

GC-analyse af komplekse, vandholdige prøver

Automatiseret prøveforberedelse til ekstensiv karakterisering

Vandige prøver er problematiske for gaskromatografi, fordi de ofte kræver manuel prøveforberedelse med behov for ekstrahering eller brug af reagenser. Fully evaporative dynamic headspace kombineret med pH-ændringer, esterificering og silylering muliggør en ekstensiv automatiseret karakterisering af vandige prøver.

Af René Bjerregaard Madsen og Marianne Glasius, Institut for Kemi, Aarhus Universitet og Rikke Bendixen og Jens Glastrup, MSCi

De senere års udvikling af automatiserede injektionssystemer og prøveforberedelsesstationer til gaskromatografi (GC) har betydet, at et stort antal prøver kan analyseres på kort tid. Samtidig stiger kravene og ønsket om overvågning af processer via kromatografiske analyser. Skift af kolonner for at separere komponenter med forskellige funktionelle grupper er således nødvendigt, hvilket nedsætter produktiviteten. Analyser af vandige prøver er særligt problematiske, da gentagen injektion af vandige prøver nedsætter kolonnelevetiden og øger vedligeholdelsesfrekvensen af massepektrometeret. Væske- eller fastfase-ekstraktion er ofte nødvendig til denne type analyser, men er meget afhængig af solventet eller egenskaber af den faste fase og af faktorer som pH og ionstyrke af prøven.

Derivatiseringsreagenser har i årtier været anvendt for at kunne foretage analyser på standard apolære kolonner samt for at kunne analysere komponenter, der ellers ikke er GC-egnede (pga. deres polaritet og/eller flygtighed).

Disse reagenser kan være mere eller mindre selektive med silyleringsreagenser som de mindst selektive. Silyleringsreagenser reagerer dog med vand, og komplet inddampning af prøven er nødvendig inden tilsætning af reagens. Således vil flygtige stoffer fordampe, og

der er risiko for kondenseringsreaktioner i prøven. Samtidig øger silyleringsreagenser behovet for vedligeholdelse af GC-MS systemet.

Methylering har ligeledes været en meget anvendt derivatiseringsmetode til analyse af carboxylsyrer med enten BF_3 , svovlsyre, eller kaliumhydroxid som katalysator. Dette involverer imidlertid lange reaktionstider og omstændelig ekstrahering i større mængder organisk solvent.

En kombination af selektivitet fra væskeekstraktion, renhed fra fast-fase-ekstraktion, samt øget flygtighed, termisk stabilitet og sensitivitet af analytter fra derivatisering vil således mindske behovet for kolonneskift og vedligeholdelse. I det følgende viser vi, hvordan dette kan opnås ved hjælp af standard GC-MS koblet med "fully evaporative dynamic headspace" (FEDHS). For at demonstrere metodens anvendelighed har vi her analyseret komplekse vandprøver fra hydrotermisk omdannelse (HTL) af biomasse.

Hydrotermisk omdannelse af biomasse

HTL foretages på en vandig opløsning af biomasse, som udsættes for høj temperatur (250-370°C) og tryk (100-250 bar), altså i subkritisk tilstand. Formålet er at

skabe en oliefase, der enten kan bruges som brændstof eller til værdifulde kemikalier, og processen er yderst lovende. Imidlertid dannes der store mængder



Figur 1. Billeder af det anvendte udstyr.
A) GC-MS med tilhørende multipurpose sampler.
B) Dynamic headspace.
C) Termisk desorptionsenhed.

spildevand, som skal udnyttes for at gøre processen rentabel. Spildevandet kan eventuelt recirkuleres som procesvand, omdannes til værdifulde kemikalier eller til kultivering af mikroalger, men der er behov for detaljeret karakterisering af spildevandet for at klarlægge anvendelsesmulighederne.

FEDHS

FEDHS er en dynamisk headspace-metode, som udnytter, at mange organiske forbindelser, også de mere polære, har et damptryk inden for et område, hvor de fordamper, når der blæses nitrogen over dem tilstrækkeligt længe. Overgangen til gasform vil selvfølgelig være hurtigere ved højere temperatur. Nitrogen og organiske gasser kan dernæst ledes gennem en adsorbent, der fanger analytterne ved lavere temperatur. Dette opnås ved et to-nåls-system, som først leder gasflowet over prøven, og herefter gennem et rør pakket med Tenax adsorbent.

Tenax kan adsorbere en lang række organiske forbindelser (f.eks. alle alkaner $> C_6$), hvorimod vand og methanol ikke opsamles. Røret kan herefter overføres til en termisk desorptionsenhed (TDU), hvor analytterne desorberes ved opvarmning og højt flow af bæregas. Analytterne fokuseres igen i et afkølet injektionssystem (CIS) ved 10°C , som efterfølgende "injicerer" analytterne på kolonnen. Det samlede automatiserede system tillader desorption fra flere vials, samt opsamling og desorption på flere adsorbenter, og sluttelig en samlet injektion på GC-systemet.

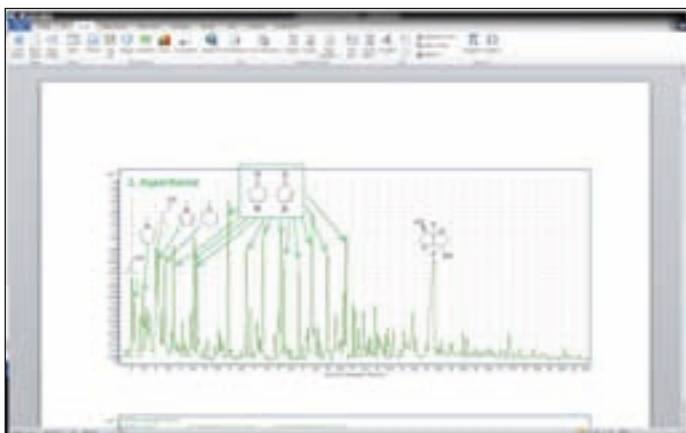
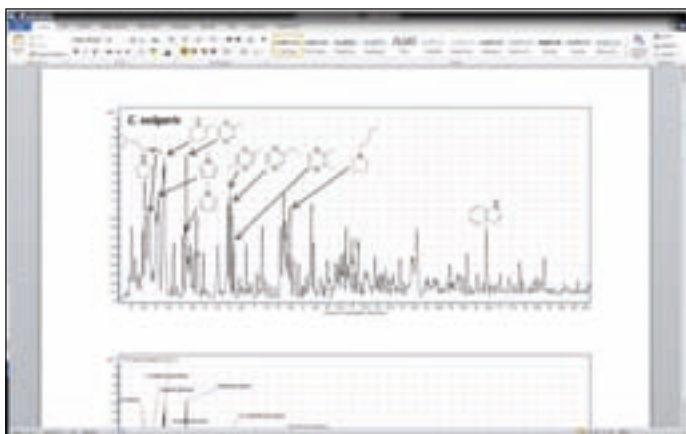
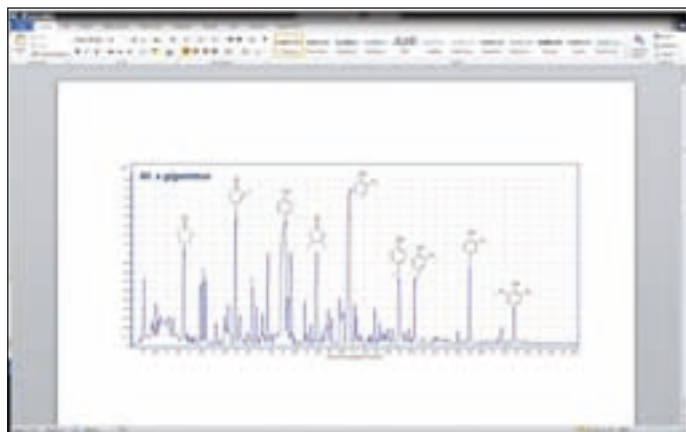
Fremgangsmåde

FEDHS blev her foretaget på HTL-vandprøver fra *Chlorella vulgaris* (mikroalge), *Laminaria hyperborea* (makroalge) og *Miscanthus x giganteus* (eksempel på lignocellulose). Biomasser har ofte et højt mineralindhold og i HTL bruges desuden alkalisalte til at øge omdannel-

sen, hvilket giver pH-værdier i vandprøven fra 5-9 afhængig af biomassen. Vandprøverne blev fortyndet 1:9 med methanol inden $3\ \mu\text{l}$ blev overført til en 20 ml headspace vial. Der blev anvendt et GERSTEL-DHS system til ekstraktion og injektion, figur 1. Vialen blev inkuberet ved 80°C i den dynamiske headspace enhed (DHS) i 1 min., inden vialen blev flushet med 2 L nitrogen, og analytterne blev fanget på Tenax-adsorbenten i TDU-røret ved 30°C .

Røret blev overført til TDU-enheden, hvor temperaturen blev øget til 280°C samtidig med et desorptionsflow på 20 ml/min. Analytterne blev fokuseret på en Tenax-liner i CIS-enheden, som blev afkølet med carbondioxid til 10°C . Efter endt desorption blev analytterne frigivet fra CIS-enheden og injiceret på kolonnen (HP-5 ms, 30 m x $0,25\ \text{mm}$ x $0,25\ \mu\text{m}$). Indstillingerne for DHS, TDU, CIS og GC-MS var de samme i alle forsøg og kun tilsætningen af reagenser blev ændret.





Figur 2. Total ionkromatogrammer fra FEDHS af vandprøve fra HTL af *M. x giganteus* (blå), *C. vulgaris* (sort) og *L. hyperborea* (grøn).

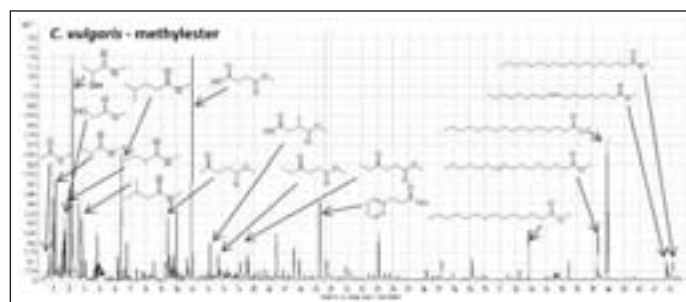
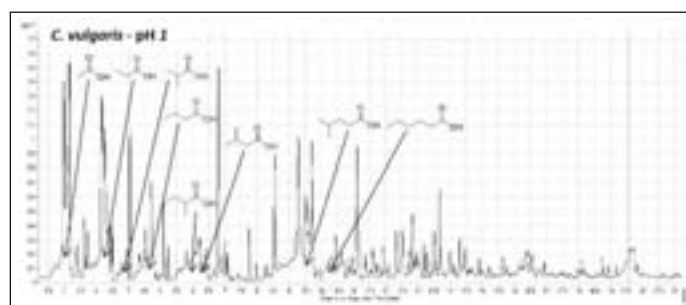
Resultater

Kromatogrammerne viser, at ved svagt sur, neutral eller svagt basisk pH kan en lang række analytter i form af aminer, pyraziner, pyrrolidiner, phenoler og cykliske ketoner detekteres, figur 2. Det er imidlertid velkendt, at vandfasen indeholder en stor mængde af forskellige små carboxylsyrer, enkelte glykoler, glycerol og en række forskellige fedtsyrer og hydroxypyridiner [1]. Ved neutral pH vil disse analytter udfælde med kationerne under inddampning.

Ved at sænke pH til < 4 kan vi holde carboxylsyrerne protonerede, så de ikke fælder ud. Adskillige små carboxylsyrer kan således observeres fra vandfasen af *C. vulgaris* efter inddampning ved pH 1, figur 3. Der er dog flere begrænsninger ved den sure inddampning:

- 1) de nitrogenholdige forbindelser såsom pyrroler og pyraziner protoneres og udfældes i opløsningen, så to forskellige analyser er derfor nødvendige,
- 2) organiske syrer viser kraftig "fronting" og en anden kolonne med mere polar stationær fase bør anvendes,
- 3) glykoler detekteres ikke, fordi de co-eluerer med carboxylsyrerne og ligeledes har tendens til "tailing". Enkelte er så polære (f.eks. glycerol, hydroxy- og oxo-syrer), at de ikke kromatograferer.

For at undgå kolonneskift og gøre fedtsyrerne mere flygtige valgte vi at udføre en methylesterificering. Vandprøven fra *C. vulgaris* blev valgt, fordi den indeholder den største variation af carboxylsyrer. Vi sænkede pH til 1 og tilsatte 50 µl methanol. Prøven blev rystet i 30 min. i en agitator ved 30°C, imens den foregående prøve blev analyseret. Prøven blev overført til DHS og inddampet uden videre prøveforberedelse. En stor mængde methylerede små organiske syrer i form af eddikesyre, propionsyre, glykolsyre, mælkesyre (2-hydroxypropansyre) og smørsyre (butansyre) blev detekteret sammen med methylerede dicarboxylsyrer i form af ravsyre (butandisyre), methylravsyre og glutarsyre (pentandisyre). Adipinsyre (hexandisyre) og azelainsyre (nonandisyre) var til stede i små mængder. Til trods for kogepunkter over 300°C blev der detekteret adskillige methylestre af hovedsageligt myristinsyre (C_{14}), palmitinsyre (C_{16}) og stearinsyre (C_{18}). Dette viser således, at analysen af fedtsyremethylestre (FAMES) kan ske helt uden brug af ekstraheringsolventer.



Figur 3. Total ionkromatogram fra FEDHS af vandprøve fra HTL af *C. vulgaris*. Top - udført ved pH 1. Bund - analyse efter methylesterificering.

Metodeoptimering til analyse af alkoholer

Imidlertid detekterede vi ingen glykoler eller glycerol, selvom det er velkendt, at HTL-processen frigiver glycerol fra triglycerider, som i øvrigt heller ikke blev detekteret [2]. Vandprøven fra *L. hyperborea* indeholder den største mængde alkoholer og er derfor illustreret her. For at detektere alkoholer totalinddampede vi først prøven på TDU-røret, hvilket betyder, at alle forbindelser, der fordamper, overføres til TDU-røret. Herefter tilsatte vi 1 µl *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamid (MSTFA) til den samme vial og inddampede på det samme TDU-rør. Herved vil silyleringsreagensen



Årets fem EliteForsk-prismodtagere

EliteForsk-prisen uddeles hvert år til forskere under 45 år, hvis forskning er i international topklasse. Årets fem prismodtagere bedriver grundforskning, der kan styrke udviklingen af nye teknologiske muligheder, bidrage med nye sundhedsvidenskabelige gennembrud, og som kan løse fremtidens globale udfordringer.



De fem EliteForsk-prismodtagere er:

Professor Robert A. Fenton fra Aarhus Universitet, Institut for Biomedicin

Hans forskning i membranproteineres rolle i celler på de indre overflader i nyre har givet ny viden om, hvordan vand- og saltkanaler i nyren er vigtig for at regulere kroppens vandbalance og dermed blodtrykket, men proteinet har også betydning for diabetes og knogleskørhed.

Professor Søren Fournais fra Aarhus Universitet, Matematisk Institut
Grundforskning i matematikken bag kvantefysikken, især den grundlæggende Schrödingers ligning. Har fundet egenskaber ved løsningen, selvom den ikke kan løses eksakt. F.eks. i hvor vid udstrækning energien øges i et kvantefysisk system med magnetisk påvirkning.

Professor Anja Groth fra Københavns Universitet, Biotech Research and Innovation Centre (BRIC)

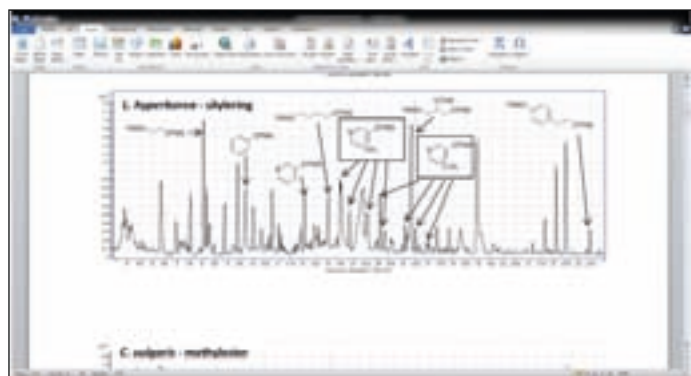
Forsker i cellehukommelse, dvs. hvordan DNA'et og information om cellens funktion overføres, når celler deler sig i to nye celler. Fejl i cellehukommelsen og i kopieringen af DNA'et kan skade organismen og lede til kræft.

Fellow Stig Helveg fra Haldor Topsøe A/S

Verdensførende i at udvikle og bruge elektronmikroskopi til at studere katalysatorers overflader helt ned i atomstørrelse. Den viden bruges til at forbedre mange forskellige katalysatorer, der er afgørende for at mindske energiforbruget.

Professor og VILLUM Investigator N. Asger Mortensen fra Syddansk Universitet, Technical Science Center for Nano Optics

Arbejder med lysstof-vekselvirkninger på grænsefladen mellem kvantefysik og elektrodynamik. Det kan bidrage til f.eks. at udvikle kommunikationssystemer, der ikke kan aflures, hurtigere informationsbehandling og udvikling af sensorer til nytte for eksempelvis medicinframstilling.



Figur 4. Total ionkromatogram fra FEDHS af vandprøve fra HTL af *L. hyperborea* med online/in-situ silylering.

adsorberes til Tenax. Silylering vil således ske enten på TDU-røret (online) eller det vil ske i gasfase, når røret opvarmes i TDU-enheden (in-situ).

Kromatogrammet i figur 4 viser, at vi var i stand til at detektere ethylenglykol, tetramethylenglykol, glycerol og en række forskellige alkylerede 3-hydroxypyridiner. Det er imidlertid kun få 3-hydroxypyridiner, der findes i NIST-biblioteket over massespektre. Derfor er identifikation foretaget ved manuel fortolkning af massespektrene. Behovet for et længere solvent delay ved denne analyse betyder, at de mere flygtige stoffer ikke detekteres og yderligere optimering er nødvendig.

Konklusion

Ved hjælp af simple pH-ændringer og effektive derivatiseringer kan vi målrette vores analyse til specifikke forbindelser i en yderst kompleks matrice.

Den fuldt automatiserede metode gør brug af et minimum af organiske solventer og overflødig manuelt ekstraheringsarbejde og tidskrævende kolonneskift. Den store styrke ved FEDHS er muligheden for at lave sporanalyser især i vandige prøver, hvor der kan anvendes et større volumen eller laves sekventiel prøveopsamling.

Endvidere viser FEDHS, at der kan analyseres overraskende store molekyler ved denne metode (ved 80°C har vi set op til C₂₄), og der er mulighed for at øge inkuberingstemperaturen yderligere til 200°C.

Metoderne anvendt i denne artikel kan overføres til analyse af aromastoffer (pyrroler, pyraziner, indoler), metabolitter (edikesyre, glykolsyre, mælkesyre), forbindelser i atmosfæriske partikler (ravsyre, glutarsyre, adipinsyre, azelainsyre), urenheder (glykoler), solventrester og FAMES i en række forskellige matricer.

E-mail:

Marianne Glasius: glasius@chem.au.dk

Referencer

1. R.B. Madsen, P. Biller, M.M. Jensen, J. Becker, B.B. Iversen, M. Glasius (2016) Predicting the chemical composition of aqueous phase from hydrothermal liquefaction of model compounds and biomasses. *Energy & Fuels*, 30, 10470-10483.
2. R.B. Madsen, R. Bernberg, P. Biller, J. Becker, B.B. Iversen, M. Glasius (2017) Hydrothermal Co-liquefaction of Biomasses - Quantitative Analysis of Bio-crude and Aqueous Phase Composition. *Sustainable Energy & Fuels*, 1, 789-805.