

CHROM. 10,769

FLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHE PARAMETER HERBIZIDER WIRKSTOFFGRUPPEN

II*. CHLORPHENOXYALKANSÄUREN

J. PRIBYL und F. HERZEL

Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes, Postfach, D-1000 Berlin 33 (B.R.D.)

(Eingegangen am 24. November 1977)

SUMMARY

Liquid chromatographic parameters of groups of herbicidal active substances. II. Chlorophenoxyalkanoic acids

The liquid chromatographic properties of the most important active ingredients of the chlorophenoxyalkanoic acid herbicides were analysed on unmodified silica gel and on some reversed phases. An effective retention of the substances as well as good separation on the reversed phase "RP-2" could be obtained by adding 60 mmoles of tetramethylammonium halogenide per litre of mobile phase. The UV spectra of seven active ingredients and three chlorophenols were recorded. In many cases they show an absorption minimum near the most-applied UV wavelength of 254 nm.

EINLEITUNG

Die Rückstandsanalytik der Chlorphenoxyalkansäureherbizide wird heute meist gaschromatographisch (GC) durchgeführt. Da die Verbindungen als Carbonsäuren niedrige Dampfdrucke besitzen, müssen sie vor der Aufgabe auf die GC-Säule derivatisiert werden. Derartige GC-Verfahren zeichnen sich auf diese Weise zwar durch hohe Nachweisempfindlichkeiten aus, jedoch sind Umsetzungsvorgänge im Nano- oder Picomolbereich nicht immer ohne Probleme zu bewältigen und zudem bieten sie infolge der Verlängerung und Komplizierung des Analysenganges die zusätzliche Gefahr einer Fehler- und Fremdstoffeinschleppung. Wir haben deshalb die Möglichkeit untersucht, diese Säuren direkt zu bestimmen, und zwar auf dem Wege der Hochdruck-Flüssigchromatographie mit Detektion durch UV-Absorption.

Neben den Chlorphenoxyalkansäuren selbst wurden auch einige Chlorphenole untersucht, da diese einerseits als Rohstoffe oder Zwischenprodukte bei der Herstellung von Phenoxysäuren dienen, andererseits als Metaboliten beim Abbau der Phenoxysäureherbizide in der Natur auftreten.

* Erster Teil: *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 487-494.

TABELLE I
 UNTERSUCHETE CHLORPHENOXYALKANCARBONSÄUREN UND CHLORPHENOLE

Chemische Verbindung (Wirkstoff-Namen)	Strukturformel	F.P. (°C)*	Wasserlöslichkeit (ppm)	Extinktionskoeffizient (cm ² /mg)			
				Max. 1	254 nm	Max. 2	Max. 3
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)		141 (25°)	620*	10 (283 nm)	3	44 (228 nm)	91 (204 nm)
4-Chlor-2-methylphenoxyessigsäure (MCPA)		119 (20°)	825*	10 (278 nm)	3	55 (227 nm)	88 (202 nm)
2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (2,4-DP, Dichlorprop)		118 (20°)	350*	11 (284 nm)	3	52 (229 nm)	94 (206 nm)
2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T)		158	278*	12 (288 nm)	4	kein Maximum	101 (209 nm)
2-(4-Chlor-2-methylphenoxy)-propionsäure (MCP, Mecoprop)		94-95 (20°)	620*	10 (278 nm)	3	51 (228 nm)	88 (202 nm)
2-(2,4,5-Trichlorphenoxy)-propionsäure (2,4,5-TP, Fenoprop)		179-181 (25°)	140*	10 (290 nm)	2	kein Maximum	150 (210 nm)
4-(4-Chlor-2-methylphenoxy)-buttersäure (MCPB)		99-100	44*	10 (278 nm)	3	50 (227 nm)	87 (202 nm)
2,4-Dichlorphenol		45	8320 (25°)	10 (286 nm)	0	kein Maximum	53 (205 nm)
4-Chlor-2-methylphenol		49	7390 (25°)	12 (282 nm)	0	47 (226 nm)	53 (202 nm)
2,4,5-Trichlorphenol		66-67 (25°)	485	10 (290 nm)	3	kein Maximum	64 (212 nm)

* Lit. 7.

Die Literatur über die flüssigchromatographische Bestimmung der Phenoxy-säuren ist —im Gegensatz zu den GC-Methoden— nicht sehr umfangreich. Es handelt sich vielfach um Firmenschriften.

Auf Kieselgel werden mit Hexan-Essigsäure-Gemischen auf zum Teil sehr langen Säulen zufriedenstellende Trennungen von Kombinationen der hier behandelten Phenoxy-säuren erzielt^{1,2}. Von merklichem Einfluss ist dabei die Grösse der Oberfläche des Trägers. Eine Bestimmung neben verschiedenen Organochlorinsektiziden zeigte hingegen trotz komplizierter Gradienten-Elution nur mässigen Erfolg³.

Von den sogenannten Umkehrphasen (Reversed-Phasen, RP) wurden Sorbentien beschrieben, die mittels Polyamidgruppierungen⁴ oder Alkylgruppen verschiedener Kettenlänge^{5,6} substituiert waren. Hier wurde mit Methanol-Wasser- oder Methanol-Wasser-Essigsäure-Gemischen eluiert. Auch dabei war die Trennung trotz hoher Säulenlänge nicht immer zufriedenstellend. Die eingespritzten Substanzmengen lagen, soweit Angaben darüber gemacht werden, recht hoch: 5, 25 und 50 μg pro Verbindung. Ausserdem wurde mitunter für die Messung UV-Strahlung gewählt, deren Wellenlänge —wie wir anhand der aufgenommenen UV-Spektren feststellten— keine volle Ausschöpfung der Nachweis-Empfindlichkeit zulies.

PARAMETER

Die wichtigsten physikalischen Eigenschaften der von uns untersuchten Verbindungen sind in Tabelle I aufgeführt. Hier sind neben der chemischen Bezeichnung der Verbindungen jeweils ihre im Pflanzenschutz gebräuchlichen Wirkstoff-Bezeichnungen angeführt. Betrachtet man die chemische Zusammensetzung, so ist die offene obligate Substitution der 2- und 4-Stellung im Benzolkern durch Chlor bzw. Methylgruppen bemerkenswert. Die Wasserlöslichkeit bezieht sich stets auf die freie Säure und nicht auf deren Salze, die in der Praxis meist eingesetzt werden und vielfach eine unvergleichlich höhere Löslichkeit im Wasser zeigen. Die bei den Extinktionskoeffizienten in Klammern angegebenen Werte stellen die Wellenlänge dar, bei denen gemessen wurde. Wie aus den Spektren (Fig. 4) ersichtlich, sind meist drei Maxima vorhanden.

Die Möglichkeiten der Flüssigchromatographie sind infolge der Variabilität der mobilen Phase vielfältiger als die der Gaschromatographie, zumal auch hinsichtlich der Anzahl stationärer Phasen eine zunehmende Auswahl zur Verfügung steht. Wir haben jedoch die Erfahrung gemacht, dass sich für das vorliegende Problem mit Kieselgelsorbentien und einfachen Reversed-Phasen brauchbare Resultate erzielen lassen. Die Beschickung der Säulen geschah zum Teil durch Einrütteln des trockenen Materials mit Hilfe eines Vibrators und der Wasserstrahlpumpe, zum grösseren Teil jedoch nach verschiedenen Slurry-Techniken. Eine Weiterentwicklung dieser Techniken mit dem Ziele der Optimierung der Säulenleistung wurde in diesem Zusammenhang nicht angestrebt.

Es wurden prinzipiell von jedem Säulentyp zwei Exemplare hergestellt, und für die Ermittlung der chromatographischen Daten dann die leistungsfähigste und damit für die Charakterisierung ihrer Füllung typischste Säule ausgewählt. Diese Säulen wurden auf Trennleistung sowie auf allgemeine und selektive Retentionswirkung gegenüber Phenoxy-säuren und Chlorphenolen getestet.

Stationäre Phasen

Kieselgel. Kieselgel als das am häufigsten verwendete Adsorbens hält durch Wasserstoffbrückenbildung die relativ polaren Moleküle der Phenoxysäuren stärker zurück. Um sie zu eluieren, müssen sehr polare, meist wasserhaltige Elutionsmittel verwendet werden. Die Phenoxysäuren werden dann nach zunehmender Polarität eluiert.

Für den Dauerbetrieb ist das wässrig-alkoholische Elutionsmittel sicherlich nicht problemlos (Reproduzierbarkeit des Wassergehaltes der Mischung, Haltbarkeit der Säule auf Grund der Löslichkeit des Kieselgels). Das trifft jedoch für das verschiedentlich empfohlene und hinsichtlich seiner Polarität ausserordentlich gegensätzliche und zudem aggressive Gemisch Hexan-Essigsäure mindestens ebenso zu.

Umkehrphasen. Umkehrphasen mit fest verankerten Kohlenstoffketten (Bürsten) halten Stoffe geringerer Polarität stärker zurück. Die hier untersuchten Verbindungen werden teilweise auf Grund ihrer hohen Polarität kaum festgehalten. So wandern 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-T und MCPP bereits mit Wasser oder wässrigen Kochsalzlösungen ohne Alkoholzusatz durch die RP-Säule. Andererseits werden die etwas weniger polaren Vertreter wie MCPB, 2,4,5-TP, 2,4,5-Trichlorphenol, 4-Chlorphenol und 2,4-Dichlorphenol so stark an die RP-Packung sorbiert, dass Wasser nicht ausreicht, die Stoffe zu eluieren.

Eine Lösung für dieses Problem fanden wir in der Zugabe bestimmter quartärer Amine zum Elutionsmittel. Durch eine sogenannte Ionenpaarbildung werden hierdurch die chromatographischen Eigenschaften der Phenoxysäuren entscheidend beeinflusst. Auf diese Weise können Unterschiede in den Eigenschaften der besonders stark polaren Phenoxysäuren infolge einer "Maskierung" der vermutlich für das einheitliche chromatographische Verhalten verantwortlichen stark dominierenden Carboxylgruppen besser zur Geltung kommen. Die Auftrennung der einzelnen Phenoxysäuren voneinander konnte nach diesen Verfahren wesentlich verbessert werden. Die Polarität der Phenoxysäuren wurde dabei zum Teil so stark abgeschwächt, dass sie sich nicht mehr allein mit Wasser (plus Tetraalkylammoniumhalogenid) eluieren liessen und die Elutionsstärke durch Alkoholzusatz erhöht werden musste.

Molekularsiebe. Molekularsiebe bewirken bekanntlich auf Grund ihres spezifischen Porendurchmessers eine Aufteilung nach Molekülgrösse. Wird die mögliche Restadsorption des Siebes ausgeschaltet, so kommt die Trennung durch Molekülgrössenunterschiede zustande. Da die Unterschiede zwischen kritischen Molekular-durchmessern relativ gering sind, lassen sich, wie auch unsere Messergebnisse gezeigt haben, die Molekularsiebe für die Trennung der hier untersuchten Pflanzenschutzmittel voneinander nicht gut verwenden. Für eine vorherige Abtrennung ("cleanup") der Phenoxysäuren von verschiedenen höhermolekularen Stoffen, z.B. aus Bodenextrakten, sind die Molekularsiebe sicherlich geeignet, jedoch wurde die Untersuchung dieser Frage nicht vertieft.

Mobile Phasen

Die Auswahl einer geeigneten mobilen Phase hat einen entscheidenden Einfluss auf das Gelingen einer Trennung. In Fig. 1 wird dies verdeutlicht. Die in Tabelle II aufgeführten Lösungsmittel erfüllen die gestellten Ansprüche; sie sind im UV-Bereich meist schon ab 220 nm von ausreichender Transparenz. Die verwendete Konzentration (30–60 mM) des "Komplexierungsstoffes" entspricht einem erheblichen

Überschuss schon an der Eintrittsstelle in das chromatographische System (Einspritzblock).

ERGEBNISSE

Die besten Ergebnisse wurden mit Säulenfüllungen aus Perisorb RP-2 in einer Stahlsäule von 50 cm × 3.5 mm I.D. sowie mit einem Elutionsmittel aus 5 bis 15% wässrigem Methanol bei Zusatz von 30 bis 60 mM Tetraäthylammoniumbromid in Wasser erzielt.

Fig. 1 zeigt die Chromatogramme eines Gemisches von fünf Substanzen. Die Proben wurden in Wasser oder 30%igem wässrigem Methanol gelöst und eingespritzt;

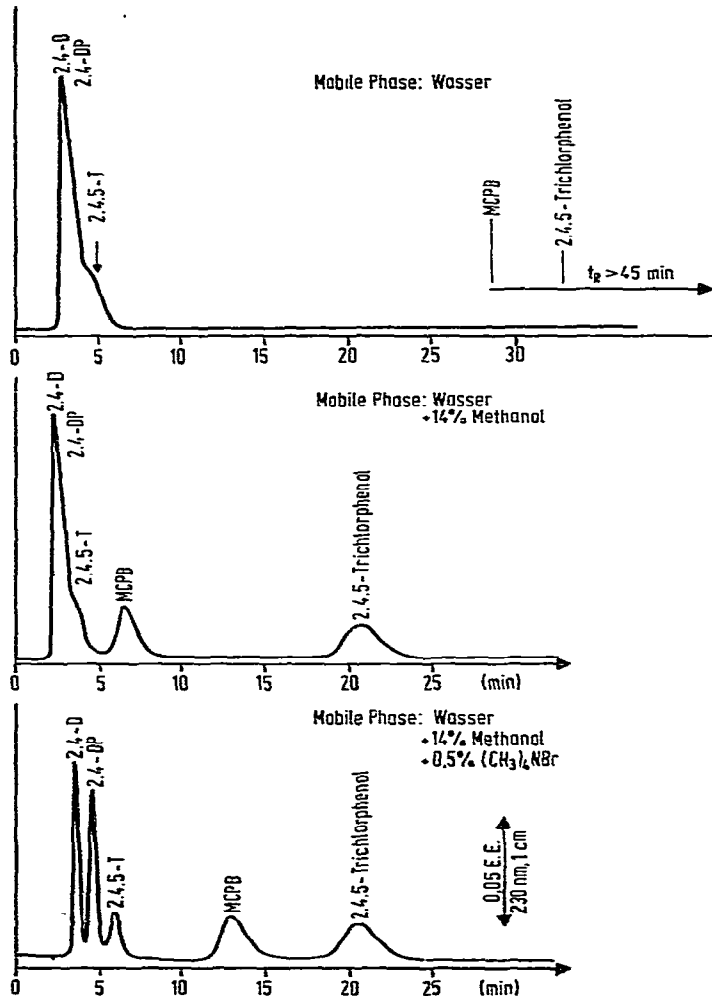


Fig. 1. Einfluss des Gehaltes an Methanol und tertiärem Ammoniumsalz auf die Trenneigenschaften der Säule (500 × 3.5 mm); stationäre Phase: Perisorb RP-2, 30–40 μm; Fließgeschwindigkeit 2 ml/min; isocratisch.

das Einspritzvolumen betrug überwiegend $10 \mu\text{l}$ mit je $1\text{--}2 \mu\text{g}$ Substanz. Mit reinem Wasser als Elutionsmittel (oberes Beispiel in Fig. 1) laufen drei der Substanzen ungetrennt mit der Front; die restlichen beiden verlassen die Säule erst nach *ca.* 45 min. Wird der mobilen Phase 14% Methanol zugesetzt (Mitte), so verlassen die beiden sonst schwer eluierbaren Stoffe die Säule in vertretbaren Zeiten; am Frontpeak verbessert sich jedoch nichts. Der Zusatz von 0.5% Tetramethylammoniumsalz (unteres Beispiel) ändert das Bild grundlegend: Die Reihenfolge der Elution ändert sich nicht, aber die vier Phenoxysäuren werden jetzt gut voneinander getrennt; das Phenol ändert seine Laufzeit nicht, da es naturgemäss von den organischen Kationen weniger beeinflusst wird.

So war es auch gleichgültig, welches Tetramethylammoniumsalz eingesetzt wurde; wir verwandten das Bromid, weil es bei uns von Anfang an in ausreichender Reinheit verfügbar war. Fig. 2 verdeutlicht nochmals die Abhängigkeit der Retention vom Methanol-Gehalt der mobilen Phase bei unveränderter Konzentration an Tetramethylammoniumsalz.

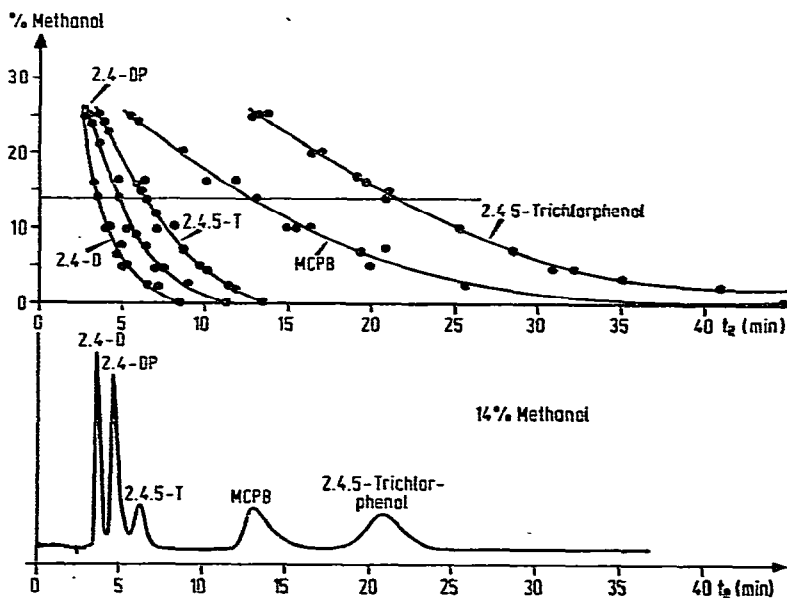


Fig. 2. Abhängigkeit der Retentionszeiten von der Zusammensetzung der mobilen Phase (wässriges Methanol mit 30 mMol Tetramethylammoniumbromid); übrige Bedingungen siehe Fig. 1.

Für das Retentionsverhalten nicht gleichgültig war die Länge des an der Reversed-Phase angelegerten Alkylrestes. Es zeigt sich, dass die RP-2-Phase geeigneter war als das analoge RP-8-Produkt; das letztere wiederum erwies sich als geeigneter als RP-18. In der gleichen Reihenfolge ist auch eine Zunahme der Retention zu verzeichnen (siehe Fig. 3). Die Reduzierung der Säulenlänge von 50 auf 25 cm ergab erwartungsgemäss schlechtere Resultate; das gleiche gilt für die Verwendung geringerer Säulenquerschnitte (2 mm anstatt 3.5 mm). Schliesslich erhielten wir mit Methanol günstigere Ergebnisse als mit Äthanol.

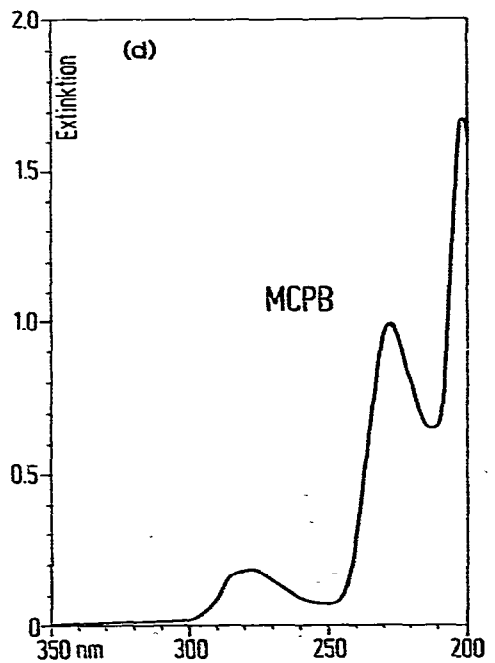
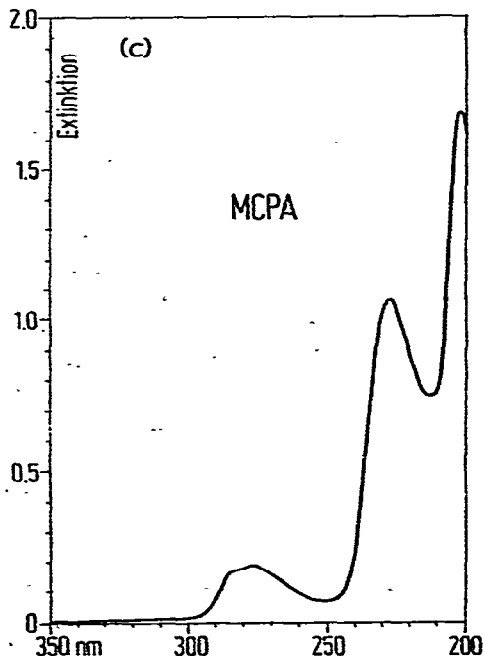
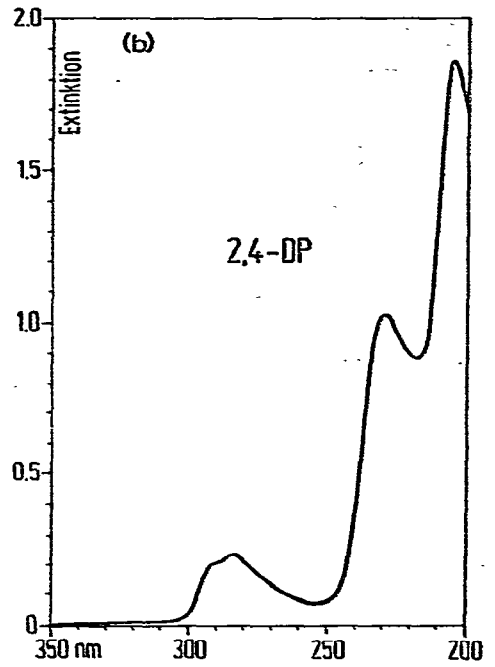
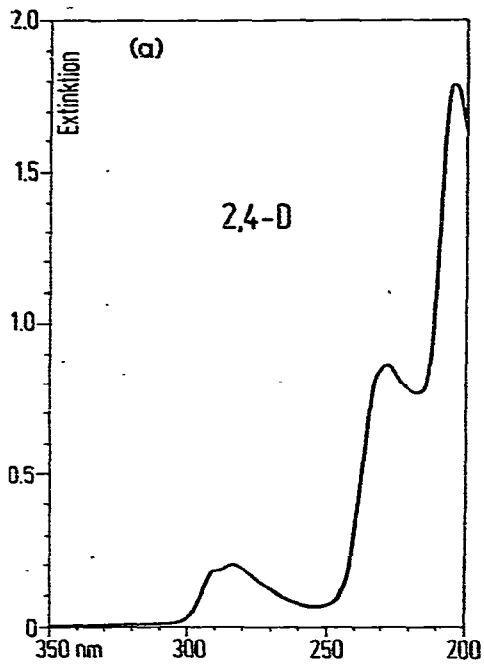


Fig. 4

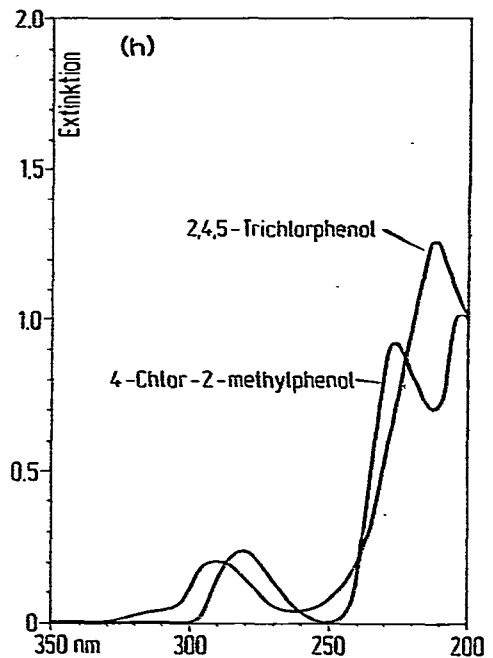
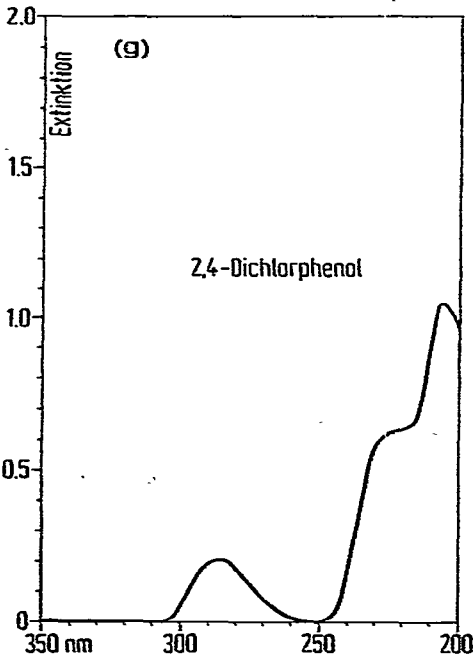
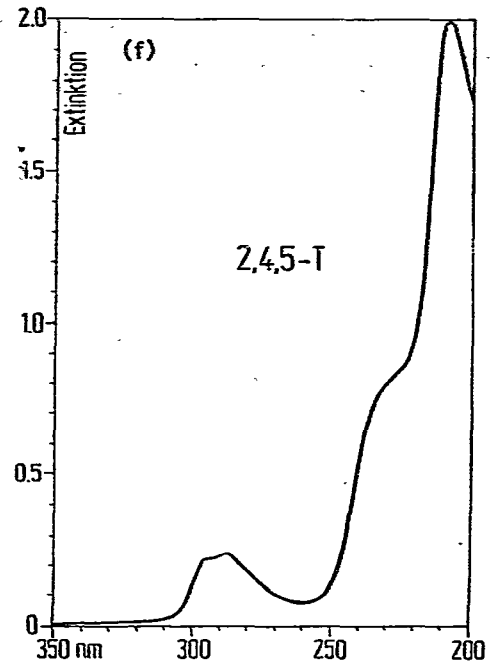
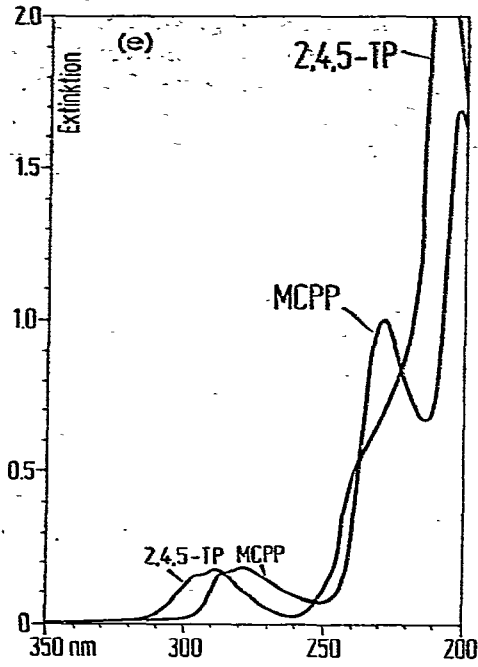


Fig. 4. UV-Spektren der untersuchten Verbindungen; 1-cm-Küvette; Konzentration: 20 µg/ml Wasser.

RP-Säulen sich umkehrt. Verschiebungen innerhalb der Reihenfolge wurden durch Schräglinien gekennzeichnet. So tauschen auf Kieselgelsäulen eine Reihe von Wirkstoffen ihre Plätze, wenn als mobile Phase Hexan-Essigsäure anstatt eines Gemisches von Wasser, Propanol und Methylenchlorid verwendet wird. Bei den RP-Säulen, die allgemein mit wässrigem Alkohol als Elutionsmittel verwendet werden, ändert sich an der (umgekehrten) Reihenfolge nichts, wenn der pH-Wert der wässrig-methanolischen Phase verändert wurde oder verschiedene Salze für eine etwaige Ionenpaarbildung, wie z.B. Natriumchlorid, Natriumphosphat, Ammoniumbromid, Tetraalkylammoniumhalogenide oder Triäthanolammoniumsalz, zugesetzt wurden. Eine Ausnahme machte hier überraschenderweise Dimethylhydraziniumdichlorid, das sogar die drei Phenole zu unterschiedlichem Retentionsverhalten veranlasste.

Die Messungen wurden an einem Varian-Gerät des Typs LC 8500 mit Spektralphotometer 635 durchgeführt. Um die Nachweisempfindlichkeit zu optimieren, wurden die UV-Spektren der untersuchten Verbindungen aufgenommen (siehe Fig. 4). Hierfür wurden die Phenoxysäuren als Natriumsalze im Wasser aufgelöst (20 µg/ml).

Die Eichkurve verlief im untersuchten Bereich von 10–3000 ng linear. Bei Versuchen mit Dosiervolumina zwischen 3 und 60 µl wurden keine unterschiedlichen Ergebnisse beobachtet. Aus der Streuung der Messwerte errechnete sich eine relative Standardabweichung von 6%. Die Nachweisgrenze liegt für 2,4-D bei etwa $4 \cdot 10^{-11}$ Mol (10 ng), naturgemäss etwas abhängig vom Trennsystem.

ZUSAMMENFASSUNG

Die flüssigchromatographischen Eigenschaften der wichtigsten Wirkstoffe der Chlorphenoxyalkancarbonsäure-Herbizide auf unmodifiziertem Kieselgel und auf einigen Umkehr-Phasen wurde untersucht. Eine wirksame Rückhaltung der Wirkstoffe sowie eine gute Trennung auf der Reversed-Phase "RP-2" konnte durch Zusatz von 60 Millimol Tetramethylammoniumhalogenid pro Liter mobiler Phase erzielt werden. Die UV-Spektren von sieben Wirkstoffen und drei Chlorphenolen wurden aufgenommen. Sie zeigen in der Nähe des gebräuchlichsten UV-Bereiches von 254 nm vielfach ein Extinktions-Minimum.

LITERATUR

- 1 *Liquid Chromatography*, E. Merck, Darmstadt, Blatt 73-9 und Blatt 74-13.
- 2 F. Eisenbeiss und H. Sieper, *J. Chromatogr.*, 83 (1973) 439.
- 3 *Liquid Chromatography*, Reeve Angel, Clifton, N.J., Sonderdruck GEM-2, p. 6.
- 4 *Liquid Chromatography*, E. Merck, Darmstadt, Blatt 74-14.
- 5 *Retention Times*, Tracor Instruments, Austin, Texas, Vol. 2, No. 2, September 1975, p. 3.
- 6 *Chromatographic Methods*, 820M9-10/1970, DuPont Instruments, Wilmington, Del., p. 10.
- 7 H. Martin und Ch. R. Worthing, *Pesticide Manual*, British Crop Protection Council, 4. Aufl., November 1974.