

HPLC-UV-screening: geharmoniseerde analysemethode voor efficiënte waterkwaliteitsbewaking

Annemieke Kolkman (KWR), Erik Emke (KWR), Gerard Stroomberg (Rijkswaterstaat), Henk Ketelaars (Evides)

Bij een aantal drinkwaterbedrijven en Rijkswaterstaat wordt de (oppervlakte)waterkwaliteit gecontroleerd met een combinatie van vloeistofchromatografie (LC) en UV diode array-detectie (LC-UV-DAD). KWR heeft instrument-onafhankelijke software ontwikkeld voor het vergelijken en opslaan van UV-spectra. Met deze UV2NIST-software is een bibliotheek gemaakt met spectra van geïdentificeerde en (nog) niet geïdentificeerde stoffen met een eenduidige en uniforme benaming. Hiermee beschikken laboratoria nu over een gezamenlijke database, die de meetresultaten van verschillende laboratoria beter onderling vergelijkbaar maakt voor een optimale waterkwaliteitsbewaking.

Door gebruik van verschillende instrumenten worden laboratoria geconfronteerd met verschillen in software en afwijkingen in de golflengteschaal. De resultaten van de metingen, de UV-spectra, zijn slecht met elkaar te vergelijken, binnen de laboratoria maar vooral tussen de laboratoria onderling. KWR heeft instrumentonafhankelijke software ontwikkeld voor het vergelijken en opslaan van UV-spectra die dit probleem oplost. Met deze nieuwe UV2NIST-software worden UV-spectra genormaliseerd en geconverteerd, en opgeslagen in het standaard NIST-formaat. Hiermee is een UV-spectrabibliotheek gemaakt die onafhankelijk is van de gebruikte apparatuur zodat de spectra met elkaar te vergelijken zijn. Door de samenwerking met waterlaboratoria die deelnemen aan het HPLC-UV-screeningsproject wordt de bibliotheek gevuld met UV-spectra van geïdentificeerde en (nog) niet geïdentificeerde organische verontreinigingen die in de Rijn en de Maas voorkomen. Deze laboratoria beschikken nu over een gezamenlijke merkonafhankelijke bibliotheek van bekende en onbekende stoffen met een eenduidige en uniforme benaming.

Waterkwaliteitsbewaking

De drinkwatersector gebruikt diverse technieken om de kwaliteit van zowel de bron als het gezuiverde water te bewaken. Een eenvoudig toepasbare en relatief goedkope manier om de

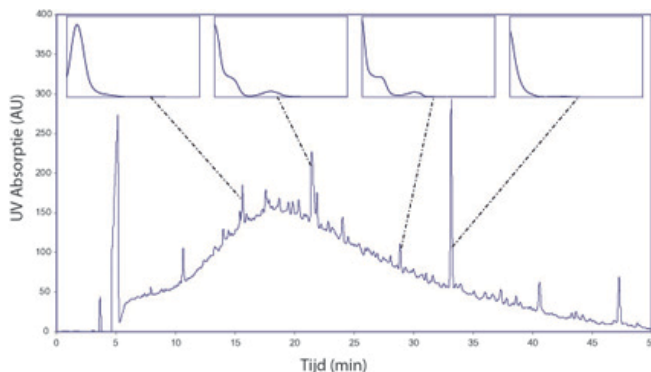
waterkwaliteit te monitoren op organische microverontreinigingen is vloeistofchromatografie gekoppeld aan UV-detectie (HPLC-UV-screening, afbeelding 1). Dit is momenteel de enige eenvoudig toepasbare techniek om een groot scala bekende en onbekende organische stoffen tegelijk te bepalen.



Afbeelding 1. HPLC-UV-screening opstelling in het laboratorium

HPLC-UV-screening geeft in de vorm van pieken in een chromatogram de aanwezigheid van organische microverontreinigingen weer (afbeelding 2). Stoffen die UV-absorptie vertonen

(bijvoorbeeld stoffen met aromatische groepen, dubbele bindingen, nitroverbindingen) en die matig polair zijn ($\log K_{ow}$ -waarden tussen 0 en 4) kunnen met deze techniek worden opgepikt. Deze screening geeft een breed beeld van de waterkwaliteit op basis van het aantal en de grootte van de pieken.



Afbeelding 2. Voorbeeld van een HPLC-UV-screeningschromatogram, met de UV-absorptiespectra van enkele componenten
Van elke piek (verbinding) uit de HPLC wordt een UV-absorptiespectrum opgenomen, wat, samen met de retentietijd, kenmerkend is voor die verbinding. De grootte van de piek is een maat voor de hoeveelheid.

Om de uitwisselbaarheid van HPLC-UV-gegevens te verbeteren werken de laboratoria van Rijkswaterstaat (de meetstations van RWS in Bimmen-Lobith en Eijsden, afbeelding 3), WML, Evides (Aqualab Zuid, afbeelding 4) en KWR in een gezamenlijk project sinds 1999 aan het harmoniseren van de gebruikte analysemethoden en aan het uniformeren van de data-output.



Afbeelding 3. RWS-meetponton te Eijsden (meetstation)



Afbeelding 4. Evides-RWS-monitoringstation te Keizersveer voor de waterkwaliteitsbewaking van het ingenomen Maaswater (wateronttrekking)

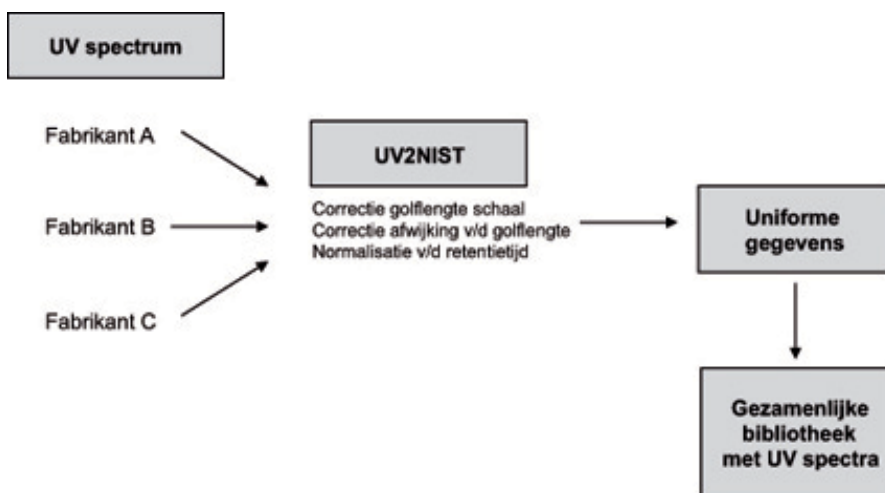
Methodeharmonisatie

De geharmoniseerde methode is gebaseerd op een online-concentratiestap van het watermonster gevolgd door HPLC-scheiding met UV-detectie van organische micro-verbindingen. De doorlooptijd van de analyse is minder dan een uur en is volledig geautomatiseerd. De nieuwe analysemethode is geïmplementeerd bij de deelnemende laboratoria en de meetstations van Rijkswaterstaat in de Rijn en de Maas.

Om de retentietijden van stoffen, zoals die in de verschillende laboratoria zijn bepaald, goed met elkaar te kunnen vergelijken, worden de retentietijden van de pieken gecorrigeerd. Twee interne standaarden waaraan vaste retentietijden zijn toegekend, dienen als referentie.

Uniforme UV-spectra

Met de bij KWR ontwikkelde UV2NIST-software (zie afbeelding 5) kan een UV-spectrum worden geïmporteerd vanuit het bestand met meetresultaten. Momenteel is dit mogelijk voor gegevens van drie fabrikanten van UV-apparatuur. UV2NIST bewerkt het UV-spectrum door (i) de golflengteschaal te uniformeren, (ii) te corrigeren voor de golflengte afwijking van een specifieke DAD en (iii) de gecorrigeerde retentietijd van een stof te berekenen. UV-spectra van dezelfde stof, maar gemeten met apparatuur van verschillende fabrikanten zijn op deze manier met elkaar te vergelijken. Een UV-spectrum van een onbekende verbinding krijgt een unieke identificatiecode. Zodra de identiteit van de onbekende verbinding bepaald is, wordt deze code vervangen door de stofnaam. Tevens kunnen andere parameters, zoals de gebruikte apparatuur, analysecondities, retentietijd en herkomst van de stof, worden vastgelegd met de software.



Afbeelding 5. Schema van de weg die de UV-spectra vanaf de verschillende apparaten gaan om in de gezamenlijke bibliotheek terecht te komen UV-spectra afkomstig van apparatuur van verschillende fabrikanten wordt door de UV2NIST-software omgezet in een uniform formaat. Vervolgens worden deze uniforme UV-spectra opgeslagen in een gezamenlijke bibliotheek.

Gezamenlijke HPLC-UV-bibliotheek

De gegenereerde uniforme UV-spectra worden vervolgens geïmporteerd in een gezamenlijke HPLC-UV-bibliotheek. Na het importeren kunnen eventuele ontbrekende gegevens, zoals de structuurformule, de brutoformule of het CAS-nummer van een stof, toegevoegd worden als de identiteit van een stof bekend is.

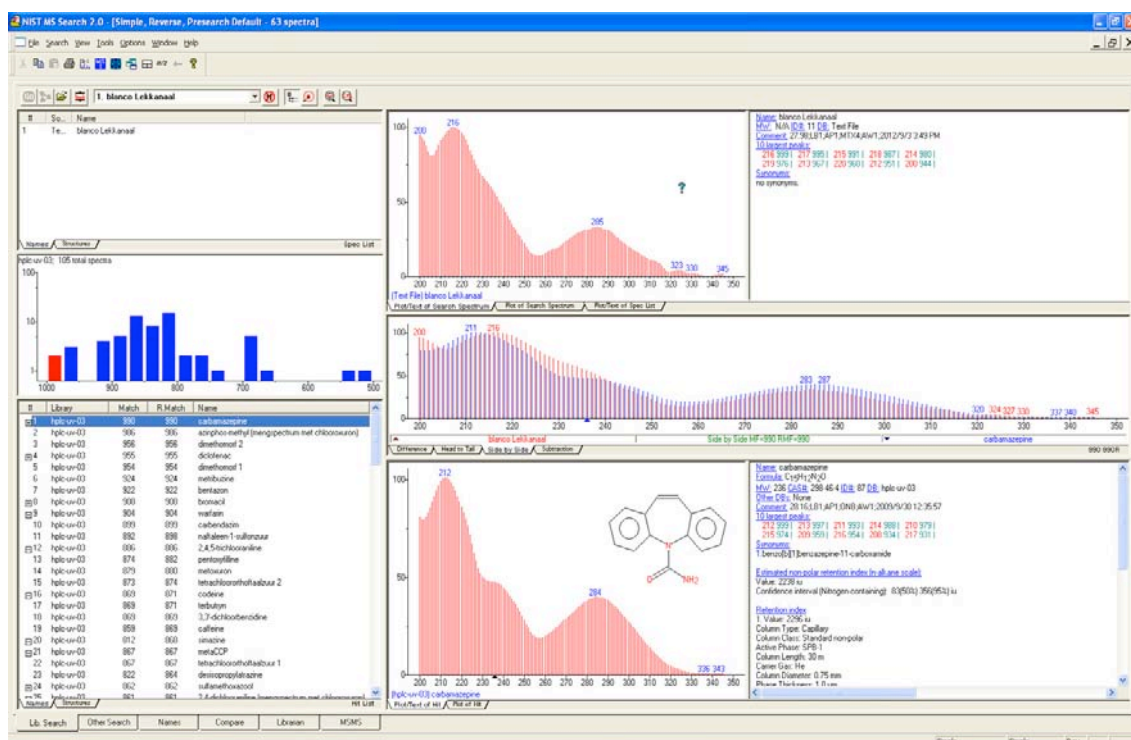
Voor het opslaan van de uniforme spectra is een bestandsformaat nodig dat zich eenvoudig laat uitlezen. Er is gekozen is voor het formaat waarmee normaliter massaspectra worden opgeslagen met het programma NIST-MS-search (NIST is National Institute of Standards and Technology). Een voordeel van dit formaat is dat er geen software voor hoeft te worden aangeschaft, aangezien een demoversie vrij verkrijgbaar is en een onbeperkte gebruiksduur heeft.

In de gezamenlijke HPLC-UV-bibliotheek staan UV-spectra van zowel bekende als onbekende verbindingen. Inmiddels bevat de bibliotheek de referentiespectra van ruim honderd stoffen, waaronder bestrijdingsmiddelen, metabolieten van bestrijdingsmiddelen, geneesmiddelen, 'drugs of abuse', en stoffen van industriële herkomst. Een standaardoplossing van deze stoffen is gemeten met de geharmoniseerde HPLC-UV-methode, en het UV-spectrum en de

genormaliseerde retentietijd zijn opgenomen in de bibliotheek. De bibliotheek kan continu worden uitgebreid met nieuwe UV-spectra.

De UV2NIST-software en de bibliotheek zijn in eigen beheer gemaakt. Dat maakt het doorvoeren van uitbreidingen en aanpassingen eenvoudig. Om te voorkomen dat de verschillende gebruikers van de gezamenlijke HPLC-UV-bibliotheek het bestand vervuilen met niet gecontroleerde of foutieve gegevens is het bestand beveiligd en wordt het centraal beheerd. Op deze manier is de betrouwbaarheid van de bibliotheek gegarandeerd. De deelnemers in het project leveren de UV-spectra. De onbekende spectra krijgen van de beheerder een code die wordt vervangen door een stofnaam zodra de identiteit achterhaald is.

Het is mogelijk om een UV-spectrum van een onbekende stof te zoeken in de HPLC-UV-bibliotheek om zo achter de identiteit van de verbinding te komen. In afbeelding 6 is een spectrum te zien van een kleine piek in een HPLC-UV-chromatogram van oppervlaktewater. Dit onbekende spectrum wordt vergeleken met de spectra die aanwezig zijn in de bibliotheek. Het referentie-UV-spectrum van carbamazepine komt het beste overeen met het gezochte UV-spectrum. Het spectrum van de zuivere stof carbamazepine en de structuurformule staan rechtsonder afgebeeld. Daarnaast worden de gecorrigeerde retentietijden van de standaard en de onbekende verbinding vergeleken. Overeenkomstige relatieve retentietijden en overeenkomstige UV-spectra zijn de belangrijkste parameters voor de identificatie van stoffen met de HPLC-UV-meting.



Afbeelding 6. De resultaatpagina van de zoekactie in de gezamenlijke bibliotheek met UV-spectra naar een stof aangetroffen in een oppervlaktewatermonster. Deze stof wordt geïdentificeerd als carbamazepine.

Toepassingen van HPLC-UV-screening en de gezamenlijke bibliotheek

Met de HPLC-UV-screening wordt een breed beeld van de waterkwaliteit verkregen ten aanzien van organische microverontreinigingen. De screening kan worden ingezet om de effectiviteit

van zuiveringsprocessen te volgen zonder de identiteit van alle pieken te kennen. Hetzelfde geldt voor de vergelijking van verschillende oppervlaktewateren en het volgen van de kwaliteit in de tijd. Tevens kunnen nieuwe bedreigingen opgespoord worden. Ook wordt deze techniek ingezet voor de bewaking van de kwaliteit van het Rijn- en Maaswater aan de Nederlandse grens en van het ingenomen Maaswater voor drinkwaterproductie.

Het is van belang dat onbekende verbindingen worden geïdentificeerd. De geïdentificeerde stoffen kunnen dan worden opgenomen in een lijst van specifieke stoffen waarop kan worden gemonitord. De HPLC-UV-methode is zodanig opgezet dat koppeling met een meer geavanceerde techniek om stoffen te identificeren, zoals massaspectrometrie, mogelijk is.

Conclusie

Om de uitwisselbaarheid van HPLC-UV-screeningsdata mogelijk te maken is er een geharmoniseerde methode ontwikkeld en geïmplementeerd in verschillende laboratoria. Tevens is er software ontwikkeld die het mogelijk maakt om UV-spectra uniform op te slaan en onderling uit te wisselen. De HPLC-UV-screening is een goede methode om op een eenvoudige en efficiënte wijze de waterkwaliteit op organische microverontreinigingen te bewaken.