

Flüssigextraktion in der Kartusche (SLE): Wässrige Proben

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 5. Mai 2009)

In der heutigen Folge beschäftigen wir uns zur Abwechslung einmal nicht mit Festphasenextraktion (SPE), sondern mit Flüssigextraktion wässriger Proben. Jedoch nicht mit der Variante, die üblicherweise mittels Ausschütteln im Scheidetrichter durchgeführt wird (Flüssig-Flüssig-Extraktion, LLE), sondern mit SLE, der sogenannten „Solid Supported Liquid Extraktion“.

Prinzip

Das Prinzip ist das gleiche wie bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion:

- ✓ Der Analyt verteilt sich zwischen der wässrigen Probe und einem organischen, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel.
- ✓ Je besser der Analyt im organischen Lösungsmittel löslich ist und je schlechter in Wasser, umso höher ist die Extraktionsausbeute.

Wie funktioniert die SLE zur Extraktion wässriger Proben?

- ✓ Die wässrige Probe wird auf trockene Diatomeenerde gegeben (Bild 1) und von ihr komplett aufgesaugt, es bildet sich eine wässrige Schicht (Bild 2).
- ✓ Nach Zugabe des organischen Lösungsmittels erfolgt der Übergang der Analyten aus der wässrigen Schicht in die organische Phase (Bild 3).



Bild 1:
Trockenes
Sorbens



Bild 2:
Wässrige
Schicht



Bild 3:
Organische
Phase

Was ist Diatomeenerde überhaupt?

- ✓ Diatomeenerde = Kieselgur, Celit
- ✓ ... ist ein Naturprodukt, das in Lagerstätten abgebaut wird.
- ✓ ... ist entstanden aus Kieselalgen (Diatomeen), die nach dem Absterben zu Boden des Gewässers sinken, in dem sie gelebt haben und dort allmählich dicke Ablagerungen bilden. Durch geologische Veränderungen, wie z.B. Bodenerhebungen, gelangen sie später an die Erdoberfläche.
(Quelle: Wikipedia)



Diatomeenerde für die Flüssigextraktion ...

- ✓ ... ist calciniert, d.h. gebrannt, um alle organischen Bestandteile zu entfernen
- ✓ ... ist gesiebt.

Hydromatrix

ist der Name für das Bulkmaterial

ChemElut

ist der Name für Diatomeenerde in Kartuschen



Flüssigextraktion in der Kartusche (SLE): wässrige Proben

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 5. Mai 2009)

Erhältliche ChemElut Kartuschen

Buffered pH	Volume (mL)	Part No.	Quantity (/Pk)
4.5	3	12198004	100
	100	12198018	25
9.0	3	12198005	100
Unbuffered	0.3	12198001	100
	1	12198002	100
	3	12198003	100
	5	12198006	100
	10	12198007	100
	20	12198008	100
	50	12198009	50
	100	12198010	25
	300	12198011	15

Hydromatrix Bulkmaterial

Item Name	Quantity	Part No.
Hydromatrix	1 kg	198003
	4 kg	198004

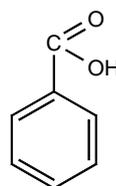
96well Format

Name	Probe -vol.	Menge	Artikelnummer
Versaplate 96-well Hydromatrix	ca. 250 µL	1 Platte	75430260
Versaplate Kartuschen Hydromatrix	ca. 250 µL	96 Versaplate Kartuschen	75530260
SLE 96 well Platte 50	ca. 50 µL	1 Platte	A4964050
SLE 96 well Platte 150	ca. 150 µL	1 Platte	A4964150

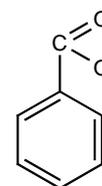
Was ist bei der Durchführung zu beachten?

1. Probenvorbehandlung

- ✓ Auch bei der Flüssigextraktion einer wässrigen Lösung spielt der **pH-Wert** eine wichtige Rolle.
- ✓ Der pH-Wert der Probe sollte – wie bei der unpolaren SPE (Folge 1) – so eingestellt sein, dass der **Analyt ungeladen** vorliegt. Dann ist er am unpolaren.
- ✓ Jede Ladung macht ein Molekül sehr viel polarer, sehr schön zu sehen am **Beispiel Benzoesäure**:



neutral
Wasserlöslichkeit
ca. 3 g/L



geladen
Wasserlöslichkeit
ca. 600 g/L

- ✓ Kurz zusammengefasst:
 - pH-Wert Einstellung für **saure** Verbindungen:
ideal ist $\text{pH} \leq \text{pKa} - 2$
 - pH-Wert Einstellung für **basische** Verbindungen
ideal ist $\text{pH} \geq \text{pKa} + 2$
- ✓ Eine pH-Wert Einstellung ist **nicht immer notwendig**, z.B. wenn der unpolare Rest des Moleküls überwiegt. Aber wenn es Probleme mit der Extraktionsausbeute gibt, sollte man auf jeden Fall auch über eine pH-Wert Einstellung nachdenken.

Besonderheit der Diatomeenerde:

- ✓ Unbehandelte Diatomeenerde reagiert in wässriger Lösung alkalisch!
- ✓ D.h. bei sauren Analyten entweder die Probe stärker sauer einstellen oder die sauer vorgepufferten ChemElut Kartuschen nehmen.
- ✓ Bei basischen Substanzen kann man dadurch oft die pH-Wert Einstellung weglassen.

Flüssigextraktion in der Kartusche (SLE): wässrige Proben

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 5. Mai 2009)

2. Auswahl der Kartusche

- ✓ ChemElut hat nichts mit SPE zu tun!
Der Mechanismus ist komplett unterschiedlich.
- ✓ **Wichtig:** Bei ChemElut muss die **Probe komplett aufgesaugt** werden, d.h. **die Kartuschengröße richtet sich nach dem Probenvolumen**.
- ✓ **Beispiel:** Auf eine ChemElut 10 mL Kartusche gibt man maximal 10 mL wässrige Probe (aber auch nicht viel weniger, siehe Probenaufgabe).

3. Vorbehandlung der Kartusche

Keine!!! Die Probe wird auf die **trockene Kartusche** aufgegeben.

4. Probenaufgabe

- ✓ Die Probe wird ohne Vakuum oder Druck aufgegeben, einfach **unter Schwerkraft einsickern** lassen.
- ✓ Anschließend ca. **5 – 15 min warten** bis die Probe ganz aufgesogen ist.
- ✓ Es sollte möglichst nur eine **schmale „Sicherheitszone“** am Fuß der Kartusche unbeladen bleiben, um sicher zu stellen, dass die Probe komplett aufgenommen wurde.
- ✓ Aber auch **nicht zu viel trocken lassen**, ggf. die Probe verdünnen oder die nächst kleinere Kartusche nehmen.

5. Elution

Mit einem **nicht wassermischbaren Lösungsmittel**

- ✓ Typische Elutionsmittel:
 - Dichlormethan, Chloroform,
 - Diethylether, Ethylacetat, n-Hexan
- ✓ Aber auch Lösemittelgemische mit einem kleinen polaren Anteil für weniger unpolare Analyten:
 - Dichlormethan / Isopropanol 90/10 oder 85/15
 - Chloroform / Methanol 90/10 oder 85/15
 - Diethylether / Ethanol 90/10 oder 85/15 oder 80/20
- ✓ **Wichtig** dabei: Die Mischung muss unmischbar sein mit Wasser!

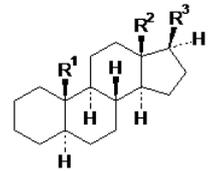
Wichtig: Mit den Elutionsmitteln experimentieren:

- ✓ Jedes Lösemittel hat eine andere **Selektivität**.
- ✓ Ähnlich starke Lösemittel können ganz unterschiedliche **Extraktreinheit** liefern aufgrund unterschiedlicher Selektivität.

Elutionsvolumen:

- ✓ 2 - 3 faches Probevolumen
- ✓ portionsweise aufgeben

Beispiel: Steroide aus Urin



Probenvorbehandlung:

- ✓ Eine pH-Wert Einstellung ist hier nicht notwendig, da die Analyten neutral sind (nur aliphatische Reste) (Formel: Römpp Chemielexikon)
- ✓ Falls nicht nur freie Steroide extrahiert werden sollen, sondern auch gebundene, ist eine Hydrolyse des Urins notwendig, z.B. mit β -Glucuronidase / Arylsulfatase
- ✓ Optional: Urin 1:1 verdünnen mit Wasser
Verdünnen ist generell aus verschiedenen Gründen meist von Vorteil, z.B. schon durch Herabsetzung der Viskosität einer Probe.

Probenaufgabe:

- ✓ 10 mL der vorbereiteten Probe wird auf eine trockene ChemElut 10 mL Kartusche gegeben (ohne Vakuum oder Druck)
- ✓ Etwa 10 min warten bis die Probe ganz aufgesogen ist.

Elution:

- ✓ Mit 2 x 10 mL Dichlormethan

Flüssigextraktion in der Kartusche (SLE): wässrige Proben

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 5. Mai 2009)

Vorteile der Flüssigextraktion mit ChemElut

- ✓ Unkomplizierte Handhabung
- ✓ Keine Emulsionsbildung!
- ✓ Extrakt absolut wasserfrei!
- ✓ Quantitative Extraktion in einem Schritt
- ✓ Bessere Extraktreinheit als bei herkömmlicher Flüssig-Flüssig-Extraktion
- ✓ Aufarbeitung vieler Proben gleichzeitig problemlos möglich



Nachteile

- ✓ Nur für Analyten geeignet, die sich in einem der nicht wassermischbaren Lösemittel oder Gemische gut lösen.
- ✓ Keine Anreicherung (erst durch Einengen des Extraktes)
- ✓ Relativ großes Elutionsvolumen
- ✓ Aufgrund des hohen Lösemittelverbrauches nur wirklich praktikabel für kleinere Probenvolumina (Kartuschen bis 300 mL sind aber erhältlich)



Einsatzbereich von ChemElut

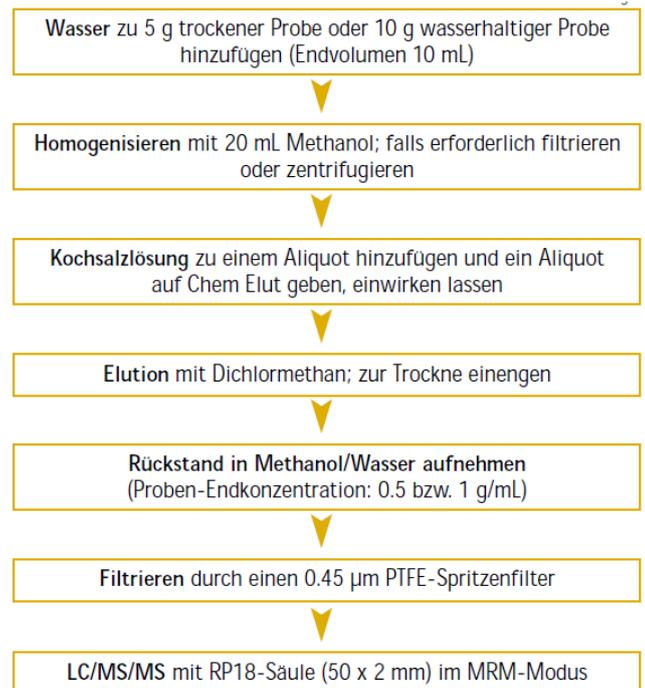
Allgemein

- ✓ Als Ersatz für die klassische Flüssig-Flüssig-Extraktion wässriger Proben
- ✓ Häufig angewendet beispielsweise in Pharma, Forensik und Toxikologie

Speziell

- ✓ Pestizidbestimmung in Lebensmitteln (Methode nach Alder und Klein, BgVV Berlin)

Schematische Darstellung



Die Details finden Sie [hier](#).

Erweiterte Anwendung

- ✓ Aufreinigung organischer Lösungen und Reaktionsgemische (mehr dazu in der nächsten Folge)

Flüssigextraktion in der Kartusche (SLE): wässrige Proben

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 5. Mai 2009)

Fehlersuche

für die Extraktion wässriger Proben mit ChemElut

Problem: Wasser im Eluat

Mögliche Ursachen:

- ✓ Zuviel Probe aufgegeben, Durchbruch
- ✓ Nicht lange genug gewartet vor der Elution, Wasser noch nicht komplett aufgesaugt
- ✓ Die wässrige Probe hat bereits organisches Lösemittel enthalten, z.B. Methanol. Mehr als 10% sollten es nicht sein (Faustregel).

Problem: Die wässrige Probe läuft nicht durch bei der Probenaufgabe

Mögliche Ursache:

Abstoßungseffekt durch den hydrophoben Filter oben

Abhilfe:

- ✓ kurz „anschubsen“ durch leichtes Rütteln oder Druck von oben oder etwas Vakuum
- ✓ aber nur leicht und ganz kurz, nur so lange bis das Wasser einzusickern beginnt

Problem: Das Elutionsmittel läuft nicht durch, bleibt über dem Sorbens stehen.

Mögliche Ursache:

- ✓ Zuviel Probe aufgegeben, zwischen den Partikeln sitzt Wasser, das organische Lösemittel kommt nicht durch

Problem: zu geringe Wiederfindung / Extraktionsausbeute

Mögliche Ursachen:

- ✓ zu geringes Elutionsvolumen
- ✓ ungeeignetes Elutionsmittel
- ✓ Substanz zu polar
- ✓ pH-Wert nicht richtig eingestellt

Applikationsbeispiele und Literatur

[Varian Environmental Advantage Note](#)

[Varian Bioanalytical Advantage Note](#)

[Applikationen aus den Bereichen Klinische Analytik, Toxikologie, Umwelt, Lebensmittel](#)

(Kontakt Daten siehe oben für Fragen und Detailinfos zu den Applikationen)