

NN31545.1350

I
1350

juni 1982

Instituut voor Cultuurtechniek en Waterhuishouding
Wageningen

BIBLIOTHEEK STARINGGEBOUW

DE ANALYSE VAN ALKYLFENOLEN MET BEHULP VAN
HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

G. Ursinus

Nota's van het Instituut zijn in principe interne communicatiemiddelen, dus geen officiële publikaties. Hun inhoud varieert sterk en kan zowel betrekking hebben op een eenvoudige weergave van cijferreeksen, als op een concluderende discussie van onderzoeksresultaten. In de meeste gevallen zullen de conclusies echter van voorlopige aard zijn omdat het onderzoek nog niet is afgesloten. Bepaalde nota's komen niet voor verspreiding buiten het Instituut in aanmerking

29 DEC. 1982

JSN 175199-01

I N H O U D

	blz.
VOORWOORD	
1. INLEIDING	1
2. STRUCTUURFORMULES ONDERZOCHE ALKYLFENOLEN	3
3. APPARATUUR EN MATERIALEN	4
3.1. Opbouw vloeistofchromatograaf	4
3.2. Kolom	5
3.3. Voorkolom	5
3.4. Monsterwisselaar	5
3.5. UV-Vis detector	6
3.6. Integrator	6
3.7. Chemicaliën	6
4. ACHTERGRONDEN SCHEIDING EN DETECTIE	7
4.1. Principe van de vloeistofchromatografie	7
4.2. Reversed phase vloeistofchromatografie	8
4.3. De voorkolom	9
4.4. Detectiemethoden	11
4.5. De analyse	12
5. RESULTATEN EN DISCUSSIE	13
5.1. De scheiding	13
5.2. Lineariteit van de methode	13
5.3. Effect van aanzuren en toevoegen van zout op de scheiding van meta cresol en ortho cresol bij een injectionevolume groter dan 10 ml	18
5.4. Identificatie alkylfenolen aan de hand van retentie- tijd en piekoppervlakte bij 210 nm, 240 nm en 280 nm	19

	blz.
5.5. Onderzochte monsters op aanwezigheid van alkylfenolen	20
5.6. Fouten bij de integratie en de basislijncorrectie	31
6. CONCLUSIES	35
7. SUGGESTIES VERDER ONDERZOEK	36
8. LITERATUUR	37
BIJLAGEN	38

VOORWOORD

Dit onderzoek is verricht in het kader van het stagejaar van de HBO-B-opleiding analytisch chemische richting van de STOVA (Stichting Tot Opleiding Van Analisten) te Wageningen.

De stage heb ik doorgebracht op het Waterkwaliteitslaboratorium van het Instituut voor Cultuurtechniek en Waterhuishouding (ICW) te Wageningen.

Dit verslag is door het instituut als nota uitgegeven. Gedurende de stageperiode heb ik kennis kunnen maken met de werkzaamheden van het instituut en in het bijzonder van de hoofdafdeling Waterkwaliteit. De hoofdafdeling Waterkwaliteit houdt zich bezig op het terrein van de invloeden van de menselijke activiteiten in landelijke gebieden en de natuur op de waterkwaliteit.

Het 'Waterkwaliteitslaboratorium' is verantwoordelijk voor de analyse van dat water. De monsters worden geanalyseerd op verschillende organische en anorganische bestanddelen. De bepalingen gebeuren veelal met behulp van titrimetrische- en colorimetrische technieken, atomaire absorptie spectometrie, gas- en vloeistofchromatografie.

In dit verslag wordt het onderzoek beschreven dat door mij is verricht op het laboratorium en is mede tot stand gekomen dankzij J. Harmsen die mij tijdens de stage heeft begeleid.

1. INLEIDING

Onderzoek naar organische stoffen in grondwater vereist een zekere gerichte aanpak, omdat het aantal stoffen dat kan voorkomen erg groot is en de samenstelling zeer complex.

In het verleden is al onderzoek gedaan naar olie (v.d. Berg, 1980) en polycyclische aromaten (v.d. Peppel, 1981).

In deze nota wordt de analyse van alkylfenolen beschreven. De fenolen kunnen voorkomen in percolatiewater van een vuilstort en op plaatsen waar chemisch afval door een ongeval of opzettelijk terecht is gekomen. Fenolen kunnen ook worden gevormd bij de afbraak van bijvoorbeeld olie.

Met behulp van afgeleide spektrometrie zijn fenolconcentraties boven 1 mg/l aangetoond in water, dat in contact is geweest met chemisch afval op een vuilstort. De ondergrens van de methode met afgeleide spektrometrie is echter ca. 1 mg/l. Zulke hoge gehalten komen zeer weinig voor.

De hierdoor ontstane behoefte alkylfenolen in watermonsters in concentraties vanaf 10 µg/l te kunnen bepalen leidde tot de ontwikkeling van een analysemethode.

Een groot probleem bij een dergelijk onderzoek is de isolatie van de stoffen uit het medium, in dit geval water. Vooral voor fenolen is de isolatie vrij moeilijk, omdat ze vrij polair zijn en daarom goed oplosbaar in water.

De stoffen kunnen met behulp van een geschikt oplosmiddel geëxtraheerd worden. Hierbij blijft het probleem bestaan van vaak onvolledige extractie en extractie van niet gewenste stoffen. Coutts, Hargesheimer en Pasutto (1979) acetyleren de fenolen in de waterfase met behulp van azijnzuuranhydride.

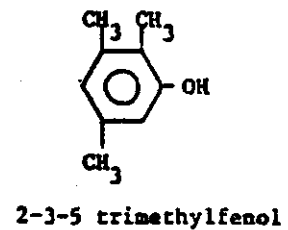
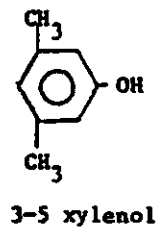
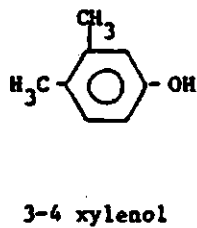
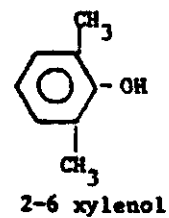
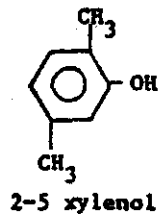
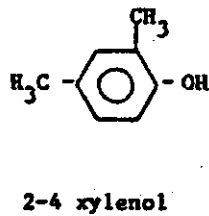
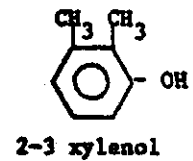
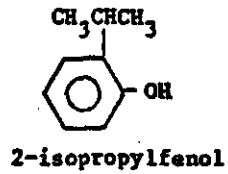
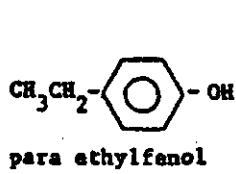
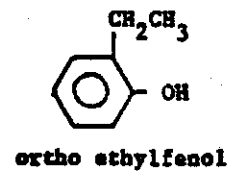
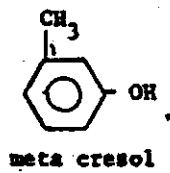
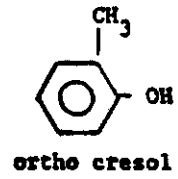
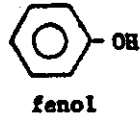
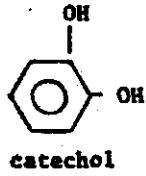
De extractie van de geacetyleerde fenolen met methyleenchloride blijkt in tegenstelling tot niet geacetyleerde fenolen vrijwel volledig te zijn. Het ingedampte extract werd geanalyseerd met behulp van een gaschromatograaf.

In tweede instantie kan gedacht worden aan het overleiden van het monster over een XAD hars. Hierbij worden de stoffen licht geadsorbeerd. Na adsorptie kan desorptie plaatsvinden met behulp van een geschikt oplosmiddel. De praktijk leert, dat tijdens de desorptie gemakkelijk storende verontreinigingen vooraf de hars geïntroduceerd worden (v.d. Berg, 1980).

Een betere methode lijkt de adsorptie op een voorkolom van een HPLC-systeem. Het voordeel is, dat de isolatie en analyse in één systeem plaatsvindt, zodat de kans op fouten kleiner wordt. Werkhoven-Goewie, Brinkman en Frei (1981) beschrijven de doorbraakcapaciteit van chloorfenolen op een voorkolom in combinatie met HPLC. Ogan en Kalz (1981) vergelijken de vloeistofchromatografische scheiding van alkylfenolen met fluorescentie en ultraviolet detectie. Zij vinden een ondergrens van 0,5 mg/l per alkylfenol.

In deze nota is de scheiding van alkylfenolen met behulp van vloeistofchromatografie in combinatie met UV-detectie beschreven.

2. STRUCTUURFORMULES ONDERZOCHE ALKYLFENOLEN



3. APPARATUUR EN MATERIALEN

3.1. Opbouw vloeistofchromatograaf

Er is gebruik gemaakt van de Varian 5020 vloeistofchromatograaf. Het volgende schema geeft de opbouw van de vloeistofchromatograaf weer (fig. 1).

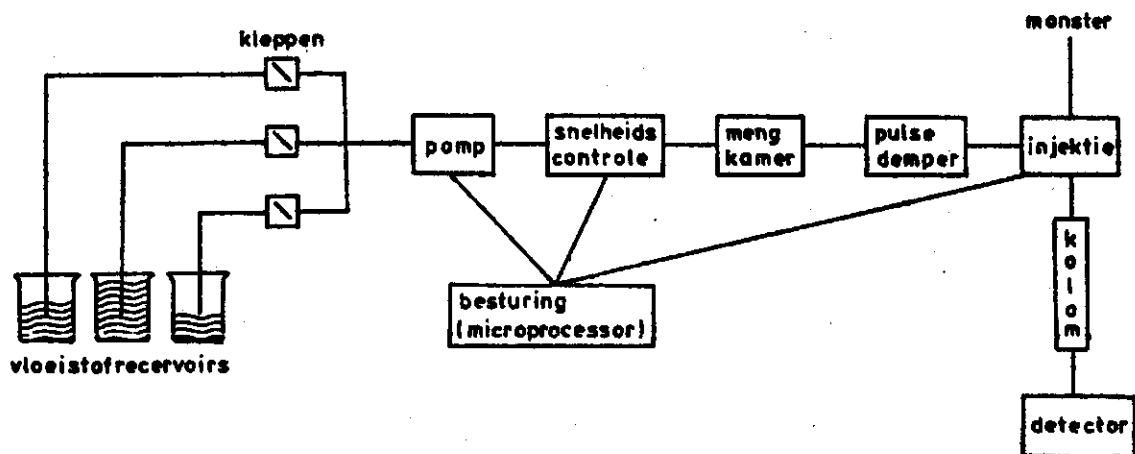


Fig. 1. Opbouw vloeistofchromatograaf (Harmsen, 1980)

Het geheel wordt gestuurd middels een microprocessor. Als mobiele fase bestaat de keus uit drie vloeistoffen die twee aan twee gemengd kunnen worden, zodat het werken met een gradiënt mogelijk wordt. De samenstelling van de mobiele fase wordt met de kleppen geregeld. Na de pomp en de snelheidscontrole komt de mengkamer, waar de vloeistoffen worden gemengd. Na de pulsedemper, die zorgt voor een constante vloeistofstroom, komt de mobiele fase in het injectiesysteem. Dit

injectionssysteem bestaat mede uit een loop, waarin het monster geïnjecteerd wordt. Deze injectie kan met de hand gebeuren met behulp van een injectiespuit. Daarnaast is automatisering mogelijk door het gebruik van een autosampler, die zelf na een bepaalde tijdsduur in de loop injecteert (zie bijlage 1, 2 en 3). Daarna komt het monster in de kolom, waarin de scheiding plaatsvindt. De componenten worden gedetecteerd in de detector. De berekening van piekoppervlaktes gebeurt door middel van de integrator.

3.2. K o l o m

De gebruikte kolom is een reversed phase van het type Licrosorb 10 RP 18 (Chrompack cat.no.: 27811):

lengte = 25 cm
inwendige diameter= 4,6 mm.

3.3. V o o r k o l o m

De voorkolom is gevuld met reversed phase materiaal van het type Vydac (Varian cat.no.: 207):

lengte = 4 cm
inwendige diameter= 4 mm.

3.4. M o n s t e r w i s s e l a a r

De gebruikte monsterwisselaar is een Kipp Analytica 9209 HPLC autosampler. De capaciteit van de carrousel bedraagt 125 monsters. Vóór de injectie wordt het monster door middel van overdruk in een loop gebracht via een injectienaald. Na het omschakelen van de loop-injector komt het monster op de kolom (zie bijlage 2). De enige beperkende faktor is de inhoud van de monsterflesjes. Deze bevatten maximaal 2 ml gefiltreerde vloeistof (filtratie over een membraanfilter) waarvan ten hoogste 1 ml gebruikt kan worden voor het vullen van de loop.

De flushtime bepaalt de tijdsduur van monsternamen. Hierna schakelt de injectieloop automatisch om. Het voordeel van een continue "monster-

room" door de loop gedurende de flushtime is, dat de loop tevens gespoeld wordt.

3.5. U V - V i s d e t e c t o r

De gebruikte detector is een UV-spectrofotometer (Varian Vari-Chrom). Detectiegolflengtes: 210 nm, 240 nm of 280 nm. Slit: 16 nm.

3.6. I n t e g r a t o r

De Vista 401 van Varian maakt het detectiesignaal visueel door het plotten van een chromatogram. Tevens worden automatisch de piekoppervlaktes berekend. Het grote voordeel van deze integrator is dat het onbewerkte detectorsignaal vastgelegd wordt op een schijf. Na de analyse is het dan mogelijk herberekeningen uit te voeren.

3.7. C h e m i c a l i ë n

Van elk type fenol zijn standaarden gemaakt van 1 g/l in ethanol. Deze standaarden zijn samengebracht in één standaard, zodat afzonderlijke fenolconcentraties ontstonden van 50 mg/l. Hieruit werden de verdere verdunningen gemaakt voor de analyses. Behalve catechol zijn de standaarden minstens 3,5 maanden houdbaar in de koelkast. De catecholoplossing in ethanol is vrij vluchtig en hiervan dient regelmatig een verse standaardoplossing gemaakt te worden.

De gebruikte mobiele fasen in de vloeistofchromatograaf zijn:

Water : demi-water is afgezogen over een membraanfilter. Daarna is het afgezogen demi-water over een reversed phase kolom geleid, om organische verontreinigingen kwijt te raken;

Acetonitril : Baker Analyzed HPLC REAGENT FW 4105 - 8143.

4. ACHTERGRONDEN SCHEIDING EN DETECTIE

4.1. Principe van de vloeistofchromatografie

De scheiding van stoffen met behulp van vloeistofchromatografie berust op een verdeling van de te scheiden stoffen over twee fasen waarbij de ene fase (stationaire fase) door een vaste drager op zijn plaats wordt gehouden, terwijl de tweede (mobiele fase) beweegt. Door selectieve vertraging (bijvoorbeeld stof A wordt minder vertraagd dan stof B), door de stationaire fase uitgeoefend, zullen de componenten van een mengsel zich met een verschillende snelheid voortbewegen en hierdoor van elkaar worden gescheiden.

De scheiding kan worden geoptimaliseerd door de kolomlengte-eenheid per evenwichtsinstelling oftewel de HETP (Height Equivalent Theoretical Plate) zo klein mogelijk te maken. De HETP wordt beschreven door de Van Deemter vergelijking:

$$\text{HETP} = A + \frac{B}{v} + C_v$$

A = Eddy diffusie

Dit wordt veroorzaakt door een niet ideaal gedrag in de kolom, doordat de pakking niet homogeen is. Er treedt een spreiding op van de component door een verschil in weglengte.

$\frac{B}{v}$. Deze term staat voor diffusie. Door concentratieverschillen ontstaat er een diffusiestroom van de hoge naar de lage concentratie. Er treedt piekverbreding op, die door een hogere vloeistofsnelheid gecompenseerd wordt.

C_v . Geldt voor het massatransport. Bij een hoge snelheid van de mobiele fase zal het evenwicht zich niet goed instellen, waardoor een hogere HETP waarde ontstaat. Bij een vloeistof als stationaire fase is C ook afhankelijk van de dikte van de vloeistoflaag. Bij een dikke laag stelt het evenwicht zich snel in, bij een dunne langzaam.

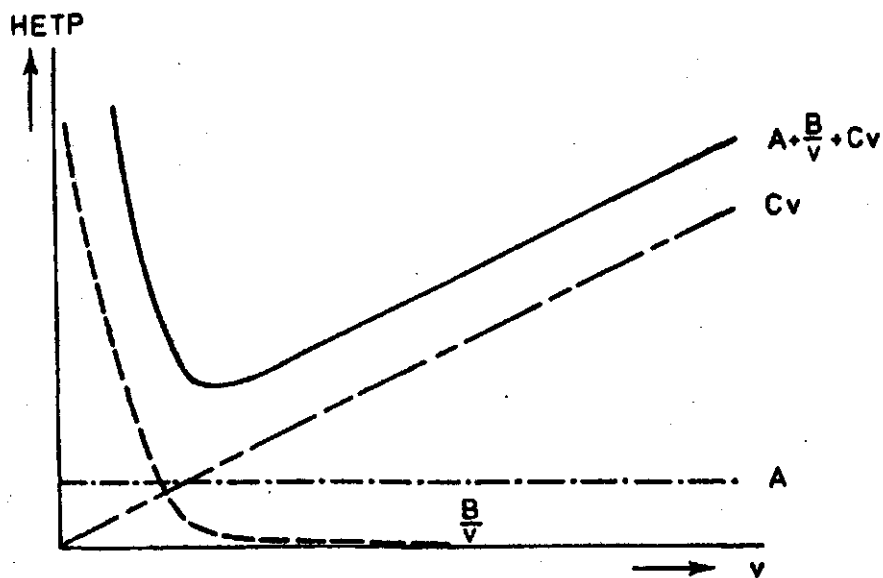
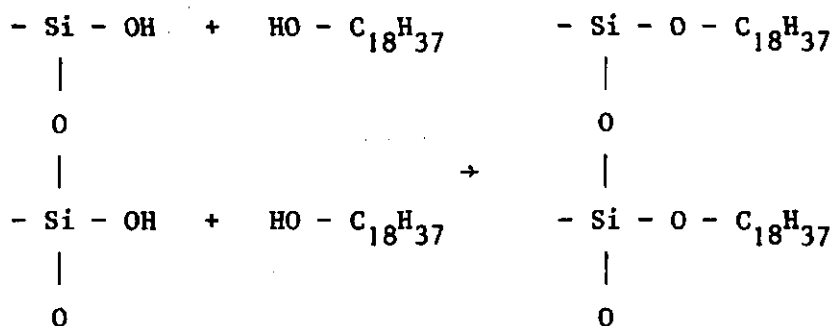


Fig. 2. De HETP als functie van de snelheid van de mobiele fase

4.2. Reversed phase vloeistofchromatografie

De gebruikte chromatografische techniek valt onder de verdelingschromatografie. De stationaire fase bestaat uit inerte bolletjes waarop een dunne laag vloeistof is aangebracht, die niet mengbaar is met de mobiele fase. Scheiding berust op een verschillende verdeling van de te bepalen stoffen over de twee vloeistoffen.

De beste scheiding wordt verkregen als het vloeistoflaagje zo dun mogelijk is, omdat dan het massatransport gunstig is (lage C_v). De kleinste C_v wordt verkregen bij een vloeistoflaagje van één molecuul dik. Daarom is er kolom materiaal ontwikkeld, waarbij de vloeistof chemisch gebonden wordt aan het dragermateriaal. De stationaire fase is dan werkelijk één molecuul dik (zie reactievergelijking).



In dit geval is er een apolaire stof ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}$) gebonden aan het dragermateriaal. Er wordt gesproken van reversed phase. Zit er uiteindelijk een polaire stof aan het dragermateriaal, dan wordt er gesproken van bonded phase. Op een bonded phase kolom kunnen polaire stoffen gescheiden worden. De reversed phase kolom wordt gebruikt voor de analyse van meer apolaire stoffen.

Voor de scheiding van fenolen is gebruik gemaakt van een reversed phase kolom. Vóór de analytische kolom is een voorkolom geplaatst, gevuld met soortgelijk materiaal als de eigenlijke scheidingskolom.

Als mobiele fasen worden water en acetonitril gebruikt. De analyse wordt gestart met het polaire water. De samenstelling van de mobiele fase wordt door bijmengen van acetonitril apolairder gemaakt, zodat eerst de polaire en daarna de apolaire verbindingen de kolom verlaten.

4.3. De voorkolom

De functie van de voorkolom is tweeledig.

Ten eerste dient het als barrière voor eventuele verontreinigingen, zodat de dure scheidingskolom niet vervuild en verstopt raakt.

Het tweede doel, waarmee de voorkolom gebruikt is, is preconcentratie van de fenolen uit de oplossing. De adsorptie van de fenolen op het gebruikte voorkolommateriaal is beter naarmate de stoffen apolairder zijn. De doorbraakcapaciteit wordt dan alleen bepaald door de absolute hoeveelheid fenol ongeacht het volume. Bij de meer polaire stoffen als catechol en fenol is de doorbraakcapaciteit ook afhankelijk van het volume.

Het voordeel van de preconcentratie is dat extractie overbodig is, en de monsters direkt zonder behandeling geïnjecteerd kunnen worden.

Bij de keuze van een voorkolom dient vooral gelet te worden op de lengte en de diameter. De adsorptie op de voorkolom moet volledig zijn. Er mag geen scheiding van componenten optreden en de stoffen moeten als een klein bandje van de voorkolom op de analytische kolom komen. Dit bevordert een goede scheiding op de analytische kolom.

Momenteel gaat men meer over op het gebruik van zeer korte voorkolommen. Het voordeel hiervan is, dat het mogelijk wordt met een isocratische vloeistofsamenstelling te werken.

Werkhoven-Goewie (1982) heeft gebruik gemaakt van een 2 mm voorkolom. Tevens heeft zij een nieuw adsorptie materiaal toegepast, dat bestaat uit een polymeer van difenylbenzeenstyreen. Het zou zeer goed bruikbaar zijn voor de scheiding van fenolen. Hiervan is echter nog geen publikatie verschenen. Het materiaal is in dit onderzoek niet toegepast, omdat de mogelijkheid pas in het verslagstadium bekend was.

De voorkolom kan op 2 manieren in het systeem gebouwd worden. Ten eerste kan de voorkolom in plaats van een loop gemonteerd worden op het loopinjektiesysteem (fig. 3).

Voor het volledige systeem zie bijlage 2.

Stand A: De injectie vindt plaats. De stoffen komen op de voorkolom.

De mobiele fase komt direkt in de kolom. Na de injectie schakelt het systeem pneumatisch over op stand B.

Stand B: De te scheiden stoffen worden met de mobiele fase meegevoerd via de voorkolom naar de analytische kolom.

Het voordeel van deze schakeling is, dat de gebruikte lengte van de voorkolom zeer klein is en de stoffen niet de gehele voorkolom door hoeven, alvorens ze op de analytische kolom komen. Een tweede voordeel is, dat er geen oplosbare verontreinigingen op de analytische kolom komen.

Ten tweede kan de voorkolom direkt voor de analytische kolom gemonteerd worden. Het systeem is iets eenvoudiger. Een nadeel is echter dat de stoffen de gehele voorkolom door moeten zodat de kans op piekverbreding toeneemt. In tegenstelling tot de voorgaande schakeling komen de goed oplosbare stoffen nu wel in de analytische kolom terecht.

In dit onderzoek is de voorkolom direkt vóór de analytische kolom geplaatst.

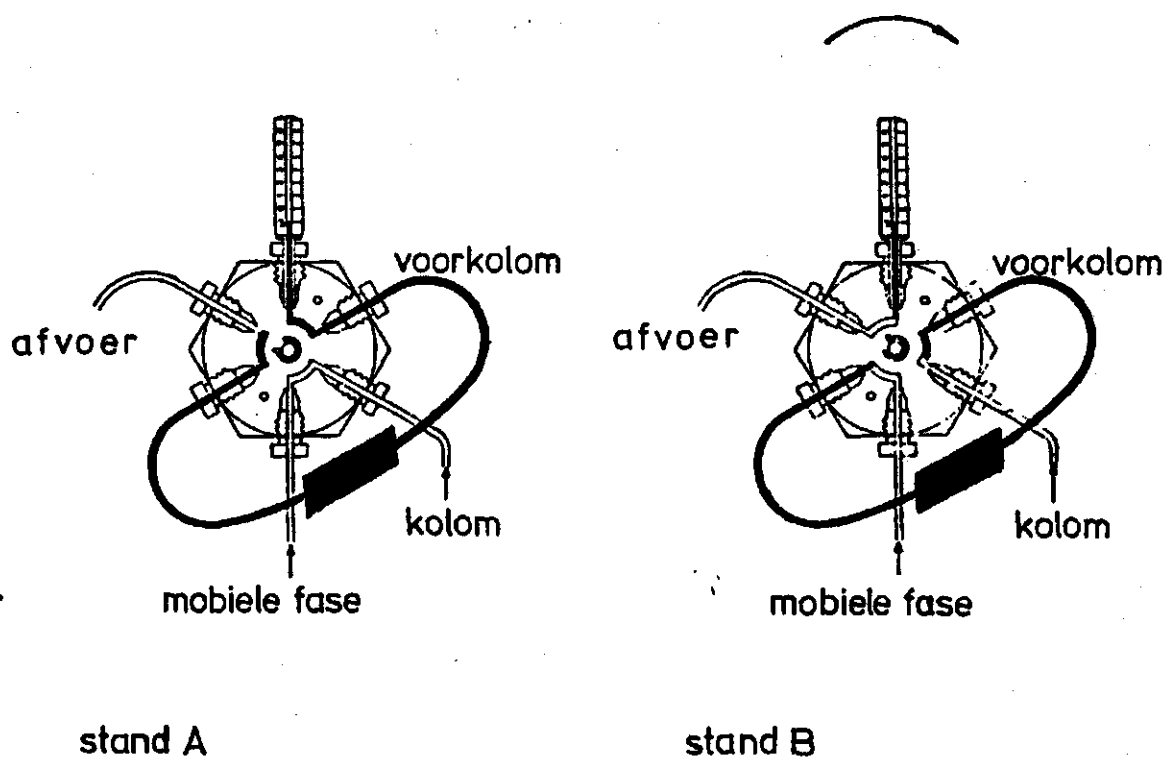


Fig. 3. Voorkolom als loop

4.4. Detectiemethoden

Voor de analyses van monsters met een gecompliceerde samenstelling blijkt één detectietechniek in de praktijk vaak niet voldoende voor de volledige opheldering van de samenstelling.

In dit geval, HPLC in combinatie met UV-detectie treden vaak storende pieken op, omdat naast de alkylfenolen vrijwel alle aromatische verbindingen in het UV-gebied absorberen. Meer betrouwbare resultaten

worden verkregen, wanneer gemeten wordt bij meerdere golflengtes in het UV-gebied.

Naast UV-detectie kan ook fluorescentie detectie gebruikt worden. Volgens Ogan en Katz (1981) is de fluorescentie detectie voor alkylfenolen namelijk gevoeliger dan de UV-detectie.

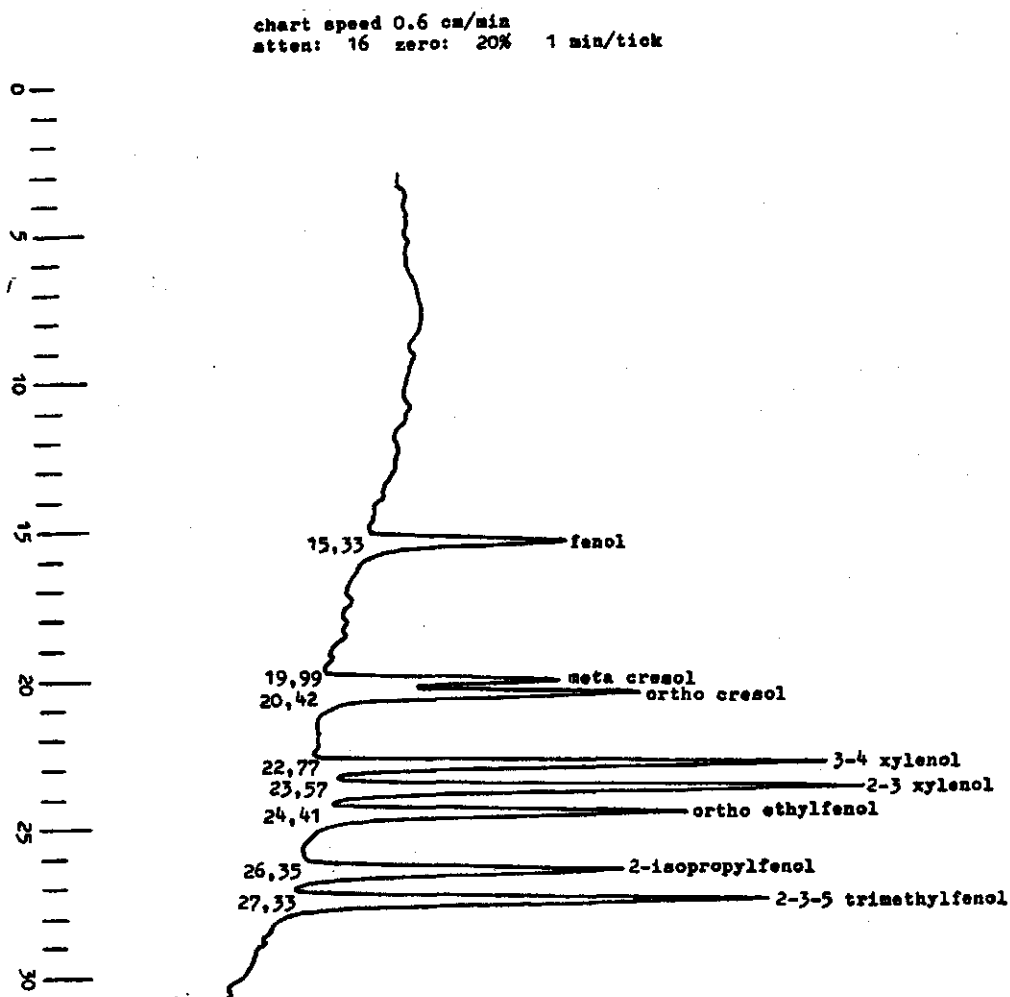
4.5. D e a n a l y s e

Na de injectie van een hoeveelheid gefiltreerd monster (over een membraanfilter) volgt de analyse. De analyse wordt gestart met 100% water. De samenstelling van de mobiele fase verandert binnen 28 minuten lineair tot 62% acetonitril en 38% water. Hierna wordt gedurende 5 minuten 100% acetonitril doorgeleid om de kolom te reinigen.

De injectie kan plaatsvinden met de hand met behulp van een injectiespuit (zie bijlage 3A). Het nadeel is, dat bij een groot injectievolume, door het vele malen injecteren de kans op piekverbreding bij de meer polaire stoffen toeneemt. Daarom is bij een injectie groter dan 1 ml het monster aangesloten op reservoir C van de HPLC (zie bijlage 4).

De monstername wordt dan in het HPLC programma opgenomen.

5. RESULTATEN EN DISCUSSIE



TITLE: ALKYLFENOLEN M.B.V HPLC

3:59 1 APR 82

CHANNEL NO: 2

SAMPLE: ST 0.6 MG/L

METHOD: FENOL

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT	TIME (MIN)	AREA COUNTS	RRT	SEP CODE
1	fenol	7.6526	15.327	82275	0.65	BB
2	meta cresol	6.9990	19.987	75248	0.85	BV
3	ortho cresol	10.7201	20.418	115254	0.87	VB
4	3-4 xylenol	15.7780	22.766	169633	0.97	BV
5	2-3 xylenol	18.4269	23.567R	198112	1.00	VV
6	ortho ethylfenol	13.2097	24.410	142021	1.04	VB
7	2-isopropylfenol	11.4033	26.350	122600	1.12	BV
8	2-3-5 trimethylfenol	15.8103	27.328	169980	1.16	VB

TOTALS

100.0000

1075123

NOTES:

injektievolume 1 ml

Fig. 4. Chromatogram en rapport van een standaardmonster dat 0,6 mg/l van elk afzonderlijk alkyfenol bevat. UV-detectie bij 280 nm. Injektievolume: 1 ml.

5.1. D e s c h e i d i n g

Het blijkt niet mogelijk alle alkylfenolen met dit kolomtype te scheiden. Vooral de isomeren hebben vaak eenzelfde retentietijd. De volgende stoffen vallen samen in het chromatogram:

- 1) meta cresol en para cresol;
- 2) para ethylfenol, 2-3 xylenol, 2-4 xylenol, 2-5 xylenol, 2-6 xylenol en 3-5 xylenol.

Alleen de stoffen die goed te scheiden zijn, zijn gebruikt voor verder onderzoek. Dit zijn:

- catechol;
- fenol;
- meta cresol;
- ortho cresol;
- 3-4 xylenol;
- 2-3 xylenol;
- ortho ethylfenol;
- 2-isopropylfenol;
- 2-3-5 trimethylfenol.

5.2. L i n e a r i t e i t v a n d e m e t h o d e

Bij de injectie van 1 ml is er een rechtlijnig verband tussen de concentratie en het piekoppervlak in het concentratiegebied van 0,1 mg/l tot 1 mg/l. Zie figuur 5a en 5b.

De detectiegrens van catechol ligt hoger dan van de andere fenolen. Een catechol concentratie van 0,5 mg/l is nodig om bij 280 nm een redelijke piek te krijgen. Door de grote polariteit van het catechol is de piek relatief breed. De methode is dan ook niet geschikt voor het bepalen van catechol.

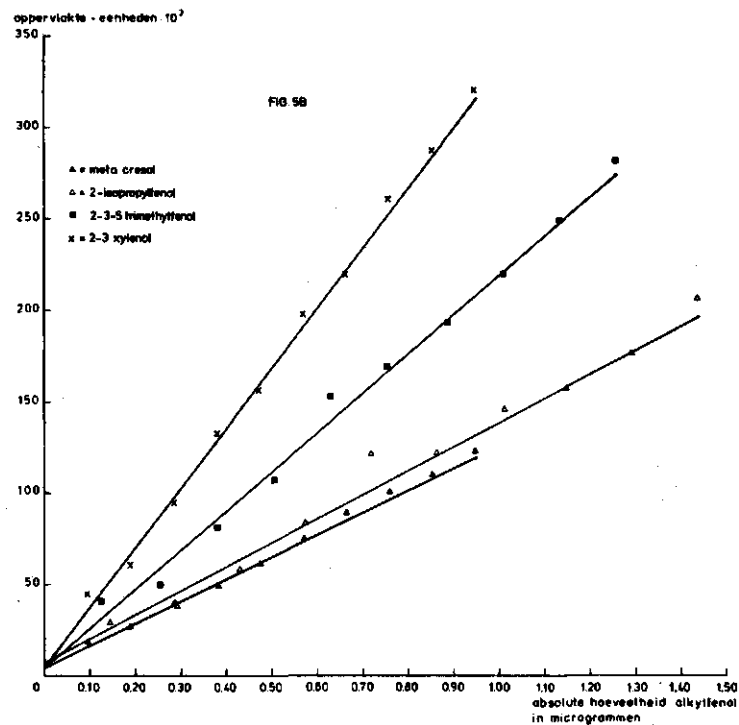
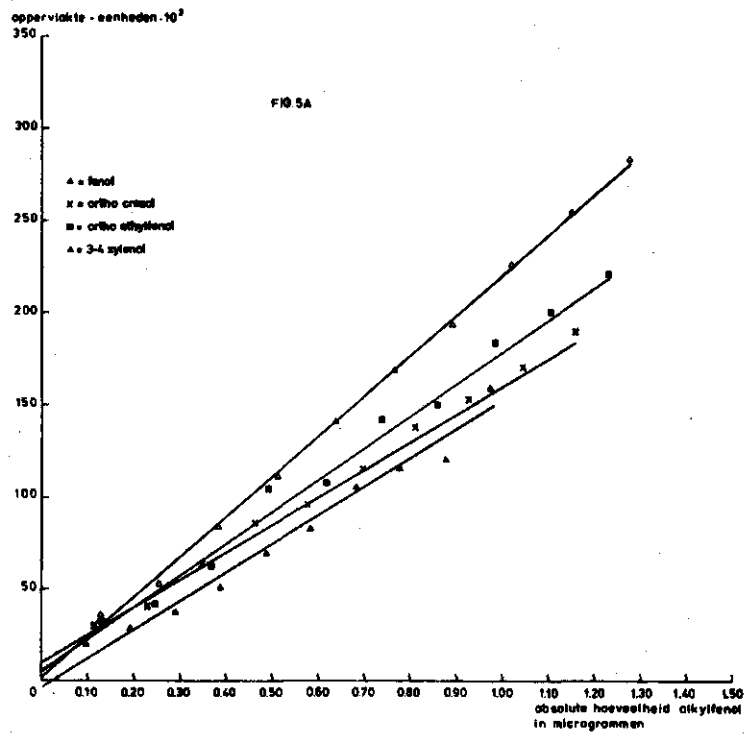


Fig. 5. IJkgrafieken van alkylfenolen, in het concentratiegebied 0,1 mg/l tot 1 mg/l. UV-detectie bij 280 nm. Injektievolume 1 ml.

Voor lagere gehalten dan 0,1 mg/l moet meer worden geïnjecteerd. Afhankelijk van het te verwachten gehalte kan tot 100 ml geïnjecteerd worden, daar ook een lineair verband bestaat tussen het piekoppervlak en de hoeveelheid geïnjecteerd volume van een bepaald gehalte. Zie figuren 6a en 6b.

Uit deze twee lineaire verbanden mag worden geconcludeerd dat er een lineair verband bestaat tussen het gemeten piekoppervlak en de absolute hoeveelheid geïnjecteerd alkylfenol tot een maximum van 1 µg.

Dit blijkt duidelijk als het piekoppervlak wordt uitgerekend als functie van het absolute gehalte. Dit is voor de volgende gevallen gedaan:

- 1 ml injectie van een standaardoplossing met gehalten oplopend van 0,1 mg/l tot 1 mg/l;
- 10 ml injectie van een standaardoplossing met gehalten oplopend van 0,01 mg/l tot 0,1 mg/l;
- 10 tot 100 ml injectie van een standaardoplossing met alkylfenolgehalten van 0,01 mg/l.

Bij een injectievolume groter dan 1 ml treedt er uitspoeling en piekverbreding van fenol op. Meta cresol en ortho cresol zijn niet meer te scheiden. Ze worden als één piek gemeten. De resultaten staan weergegeven in tabel 1.

Tabel 1. Het gemeten oppervlak als functie van de absolute hoeveelheid geïnjecteerd alkylfenol in de concentratiegebieden 0,1 mg/l tot 1 mg/l en 0,01 mg/l tot 0,1 mg/l bij een injectievolume variërend van 1 tot 100 ml. UV-detectie bij 280 nm

	1 ml injectie in concentratiegebied alkylfenolen: 0,1 mg/l tot 1 mg/l			10 ml injectie in concentratiegebied alkylfenolen: 0,01 mg/l tot 0,1 mg/l			10 tot 100 ml injectie, afzonderlijke alkylfenolconcentraties: 0,01 mg/l		
	Helling	Intercept	Correlatie coëfficiënt	Helling	Intercept	Correlatie coëfficiënt	Helling	Intercept	Correlatie coëfficiënt
Fenol	$1,53 \times 10^5$	$- 3,77 \times 10^3$	0,988						
Meta cresol	$1,26 \times 10^5$	$4,16 \times 10^3$	0,999	$1,12 \times 10^5$	$- 4,40 \times 10^2$	0,998	0,5 (m=0) cresol		
Ortho cresol	$1,34 \times 10^5$	$9,51 \times 10^3$	0,999	$1,83 \times 10^5$	$- 4,30 \times 10^3$	0,992	$- 1,15 \times 10^5$	$9,44 \times 10^3$	0,994
3-4 xylanol	$2,19 \times 10^5$	$1,57 \times 10^3$	0,999	$2,25 \times 10^5$	$- 1,83 \times 10^4$	0,993	$1,95 \times 10^5$	$2,60 \times 10^2$	1,000
2-3 xylanol	$3,33 \times 10^5$	$4,75 \times 10^3$	0,999	$3,81 \times 10^5$	$- 2,03 \times 10^4$	0,993	$3,41 \times 10^5$	$- 7,12 \times 10^3$	1,000
ortho ethylfenol	$1,76 \times 10^5$	$4,88 \times 10^3$	0,994	$2,20 \times 10^5$	$- 2,12 \times 10^4$	0,985	$1,82 \times 10^5$	$- 5,21 \times 10^3$	0,997
2-isopropylfenol	$1,37 \times 10^5$	$6,58 \times 10^3$	0,993	$1,40 \times 10^5$	$- 1,92 \times 10^3$	0,991	$1,20 \times 10^5$	$5,53 \times 10^3$	0,996
2-3-5 trimethylfenol	$2,18 \times 10^5$	$4,14 \times 10^3$	0,997	$2,20 \times 10^5$	$- 1,23 \times 10^4$	0,985	$1,88 \times 10^5$	$- 4,73 \times 10^2$	0,993

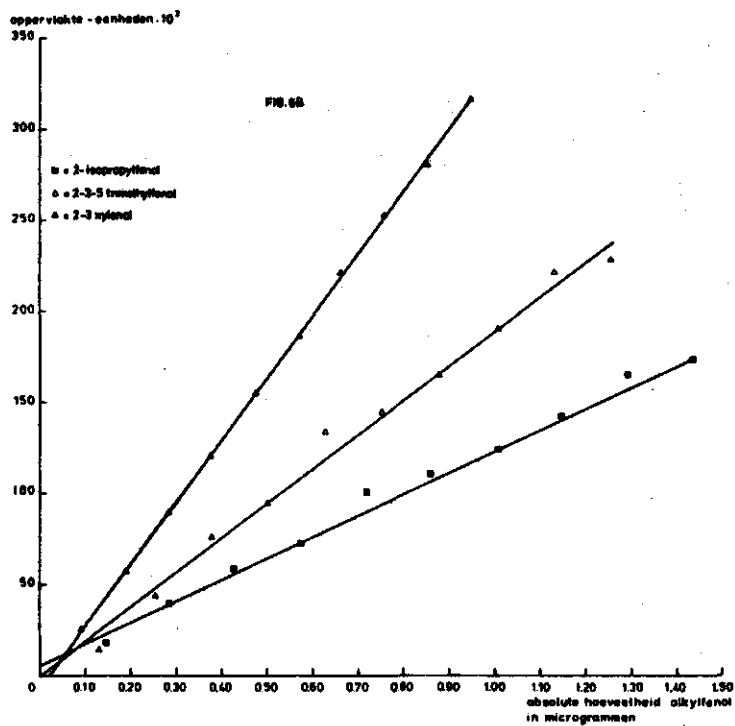
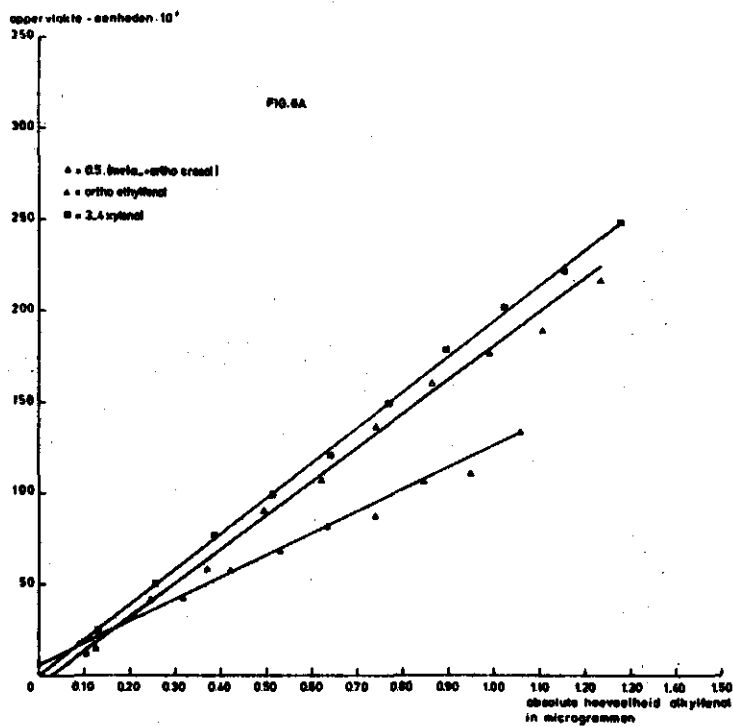


Fig. 6. IJkgrafieken van alkylfenolen bij een 10 tot 100 ml injectie van een standaardmonster met afzonderlijke alkylfenolconcentraties van 0,01 mg/l. UV-detectie bij 280 nm

Uit tabel 1 blijkt dat de hellingen redelijk met elkaar in overeenstemming zijn. Verschillen kunnen toegeschreven worden aan dag tot dag verschillen bij de analyse.

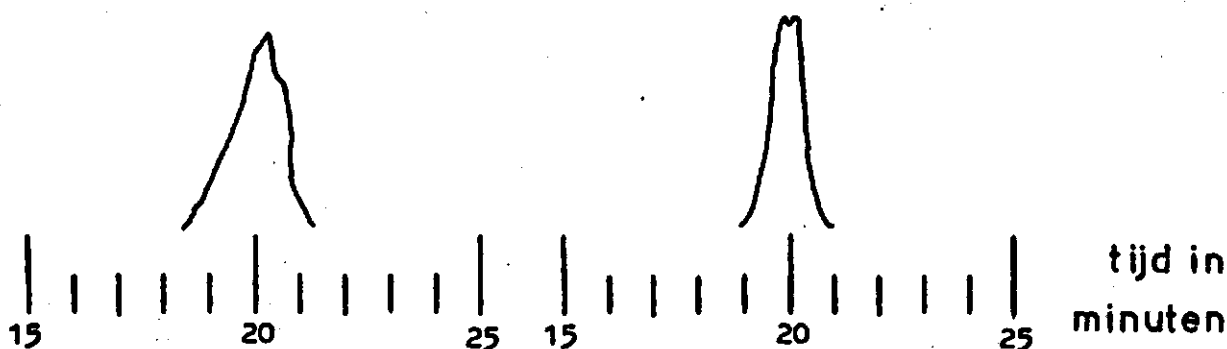
Bij een injectievolume groter dan 1 ml treedt zodanige piekverbreding op dat fenol niet meer reproduceerbaar te meten is en meta cresol en ortho cresol samen vallen in het chromatogram. De helling en het intercept is daarom als het totaal van meta cresol en ortho cresol berekend.

De ijklijnen zijn binnen een fout van 20% reproduceerbaar. Het is daarom van belang bij elke analyse een standaard mee te nemen en niet af te gaan op een ijklijn die enkele dagen eerder geproduceerd is.

5.3. Effect van aanzuren en toevoegen van zout op de scheiding van meta cresol en ortho cresol bij een injectievolume groter dan 10 ml

Een verbetering van de scheiding kan plaatsvinden door de stoffen apolairder te maken, zodat een betere adsorptie op het kolom materiaal ontstaat, of door het oplosmiddel polairder te maken. De apolaire stoffen worden als het ware gedwongen op de kolom te adsorberen.

Door verlaging van de pH tot 3 met behulp van zwavelzuur zijn de hydroxylgroepen van de fenolen geprotoneerd, zodat hun polariteit afneemt. Tevens is het water polairder gemaakt met Na_2SO_4 tot een oplossing ontstond die 35 g/l bevatte. (NaCl is corrosief voor het leidingensysteem van de vloeistofchromatograaf.) Figuur 7 geeft de scheiding van meta cresol en ortho cresol voor en na toevoeging van zwavelzuur en Na_2SO_4 .



scheiding meta cresol en
ortho cresol zonder toevoegingen

scheiding meta cresol en ortho
cresol met toevoegingen

Fig. 7. Invloed toevoeging zwavelzuur tot pH = 3 en Na_2SO_4 (35 g/l) op de scheiding van meta cresol en ortho cresol. Bij een injectievolumen van 20 ml

Zoals figuur 7 laat zien worden onder deze omstandigheden meta cresol en ortho cresol bij een injectievolumen groter dan 10 ml niet gescheiden.

5.4. Identificatie alkylfenolen aan de hand van retentietijd en piekoppervlakte bij 210 nm, 240 nm en 280 nm

De identificatie van alkylfenolen in monsters vindt plaats door de chromatogrammen bij 210 nm, 240 nm en 280 nm met een standaard te vergelijken.

Als eerste identificatie dient de retentietijd. De retentietijd van een piek in een chromatogram van een monster moet overeenkomen met die van een standaard. Daar met gradiënt-elutie de retentietijden iets minder reproduceerbaar zijn is een verschil van 0,2 minuut als grens aangehouden.

Als tweede identificatie worden de verhoudingen van de piekoppervlaktes bij 210 nm en 280 nm van een standaard ($\frac{\text{standaard 210}}{\text{standaard 280}}$) vergeleken met de verhoudingen van de piekoppervlaktes bij 210 nm en 280 nm van het monster ($\frac{\text{monster 210}}{\text{monster 280}}$). Wanneer de eerste verhoudingen (210 nm/280 nm) overeenkomen met een alkylfenol, dan worden ook de verhoudingen

280 nm/240 nm gemeten. Pas als deze verhouding voor het monster hetzelfde is als voor de standaard is er een alkylfenol aangetoond. Deze laatste controle gaat niet meer op bij hele kleine pieken omdat dan de absorptie bij 240 nm niet meer goed meetbaar is.

In tabel 2 staan de oppervlaktes en de verhoudingen voor een standaardmonster gemeten bij 210 nm, 240 nm en 280 nm weergegeven.

Tabel 2. Absolute piekoppervlaktes alkylfenolstandaarden bij concentraties van 0,05 mg/l bij 280 nm en de relatieve oppervlaktes bij 210 nm en 240 nm ten opzichte van 280 nm. Injektievolume 10 ml (n.b. = niet bepaald).

Alkylfenol-standaard	Piekoppervlak bij 280 nm	$\frac{\text{piekoppervlak 210 nm}}{\text{piekoppervlak 280 nm}}$	$\frac{\text{piekoppervlak 280 nm}}{\text{piekoppervlak 240 nm}}$
Fenol	57.696	7,7	n.b.
Meta cresol	64.908	11,4	2,5
Ortho cresol	82.257	8,5	3,2
Para cresol	95.157	5,0	n.b.
Ortho ethylfenol	83.730	6,8	3,1
Para ethylfenol	89.679	5,1	n.b.
2-3 xylenol	166.041	16,3	1,8
2-4 xylenol	119.763	7,6	n.b.
2-5 xylenol	108.937	9,1	n.b.
2-6 xylenol	74.295	12,4	n.b.
3-4 xylenol	98.127	9,2	1,6
3-5 xylenol	64.986	16,3	n.b.
2-isopropylfenol	70.000	18,0	1,2
2,3,5 trimethylfenol	106.041	6,6	3,6

5.5. Onderzochte monsters op aanwezigheid van alkylfenolen

5.5.1. Rijnwater

Er is een Rijnwatermonster genomen in Wageningen. Dit is afgezogen over een membraanfilter. Hiervan is 20 ml geïnjecteerd via reservoir C (zie bijlage 4) en geanalyseerd bij 210 nm en 280 nm.

Zie figuur 8 en 9. In tabel 3 zijn de pieken opgenomen, die qua retentietijd overeenkomen met de pieken van een standaardmonster geanalyseerd bij 280 nm en 210 nm. Een piek is in de tabel opgenomen wanneer de retentietijd niet meer dan 0,2 minuut naar boven of beneden afwijkt met de overeenkomstige piek in het standaardmonster. Tevens is de verhouding van de piekoppervlaktes bij 280 nm en 210 nm bepaald.

Tabel 3. UV-absorptie van een rijwatermonster bij 280 nm en 210 nm. Injektievolume: 20 µl

Piekretentietijd overeenkomstig met	Golflengte: 280 nm		Golflengte: 210 nm		monster 210 nm monster 280 nm	standaard 210 nm standaard 280 nm
	retentietijd monster (min)	retentietijd standaard (min)	retentietijd monster (min)	retentietijd standaard (min)		
Meta cresol	18,22	18,22	16,21	16,21	x	-
2-3 xylol	21,64	21,64	18,78	18,97	3,7	16,3
Ortho ethylfenol	22,45	22,47	19,52	19,66	7,6	6,8
2-isopropylfenol	24,58	24,39	-	-	-	-
2-3-5 trimethylfenol	25,46	25,36	21,68	21,86	2,3	6,6

x = ethylfenol valt samen met verontreiniging in het chromatogram, zodat de oppervlakte niet te bepalen is

De verschillen in retentietijd tussen de analyses bij 280 nm en 210 nm worden veroorzaakt door het feit, dat de analyses op verschillende dagen zijn uitgevoerd.

Uit tabel 3 en de chromatogrammen blijkt dat meta cresol of para cresol als een spoortje aanwezig kan zijn, waarschijnlijk in een concentratie lager dan 0,01 mg/l. De aanwezigheid van ortho ethylfenol of para ethylfenol is zeer waarschijnlijk. Wanneer de piek als ortho ethylfenol berekend wordt is er $3,0 \times 10^{-3}$ mg/l aanwezig. Dit illustreert dus duidelijk hoe gering de piekoppervlaktes zijn. Van de overige pieken wijken de verhoudingen $\frac{\text{standaard 210}}{\text{standaard 280}}$ en $\frac{\text{monster 210}}{\text{monster 280}}$ te veel af. Controle bij 240 nm heeft geen zin, omdat de piekoppervlaktes bij 280 nm al klein zijn.

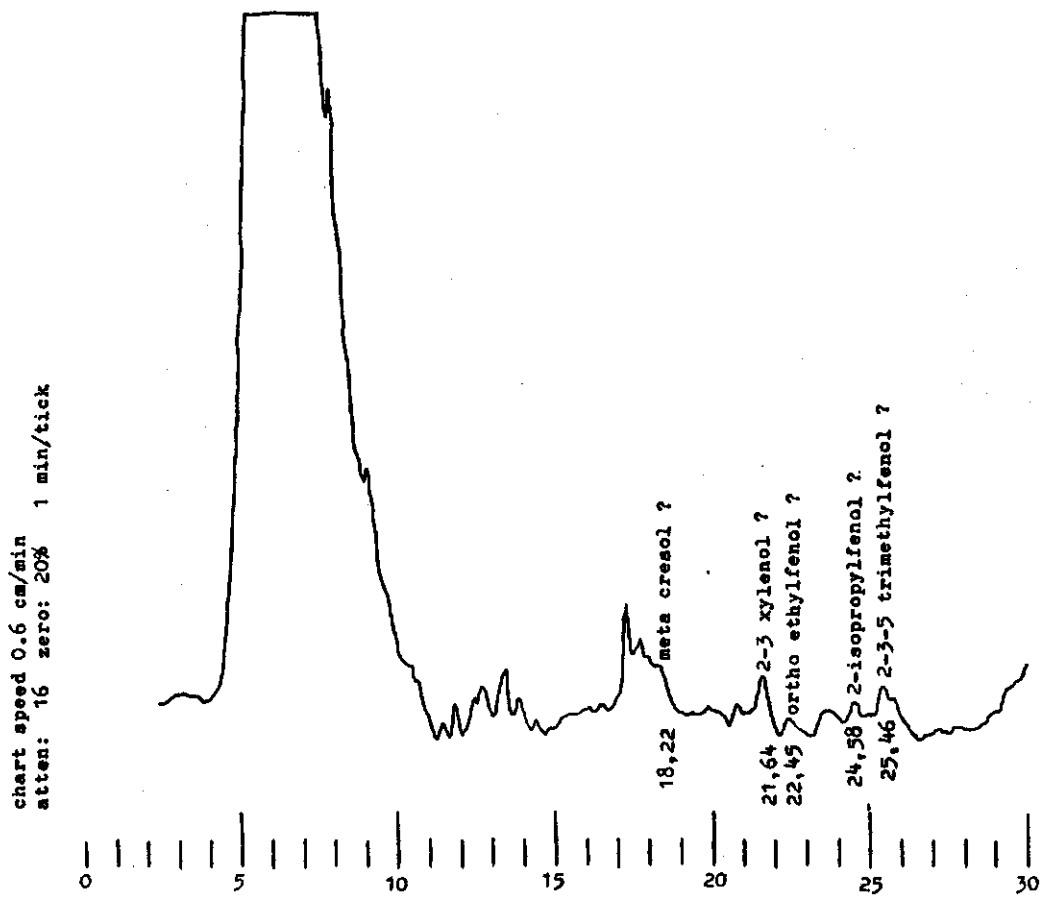


Fig. 8. Chromatogram Rijnwatermonster bij 280 nm. Injektievolume:
 20 ml

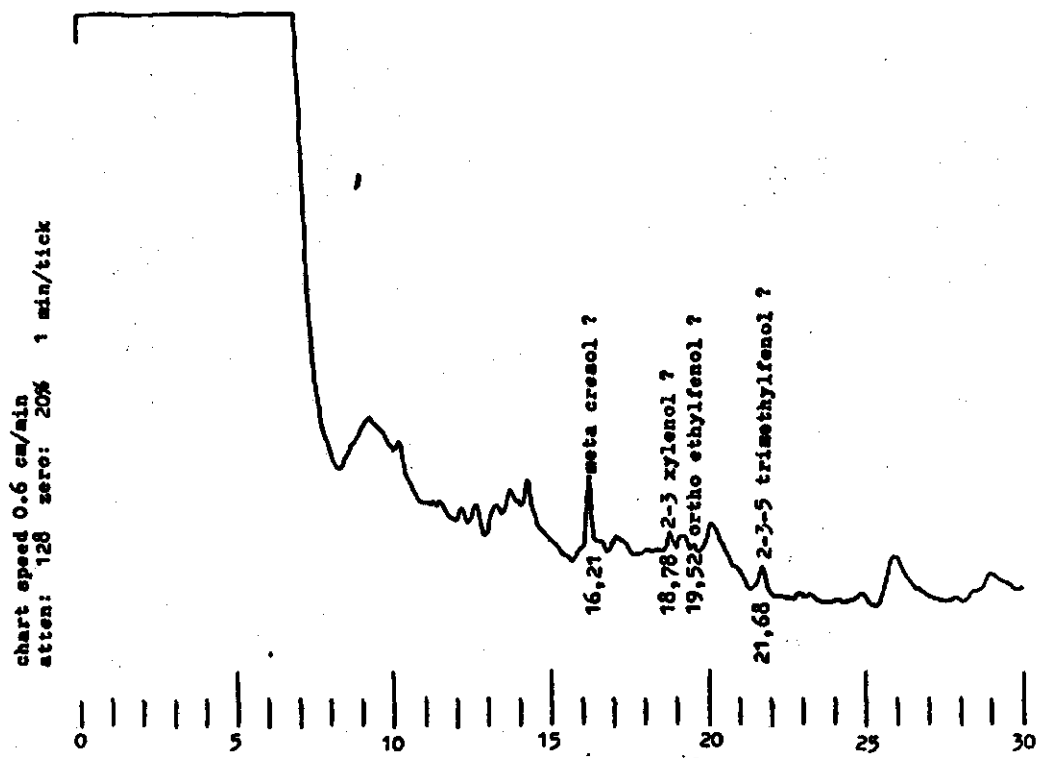


Fig. 9. Chromatogram Rijnwatermonster bij 210 nm. Injektievolume:
20 ml

5.5.2. Water verzadigd met benzine

Het water-benzinemonster is op gelijke wijze behandeld als het Rijnwatermonster. Nu is er echter 10 ml monster geïnjecteerd. Voor de analyse van het watermonster zie figuur 10 en 11 en tabel 4.

Afgaande op de verhoudingen in tabel 4 is er geen enkel alkylfenol aanwezig. Toch blijft de mogelijkheid bestaan, dat de alkylfenolen in lage concentraties aanwezig zijn, maar in het chromatogram samenvallen met verontreinigingen. De aanwezigheid van fenol is onwaarschijnlijk, omdat op die plaats in het chromatogram juist een brede piek verwacht wordt, vanwege de uitspoeling van het fenol.

Gezien de scherpe pieken bij de analyse bij 240 nm is de aanwezigheid van ortho cresol en 2-3 xylenol of een alkylfenol dat hiermee samenvalt, bij deze golflengte gecontroleerd. Zie figuur 12 en tabel 5.

Op grond van tabel 5 kunnen ortho cresol en 2-3 xylenol hooguit als sporen aanwezig zijn.

Tabel 4. UV-absorptie watermonster verzadigd met benzine bij 280 nm en 210 nm. Injektievolume: 10 ml

Piekenretentietijd overeenkomstig met	Golflengte: 280 nm		Golflengte: 210 nm		monster 210 nm monster 280 nm	standaard 210 nm standaard 280 nm
	retentietijd monster (min)	retentietijd standaard (min)	retentietijd monster (min)	retentietijd standaard (min)		
Fenol	14,42	14,30	14,21	14,11	15,8	7,7
Meta cresol	18,40	18,22	18,13	18,20	1,3	11,4
Ortho cresol	18,40	18,64	18,50	18,61	1,7	8,5
3-4 xylenol	-	-	20,73	20,81	-	-
2-3 xylenol	21,75	21,64	21,79	21,59	10,2	16,3
Ortho ethylfenol	22,56	22,47	22,86	22,43	463	6,8
2-isopropylfenol	24,27	24,39	24,25	24,34	3,2	18,0

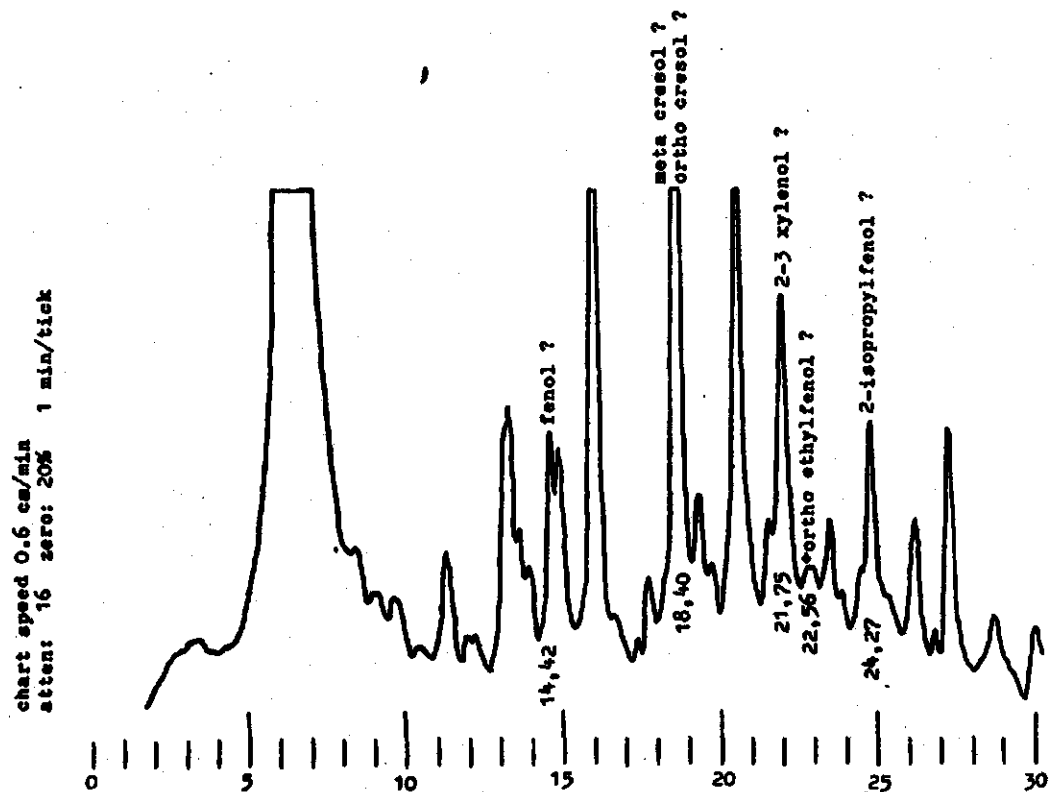


Fig. 10. Chromatogram watermonster verzadigd met benzine bij 280 nm.
 Injektievolumen: 10 ml

Tabel 5. UV-absorptie watermonster verzadigd met benzine bij 280 nm en 240 nm. Injektievolumen: 10 ml

Piekenretentietijd overeenkomstig met	Golflengte: 280 nm		Golflengte: 240 nm		monster 280 nm	standaard 280 nm
	retentietijd monster (min)	retentietijd standaard (min)	retentietijd monster (min)	retentietijd standaard (min)		
Ortho cresol	18,40	18,64	18,33	18,63	0,68	3,2
2-3 xylenol	21,75	21,64	21,76	21,65	0,30	1,8

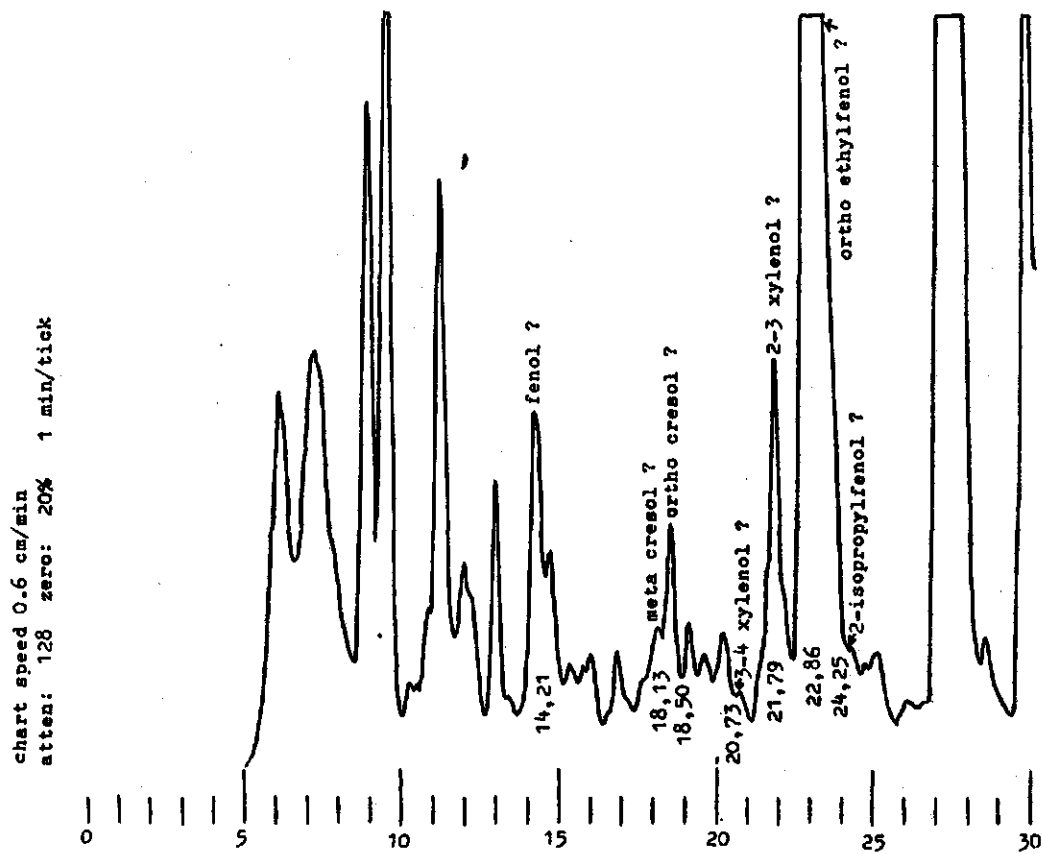


Fig. 11. Chromatogram watermonster verzadigd met benzine bij 210 nm.
 Injektievolume: 10 ml

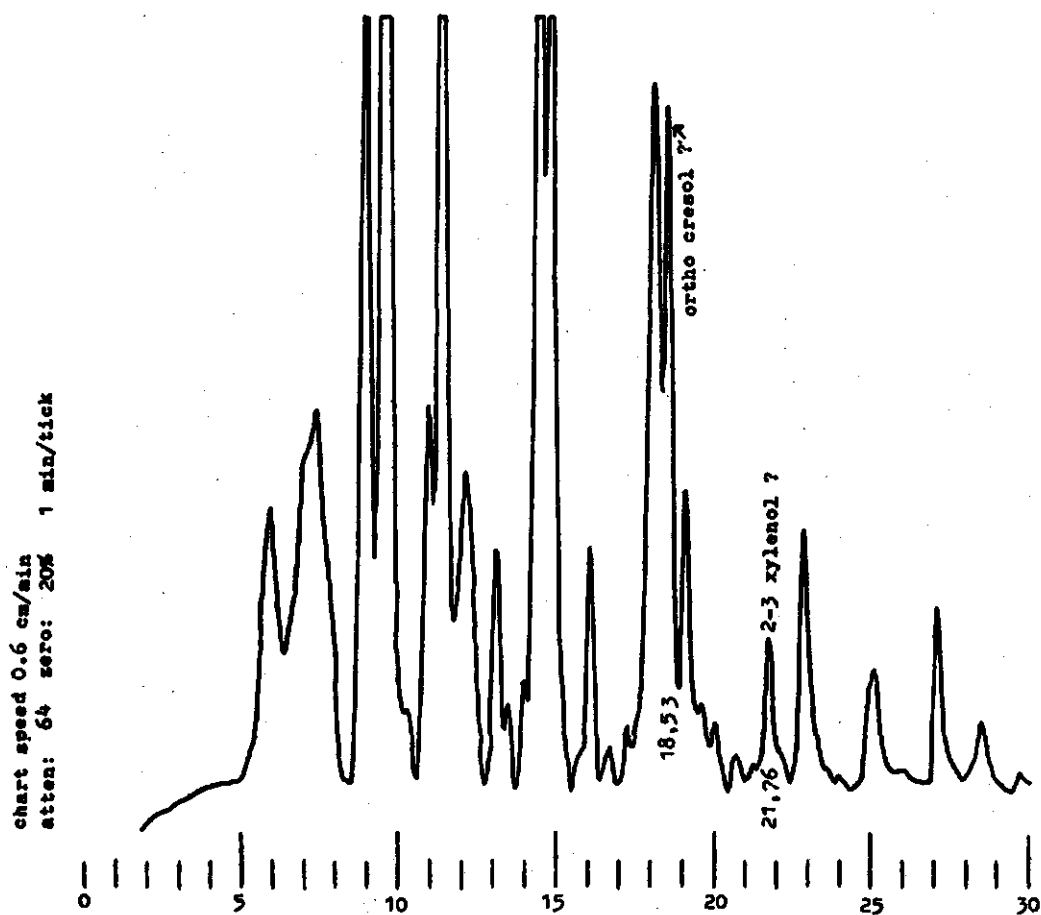


Fig. 12. Chromatogram watermonster verzadigd met benzine bij 240 nm.
 Injektievolume: 10 ml

5.5.3. Water verzadigd met huisbrandolie

Het monster heeft dezelfde behandeling gehad als het Rijnwatermonster en het water-benzinemonster. Er is weer 10 ml monster geïnjecteerd. Voor de resultaten bij 280 nm en 210 nm zie figuur 13 en 14 en tabel 6.

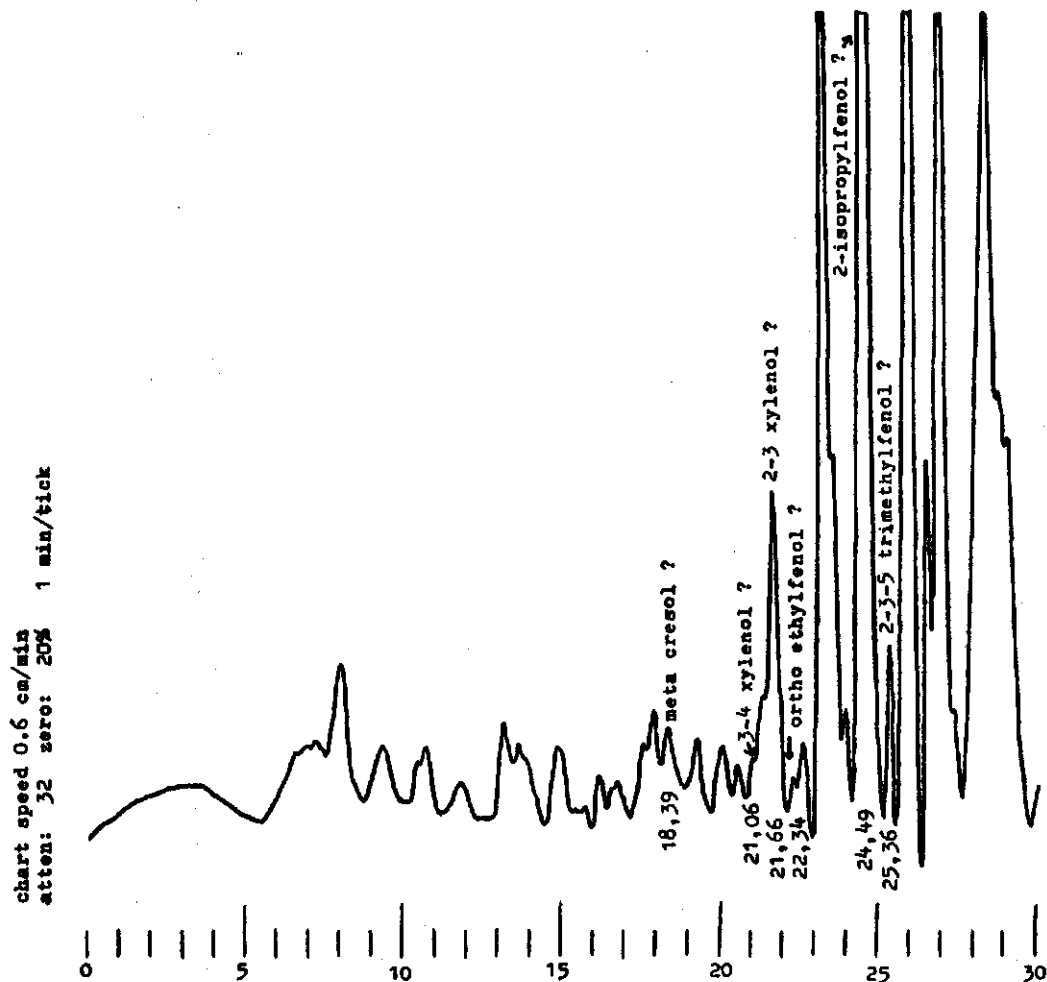


Fig. 13. Chromatogram watermonster verzadigd met huisbrandolie bij 280 nm. Injektievolume: 10 ml

Tabel 6. UV-absorptie watermonster verzadigd met huisbrandolie bij 280 nm en 210 nm. Injektievolume: 10 ml

Piekenretentie- tijd overeen- komstig met	Golflengte: 280 nm		Golflengte: 210 nm		monster 210 nm monster 280 nm	standaard 210 nm standaard 280 nm
	retentietijd monster (min)	retentietijd standaard (min)	retentietijd monster (min)	retentietijd standaard (min)		
Fenol	-	-	14,31	14,11	-	-
Meta cresol	18,39	18,22	18,02	18,20	7,4	11,4
3-4 xylenol	21,06	20,85	20,75	20,81	28,1	9,2
2-3 xylenol	21,66	21,64	21,71	21,59	9,2	16,3
Orto ethylfenol	22,34	22,47	22,43	22,43	x	-
2-isopropylfenol	24,49	24,39	24,54	24,34	2,5	18
2-3-5 trimethylfenol	25,36	25,36	25,35	25,29	9,0	6,6

x = alkylfenol valt samen met verontreiniging in het chromatogram, zodat de oppervlakte niet te bepalen is

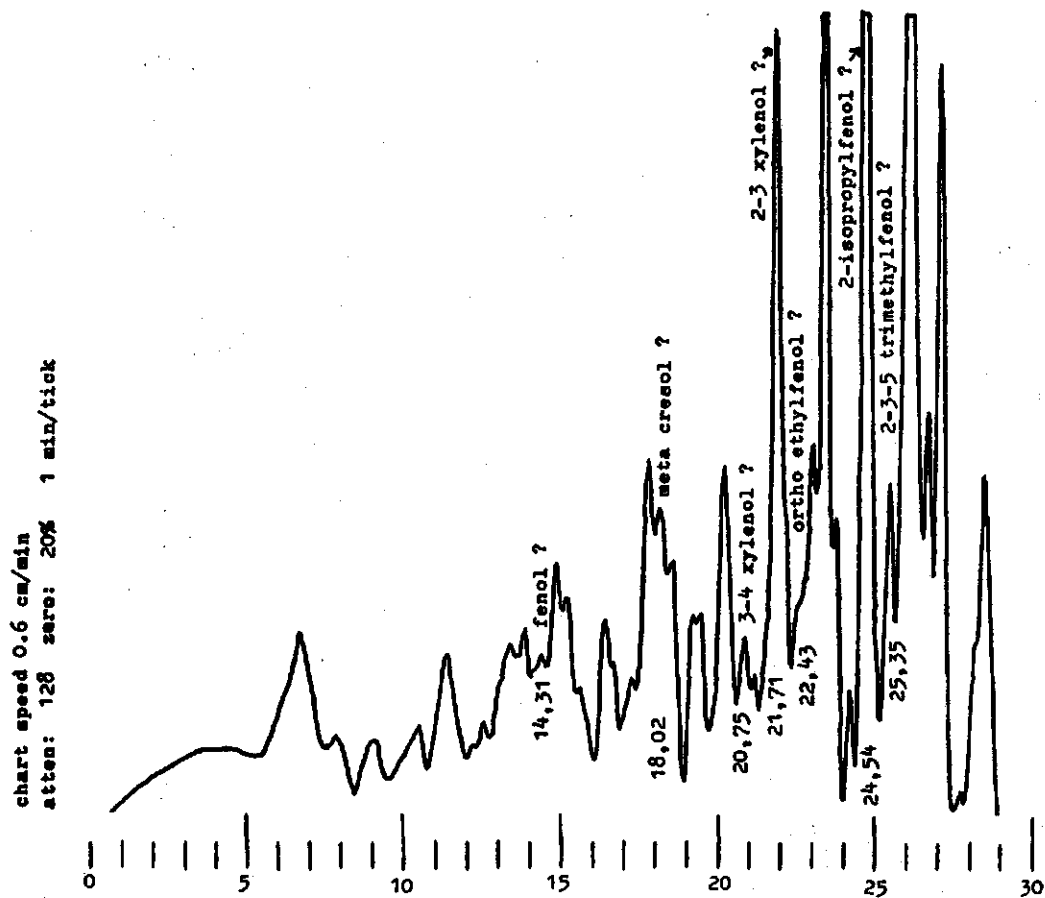


Fig. 14. Chromatogram watermonster verzadigd met huisbrandolie bij 210 nm. Injektievolumen: 10 ml

Op grond van tabel 6 is het onwaarschijnlijk dat 2-isopropylfenol, 3-4 xylenol aanwezig zijn.

Bij de analyse bij 210 nm valt ortho ethylfenol samen met een verontreiniging. Daarom zal de ortho ethylfenol of para ethylfenolconcentratie, wanneer het aanwezig is, kleiner zijn dan 0,03 mg/l (berekend op basis van de meting bij 280 nm).

Bij 280 nm wordt er op de plaats van fenol niets gemeten, maar bij 210 nm wel. Hieruit kan alleen geconcludeerd worden, dat wanneer het fenol werkelijk aanwezig is, dit in een concentratie zal zijn kleiner dan 0,1 mg/l.

De aanwezigheid van meta cresol, 2-3 xyleneol of een alkylfenol dat hiermee samenvalt en 2-3-5 trimethylfenol is gecontroleerd bij 240 nm omdat de pieken bij 280 nm van zodanige grootte zijn, dat bij 240 nm nog redelijke pieken verwacht mogen worden. Zie figuur 15 en tabel 7.

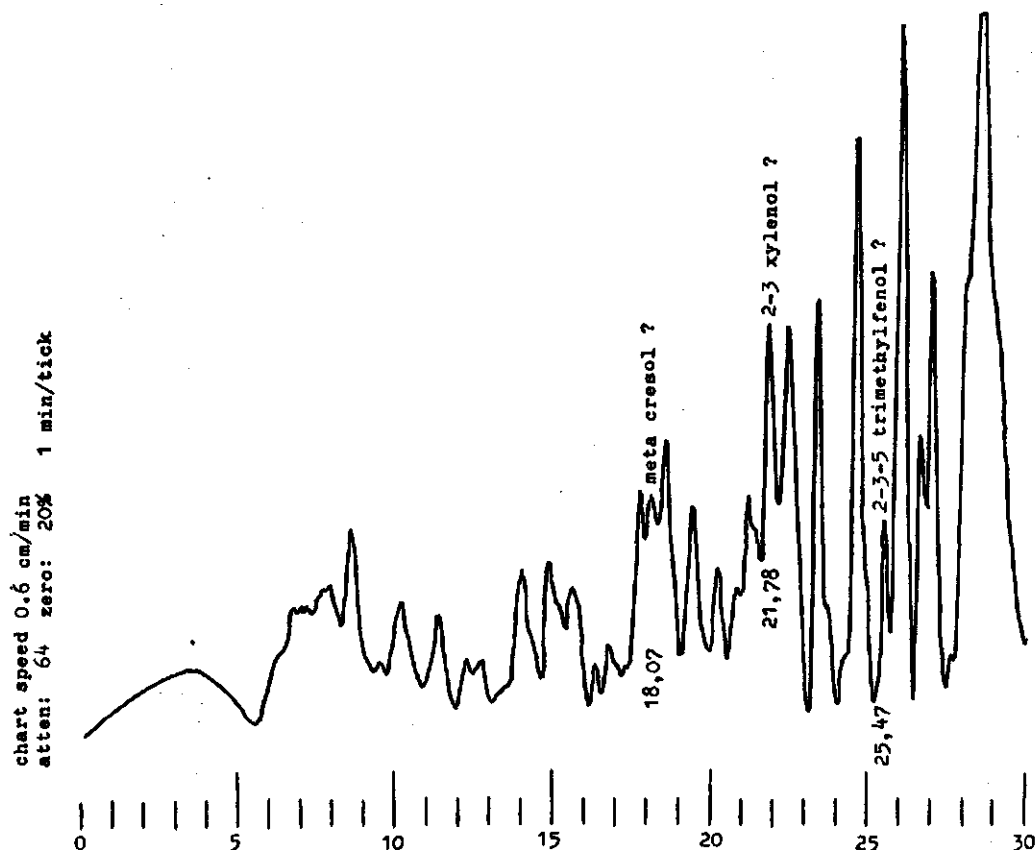


Fig. 15. Chromatogram watermonster verzadigd met huisbrandolie bij 240 nm. Injektievolume: 10 ml

Tabel 7. UV-absorptie watermonster verzadigd met huisbrandolie bij 280 nm en 240 nm

Piekenretentie- tijd overeen- komstig met	Golflengte: 280 nm		Golflengte: 240 nm		monster 280 nm	standaard 280 nm
	retentietijd monster (min)	retentietijd standaard (min)	retentietijd monster (min)	retentietijd standaard (min)		
Meta cresol	18,39	18,22	18,07	18,19	0,4	2,5
2-3 xyleneol	21,66	21,64	21,78	21,65	0,5	1,8
2-3-5 trimethylfenol	25,36	25,26	25,47	25,33	0,6	3,6

Uit tabel 7 blijkt dat de pieken veroorzaakt worden door andere stoffen dan alkylfenolen. De pieken bij 240 nm zijn namelijk groter dan bij 280 nm, dit in tegenstelling tot de pieken in het standaardmonster.

Uit de resultaten van de monsters blijkt dat het erg moeilijk is, op grond van de metingen bij 210 nm, 240 nm en 280 nm een uitspraak te doen over de aanwezigheid van alkylfenolen. Vaak zijn er storende stoffen aanwezig die qua retentietijd overeenkomen. Door gebruik te maken van drie verschillende golflengtes moet het alsnog mogelijk zijn tot een juiste identificatie te komen. Bij 210 nm wordt echter op de helling van een absorptiemaximum gemeten waardoor de verhoudingen minder betrouwbaar worden. Ook de meting bij 240 nm is niet altijd mogelijk, omdat vooral bij geringe gehalten de pieken veel te klein worden.

5.6. Fouten bij de integratie en de basislijncorrectie

Een verkeerde integratie kan tot zeer grote fouten leiden. Het volgende voorbeeld illustreert hoe sterk een integratiefout doorwerkt in het uiteindelijke resultaat. Zie figuur 16.

De integratiegegevens zijn verwerkt in tabel 8.

Tabel 8. Integratiegegevens standaardmonster bij twee verschillende integratieprocedures bij 280 nm

	oppervlak 1 ^e integratie	oppervlak 2 ^e integratie	Procentuele afwijking 1 ^e en 2 ^e integratie
Fenol	76 604	90 279	17,9
Meta cresol	64 719	71 130	9,9
Ortho cresol	93 126	102 139	9,7
3-4 xyleneol	127 334	136 425	7,1
2-3 xyleneol	161 445	171 267	6,1
Ortho ethylfenol	113 388	136 953	20,8
2-isopropylfenol	87 048	97 962	12,5
2-3-5 trimethylfenol	118 477	121 940	2,9

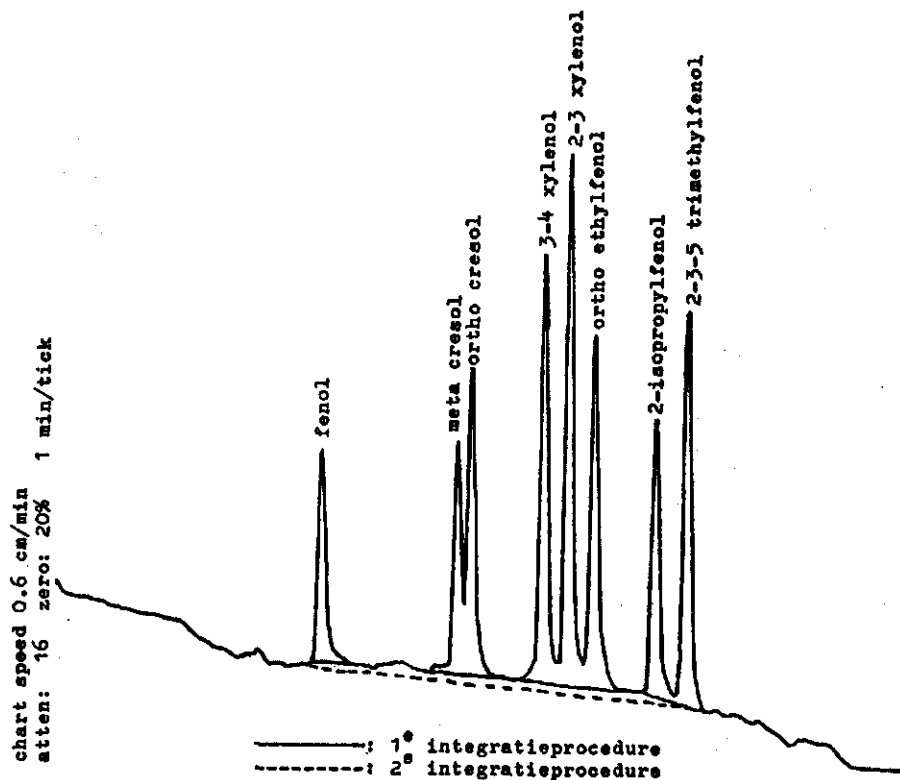


Fig. 16. Chromatogram van een standaardmonster alkylfenolen met afzonderlijke concentraties van 0,6 mg/l bij 2 verschillende integratieprocedures. UV-detectie bij 280 nm. Injektievolume 1 ml

Tabel 8 illustreert duidelijk hoe een ogenschijnlijk kleine integratie-afwijking gemakkelijk fouten van 10% tot 20% kan veroorzaken.

Een tweede foutenbron is de basislijncorrectie. Naarmate het injektievolume groter is verloopt de basislijn meer. Om een juiste integratie toe te passen wordt de analyse door de integrator geplot. Het basisverloop mag daarom niet groter zijn dan het bereik van het papier. Daarom zijn de analyses gecorrigeerd voor de basislijn, door de gegevens die op de schijf van de integrator staan, in een grafiek

uit te zetten, om op die manier de juiste basislijn vast te stellen. Dit dient zeer kritisch te gebeuren daar een foutieve basislijncorrectie tot ernstig afwijkende integraties kan leiden.

In het volgende voorbeeld is het chromatogram te zien van een analyse van water verzadigd met benzine bij 280 nm, zonder basislijn correctie. De gegevens vanaf de schijf zijn uitgezet in figuur 17.

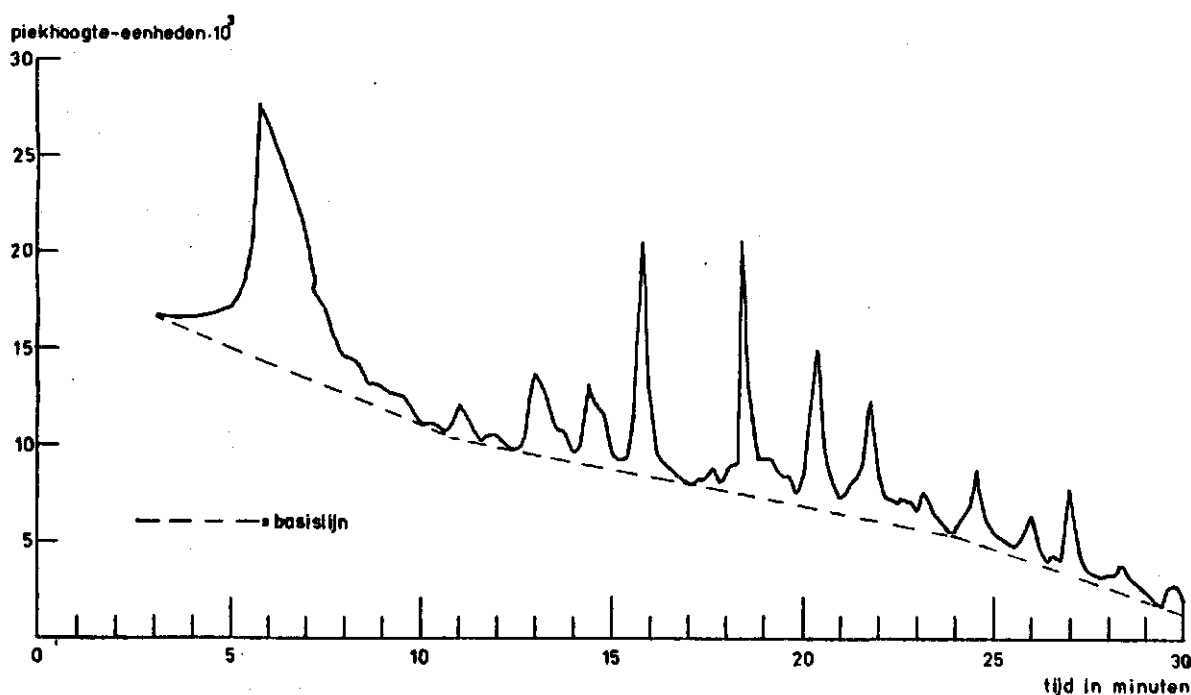


Fig. 17. Chromatogram van een watermonster verzadigd met benzine bij 280 nm, zonder basislijncorrectie. Injektievolumen: 10 ml

Door de coördinaten van de basislijn, uit figuur 17, in het geheugen van de integrator te brengen, is het mogelijk voor het basislijnverloop te corrigeren, zodat de analyse goed op papier is te krijgen.

Hierna kan de integratieprocedure toegepast worden. In figuur 10 is het chromatogram te zien van de analyse na basislijncorrectie en integratie.

Wanneer de twee figuren met elkaar vergeleken worden is het gemakkelijk in te zien dat een verkeerde basislijncorrectie gemakkelijk fouten introduceert bij het bepalen van het oppervlak van de pieken.

6. CONCLUSIES

In deze nota is een methode beschreven om met behulp van HPLC alkylfenolen te bepalen. Gebruik wordt gemaakt van een reversed phase kolom en detectie bij 280 nm. De concentratie vindt plaats op een voorkolom, die in het systeem is ingebouwd, zodat een moeilijke en tijdrovende extractietechniek niet nodig is.

De methode blijkt in kwantitatief opzicht goed te voldoen. In het concentratiegebied tussen 0,01 mg/l tot 1 mg/l is er een lineair verband tussen de absolute hoeveelheid geïnjecteerde alkylfenol en het gemeten piekoppervlak. Afhankelijk van de aanwezige hoeveelheid alkylfenol kan een volume worden geïnjecteerd tot 100 ml.

De ondergrens is 0,01 mg/l voor de meeste alkylfenolen. Dit is aanzienlijk lager dan de grens gevonden door Ogan en Katz (1981). Zij vonden een ondergrens van circa 0,5 mg/l. Fenol en catechol zijn door hun grote polariteit minder goed te bepalen. Hun ondergrenzen zijn respectievelijk 0,1 mg/l en 0,5 mg/l. De maximale injectie van deze twee stoffen is ook veel lager, daar ze slechts zwak geadsorbeerd zijn aan de voorkolom. Bij grotere injecties vindt uitspoeling plaats, waardoor piekverbreding optreedt en veel te weinig wordt gevonden.

Voor de identificatie is detectie bij meerdere golflengtes noodzakelijk. Dit blijkt vooral bij aanwezigheid van kleine hoeveelheden erg moeilijk te zijn door aanwezigheid van storende stoffen. Voor een juiste identificatie is een specifieke detector of een tweede onafhankelijke techniek (gaschromatografie) nodig. Is een alkylfenol eenmaal aangetoond dan is de beschreven HPLC-techniek een geschikte bepalingstechniek.

7. SUGGESTIES VERDER ONDERZOEK

Naast de HPLC methode kan de gaschromatografische analyse van alkylfenolen volgens Coutts, Hargesheimer en Passuto (1979) toegepast worden. Ze acetyleren de alkylfenolen in de waterfase waardoor het extractierendement met methyleenchloride verhoogd wordt. Het extract wordt ingedampt en geïnjecteerd in de gaschromatograaf, uitgerust met het macro-injektiesysteem. Deze gaschromatografische analyse is uitgevoerd met behulp van een voorkolom gevuld met apolair voorkolom-materiaal (5% Silicone O.V.-1 op Chromosorb W AW-DMCS). De scheiding gebeurt met een capillaire kolom van het type Fused Sylica.

Lengte : 25 m
Inwendige diameter: 0,26 mm
Vloeistof fase : CP Sil 5
Filmdikte : 0,14 μ m

De resultaten waren niet bevredigend. In eerste instantie door verontreinigde chemicaliën. Ten tweede doordat het percentage vloeistoffase in de voorkolom vermoedelijk te hoog was, waardoor bleeding optrad.

Voor verder onderzoek dient aandacht besteed te worden aan het type voorkolom en capillaire kolom.

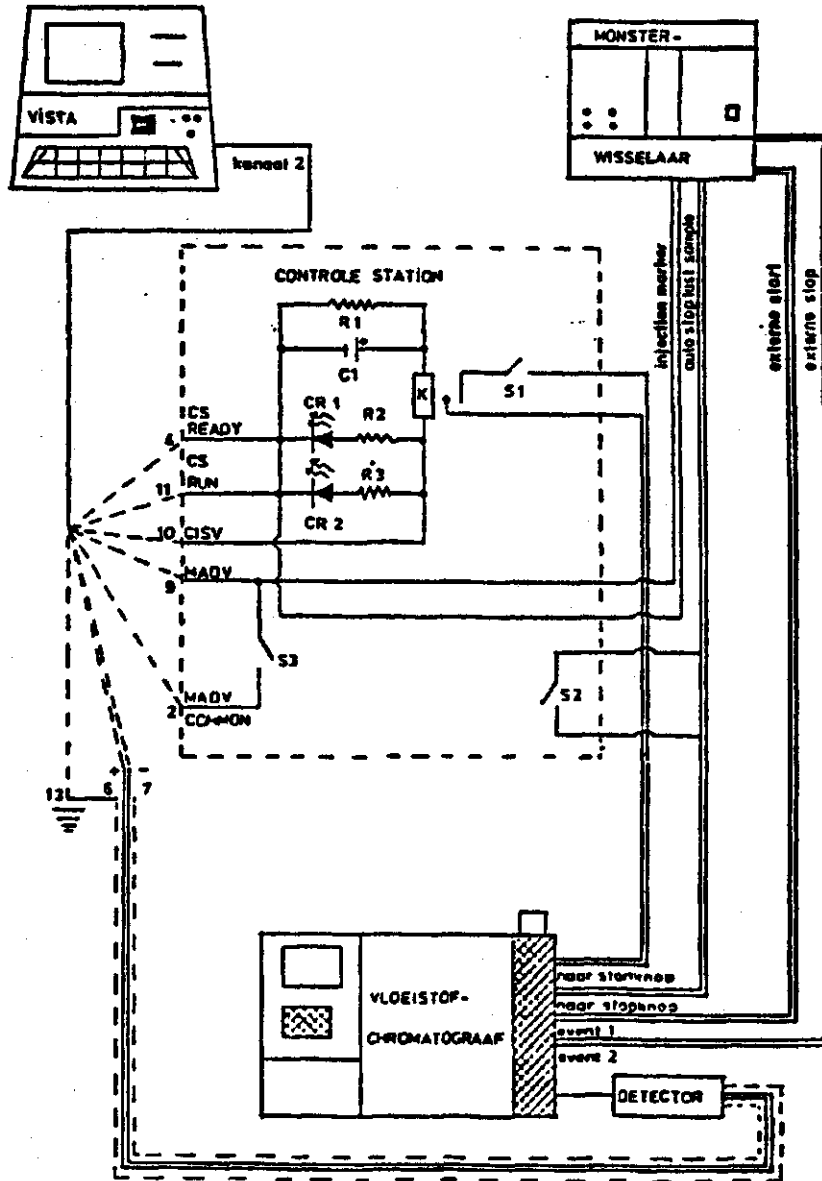
De HPLC-techniek kan verbeterd worden door het gebruik van een korte voorkolom met een lengte van enige millimeters gevuld met een nieuw type kolom materiaal bijvoorbeeld het polymeer van difenylbenzeenstyreen.

8. LITERATUUR

- BERG, C. VAN DE, 1980. De analyse van oliecomponenten in water met behulp van XAD-hars en gaschromatografie. Nota 1192, ICW.
- COUTTS, R.T., E.E. HARGESHEIMER and F.M. PASUTTO, 1979. Gaschromatographic analyses of trace phenols by direct acetylation in aqueous solution. J. Chrom., 179, 291-299.
- HARMSSEN, J. CHROMATOGRAFIE, 1980. (Samenvatting van de cursus gegeven in het voorjaar 1980.) Nota 1224, ICW.
- OGAN, K., E. KATZ, 1981. Liquid chromatographic separation of alkylphenols with fluorescence and ultraviolet detection. Anal. Chem. 53, 160-163.
- PEPPEL, A.C. VAN DE, 1981. De analyse van polycyclische aromaten in water met behulp van vloeistofchromatografie. Nota 1273, ICW.
- WERKHOVEN-GOEWIE, C.E., U.A.Th. BRINKMAN and R.W. FREI, 1981. Trace enrichment of polar compounds on chemically bonded and carbonaceous sorbents and application to chlorophenols. Anal. Chem. 53, 2072-2080.
- WERKHOVEN-GOEWIE, C.E., 1982. Lezing gehouden op 12th ANNUAL SYMPOSIUM ON THE ANALYTICAL CHEMISTRY OF POLLUTANTS. April 14-16, Amsterdam. The Netherlands.

Bijlage I

ELEKTRONISCH SCHAKELSCHEMA HPLC-SYSTEEM



R_1 = weerstand: 8,2 k Ω , $\frac{1}{4}$ W, 5%
 $R_2 = R_3$ weerstand: 120 Ω , $\frac{1}{4}$ W, 5%
 C_1 = condensator: 250 μ F, 50v
 K = Reed Relay: 100 Ω , 5v
 $CR_1 = CR_2 =$ LED

S_1 = Vista start L.C. (dicht) - LC start Vista (open)
 S_2 = monsterwisselaar stopt pomp (ja = dicht)
 S_3 = Advance

In het laboratorium worden de autosampler en de vloeistofchromatograaf permanent in combinatie met elkaar gebruikt, zodat de apparatuur niet voortdurend omgebouwd hoeft te worden.

In figuur 18 is direkt te zien, hoe de mobiele fase door het systeem de kolom ingeleid wordt.

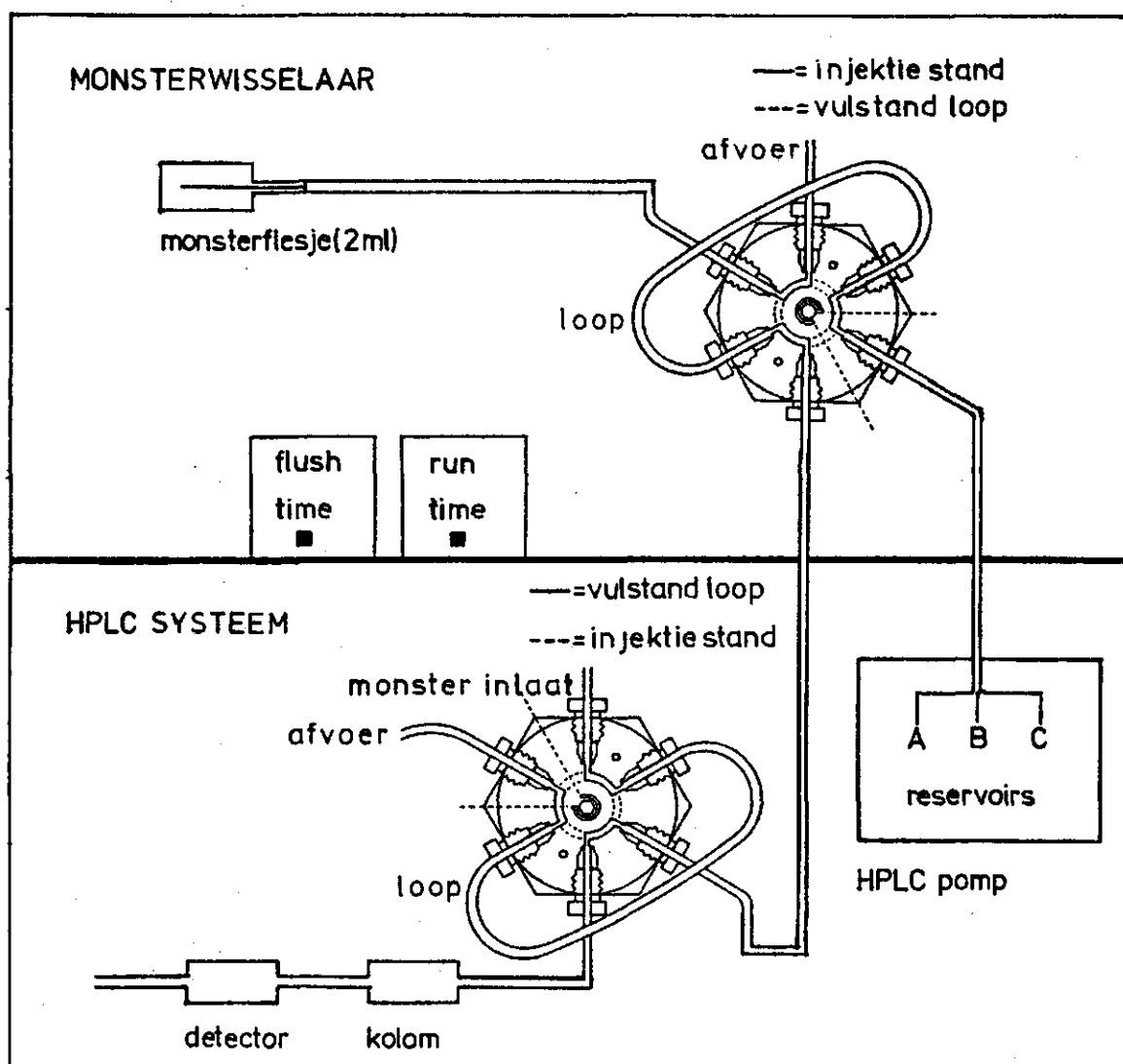


Fig. 18. Combinatie loopinjectiesystemen vloeistofchromatograaf en autosampler

Vervolg bijlage 2

Het voordeel van een loopinjektiesysteem is, dat tijdens de injectie de pomp niet gestopt hoeft te worden. Het omschakelen van de loopinjektor van de autosampler en de vloeistofchromatograaf wordt geregeld in het programma van de vloeistofchromatograaf door middel van events. Een event vertegenwoordigt een elektronisch signaal, waarmee een relais wordt bekrachtigd.

De tijdsduur waarmee de loopinjektor van de autosampler op de vulstand staat wordt bepaald door de flushtime (in seconden). Na de flushtime wordt de autosampler weer gestopt vanuit de vloeistofchromatograaf. Het stopsignaal is noodzakelijk, omdat anders na de aangegeven runtime (in minuten) de autosampler opnieuw injecteert.

DE 1 ml INJEKTIE

Het vullen van de 1 ml loop met monster, kan plaatsvinden met behulp van een injectiespuit die direkt geprikt wordt in het loopin-jektiesysteem van de HPLC (zie A) of met behulp van een monsterwisse-laar, wanneer automatisering gewenst is (zie B).

A: Het vullen van de loop van de HPLC met behulp van een injectie-spuit.

Na de injectie start de HPLC de integrator. Zie programma 1 van de HPLC.

Programma 1 van de HPLC voor de analyse van alkylfenolen. Injectie-volume 1 ml, met behulp van een injectiespuit.

TIME	CODE	VALUE	Betekenis
0,0	FLOW	2	vloeistofsnelheid 2 ml/min
0,0	%	0	vloeistofsamenstelling: 100% water
0,0	RSVR	AB	reservoir A is water; reservoir B is acetonitril
0,0	EVENT	0	geen relais bekrachtigd
0,0	EVENT	4	loop HPLC schakelt om = injectie
2,1	EVENT	1	start integrator
2,2	EVENT	0	geen relais bekrachtigd
2,2	%	0	vloeistofsamenstelling: 100% water, begin gradiënt
30,2	%	62	vloeistofsamenstelling: 62% acetonitril en 38% water, einde gradiënt
32,2	%	100	schoonmaken kolom met 100% acetonitril
37,2	%	100	
42,2	%	0	vloeistofsamenstelling 100% water

Time is gegeven in minuten

In figuur 19 is te zien hoe de HPLC, de monsterwisselaar, de integrator en de UV-detector elektronisch verbonden zijn, wanneer 1 ml monster met een injectiespuit geïnjecteerd wordt (gebruik HPLC loop).

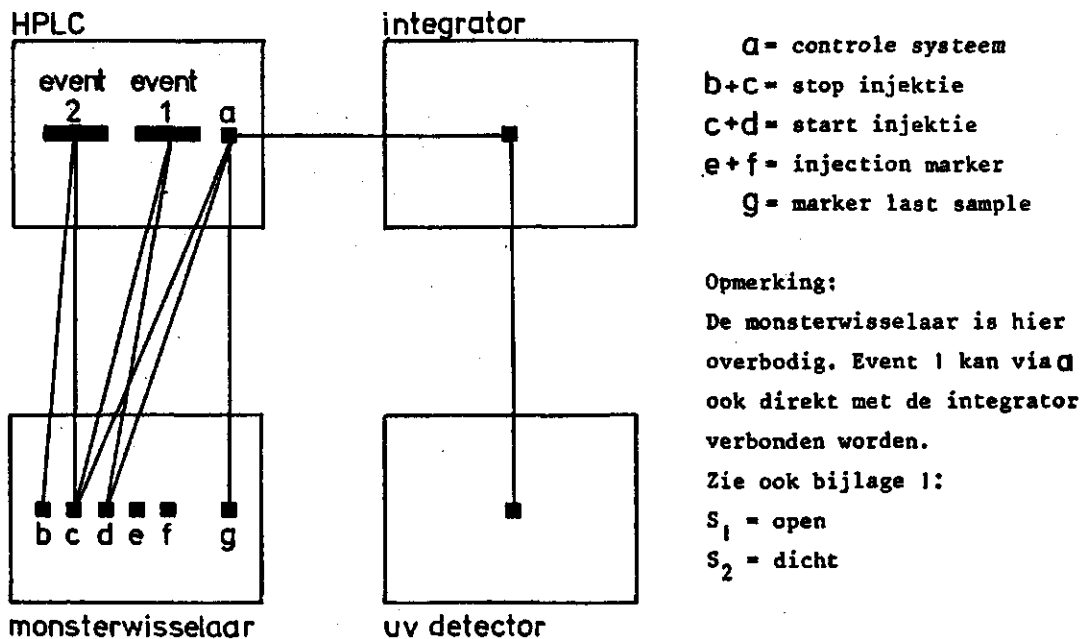


Fig. 19. Elektronisch verbindingsschema HPLC, monsterwisselaar, integrator en UV-detector bij gebruik HPLC loop voor een 1 ml injectie

B: Het automatisch vullen van de monsterwisselaarloop.

De integrator start al dan niet de HPLC, de HPLC start de monsterwisselaar en na de injectie start de monsterwisselaar de integrator. Zie programma 2 van de HPLC.

Programma 2 van de HPLC voor de analyse van alkylfenolen. Injektievolumen 1 ml met behulp van de monsterwisselaar.

TIME	CODE	VALUE	Betekenis
0,0	FLOW	2	vloeistofsnelheid 2 ml/min
0,0	%	0	vloeistofsamenstelling: 100% water
0,0	RSVR	AB	reservoir A is water; reservoir B is acetonitril
0,1	EVENT	1	start monsterwisselaar
0,2	%	0	vloeistofsamenstelling: 100% water
1	EVENT	2	stop. "Run" monsterwisselaar
1,1	EVENT	0	geen relais bekrachtigd
28,2	%	62	vloeistofsamenstelling: 62% acetonitril en 38% water, einde gradiënt
30,2	%	100	} schoonmaken kolom met 100% acetonitril
35,2	%	100	
40,2	%	0	vloeistofsamenstelling: 100% water

TIME is gegeven in minuten

Flushtime monsterwisselaar: 12 seconden.

In figuur 20 is te zien hoe de HPLC de monsterwisselaar, de integrator en de UV-detector elektronisch verbonden zijn bij gebruik van de monsterwisselaar.

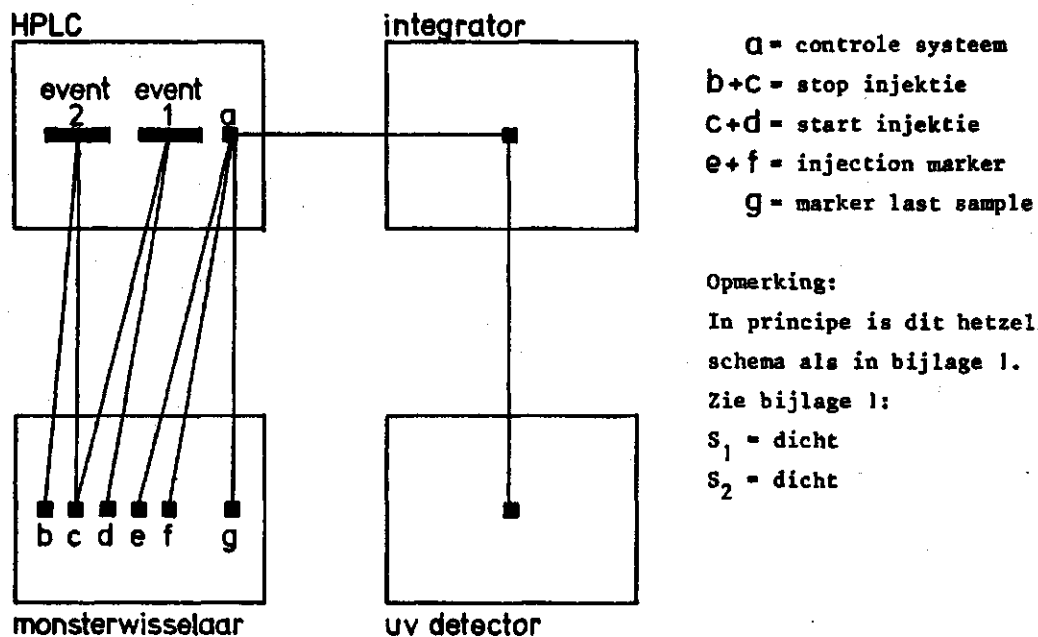


Fig. 20. Elektronisch verbindingsschema HPLC, monsterwisselaar, integrator en UV-detector bij gebruik monsterwisselaar voor een 1 ml injectie.

DE INJEKTIE TOT 100 ml

Het monster wordt aangesloten op reservoir C van de HPLC (zie bijlage 2) en als mobiele fase door de kolom gepompt. De HPLC start de integrator. Zie programma 3 van de HPLC.

Programma 3 van de HPLC voor de analyse van alkylfenolen, bij een injectievolume tot 100 ml via reservoir C. Injectievolume: 10 ml

TIME	CODE	VALUE	Betekenis
0,0	FLOW	2	vloeistofsnelheid: 2 ml/min
0,0	%	0	vloeistofsamenstelling: 100% water
0,0	RSVR	AC	reservoir A is water; reservoir C is monster
0,1	%	100	vloeistofsamenstelling: 100% monster
5	%	100	vloeistofsamenstelling: 100% monster
5,1	%	0	vloeistofsamenstelling: 100% water begin gradiënt
5,1	RSVR	AB	reservoir A is water; reservoir B is acetonitril
5,1	EVENT	1	start integrator
5,2	EVENT	0	geen relais bekrachtigd
33,1	%	62	einde gradiënt
35,1	%	100	} schoonmaken kolom met 100% acetonitril
40,1	%	100	
45,1	%	0	vloeistofsamenstelling: 100% water

Voor het elektronisch verbindingsschema HPLC, monsterwisselaar, integrator en UV-detector zie bijlage 3A.