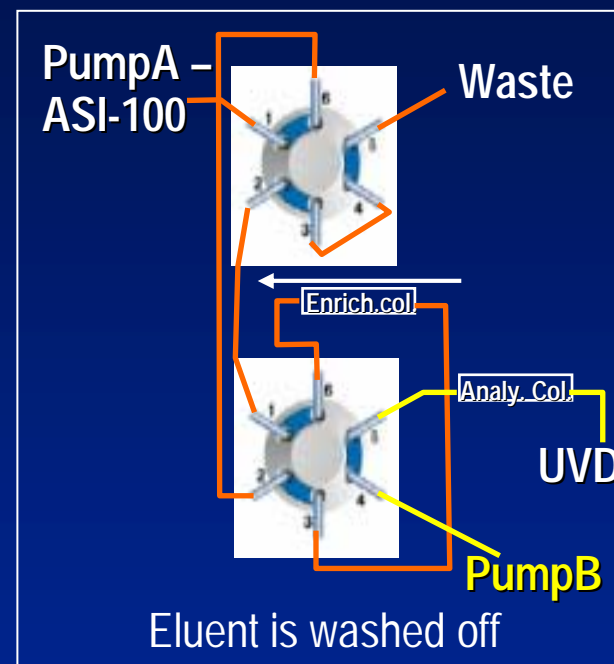
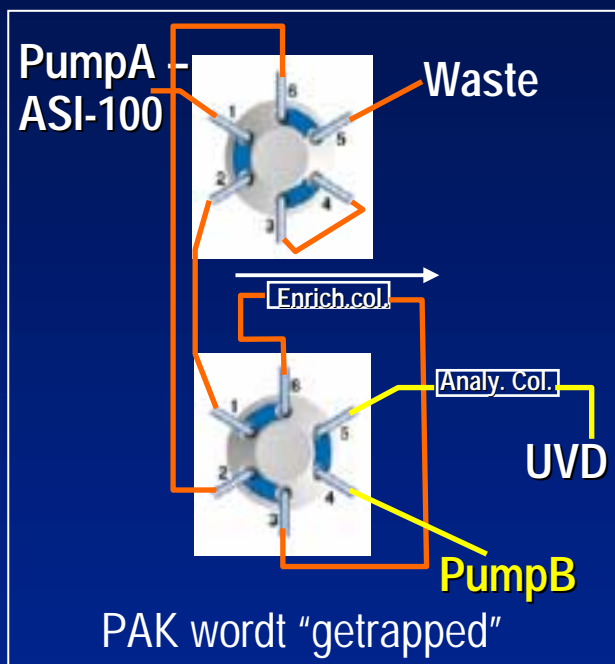
- DACC\* stationaire fase voor monster opzuivering en concentratie
- PAK HPLC analyse op specifieke kolom

### ◆ Benodigde apparatuur

- Summit Dual Gradiënt System voor directe injecties (2 onafhankelijke gradiënt pompen)
- Cacaoboter is vast op kamertemperatuur. Autosampler op 40 °C
- Meerdere kranen dienen aangestuurd te worden
- Kolom dient gethermostatiseerd te zijn
- Volledig automatische aansturing voor hoge reproduceerbaarheid en minimale gebruikertijd

\*DACC = donor-acceptor complex chromatography

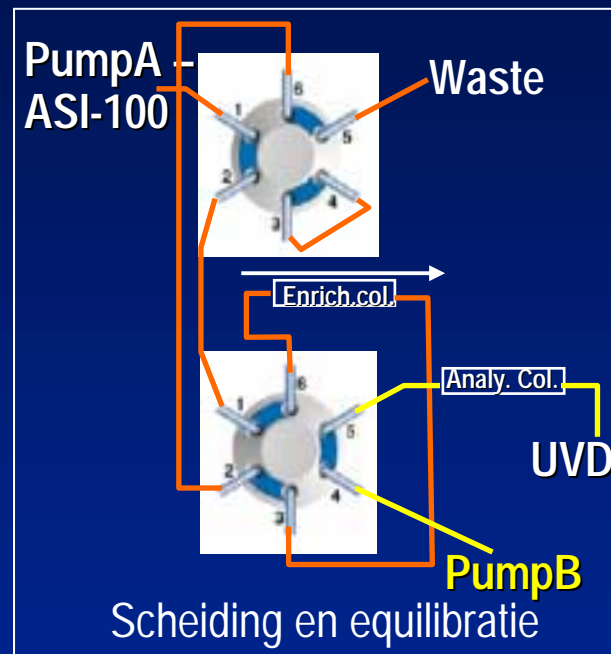
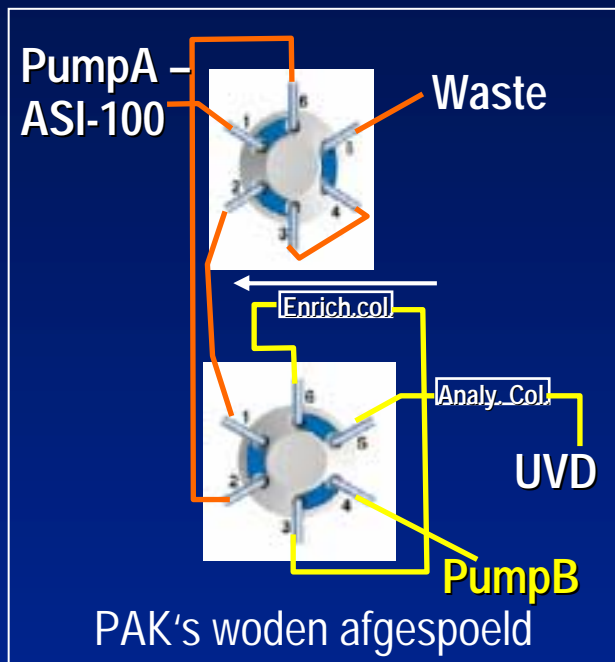
# Schakelschema voor PAK's in olieën (1)



- ◆ Directe injectie van het monster op de voorkolom met IPA
- ◆ Scheidingskolom equilibreert met de tweede pomp op hetzelfde moment

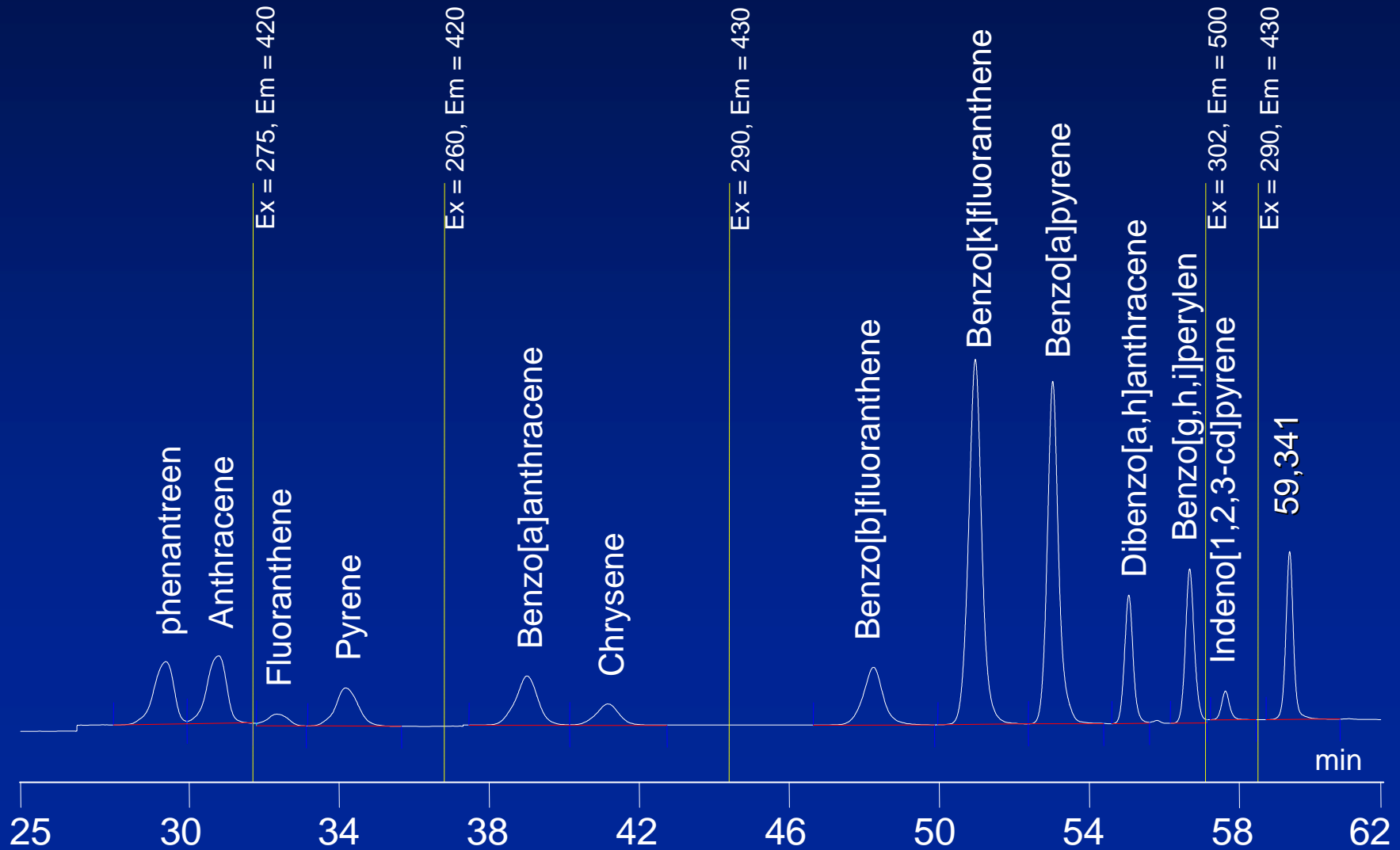
- ◆ Voorkolom wordt omgekeerd leeggespoeld
- ◆ Overgebleven IPA wordt verwijderd

## Schakelschema voor PAK's in olieën (2)



- ◆ Voorkolom wordt in de flow geschakeld
- ◆ Analyten worden op de scheidingskolom gebracht
- ◆ Gradiënt scheiding en fluorescentie detectie
- ◆ Voorkolom wordt uit de flow geschakeld voor het volgende monster
- ◆ Voorkolom wordt gespoeld tijdens de analytische scheiding

# 11.11 ppb geaddeerd aan olie



# Voordeel van SPE vs traditionele methode

- ◆ Totale analysetijd gaat van 9 uur naar 80 minuten
- ◆ Monster kan onverdund worden ingezet zonder enige tussenkomst van de analist
- ◆ Robuuste methode door de volledige automatisering



# ***Pesticiden***

# Introductie OCB/PCB

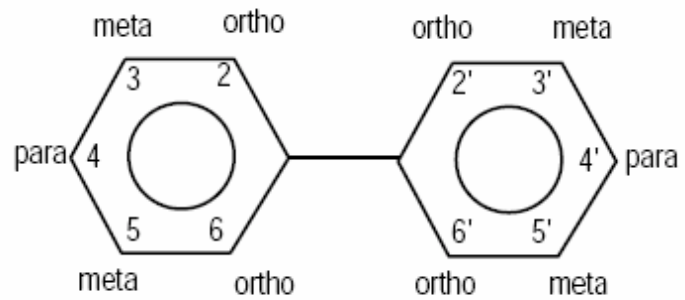
- ◆ PCB (Poly-Chloor-Bifenylen) worden geproduceerd en komen niet van nature voor. Er zijn ongeveer 209 congenere PCB's, waarvan er ongeveer 100 in het milieu zijn aangetoond. De fysisch-chemische eigenschappen van de verschillende verbindingen zijn zeer divers. Zo loopt het molecuulgewicht van PCB uiteen van 188 voor monochlorobifenyl tot 494 voor decachlorobifenyl. Ook de wateroplosbaarheid verschilt, maar is over het algemeen laag en neemt verder af bij toename van de chlorering van de fenylingen. De meest toxische vormen van PCB zijn aan de meta- en para-posities gesubstitueerd met chlooratomen, zoals bij 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl
- ◆ Directe emissie van PCB vindt plaats door lekkages tijdens de productie, lekkages uit transformatoren en stort van PCB-houdende apparatuur. Indirecte emissie van PCB kan plaatsvinden bij verbranding van huishoudelijk afval in vuilverbrandingsinstallaties en zogenaamde allesbranders, vooral bij temperaturen beneden 1000 °C.

OCB staat voor Organo-Chloor-Bestrijdingsmiddelen

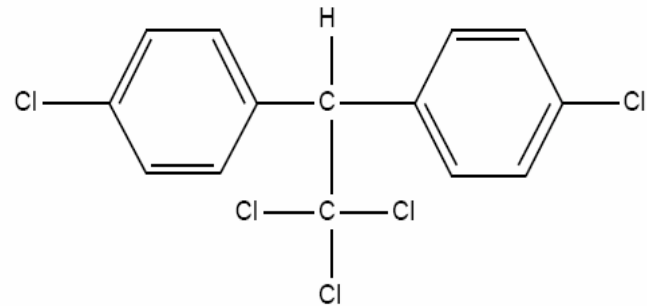




# Componenten en structuren:



DDT



# SPE procedure OCB/PCB

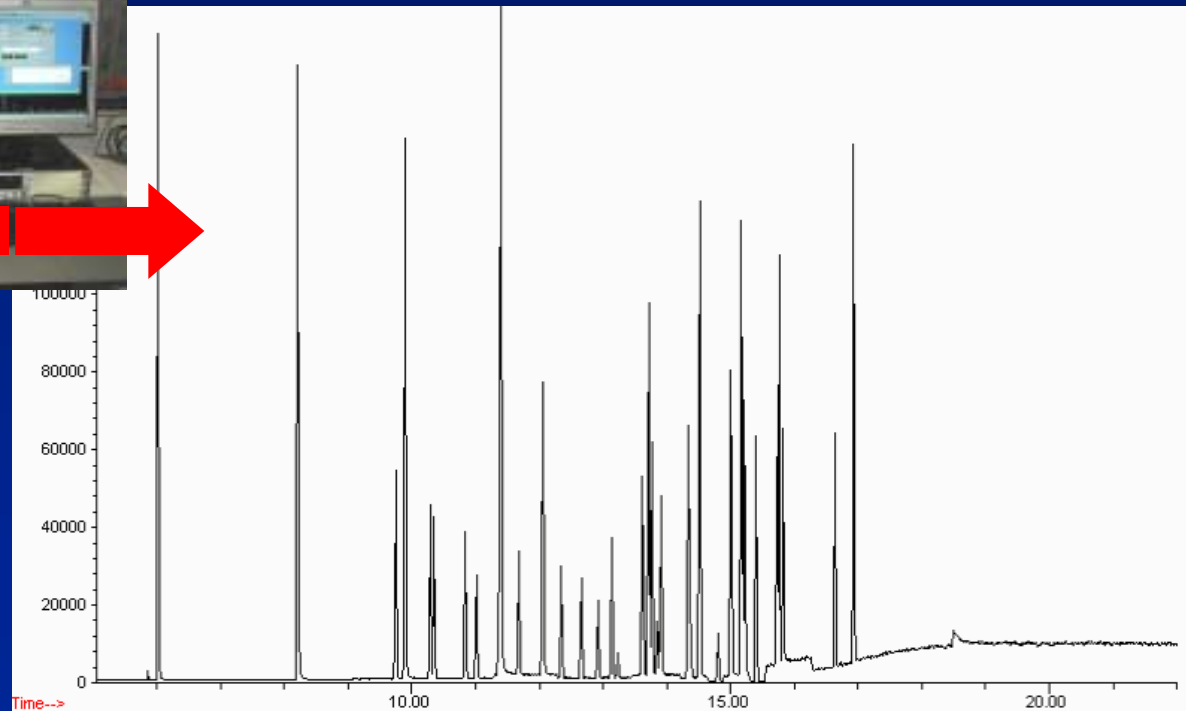
Na aceton extractie van de grond wordt het sample in de WPS 3000 SPE geplaatst. De SPE cartridge ondergaat de volgende Behandelingen:

- ◆ Activering met 4 ml aceton
- ◆ Conditioneren met 4 ml water
- ◆ 4 ml monster opbrengen
- ◆ Wassen met 4 ml water
- ◆ Drogen met N<sub>2</sub>
- ◆ Oplossen in MTBE/heptaan (100 µl)



WPS 3000 SPE

# GC-MS detectie OCB/PCB



## Resultaten: PCB GROND

◆ $VC_r$	=	4.1 – 6.1 %
◆ $VC_w$	=	7.1 – 14.0 %
◆ Terugvinding	=	80 - 85 %
◆ Detectie limiet	=	0.001 - 0.003 mg/kg.ds

## Resultaten: OCB GROND

◆ $VC_r$	=	3.5 – 12.2 %
◆ $VC_w$	=	5.8 – 14.4 %
◆ Terugvinding	=	80 -105 %
◆ Detectie limiet	=	0.001 - 0.003 mg/kg.ds



# ***Glyfosaat /AMPA***

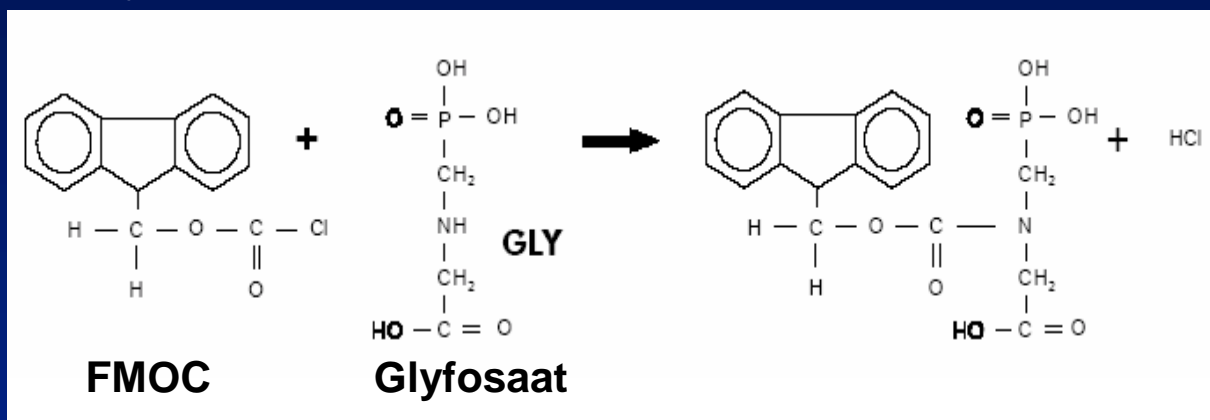
# Introductie Glyfosaat/Ampa (Round-up)



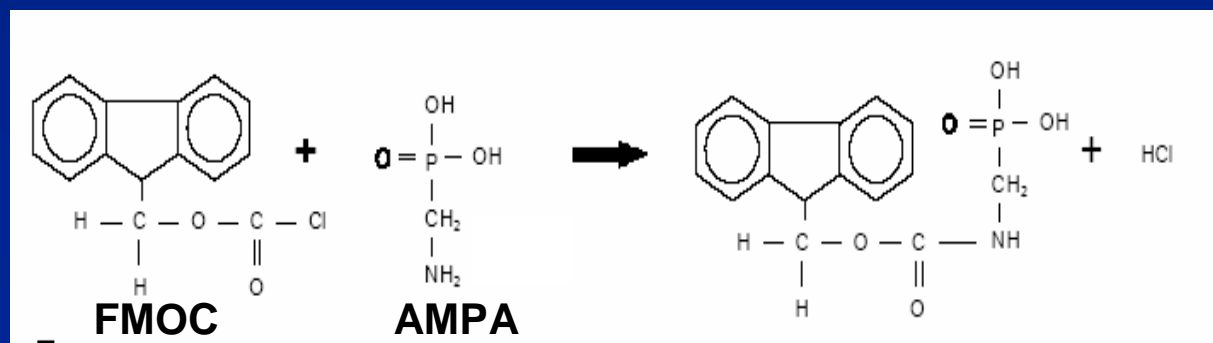
- ◆ In het verleden hebben de stoffen simazin en diuron ernstige waterkwaliteitsproblemen veroorzaakt. Momenteel is glyfosaat de belangrijkste stof. Ook het afbraakproduct van glyfosaat, AMPA (aminomethylfosfonzuur), is een probleemstof.
- ◆ De directe effecten van glyfosaat op het ecosysteem treden waarschijnlijk op in kleinere wateren, zoals stadswateren. In grotere wateren zijn directe effecten op het ecosysteem minder waarschijnlijk, omdat er aanzienlijke verdunning plaatsvindt en glyfosaat wordt omgezet in AMPA. Het is niet bekend wat de chronische effecten zijn bij langdurige blootstelling aan lage doses.

# Reacties met FMOC:

## Glyfosaat



## AMPA (Amino Methyl Phosphate Acid)





# Bepaling van Glyfosaat / AMPA

## Pre-kolom derivatisering gevolgt door SPE

### Derivatisering (in autosampler)

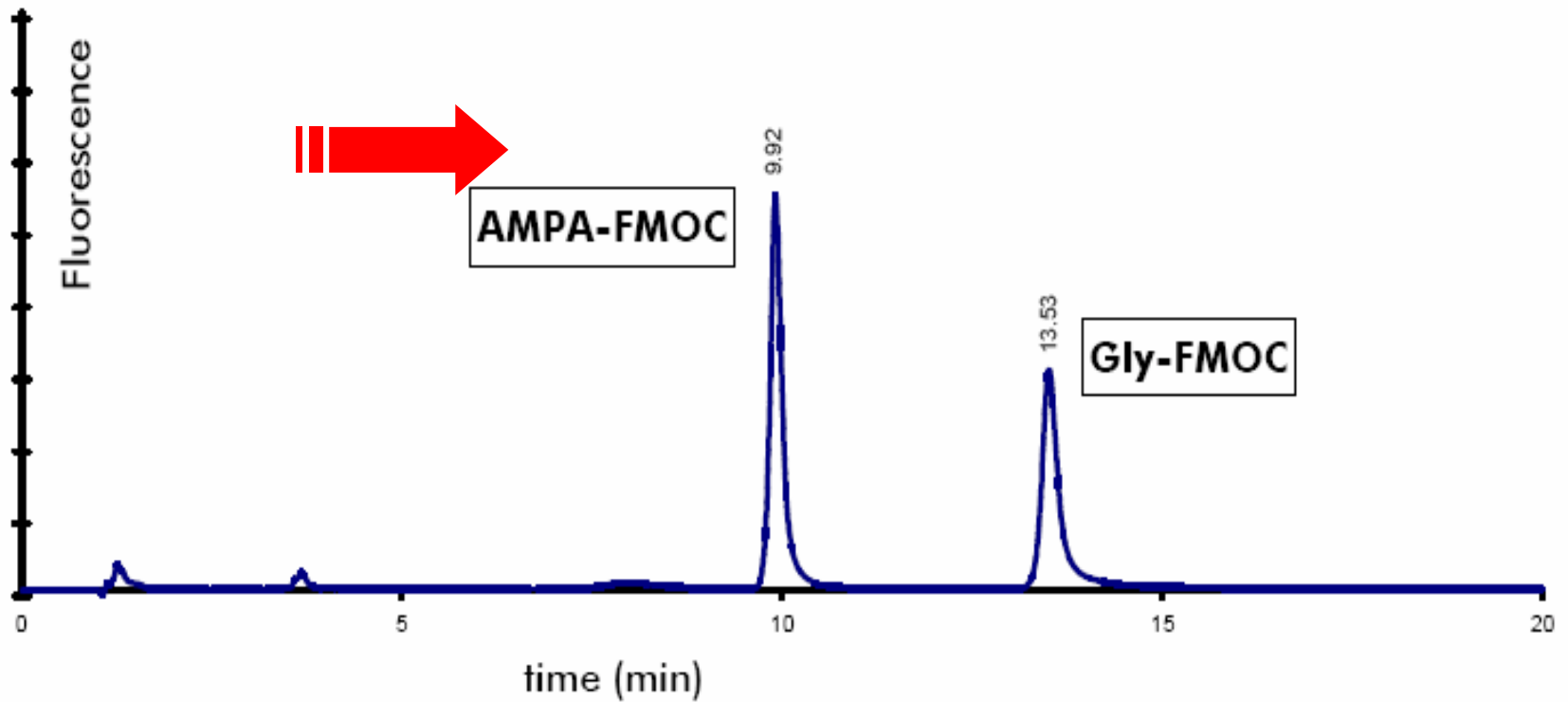
- ◆ 300  $\mu\text{L}$  sample
- ◆ 40  $\mu\text{L}$  boorzuur (buffer 0.16M pH 8.7)
- ◆ 240  $\mu\text{L}$  FMOC (Fluorenyloxycarbonylchloride)
- ◆ 20 minuten reactietijd (gethermostiseerd)
- ◆ 180  $\mu\text{L}$  Fosforzuur (reactie stoppen)

# SPE procedure Glyfosaat / AMPA

Het watermonster wordt geïnjecteerd via de WPS 3000 SPE. Na eerst de derivatisering uit te voeren, ondergaat de SPE cartridge de volgende behandelingen:

- ◆ Activering met 6 ml 0,05 % mierenzuur
- ◆ Conditioneren met 2 ml isopropanol (IPA)
- ◆ Mengen van 200 ul gederivatiseerd monster met 4 ml IPA
- ◆ Elutie met Acetonitril ( plus 0,1 % fosforzuur)

# Chromatogram (Flu)



## Resultaten: Glyfosaat/Ampa

◆ $VC_r$	=	2.4 %
◆ $VC_w$	=	5.8 %
◆ Terugvinding	=	88 %
◆ Detectie limiet	=	0.08 $\mu\text{g/L}$

# Samenvatting

- ◆ SPE HPLC kan aanzienlijk besparingen opleveren voor diverse milieu en voedingsanalyses
- ◆ Aandacht voor de hardware om “teleurstellingen” te voorkomen
- ◆ Aansturing apparatuur inclusief schakelkranen essentieel (CHROMELEON)
- ◆ Kant en klare methoden voor optimaal gebruiksgemak
- ◆ Dionex heeft SPE ervaring en kan u assisteren bij verdere implementatie en methodeontwikkeling voor andere toepassingen.



# Samenwerking en dankwoord

Resultaten zijn verkregen in samenwerking met diverse laboratoria en bedrijven.

Speciale dank aan:

- ◆ ADM
- ◆ Analytico / Eurofins
- ◆ Het Waterlaboratorium, Amsterdam
- ◆ Collega's Dionex applicatielaboratorium

?????