

GC-analyse af "håbløse" matricer

Prøveforberedelse "all-in-one".

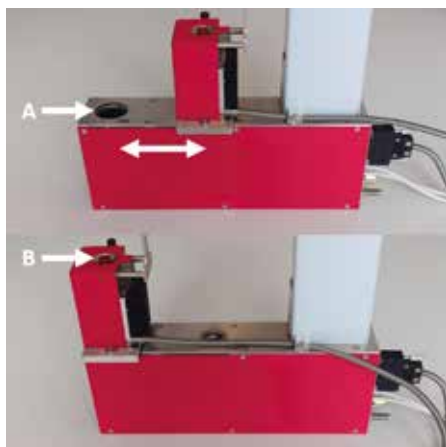
Af Jens Glastrup, MSCi ApS

For nogle år siden var jeg på besøg på Ravmuseet i Thyborøn, som drives af Bjarne Hansen. Hans far var Aage Hansen, eller Rav-Aage, som brugte en stor del af sit liv til at få Cheminovas forurening frem i lyset [1]. Hans søn viderefører dette arbejde, og af og til bliver der stadig fundet klynger af døde fugle og fisk i området. Her kunne det være meget interessant at screene for et eventuelt indhold af giftstoffer.

Bjarne havde sådan set nogle af de døde sild liggende i sin fryser, og der var også nogle sedimenter, som kunne være spændende, men hans held med at få nogen til at analysere dem kunne ligge på et meget lille sted. Det slog mig, at et af problemerne, ud over administrativ træghed, kunne være, at matricen virkelig ikke er helt nem at gå til. Her nævner jeg blot enkeltanalyse, SPE, QuEChERS, og alligevel uundgåelig forurening af injektor/kolonne.

Udvikling af ny metode til ekstraktion og analyse

Vi havde puslet lidt med nogle ideer. Den mest simple metode til ekstraktion af eventuelle pesticider fra en organisk matricer – vegetabilsk eller animalsk – er en væskeekstraktion (LLE), hvor et sol-



Figur 1. Billede af DHS-enheten. Øverste halvdel hvor isætningen af vial (A) er angivet. Herefter forskydes slæden hen over vial, og der isættes et TD-rør (B).



Foto: www.magnific.com

vent rystes mod den vandige fase. Den har imidlertid den ulempe, at den uundgåeligt medtager en del af den uinteressante organiske matricer og desuden, at koncentrationen af de ønskede analytter kan være for lav til at analysere på et GC/MS-system.

På en af vore autosamlere har vi et modul, et automatiseret dynamisk headspacesystem, som kunne anvendes til at inddampe solventet ved lav temperatur (Solvent Purge, SP), se figur 1. Ved næsten tørhed, hvor prøven nu indeholder de interessante analytter samt en stor mængde af højmolekylært materiale fra den organiske matricer, kunne vi nu hæve temperaturen og overføre alle komponenter til en TD-patron (Component Purge, CP) som kunne analyseres direkte i GC/MS-systemet. Det viste sig, at komponenter op til en molvægt >400 kunne overføres kvantitativt, hvorimod oligomere har for lavt et damptryk til at blive overført. Processen har dermed en dobbelt funktion. Den opkoncentrerer

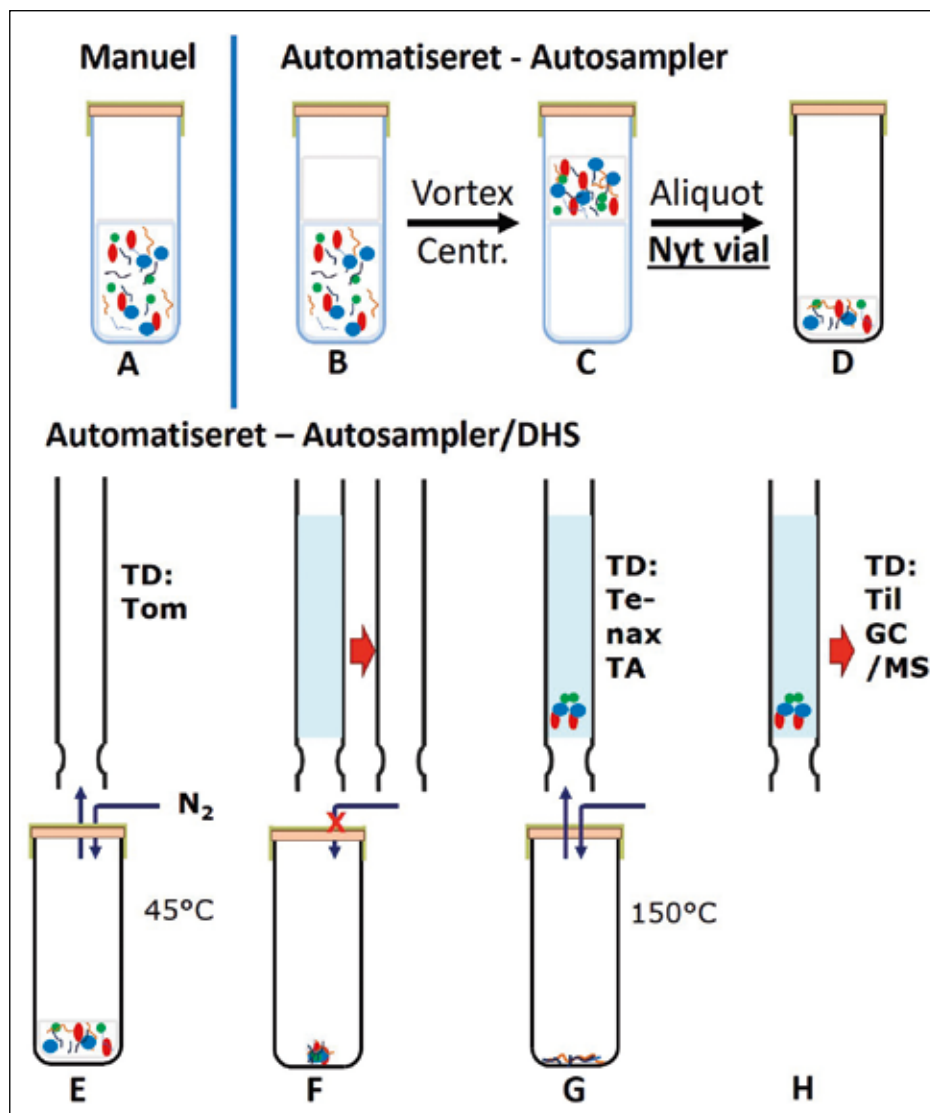
prøven kraftigt, og selekterer samtidig for komponenter, som er interessante for en GC-analyse. TD-patronen kunne genbruges til mere end 200 analyser, hvilket demonstrerer, at højmolekylære komponenter ikke overføres via gasfasen.

Samme autosampler har også en vortex samt centrifuge monteret, hvilket betød, at vi kunne udføre LLE online. Alt i alt har vi fået udviklet en procedure, hvor vi kan tilsætte 10 mL vand/vandigt homogeniserat til et vial og sætte dette i autosampleren, som så udfører resten. Et komplet flowdiagram ses i figur 2.

Test af metodens effektivitet og følsomhed

Vi har sammensat en pesticidmix (P4) med et molvægtsinterval fra MW 128 til 423, dels for 1: at teste metodens effektivitet ved den ovenfor nævnte ekstraktion samt 2: finde følsomheden af metoden. Vi har her sat en detektionsgrænse ved $s/n > 2$. En 10 ppb spike i rensset spilde-

Figur 2. Komplet flowdiagram for den samlede ekstraktionsprocedure. A: **Manuel** til-sætning af 10 mL prøve til autosampler vial, **Automatiseret**: B: Til-sætning af solvent og eventuel buffer til vial, C: Vortex og efterfølgende centrifugering ved LLE-ekstraktionen, D: Overførsel af 1,0 mL aliquot til nyt vial, E: Vial overført til DHS-enhed samt afdampning af solvent (SP), F: Isætning af TD-rør med Tenax TA, G: Overførsel af analytter til TD-rør (CP), H: Overførsel af TD-rør til analyse.



vand ses i figur 3, side 26. Et eksempel på lineariteten ses i figur 4, side 26, hvor vi har plottet Lindan (γ -HCH) samt Endrin-værdier i spildevand som en funktion af koncentrationen. Med en $S/N > 2$ har vi en detektionsgrænse for Lindan på 10 ppt og på Endrin på 50 ppt, dette vel at mærke i "full scan" mode, hvor massespektrometeret scannede fra m/z 50-500.

Generelt fandt vi, i full scan, detection limits som lå i området 10-100 ppt, dog med Endosulfan-sulfat som en undtagelse, idet vi her var oppe på en detektionsgrænse på >200 ppt. Vi forventer endvidere, at vi vil kunne analysere molekyler med en molvægt >500. I den etablerede metode kunne vi se, at 10 minutter ved 150°C var tilstrækkeligt til at overføre komponenter med MW omkring 400. DHS-systemet har mulighed for at afdampe med op til 200°C samt udføre lang tids CP, men dette er endnu ikke testet.

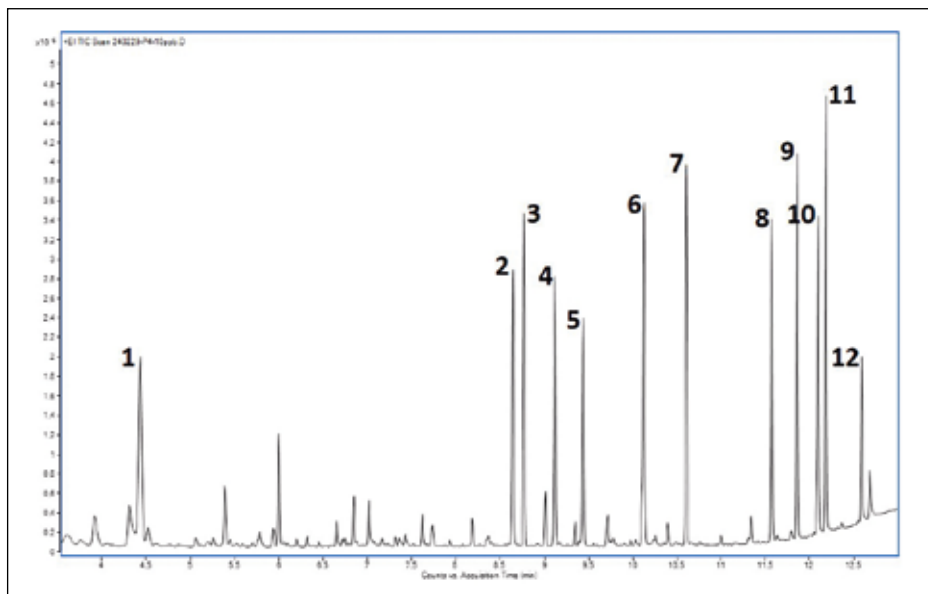
Vi har også testet systemet på vandige emulsioner af plantemateriale. Vi har homogeniseret materialet i vand, spiket med varierende koncentrationer af P4, og herefter ekstraheret som beskrevet ovenfor. Her fandt vi, at den typiske detektionsgrænse for de samme komponenter ligger på 250-500 ppt.

Metoden er velegnet til screening af ukendte matricer

Vi anser metoden for at være lidt af et Kinderæg. Indledningsvis er der tale om en kraftig opkoncentrering af prøverne. Ved normal LLE, hvor der typisk anvendes 2-5 mL solvent op mod for eksempel jordprøver, er det vanskeligt at injicere mere end 5-10 μ L (maks. 0,5 procent) af det ekstraherede volumen. Her ekstraherer vi kun fra 10 mL vand, men til gengæld inddamper vi fra 1,0 mL solvent, og anvender således 40 procent af det ekstraherede volumen i injektionen, samtidig er hele processen automatiseret.

Den efterfølgende overførsel af komponenter i gasfasen, CP, fra vial til TD-rør, selekterer for komponenter, som kan chromatografere på GC, og





Figur 3. Chromatogram (full scan) af de 12 komponenter i standardblandingen P4, spiket i 10 ppb's koncentration i rensat spildevand fra Avedøreværket. Komponenterne er: 1: Naphthalen, 2: α -HCH, 3: HCB, 4: γ -HCH (Lindan), 5: δ -HCH, 6: Heptachlor, 7: Aldrin, 8: Endosulfan-1, 9: Dieldrin, 10: Endrin, 11: Endosulfan-2, 12: Endosulfan sulfate.

endelig forhindrer gasfaseoverførslen, at oligomere, -peptider, -saccharider eller lignende, overføres til GC.

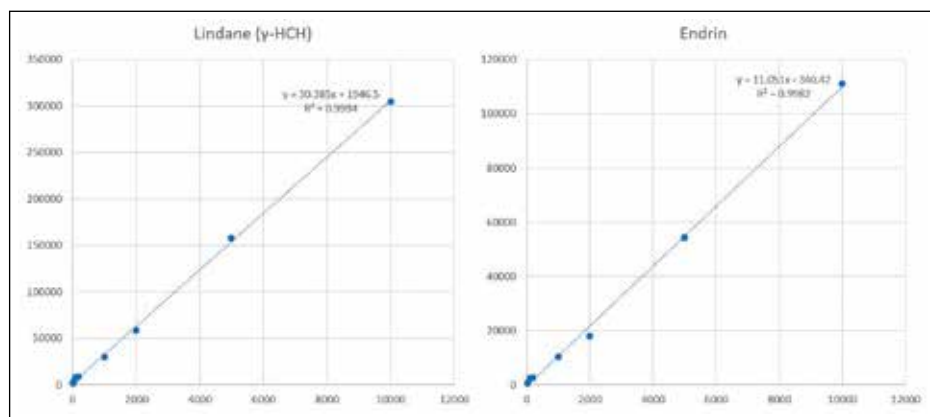
Under hele optimeringsprocessen er der kørt mere end 200 prøver med det samme TD-rør. Det har på intet tidspunkt være skiftet, og ligeledes har injektorzonen kørt uden vedligehold. En eventuel kontaminering ville afsløres af Endrintoppen [2], som hurtigt ville forsvinde fra chromatogrammerne.

Ved manuel LLE, altså med konventionel skilletragt, vil det være muligt at ekstrahere langt mere effektivt, for eksempel 2,5/500 mL, og vi forventer derfor detektionsgrænser på under 1 ppt for en lang række stoffer i full scan. Til gengæld vil arbejdet med LLE, rengøring af glasvarer osv., lægge beslag på manuelle laboratorieressourcer.

Vi mener derfor, at metoden vil være velegnet specielt til screening af ukendte

matricer. Det skal dog nævnes, at hvor "rene" vandige opløsninger formentlig ville kunne ekstraheres direkte, så vil homogeniserede organiske matricer, animalske eller vegetabiliske, kræve tilsætning af buffer på grund af tilstedeværelsen af organiske frie fedtsyrer. De bliver overført til TD-røret ved CP-delen af ekstraktionen, og da de både "tailer" og "fronter" på en upolær GC-kolonne, er der risiko for, at de kommer til at dække for de interessante komponenter. Det skal dog nævnes, at der i de moderne softwarepakker, for eksempel Agilent's MassHunter "Unknowns" Analysis, er mulighed for at trække komponenter ud af en kompliceret baggrund ved hjælp af Deconvolution.

En anden ulempe, specielt ved analysen af animalske matricer (fisk), er emulsioner. Selv ved brug af udsaltnings så vi, ved vortexing af fiskeholdige



Figur 4. Kalibreringskurve for Lindan samt Endrin med indlagte værdier fra 10 ppt til 10 ppb i den vandige opløsning. Anvendte m/z udtrykket fra full scan: Lindan: 180,9, Endrin: 262,8

Anvendt instrument: Agilent 8890/5977 GC/MS med påmonteret GERSTEL MPS Robotic auto-sampler, med termisk desorption, DHS-enhed, centrifuge samt vortex. Kolonne 5%-phenylmethyl.

matricer, en udpræget tendens til emulgering af vand-solvent matricen på et niveau, hvor det ikke længere var muligt at adskille de to faser ved centrifugering. Det er derfor muligt/sandsynligt, at man på nogle matricer er nødt til at udføre en manuel og nænsom LLE, hvor man ikke kan forvente en maksimal ekstraktion af de organiske komponenter, og hvor man derfor vil blive nødt til at angive en eventuel kvantisering som minimumsværdier.

Vær forsigtig ved forsøg med andre solventer

Til sidst bliver vi nødt til at nævne, at man også skal være forsigtig med eksperimenter med andre solventer end de ovenfor nævnte. I de indledende forsøg var også Ethylacetat på tale, men det viste sig at være en fejltagelse. Tætningen i såvel DHS- som TD-systemet er o-ringsbaseret og efter et par injektioner med Ethylacetat var hele systemet utæt, og vi kunne visuelt se, at de var svulmet. Dette medførte en komplet udskiftning af alle o-ringe i hele systemet – samt lidt nedetid. En mere præcis gennemgang, samt alle relevante parametre findes i vores artikel [3] eller ved direkte henvendelse.

Men tilbage til Bjarnes sild. Efter en fem års tid mener vi sådan set, at vi har en fungerende metode, men desværre er der ikke længere nogle sild i fryseren. Så hvis nogle af læserne skulle have nogle interessante prøver, kunne det da være spændende at se, om vi kan vride noget information ud af dem? Så kunne der også komme en opfølgning her i bladet.

E-mail:

Jens Glastrup: jens@msconsult.dk

Referencer

1. J. Østergaard, F. Højgaard Madsen, Fisk kan ikke tale: en fiskers kamp mod Cheminovas forurening, Rebild 2017.
2. H.L. MacDonell, D.L. Eaton (1968), Thermal decomposition of endrin as a measure of surface activity of gas chromatographic support media. Anal. Chem., 40(10) (1968) 1453-1455.
3. J. Glastrup, R.B. Bendixen, R.B. Hansen, Principles for a purification tool for gas chromatography: Vapour Pressure Purification. J. Chrom. A, 1765 (2026), 466538.