

## Unpolare SPE: Elution

(veröffentlicht auf [www.analytik-news.de](http://www.analytik-news.de) am 31. März 2009)

In der heutigen Folge beschäftigen wir uns mit dem letzten Schritt der SPE, der Elution. Dabei interessiert uns die Fragestellung, wie man Analyten, die an unpolarem Sorbens wie C18 oder Polymer adsorbiert sind, wieder „ablösen“ kann.

### Welche Lösemittel sind geeignet zur Elution von unpolarem Sorbens?

Typische Lösemittel und Lösemittelmischungen

- ✓ Methanol
- ✓ Acetonitril oder Gemische Methanol/Acetonitril
- ✓ Isopropanol
- ✓ Aceton
- ✓ THF
- ✓ Ethylacetat
- ✓ Dichlormethan, Chloroform
- ✓ Hexan

Zunehmende Elutionsstärke



Der Mischung von Lösemitteln sind hierbei (fast) keine Grenzen gesetzt. So lange sie miteinander mischbar sind und der Analyt sich darin löst, sind alle möglichen Gemische denkbar. Für polare Analyten sind auch Gemische mit wässrigem Anteil denkbar.

Die Lösemittel ab Ethylacetat sind nicht (vollständig) wassermischbar, weshalb das Sorbens vor der Elution komplett trocken sein muss.

(Details zum Trocknen finden Sie in [Folge 6](#)).

### Wie bekommt man einen schnellen Überblick über geeignete Elutionsmittel?

- ✓ Man kann beispielsweise zunächst mit einem polaren Lösemittel eluieren (z.B. Methanol), anschließend das Sorbens trocknen und mit einem unpolaren Elutionsmittel (z.B. Ethylacetat) nacheluieren.
- ✓ Durch Analyse der beiden unterschiedlichen Fraktionen bekommt man schnell einen Überblick, ob ein starkes unpolares Lösemittel notwendig ist oder das polare Lösemittel ausreicht.
- ✓ Bei der Auswahl des Elutionsmittels ist auch die Elution von Matrixbestandteilen zu bedenken. Man braucht ein Lösemittel, das den Analyten so gut wie nötig desorbiert, aber die Matrixbestandteile so weit wie möglich auf dem Sorbens belässt.

### Warum wird dem Elutionsmittel manchmal Säure oder Base zugesetzt?

- ✓ Bei Analyten mit sauren oder basischen Eigenschaften kann man durch Zugabe von Säure oder Base zum Elutionsmittel die Desorption beschleunigen.
- ✓ Warum? Weil man durch Zugabe von Säure die basischen Analyten protoniert bzw. durch Zugabe von Base die sauren Analyten deprotoniert.
- ✓ Mit dem Ergebnis, dass die Analyten ionisch werden, also polarer.
- ✓ Und je polarer eine Substanz ist, umso weniger hydrophobe Wechselwirkungen geht sie mit dem unpolaren Sorbens ein, also ist sie weniger fest gebunden und lässt sich leichter ablösen.
- ✓ Elutionsmittel für Basen: beispielsweise
  - Methanol mit 2% Säure
    - Phosphorsäure, Ameisensäure, Essigsäure
    - je nach nachfolgender Analysenmethode
- ✓ Elutionsmittel für Säuren: beispielsweise
  - Methanol mit 2-5% Ammoniak

### Was hat man davon, wenn die Analyten durch Zugabe von Säure oder Base leichter desorbiert werden können?

Man kann mit geringerem Elutionsvolumen auskommen oder mit einem schwächeren Elutionsmittel, das u.U. weniger Matrixbestandteile vom Sorbens löst als ein stärkeres Elutionsmittel.

### Wonach richtet sich in erster Linie die Auswahl des Lösemittels?

- ✓ Der Analyt muss im Elutionsmittel gut löslich sein.
- ✓ Das Elutionsmittel muss zur nachfolgenden Messmethode passen (GC, LC, LC/MS)
- ✓ oder gut einengbar sein, falls ein Lösemittelwechsel notwendig sein sollte.
  - **Vorsicht:** unbedingt testen, ob die Analyten nach dem Einengen noch komplett vorhanden sind!

## Unpolare SPE: Elution

(veröffentlicht auf [www.analytik-news.de](http://www.analytik-news.de) am 31. März 2009)

### Welches Elutionsvolumen wird empfohlen?

Das Elutionsvolumen ist abhängig

- ✓ von der Stärke der Wechselwirkungen zwischen Analyt und Sorbens
- ✓ von der Stärke des Elutionsmittels für den jeweiligen Analyten
- ✓ vom Totvolumen des SPE-Materials

Ein starkes Elutionsmittel (auf einen bestimmten Analyten bezogen) eluiert ihn mit geringerem Volumen, ein schwaches Elutionsmittel eluiert ihn verzögert, benötigt also ein größeres Volumen.

Das absolute Minimum an Elutionsvolumen ist das 2-fache Totvolumen des Sorbensbettes, wobei dies von Sorbens zu Sorbens variieren kann.

**Faustregel:** 100 mg Sorbens haben etwa 125µL Totvolumen, d.h. pro 100mg Sorbens ist das absolute Minimum an Elutionsvolumen 250µL

Aber für die Methodenentwicklung ist das viel zu wenig!

Die folgende Tabelle enthält **Vorschläge für Elutionsvolumina** für die Methodenentwicklung.

Sorbensmenge [mg]	Volumen [mL]
10	0,2 - 0,5
30	0,5 - 1
60	1 - 1,5
100	1,5 - 2,5
200	3 - 5
500	5 - 10

Auch wenn die Volumina relativ hoch erscheinen, lohnt es sich, sie bei der Methodenentwicklung anzuwenden. So kann man ein zu geringes Elutionsvolumen zunächst als Fehlerquelle für schlechte Wiederfindungsraten ausschließen.

Ist die Wiederfindungsrate trotz großem Elutionsvolumen nicht in Ordnung, dann kann man zunächst einfach mit der gleichen Menge an Elutionsvolumen noch einmal eluieren, um das Volumen endgültig als Fehlerquelle auszuschließen.

✓ Falls bei der 2. Elution noch Analyt gefunden wird, muss man zunächst hier ansetzen und das Elutionsmittel und/oder das Volumen ändern.

✓ Eluiert bei der 2. Elution nichts mehr an Analyt, ist das verwendete Lösemittel nicht geeignet für die Elution oder der Fehler ist bei einem der anderen Schritte der SPE zu suchen.

• Oder bei der weiteren Bearbeitung des Eluates. Aus diesem Grund sollte zunächst sicher gestellt sein, dass bei der Weiterbearbeitung des Extraktes (z.B. einengen, derivatisieren) nichts vom Analyt verloren geht.

- Ein einfacher Test:
  - Standard zum reinen Elutionsmittel (gleiches Volumen wie beim Elutionsschritt) zudosieren,
  - alle Schritte durchführen, die nach der Elution bis zur Messung anstehen und
  - anhand eines Vergleiches zur Messung von reinem Standard schauen, ob „unterwegs“ Analyt verloren geht.

Wenn die Wiederfindungsrate in Ordnung ist, kann man das Elutionsvolumen optimieren.

✓ Man kann dazu beispielsweise in Fraktionen eluieren (z.B. 0,5 mL oder 1 mL-Schritte) und anhand der gemessenen Konzentrationen in den einzelnen Eluaten genau sehen, nach wieviel Milliliter Elutionsmittel die Analyten vollständig eluiert sind.

## Unpolare SPE: Elution

(veröffentlicht auf [www.analytik-news.de](http://www.analytik-news.de) am 31. März 2009)

### Warum sollte man das Elutionsmittel in mehreren Portionen aufgeben?

Die Elution ist effektiver, wenn man das Elutionsmittel in mehreren kleinen Portionen aufgibt. Die Verteilung des Lösemittels in den Poren des Sorbens erfolgt bei jedem Elutionsschritt neu. Es können sich keine Kanäle bilden, durch die das Lösemittel „durchrauscht“. So ist eine gleichmäßige Benetzung und Elution sicher gestellt.

Die folgende Abbildung zeigt die Elution eines blauen Farbstoffes von C18-Material mit 4x 50 µL (A) und 1x 200 µL (B).



A B

Es ist eindeutig zu erkennen, dass bei der Elution mit 4 kleinen Portionen an Lösemittel das SPE-Material gleichmäßiger vom Elutionsmittel benetzt wird und die Analyten vollständig eluiert werden können.

### Was ist beim Durchfluss zu beachten?

Bei der Elution ist es ganz wichtig, dass langsam gearbeitet wird.

### Vorschlag für die Durchführung der Elution:

- ✓ Erste Portion Elutionsmittel ohne Vakuum (oder Überdruck) auf die Kartusche geben,
- ✓ einsickern und kurz (z.B. eine Minute) einwirken lassen,
- ✓ so langsam wie möglich (ggf. ohne Vakuum oder Überdruck) durchtropfen lassen.
- ✓ Die weiteren Portionen Elutionsmittel (2 - 3) analog behandeln.
- ✓ Am Ende durch Anlegen von Vakuum (oder Überdruck) restliches Elutionsmittel aus der Kartusche saugen (bzw. drücken).