

Sammenligning af ekstraktionsmetoder

Sammenligning af online headspace ekstraktionsmetoder til GC/MS ved analyser i et bredere molekylvægtssområde.

Af Mátyás Ripszám, MSCi ApS

Gaskromatografi koblet til massespektrometri (GC-MS) er en stærk analytisk teknik til analyse af små organiske forbindelser. Ud over en god chromatografisk separation (GC) kan massespektrometeret (MS) identificere/kvantificere komponenter, systemet kan altså bruges til såvel target som non-target analyse [1]. Ofte injiceres prøven, typisk 1 µL, i en injektor, som så er direkte forbundet til kolonnen. I mange GC-MS applikationer er den stationære fase relativt upolær. Hertil bruges så bedst et upolært solvent for at sikre bedst mulig fokusering på kolonnen [1]. I en del tilfælde er matrix vandig eller indeholder et solvent som kan være skadelig for kolonnen (for eksempel DMSO). I andre tilfælde er der tale om en fast matrix, hvor almindelig injection er umulig. I disse tilfælde kan headspace-prøveudtagning være nyttig [2].

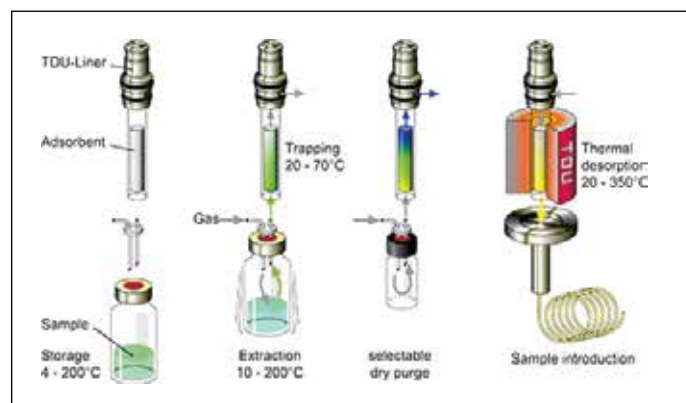
Headspace-prøveudtagning

Headspace-prøveudtagning inkluderer et inkubationstrin, hvor der indstiller sig en ligevægt mellem prøven og gasfasen. Der er herefter to typer af prøveudtagning. Ved den ene udtages der en prøve direkte fra denne gasfase, efter at ligevægt er opnået, dette kaldes statisk headspace (SHS). Denne metode er særdeles nyttig ved analyse af flygtige organiske forbindelser (VOC'er). Den største ulempe ved SHS er manglen på følsomhed, da prøveoverførslen ikke er stor, typisk omkring 1 mL gasfase, men omvendt har GC(-MS) selvfølgelig en grundlæggende høj følsomhed. Typisk er man af tekniske årsager også nødt til at "splitte" ved injektionen. For at løse dette problem kan der anvendes flere headspace-ekstraktioner (MHE, HIT), hvor headspace samples flere gange for at opnå følsomhed [2,3].

En anden opkoncentrering er solid phase mikroekstraktion (SPME), hvor en fiber med en tynd stationær fase eksponeres i headspace (HS-SPME) [3], og efterfølgende desorberes direkte i en varm injektor. De stationære faser kan fås mere eller mindre polære og kan derfor delvist vælges i forhold til, hvilke komponenter der ønskes ekstraheret. Med HS-SPME er en betydelig opkoncentrering mulig, men da der kan være flere af hinanden uafhængige partitioneringsprocesser på den samme stationære fase, kan dette give anledning til forskellig adsorbtionseffektivitet ved forskellige matricer [4-6].

En tredje type af headspace-prøveudtagning kaldes dynamisk headspace (DHS), samt ved fuldstændig udbagning af prøven: fully evaporative dynamic headspace (FE-DHS). Denne fremgangsmåde "stripper" konstant headspace af en prøve med en "purge" gas. Der er derfor kontinuerligt ikke-ligevægt mellem matrix og headspace i prøven, og komponenter bliver derfor lige så kontinuerligt overført fra matrix til headspace. Gassen med komponenterne bliver herefter ført gennem en adsorbent, som kvantitativt opsamler alle strippede komponenter. Når

processen stoppes, er der derfor opkoncentreret komponenter over en 5-30 min. (nogle gange længere) på en adsorbent, altså en ganske betydelig opkoncentrering. Adsorbenten bliver herefter overført til en termisk desorber som sidder umiddelbart foran kolonnen på GC'en, desorberet ved høj temperatur i en carrier gas og chromatograferet på almindelig vis [7,8], figur 1. En variant af DHS er fully evaporative DHS (FE-DHS); prøven indampes til tørhed under ekstraktionen, hvorved selv meget højtstående komponenter kan overføres til kolonnen. Typisk indampes kun små absolutte mængder, hvilket medfører, at den ekstreme følsomhed, DHS ofte forbindes med, går fløjten, mod at man til gengæld får et komplet billede af, hvad prøven indeholder.



Figur 1. Dynamisk Headspace (DHS): 1: Enkeltkomponenterne i DHS setup, 2: Montering af vial i desorptions-/adsorbtionstrinet, 3: Evt. tørring (typisk fjernelse af vand) af TD-røret, 4: Analyse af TD-røret i GC'en.

Målet for dette studium var at sammenligne de tre teknikker; hvad er styrken og svagheden ved den enkelte metode? Der blev derfor udarbejdet en standard-mix med en homolog serie alkaner, en homolog serie fedtsyremethylestre (FAMES) samt en serie med polycykliske aromatiske hydrocarboner (PAH's). Denne mix blev brugt til at vurdere ekstraktionseffektiviteten ved de forskellige teknikker, og hvor denne så også blev sammenlignet med effektiviteten ved en almindelig væskeinjektion - hvor det antages, at alt overføres.

Materialer og metoder:

- **Prøveforberedelse:** De standardblandinger, der blev anvendt, var: alkaner fra heptan til triacontan (C₇-C₃₀, Supelco), en FAME-mix fra Supelco (C₁₀-C₂₁) samt en Restek Mega-Mix (Restek 8720), som, udover en lang række chlorerede forbindelser, også indeholder PAH'erne. Koncentrationen af hver enkelt komponent var 0,05-0,1 m/m%. Stamopløsningen ►

blev forberedt ved at udtage 100 µL af hver mix, inddampe til tørhed og herefter genopløse den samlede prøve i methanol. Slutkoncentrationen i stamopløsningen var 5-10 ppm. For SHS samt SPME var prøveforberedelsen den samme: 10 µL af stamopløsningen blev overført til et 20 mL headspace vial (GERSTEL). Ved DHS blev 2 µL overført til et headspace vial. Ved væskeinjektion blev 1 µL injiceret på GC via en GERSTEL CIS 4 injektor.

- SHS, SPME DHS samt væskeinjektion: I alle tilfælde blev en GERSTEL MPS Robotic anvendt, med de relevante teknikker opsat på robotten.
- SHS samt SPME: Vial blev inkuberet fem minutter ved 60°C. Til SHS blev en 2,5 mL sprøjte anvendt, herfra blev der udtaget 1 mL med sprøjten og direkte injiceret i CIS-injektoren. Til SPME blev en PDMS/DVB 30 µm (Supelco) fiber anvendt. Inkubationstiden for SPME-fiberen var fem minutter og desorptionstiden var tre minutter @250°C.
- DHS: Til disse analyser blev der anvendt tre forskellige temperatur set-ups for at demonstrere temperaturens betydning ved analysen af højt-kogende komponenter, tabel 1. Purge gas: N₂, flow gennem vial 50 mL/min., adsorbent på TD-røret Tenax TA. Efter ekstraktion blev røret automatisk overført til den termiske desorber (TDU) og desorberet ved 300°C i ti minutter.

	Opsamlet volumen	Inkuberingstemperatur i DHS
Volatiles	500 mL	60°C
Semi-volatiles	1.500 mL	80°C
Fully evaporative (FE-DHS)	5.000 mL	150°C

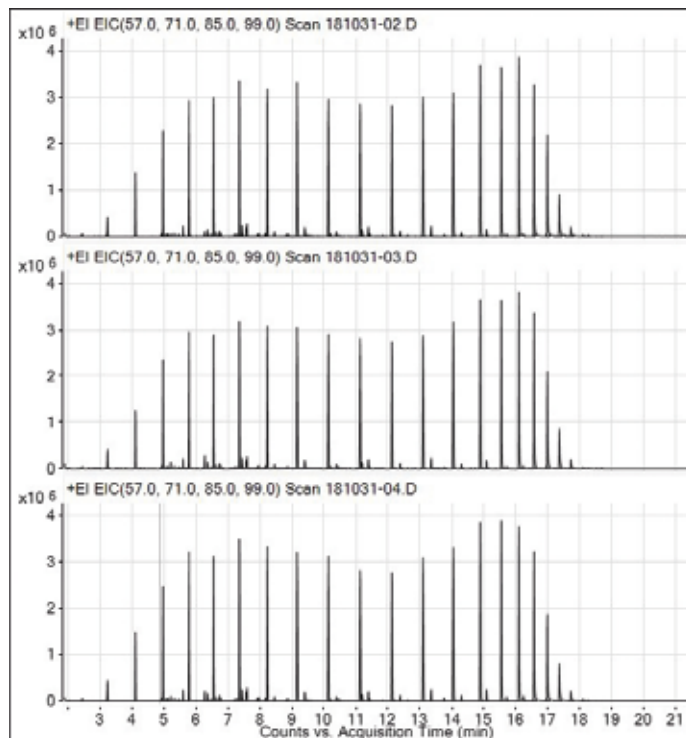
Tabel 1. De tre forskellige temperaturer samt prøvevolumener, der blev anvendt ved DHS.

- GC-MS: GC-MS metoden var ens for alle de ovenfor beskrevne analyser: Injector (CIS 4): split20:1, Initial temp: 0°C, 0,1 min.; rampe til 310°C, 12°C/sek., hold på 310°C, 4 min. CIS 4 liner fyldt med Tenax TA til bedre fokusering af de små komponenter. Kolonne: J&W DB5-MS UI (30 x 0,25 x 0,25). GC i konstant flow mode 1,4 mL/min. Kolonneovn: Initial temp: 35°C, 1 min.; rampe til 140°C, 20°C/min.; rampe til 220°C, 10°C/min.; rampe til 300°C, 25°C/min.; hold på 300°C, 4 min. Transfer line til MS: 320°C. MS i full scan mode (m/z fra 50 til 350), med analysator slukket det første 1,8 minut. Ion source temperatur 280°C (for at formindske "tailing").
- Dataevaluering: Alle opsamlede data blev analyseret med Agilent MassHunter Qualitative and Quantitative software. Alle toppe blev analyseret ud fra et "targeted approach" med en "Quantifier" og to "Qualifier" ioner. De fundne toparealer blev overført til Excel og blev normaliseret i forhold til en udvalgt top. Dette for at udligne de forskellige absolutte mængder, der blev tilsat til vials ved de forskellige analysemetoder.
- Alkaner blev normaliserede i forhold til tetradekan (C₁₄) ved liquid inj., SPME samt DHS, og dekan (C₁₀) ved SHS. FAMES i forhold til methyl decanoat (C₁₁), og PAH'erne i forhold til C₁₀, Naphthalen. Efterfølgende blev alle relative arealværdier plottet mod alle komponenter i den homologe serie for hhv. væskeinjektion, SHS, SPME, DHS samt FE-DHS.

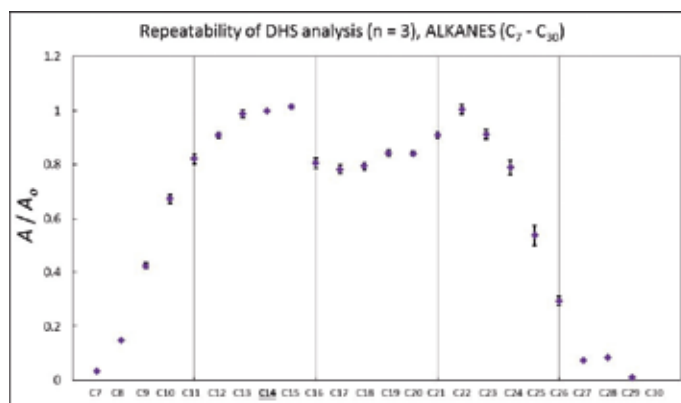
Resultater samt diskussion

Repeatability:

Vi har undersøgt "Repeatability" (gentageligheden) på alkaner, på tre parallelle DHS-analyser med et purge på 1.500 mL, figur 2. Der er god repeatability på de fleste alkaner, fra 0,6 til 7,7% RSD. Otte "high boilers" med små toparealer varierede fra 9,3-23,9%. Variationen af de relative toparealer ses i figur 3, for alkanerne.



Figur 2. Ionchromatogrammer (m/z 57, 71, 85 samt 99) for de gentagne DHS-analyser.

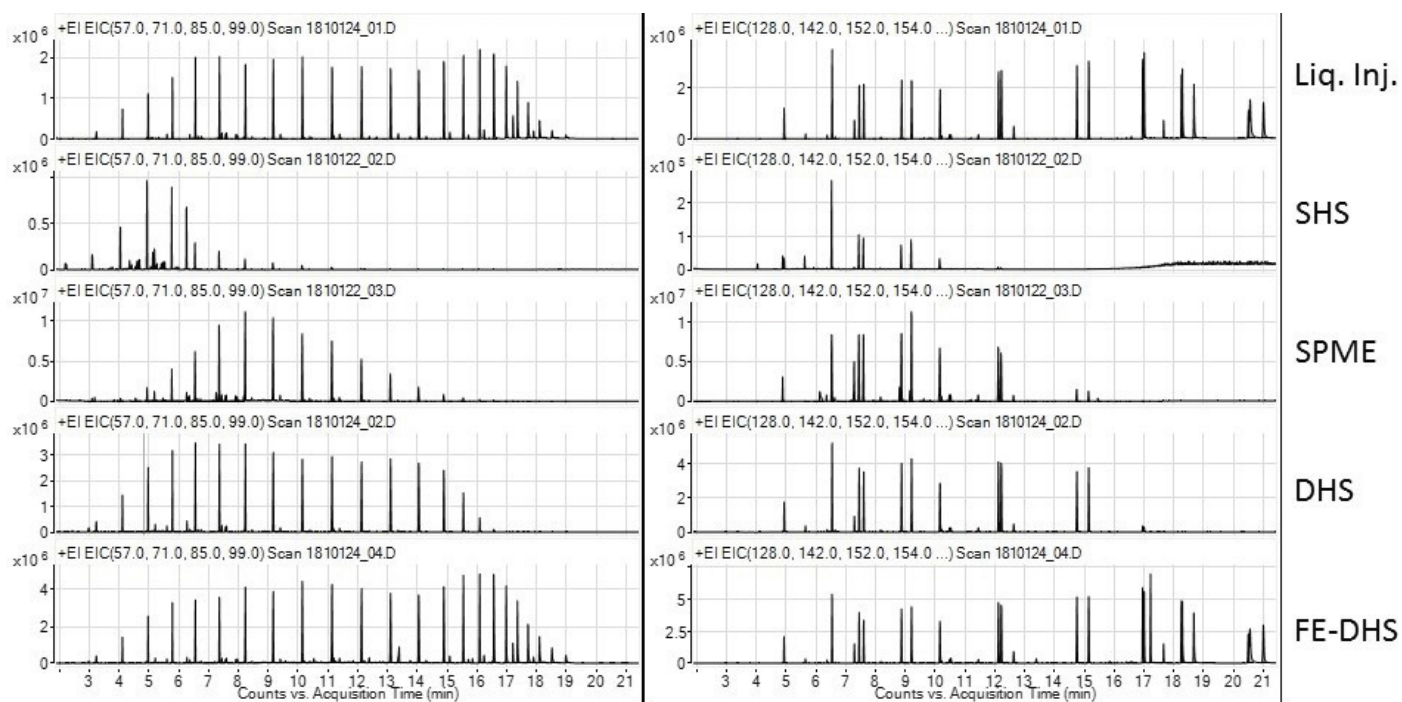


Figur 3. Repeatability (n=3) af de relative toparealer ved DHS-analysen med et purge volumen på 1.500 mL. Y-aksen viser toparealet af hver top relativt til toparealet af tetradekan.

Sammenligning af de tre headspace-teknikker

Ekstraktionseffektiviteten af de undersøgte teknikker blev sammenlignet med væskeinjektion. I figur 4 ses de ekstraherede ionchromatogrammer for alkanerne samt for PAH'erne for de forskellige ekstraktionsteknikker. Hvad angår statisk headspace er ekstraktionen af de små alkaner, som forventet, mere effektiv i forhold til resten af teknikkerne. Effektiviteten for hhv. SPME samt DHS er nogenlunde ens, hvor SPME er lidt mindre effektiv ved såvel de små komponenter som "high boilers". Med fully evaporative DHS (FE-DHS) kan der udføres kvantitativ ekstraktion af selv de højest kogende, der er medtaget i denne analyse.

Ekstraktionseffektiviteten kan illustreres yderligere ved at bruge de relative toparealer. I figur 5 ses de normaliserede toparealer for alkanerne, som spænder over et kogepunktsinterval fra 98-450°C og en molekylvægt fra 100-422 g/mol. Med SHS er ekstraktionen effektiv fra heptan (C₇) til dodekan (C₁₂), SPME er effektiv op til C₁₈, men recovery er først god fra C₁₂ og opefter. DHS er effektiv op til heneicosan (C₂₁), hvorefter den

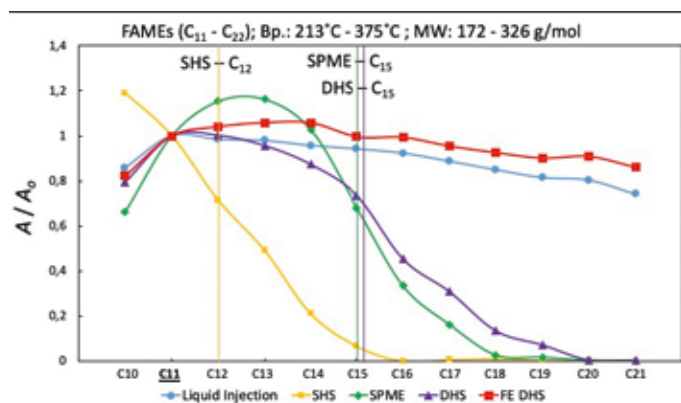


Figur 4. Ionchromatogrammer af alkaner (m/z: 57; 71; 85 og 99) samt af PAH'er (m/z: 128; 142; 152; 154; 165; 178; 202; 228; 252; 276 og 278).

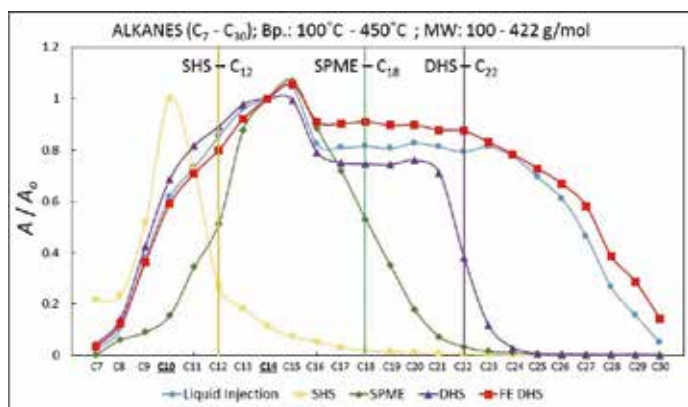
klinger af. FE-DHS derimod viser fuldstændig effektivitet helt op til C_{30} .

For FAMES ses der lignende resultater, se figur 6. SHS er mere effektiv for de små komponenter. SPME samt DHS er sammenlignelige i effektivitet og klinger begge af efter C_{15} . FE-DHS viser samme resultat som set ved alkanerne, altså komplet ekstraktion.

PAH'erne, figur 7, viser igen mere eller mindre de samme resultater som alkanerne. Hvad der er noget overraskende er dog, at selv [1,2,3-cd]pyren er effektivt ekstraheret med FE-DHS sammenlignet med væskeinjektionen. Dette kan skyldes, at højtstående PAH'er sublimerer, og dette betyder ikke nødvendigvis, at alle komponenter med et kogepunkt $>500^\circ\text{C}$ vil kunne analyseres med FE-DHS.

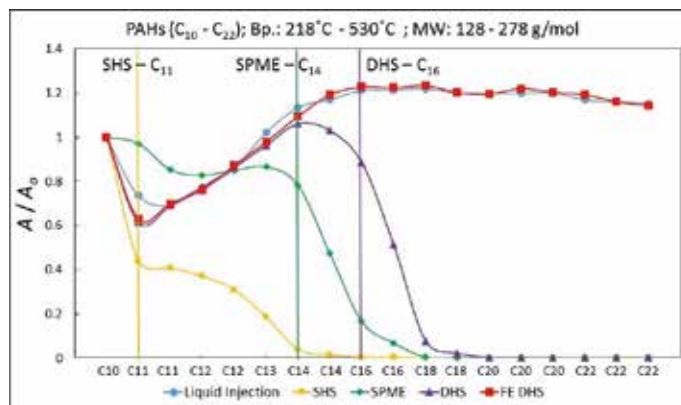


Figur 6. De relative toparealer af den homologe serie FAMES (normaliseret til C_{11}), vist for de forskellige headspace ekstraktionsteknikker.



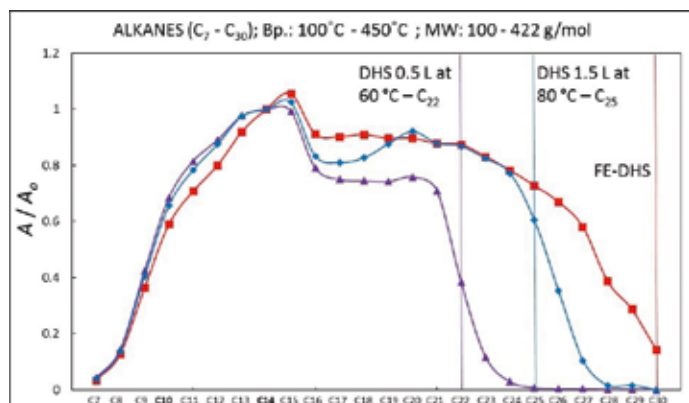
Figur 5. De relative toparealer af den homologe serie alkaner (normaliseret til C_{10} og C_{14}), vist for de forskellige headspace ekstraktionsteknikker.

De fundne resultater af analyserne er ikke overraskende hvad angår SHS samt SPME. Det er almindelig kendt, at statisk headspace ikke rækker langt op i molvægt, og at følsomheden ikke er overvældende i forhold til for eksempel SPME. SPME er en i mange tilfælde en effektiv headspace ekstraktionsme-



Figur 7. De relative toparealer af PAH-serien (normaliseret til naphthalen), vist for de forskellige headspace ekstraktionsteknikker.

tode, og da der er en bred række af stationære faser at vælge imellem, er der mange muligheder for ekstraktion. Prisen er naturligvis, at der er en vis selektivitet, afhængigt af valget af den stationære fase på nålen. Prismæssigt er begge metoder også absolut overkommelige. Dynamisk headspace er lidt i en anden vægtklasse, men omvendt viser ovenstående, at bredden i teknikken er stor.



Figur 8. Det relative topareal af den homologe serie af alkaner (normaliseret til C_{14}), for de tre forskellige ekstraktionstyper vist i tabel 1.

De klassiske områder har altid været fødevarer samt miljøanalyser, men på grund af det brede molvægtsanalyseområde er der også store muligheder for egentlig faststofanalyse, fra industrielle råvarer til mikrobiologisk emittering over agar.

Dette er et analyseområde som tidligere har givet store udfordringer for GC-teknikken, idet GC(-MS) systemer typisk er designet og opbygget til "1 μ L injektioner". Det skal her bemærkes (det er vores erfaring), at der til en vis grad kan kompenseres for en højere temperatur, til ekstraktion af større komponenter, ved en længere purgetid med et højere flow. I figur 8 vises alkanerne analyseret ud fra parametrene i tabel 1, side 24.

E-mail:

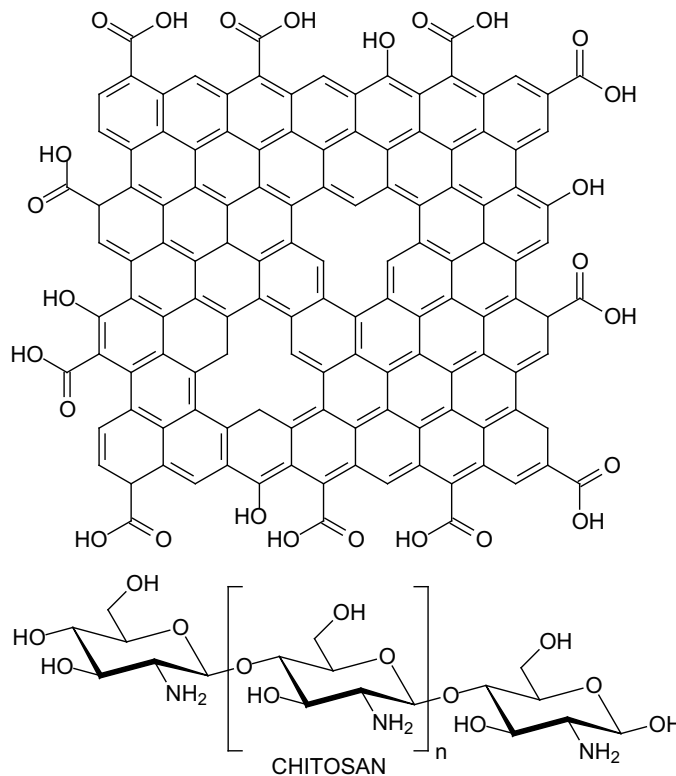
Jens Glastrup: jens@msconsult.dk

Referencer:

1. Grob, D.K. *Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography: Concepts, Processes, Practical Guidelines, Sources of Error*. 2001. DOI: 10.1002/9783527612871.
2. Ettre, B.K.L.S., *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice, Second Edition*. 2006: John Wiley & Sons, Inc.
3. Jun, T, S. Kikua, O. Nobuo: *HIT it -targeting VOCs and SVOCs*, in GERS-TEL Solutions, vol.: 13, 2012, p. 14-16.
4. Pawliszyn, J., 2 - *Theory of Solid-Phase Microextraction*, in *Handbook of Solid Phase Microextraction*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Elsevier: Oxford. p. 13-59.
5. Pawliszyn, J., 3 - *Development of SPME Devices and Coatings*, in *Handbook of Solid Phase Microextraction*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Elsevier: Oxford. p. 61-97.
6. Pawliszyn, J., et al., 5 - *Automated SPME Systems*, in *Handbook of Solid Phase Microextraction*, J. Pawliszyn, Editor. 2012, Elsevier: Oxford. p. 135-165.
7. Boczkaj, G., P. Makoś, and A. Przyjazny, *Application of dynamic headspace and gas chromatography coupled to mass spectrometry (DHS-GC-MS) for the determination of oxygenated volatile organic compounds in refinery effluents*. Analytical Methods, 2016. 8(17): p. 3570-3577.
8. Vercruyssen, E., *Dynamic headspace (DHS) technique: set-up and parameter control for GC/MS analysis of odorant formulations*. 2014.

Nyt om ...

... Graphen som hårfarvningsmiddel



Hårfarvning foregår normalt ved, at man med base åbner hårets porer, så farvemidlet kan trænge ind i håret. Farvemidlet består som regel af aromatiske aminer og phenoler som f.eks. *p*-phenylendiamin og *p*-aminophenol samt et oxidationsmiddel, som oftest hydrogenperoxid. De anvendte aminer er ofte allergener og cancerogene. Det er nu vist, at man kan dække



hårets overflade med flager af graphenoxid opslæmmet i vand sammen med ascorbinsyre og biopolymeren chitosan. Flagerne binder fast til håret og udviser først blegning efter mere end 30 gange hårvask med shampoo. Graphenoxidet fremstilles ved behandling af graphit med svovlsyre og natriumnitrat, hvorefter det kan funktionaliseres med forskellige grupper. Man kan med metoden give håret forskellige nuancer af brunt og sort.

Carl Th.

Multifunctional Graphene Hair Dye, *Chem*, 4, April 12, 2018 side 1. DOI: 10.1016/j.chempr.2018.02.021.