



MembraneExtraction versus Flüssig-Flüssig-Extraktion

Abwasseranalytik leicht gemacht

Autoren

Barbara Hauser und Peter Popp,
UFZ Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, Sektion Analytik
Permoserstraße 15, D-04318 Leipzig

Eike Kleine-Benne, GERSTEL GmbH & Co.KG,
Aktienstraße 232 – 234, 45473 Mülheim an der Ruhr

Einführung

Auf Erdöl kann der Mensch verzichten, auf Wasser nicht. Also liegt es auf der Hand, Wasser auf mögliche Kontaminationen hin zu untersuchen; nicht nur Trinkwasser, sondern vor allem auch Ab- und Brackwasser, etwa um die Verursacher von Kontaminationen ausfindig zu machen. Enthält die Probe einen hohen Anteil an Schwebstoffen und Fremdpartikeln, kann sich die Analyse jedoch als kompliziert erweisen. Erleichterung verspricht in diesem Fall die MembraneExtraction: ein neuartiges, vom Umweltforschungszentrum (UFZ) Leipzig-Halle entwickeltes und von GERSTEL in Lizenz zur Serienreife geführtes Verfahren zur Probenvorbereitung.

Zahlreiche Probenvorbereitungsmethoden für die Chromatographie fußen gemäß anerkannter Laborvorschriften auf der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE), obgleich diese Technik mit einigen Nachteilen behaftet ist: Die Automatisierung vieler Schritte gestaltet sich schwer, und es fallen relativ große Volumina teils toxischer organischer Lösungsmittel an. Das Extrakt muss eventuell mehrfach gereinigt und eingeeengt werden, um akzeptable Detektionsgrenzen zu erreichen. Bestehende Alternativen zur LLE sind im Grunde keine, lassen sie doch immer noch zu viele Anwenderwünsche offen. Mit der MembraneExtraction ist nun Änderung in Sicht:

Die membranunterstützte Lösungsmittelextraktion fußt auf einer kleinen LLE mit einer flachen Polyethylen-Membran niedriger Dichte (LDPE), welche die wässrige Probe vom organischen Lösungsmittel trennt. Wie die Flüssig-Phasen-Mikro-Extraktion (LPME) erfolgt die MembraneExtraction offline in einem Vial, aus dem das organische Extrakt in ein Probengebervial übertragen wird; eine LargeVolume-Injektion (LVI) schließt sich an.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Extraktionsvorrichtung für die membranunterstützte LLE modifiziert, so dass sie in ein konventionelles 20-mL-Headspacevial passt. Dazu wurde aus einer flachen, 0,05 mm dicken nicht-porösen Polypropylen-Membran ein Schlauch von 6 mm Außendurchmesser (AD) heiß versiegelt und zu einem Membranbeutel geformt, der wiederum an einem Edelstahltrichter befestigt und in ein 20-mL-Glasvial gesetzt wurde, das mit 15 mL der wässrigen Probe gefüllt war. Bei GERSTEL sind heute fertige Membranbeutel mit einer Wandstärke von minimierten 0,03 mm erhältlich.

Als Probengeber diente ein MultiPurposeSampler MPS 2 von GERSTEL, der in der Lage ist, den Membranbeutel mit 500 µL eines organischen Lösungsmittels zu befüllen, anschließend bei definierter Temperatur zu schütteln und eine LVI des Extrakts direkt auszuführen.

Versuchsdurchführung

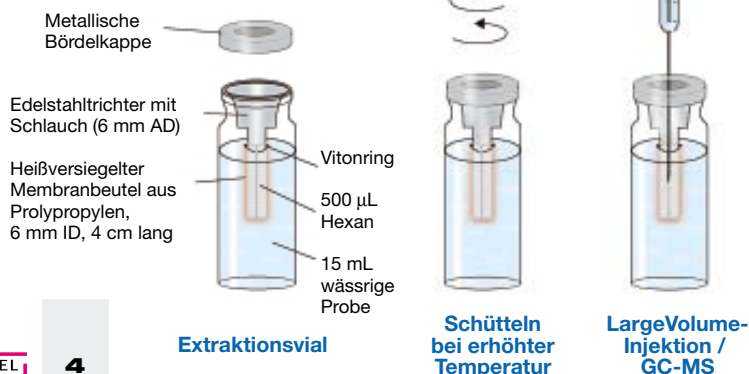
Bereitung der Standards

In Methanol gelöst wurden reine Standardsubstanzen zu 1 µg/µL, gemischte Arbeitsstandards zu 0,05, 0,5, 5 und 50 ng/µL. Als interne Standards dienen methanolische Lösungen von Simetrin (50 ng/µL) und Pentachlorbenzen (20 ng/µL); Simetrin wurde verwendet als interner Standard zur Optimierung der Extraktionsparameter und direkt dem Extraktionsmittel Hexan zugefügt.

Pentachlorbenzen wurde für die Kalibrierung der membranunterstützten LLE verwendet und der wässrigen Probe vor der Extraktion zugefügt. Die direkte Kalibrierung der LVI/GC-MS erfolgte mit gemischten Standards: 1 – 500 pg/µL in Hexan für die 10-µL-Injektion; 0,01 – 100 pg/µL für die 100-µL-Injektion.

Für die membranunterstützte LLE wurden wässrige Standards zubereitet: passende Aliquoten methanolischer Mischstandards verdünnt mit 15 mL Wasser, wobei der Methanolgehalt 0,2 Volumenprozent nicht überstieg. Jeder Wasserprobe wurden 5 g Natriumchlorid hinzugefügt, um die Extraktion der Triazine zu fördern.

Abbildung 1 Schematische Darstellung der MembraneExtraction



Membranunterstützte Lösungsmittelextraktion

Bei der MembraneExtraction wurden zur Konditionierung 8 bis 10 Membranbeutel bei Raumtemperatur dreimal mit 50 mL Hexan extrahiert. Das Vial wurde mit 15 mL einer wässrigen Probe gefüllt, der Membranbeutel mit einem Vitonring an dem Metalltrichter befestigt und der Trichter in der Öffnung des Vials aufgehängt. Anschließend wurde der Membranbeutel mit 500 µL Hexan gefüllt, dem 1 µL des internen Standards Simetrin zugesetzt wurde, und das Vial mit einer metallischen Bördelkappe verschlossen.

Zur Extraktion werden die Vials in den Intervallschüttler des MPS gesetzt und bei definierter Zeit und Temperatur geschüttelt. Anschließend werden sie vom MPS automatisch entnommen und zum Probenteller überführt. Mit einer Mikroliterspritze erfolgt die manuelle Entnahme der organischen Extrakte aus den Membranbeuteln und die Überführung in 2-mL-Probengebervials.

Anmerkung der Redaktion: Zum Zeitpunkt des Versuchs gestattete die Software des MultiPurposeSamplers nur Einzelschritt-Verfahren und keine Sequenzen automatisierter membranunterstützter LLE mehrerer Proben. Das ist heute anders: Alle Schritte verlaufen automatisiert.

LLE von Flusswasser

Um die quantitativen Ergebnisse der membranunterstützten LLE mit einer In-Vial-LLE ohne Membran zu vergleichen, wurden 15 mL Flusswasser in einem 20-mL-Headspacevial mit 1 und 5 µg/L je Analyt und 1,3 µg/L Pentachlorbenzen als internen Standard aufgestockt. Nach Hinzufügen von 1 mL Hexan wurde das Vial mit einer metallischen Bördelkappe verschlossen und 30 Minuten bei 35 °C mit 750 U/min im Intervallschüttler des MPS 2 geschüttelt. Die organische Schicht wurde sodann mit einer Mikroliterspritze aufgezogen und in ein Probengebeervial übertragen. Die LargeVolume-Injektionen für die GC/MS-Analyse erfolgten mit einem Injektionsvolumen von 100 µL. Die direkte Kalibrierung der LVI/GC-MS mit Mischstandards in Hexan und einem Injektionsvolumen von 100 µL (1 µL/s) dienten zur Bestimmung der Konzentrationen des dotierten Flusswassers.

Ergebnisse und Diskussion

Membranunterstützte Lösungsmittelextraktion

Bei der MembraneExtraction werden hydrophobe organische Verbindungen durch eine Membran in ein kleines Volumen des verwendeten organischen Lösungsmittels extrahiert. Zur Anwendung kommen sollten relativ unpolare Lösungsmittel, da sie über eine niedrigere Löslichkeit in Wasser verfügen und Lösungsmittelverluste durch die Membran vermieden werden. Andererseits lassen sich auch sehr polare Lösungsmittel verwenden, die folglich eine gute Löslichkeit in Wasser besitzen. Ihre lipophobe Eigenschaft hindert sie jedoch daran, die Membran zu passieren: Im Vorfeld einer HPLC-Untersuchung wurden polyaromatische Kohlenwasserstoffe erfolgreich mit Acetonitril aus wässrigen Proben extrahiert.

Ebenfalls sollte das Lösungsmittel nicht zu leichtflüchtig sein, da es durch die Membran in den Kopfraum der Probe diffundieren und dort kondensieren könnte. Es sollte aber flüchtig genug sein, um während der LVI wirksam über den Splitausgang entfernt werden zu können.

Anmerkung der Redaktion: GERSTEL hält Membranbeuten mit einer Wandstärke von 0,03 mm bereit, bei denen sich im beschriebenen Fall Cyclohexan als Lösungsmittel bewährt hat.

Optimierung der Extraktionsparameter

Einfluss der Matrixbestandteile

Tabelle 1 zeigt die optimierten Einflussfaktoren auf die membranunterstützte Lösungsmittelextraktion: Salz, Methanolgehalt und pH-Wert. Wurde die Lösung mit Salz (NaCl) gesättigt, resultierte eine höhere Extraktionsausbeute der Triazine; hierbei handelt es sich um relativ polare Analyten. Demgegenüber sank die Wiederfindungsrate der unpolaren Bestandteile α -HCH und Phenantren.

Wurde der Methanolgehalt auf 6,66 Vol% erhöht, hatte das keinen signifikanten Einfluss auf die Extraktion der meisten Bestandteile, mit Ausnahme der S-Triazine, deren Wiederfindungsrate um 10 bis 20 % zurückging.

Die pKs-Werte der Triazine reichen von 1,6 (Simazin) bis 4,3 (Prometon). Der pH-Wert der wässrigen Probe sollte daher etwas oberhalb von 6 liegen; ein darüber hinaus gehender pH-Wert verbessert die Extraktionsausbeute nicht. Die wässrigen Proben wurden bei allen Extraktionen mit 333 g/L NaCl (5 g NaCl auf 15 mL Wasser) gesättigt.

Optimierung der Schüttelgeschwindigkeit

Die Probe muss durchmischt und die Grenzschichten um den Membranbeutel minimiert werden, um den Transport der Analyten durch die Membran in das organische Lösungsmittel zu verbessern. Die Schüttelgeschwindigkeit des MPS 2 wurde zwischen 250 und 750 U/min variiert; bis 500 U/min steigerte sich die Extraktionsausbeute aller Analyten um 30 – 50 %, während sie sich von 500 bis 750 U/min wieder abschwächte. Die Durchmischung war für die Triazine wichtiger als für die unpolaren Bestandteile (α -HCH und Phenantren); bei allen weiteren Versuchen wurde die Schüttelgeschwindigkeit des MPS 2 daher auf 750 U/min eingestellt.

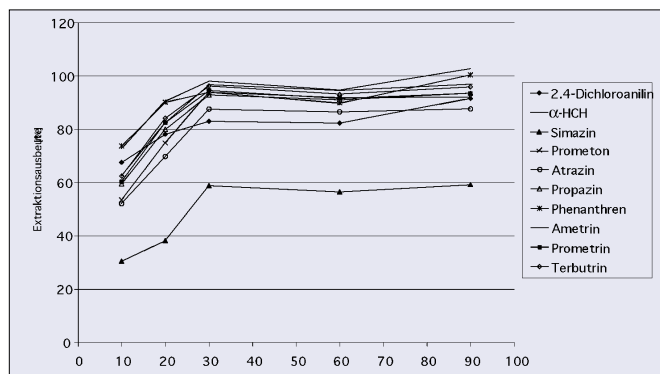


Abbildung 2 Optimierung der Extraktionsdauer (6,7 µg/L jede Komponente, 333 g/L NaCl, 55 °C, 750 U/min, Injektionsvolumen 10 µL)

Verwendete Geräte und Analysebedingungen

- Gaschromatograph 6890 (Agilent Technologies)
- Säule: HP5MS, Länge 30 m, ID 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm
- Trägergas: Helium
- Fluss: 1 mL/min (konstanter Fluss)
- Säulenvordruck: 53 kPa (Anfang)
- Temperaturprofil des Ofens: 50 °C – 2 min – 10 °C/min – 160 °C – 1 min – 3 °C/min – 200 °C – 1 min – 10 °C/min – 250 °C – 2 min

- Massenspektrometer 5973 (Agilent Technologies)
- Acquisition-Modus: Scan 30 – 350 amu
- Temperaturen: Transferleitung 280 °C
MS-Quadrupol 150 °C
MS-Ionenquelle 230 °C

- KaltAufgabeSystem KAS 4 (GERSTEL; LN₂-Kühlung)
- Verwendet wurden ungefüllte, nachträglich manuell deaktivierte Glasliner mit Verwirbelungseinstichen.

- Injektortemperatur: 20 °C (initial)
- Säulenvordruck: 5 kPa reduziert
- Modus: Solventing
- Durchfluss: 100 mL/min am Splitausgang, bis 0,08 min, dann splitlos.

Temperaturprogramm:
20 °C - 0,12 min - 12 °C/s - 250 °C - 1 min - 12 °C/s - 330 °C - 3 min.

- MultiPurposeSampler MPS 2 (GERSTEL)

Komponente	Extraktionsausbeuten [%]			
	in reinem Wasser	plus 333 g/L NaCl	plus 6,6 Vol % MeOH	bei pH 8
2,4-Dichloroanilin	66,1	90,6	58,5	68,2
α-HCH	107,6	96,2	104,5	69,2
Simazin	1,7	30,3	1,5	1,5
Prometon	6,4	74,5	5,0	4,5
Atrazin	5,0	69,4	3,9	4,5
Propazin	16,7	85,1	10,7	14,1
Phenanthren	107,1	92,9	103,4	107,6
Ametrin	21,4	94,5	14,8	19,1
Prometrin	54,8	85,9	38,1	48,9
Terbutrin	76,0	89,3	57,9	71,2

Tabelle 1

Einfluss der Matrixkomponenten auf die Extraktionsausbeute der MembraneExtraction (je Komponente aufgestockt auf 6,7 µg/L, Extraktionsdauer: 1 h bei 35 °C und 750 U/min; Injektionsvolumen 10 µL)

Komponente	10-µL-Injektion (a)			100-µL-Injektion (b)			
	Reproduzierbarkeit 30 min extraction RSD [%] (n=5)	Nachweisgrenze [ng/L]	Linearer dynamischer Bereich [µg/L]	Regressions- koeffizient (R²)	Nachweisgrenze [ng/L]	Linearer dynamischer Bereich [µg/L]	Regressions- koeffizient (R²)
2,4-Dichloroanilin	2,1	10	0,05 - 100	0,9971	5	0,005 -	0,9971
α-HCH	5,2	25	0,05 - 100	0,9987	10	0,01 - 10	0,9990
Simazin	10,4	100	0,1 - 100	0,9999	5	0,005 - 10	0,9942
Prometon	13,3	50	0,1 - 100	0,9965	5	0,005 - 10	0,9987
Atrazin	8,4	50	0,1 - 100	0,9991	1	0,005 - 10	0,9979
Propazin	11,9	50	0,1 - 100	0,9984	5	0,005 - 10	0,9994
Phenanthren	3,7	10	0,05 - 100	0,9990	1	0,1 - 10	0,9998
Ametrin	10,7	50	0,1 - 100	0,9981	5	0,005 - 10	0,9993
Prometrin	14,3	50	0,1 - 100	0,9998	5	0,005 - 10	0,9970
Terbutrin	13,1	50	0,1 - 100	0,9993	5	0,005 - 10	0,9973

Tabelle 2

Validierungsergebnisse der MembraneExtraction (10-µL-Injektion (a): Extraktionsdauer 30 min, 333 g/L NaCl, 750 U/min; 6,7 µg/L jede Komponente. 100-µL-Injektion (b): Extraktionsdauer: 1 h, 333 g/L NaCl, 45 °C, 750 U/min)

Komponente	Flusswasser, aufgestockt bis 1 µg/L		Flusswasser, aufgestockt bis 5 µg/L	
	MembraneExtraction [µg/L]	In-vial-LLE [µg/L]	MembraneExtraction [µg/L]	In-vial-LLE [µg/L]
2,4-Dichloroanilin	0,98	1,6	4,3	6,7
α-HCH	1,18	1,3	6,0	5,68
Simazin	1,28	0,8	5,8	3,49
Prometon	1,30	1,0	6,3	4,51
Atrazin	1,33	1,0	6,1	4,53
Propazin	1,31	1,10	6,2	4,71
Phenanthren	1,07	1,10	6,2	4,76
Ametrin	1,29	1,10	6,3	4,84
Prometrin	1,36	1,10	6,4	4,70
Terbutrine	1,25	1,10	6,2	4,69
Durchschnittliche Abweichung vom aufgestockten Konzentrationswert [%]	23,9	18,2	22,5	12,4

Tabelle 3

Analytische Ergebnisse [µg/L] von aufgestocktem Flusswasser; Vergleich der MembraneExtraction (a) mit der In-Vial-LLE (b) (a: Extraktionsdauer 1h, 333 g/L NaCl, 45 °C, 750 U/min, 1,3 µg/L Pentachlorbenzen als interner Standard in Wasser. b: Extraktionsdauer 30 min, 333 g/L NaCl, 45 °C, 750 U/min, 1,3 µg/L Pentachlorbenzen als interner Standard, 1 mL Hexan als Extraktionslösungsmittel; Injektionsvolumen 100 µL)

Validierung der Methode

Die Leistungsfähigkeit der membranunterstützten Lösungsmittel-Extraktion wurde unter optimierten Extraktionsbedingungen geprüft; Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Validierung. Der lineare dynamische Bereich wurde durch Extraktion aufgestockter wässriger Proben ermittelt und erstreckte sich für 10 µL zwischen 0,05 und 100 µg/L; der Regressionskoeffizient lag bei 0,9965 oder darüber. Nach 30 min Extraktion wurde die Bestimmungsgrenzen von 10 bis 100 ng/L erreicht (siehe Fazit).

Die Bestimmungsgrenzen wurden durch Blindwerte aus den ko-extrahierenden Matrixkomponenten bedingt; sie hatten ihren Ursprung in dem heißversiegelten Membranbeutel aus Polypropylen. Die ko-extrahierten Komponenten wurden auch im Single-Ion-Modus registriert. Abbildung 3 zeigt das Chromatogramm eines Extraktes, das nach einer membranunterstützten Lösungsmittel-Extraktion von Wasser erhalten wurde, welches wiederum mit 50 ng/L aufgestockt war; das soll den hohen Hintergrund hervorheben, der sich vor allem bei der 100-µL-Injektion ergibt und die Genauigkeit der Peakintegration bei niedrigeren Konzentrationen verringert.

Optimierung der Temperatur

Der Intervallschüttler des MPS 2 lässt sich bei definierter Temperatur betreiben. Wurde die Temperatur während des Schüttelns von 35 auf 55 °C erhöht (Hexan siedet bei 69 °C), verbesserte sich die Wiederfindungsrate aller Bestandteile um 10 bis 30 %; bei wasserlöslichen Triazinern besonders ausgeprägt, geringer bei 2,4-Dichloroanilin, α-HCH und Phenanthren. Zur Ermittlung der Validierungswerte bei der nachfolgenden 10-µL-Injektion wurde bei 55 °C extrahiert.

Optimierung der Extraktionszeit

Eine Extraktionsdauer von 30 Minuten führte zu einer optimalen Anreicherung aller Bestandteile (Abbildung 2); eine weitere Verlängerung führte zu keinem besseren Ergebnis. Nach 30 Minuten lag die Wiederfindung bei 60 bis 100 %, ausreichend für die Validierung der Methode

Das gesamte Extraktionsverfahren erwies sich als gut reproduzierbar. Die relative Standardabweichung von fünf aufeinanderfolgenden Extraktionen schwankte zwischen 2,1 und 13,3 %. Um die Detektionsgrenzen weiter zu verbessern, wurde abschließend 100 µL Extrakt injiziert. Das führte zu Detektionsgrenzen von 1 – 10 ng/L und einem linearen dynamischen Bereich von 0,005 – 10 µg/L; der Regressionskoeffizient lag bei 0,9970 oder darüber.

Die Ergebnisse der Validierung zeigten: Die halbautomatische membranunterstützte LLE ist eine zuverlässige Probenvorbereitungstechnik für wässrige Proben. Wird ein Injektionsvolumen von 100 µL gewählt, lässt sich der Schritt der Lösungsmittelzugabe in den Membranbeutel in das automatische Verfahren integrieren. Zu diesem Zweck kann der Probengeber mit einer 1000-µL-Spritze ausgestattet werden; sie lässt sich sowohl für die präzise Addition von 500 µL Hexan als auch, nach dem Schütteln, für die LVI von 100 µL Extrakt verwenden.

MembraneExtraction versus In-Vial-Extraktion

Die Ergebnisse der membranunterstützten Lösungsmittelextraktion wurden mit der In-Vial-Extraktion von aufgestocktem Flusswasser verglichen (Tabelle 3). Die Flusswasserprobe wurde der Weißen Elster in Leipzig entnommen und mit 1 und 5 µg/L methanolischem Mischstandard aufgestockt. Die Mengenberechnung des aufgestockten Flusswassers, das durch die membranunterstützte LLE extrahiert wurde, erfolgte nach Kalibration mit wässrigen Standards (0,001 – 10 µg/L), die unter gleichen Bedingungen extrahiert wurden. Die In-Vial-LLE erfolgte wie oben beschrieben.

Die Wiederfindungsrate der In-Vial-LLE lag bei 100 %. Es erwies sich jedoch als schwierig, das organische Extrakt aufzuziehen, da die organische Schicht sehr dünn war und die Phasengrenze durch Partikel gestört wurde. Für die Automatisierung der In-Vial-LLE müssten mindestens 4 mL Hexan verwendet werden, um eine klare Phasentrennung sicherzustellen und um das Extrakt durch den Probengeber aufziehen zu können – ohne Risiko, Wasser mit aufzuziehen und zu injizieren. Im Vergleich zur membranunterstützten Lösungsmittelextraktion senkt das die Nachweisgrenzen um den Faktor 8.

Die analytische Genauigkeit der In-Vial-Extraktion übertraf die der membranunterstützten Lösungsmittelextraktion (Tabelle 3). Die durchschnittliche Abweichung des analytischen Ergebnisses aus dem aufgestockten Konzentrationswert ergab: 12,4 % bei der In-Vial-LLE

mit 1 µg/L aufgestocktem Flusswasser und 23,9 % bei der MembraneExtraction, die jedoch leichter auszuführen ist: Wurde mit einem Injektionsvolumen von 100 µL gearbeitet, ließ sich der gesamte Ablauf, also Extraktionen und Injektion, vollständig automatisieren.

Zusammenfassung

Der MultiPurposeSampler MPS 2 gestattet die vollständige Automatisierung der membranunterstützten Lösungsmittelextraktion, die sich als vielversprechende Anreicherungstechnik für verschiedene organische Bestandteile erweist, einschließlich polarer Analyten wie Triazinen: Unter optimierten Bedingungen und einer Extraktionsdauer von 30 Minuten wurden Ausbeuten von 60 bis 100 % erzielt. Die Nachweisgrenzen lagen im unteren ng/L-Bereich. Da sich mittels der verwendeten nicht-porösen Polypropylen-Membran Wasser, Salze, Partikel und makromolekulare Bestandteile aus dem organischen Extrakt fernhalten lassen, eignet sich die MembraneExtraction vor allem für komplexe Proben mit hohem organischem Anteil.

Die MembraneExtraction eignet sich also besonders für Anwendungen in der Lebensmittel- und Bioanalytik. Bemerkenswert: Durch Wahl eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels, etwa Acetonitril, lässt sich die Methode auch mit der HPLC koppeln. Polare Lösungsmittel lösen sich nicht im Membranmaterial und können demnach auch nicht in die wässrige Probe übergehen.

In Verbindung mit der GERSTEL-MAStEr-Software, Modus: SamplePreparation, gelingt mit dem MPS 2 die Automatisierung einer Sequenz membranunterstützter Lösungsmittelextraktionen, was in kürzerer Zeit zu einem höheren Probendurchsatz führt.

Fazit

Die GERSTEL-MembraneExtraction, vorgestellt am Beispiel von Triazinen und anderen semi-flüchtigen Kontaminanten, mit direkter Kopplung an eine LargeVolume-Injektion und GC-MS-Detektion erweist sich als zeit- und kostengünstiges Verfahren zur Untersuchung von Brack- und Abwasser mit hohem Schwebstoffanteil. Sie erfüllt die Voraussetzungen der Deutschen Trinkwasserverordnung (0,1 µg/L für einzelne Pestizide) [2] und den Trinkwasserempfehlungen der Weltgesundheitsorganisation WHO (2 µg/L Atrazin und Simazin) [3].

Weitere Informationen: Coupon GA 29 / 01

Literatur

- [1] B. Hauser and P. Popp, J. Sep. Sci., 24 (2001), 551.
- [2] TV0-BRD, appendix 2/1, 01.04.1998.
- [3] WHO: Guidelines for drinking water quality, 2nd edition, volume 1, Geneva 1993.

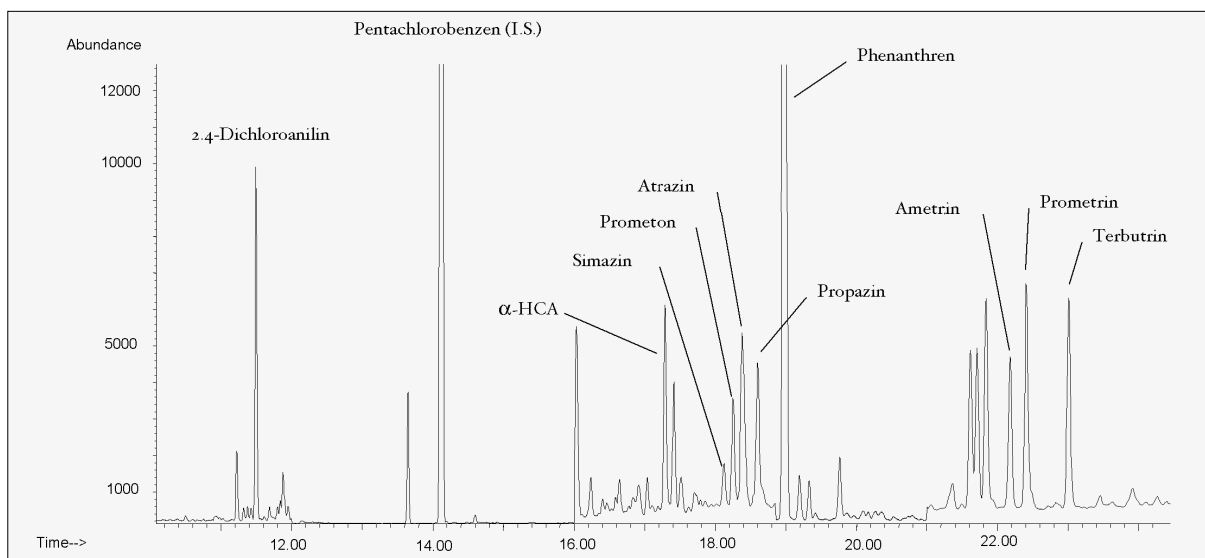


Abbildung 3
LVI/GC-MS-Chromatogramm des Single-Ion-Monitoring nach MembraneExtraction von 15 mL Wasser, aufgestockt auf 0,05 µg/L jeder Komponente (Extraktionsdauer: 1 h, 333 g/L NaCl, 45 °C, 750 U/min, Injektionsvolumen 100 µL)