

Spurenanalyse von Lignin-Oxidationsprodukten mittels HPLC-HRMS nach Anreicherung mittels Festphasenextraktion

In der Umweltanalytik spielen spurenanalytische Methoden eine große Rolle. Dazu zählt neben der eigentlichen Analytik mit zum Beispiel HPLC-MS auch die Probenvorbereitung. Dafür werden unter Anderem Extraktionsmethoden wie die Festphasenextraktion genutzt.

Lignin ist nach Zellulose das am häufigsten vorkommende Biopolymer und anhand der Zusammensetzung der Monomere können Rückschlüsse auf die Art der Vegetation geschlossen werden. In diesem Versuch erhalten Sie eine wässrige Lösung, die sehr geringe Konzentrationen von drei verschiedenen Lignin-Oxidationsprodukten oder anderen relevanten Umweltmarkern enthält. Zu diesen gehören zum Beispiel die Vanillinsäure oder die Zimtsäure. Ziel des Versuches ist es die Verbindungen mittels geeigneter Festphasenextraktion anzureichern und anschließend mittels HPLC-HRMS zu analysieren.

Gruppe	Analyten
1	p-Hydroxyacetophenon Vanillinsäure Pinsäure
2	Syringaldehyd Cumarsäure Methansulfonsäure
3	Ferulasäure Acetovanillon Pinonsäure
4	Salicylsäure Pinsäure p-Hydroxyacetophenon
5	Vanillin Acetosyringon Camphersäure

Durchführung und Auswertung

Vor Tag 1 und für das Kolloquium

Wählen Sie aus den folgenden Festphasen-Materialien ein geeignetes Material zur Anreicherung der Ihnen zugewiesenen Verbindungen aus. Recherchieren Sie auf den Internetseiten der Hersteller geeignete Methoden. Welche Lösungsmittel benötigen Sie zur Konditionierung Ihres Materials, welche zur Elution? Benötigt Ihre Probe einen bestimmten pH-Wert?

Verfügbare Festphasenmaterialien:

Hydrophilic-lipophilic balanced (HLB), 60 mg, Oasis Waters

Strong anion-exchange (MAX), 30 mg, Oasis Waters

Weak-anion exchange (WAX), 60 mg, Oasis Waters

Strong cation exchange (SCX), 1 g, Supelco

C₁₈ – Material (DSC-18), 100 mg, Supelco

- Berechnen Sie die monoisotopische Masse der deprotonierten Form [M-H]⁻ Ihrer drei Analyten bis auf die vierte Nachkommastelle genau.
- Informieren Sie sich über Validierung analytischer Methoden, welche Parameter gibt es und wie werden diese bestimmt und berechnet? (Sie finden online eine „Leitlinie zur Methodvalidierung“ vom Deutschen Umweltbundesamt)
- Überlegen Sie sich 7 sinnvolle Standardkonzentrationen für eine Kalibrierung im Bereich 1-1000 ppb und berechnen Sie die zu pipettierenden Volumina ausgehend von einer Stammlösung mit 10 µg/mL.
- Welche Elutionsreihenfolge erwarten Sie bei Ihren drei Verbindungen und warum?
- Bereiten Sie sich sorgfältig auf alle verwendeten Instrumente und Techniken vor!

Tag 1

Sie erhalten einen 100 mL Kolben mit einer Lösung, die unbekannte Konzentrationen von drei Verbindungen enthält. Füllen Sie den Kolben mit ultrareinem Wasser (Milli-Q) bis zur Eichmarke auf und entnehmen sie drei Aliquote von jeweils 10 mL. Eine der drei Proben dotieren Sie **VOR** der Festphasenextraktion mit 100 ng ihrer Verbindungen aus einer Stammlösung mit 10 µg/mL (diese erhalten Sie von den AssistentInnen).

Nutzen Sie nun das vorher von Ihnen gewählte Festphasenmaterial zur Anreicherung. Nach der Elution Ihrer Proben versetzen Sie eine der nicht-dotierten Proben mit der gleichen Menge der Standardlösung wie die vorher dotierte. Sie benötigen die dotierten Proben später für die Validierung Ihrer Methode zur Bestimmung der Wiederfindung und Matrix-Effekte.

Alle Elutionen evaporieren Sie unter einem Stickstoffstrom bei 30°C bis zur Trockenheit. Anschließend geben Sie 500 µL einer Acetonitril/Wasser (1:9) Lösung zu und bewahren Ihre Proben im Kühlschrank auf.

Zur späteren Quantifizierung Ihrer Proben setzen sie eine Standardreihe mit verschiedenen Konzentrationen im Bereich 1-1000 ppb an. Wählen Sie 7 sinnvolle Konzentrationen und setzen Sie diese in jeweils 1 mL Acetonitril/Wasser (1:9) an. Sie erhalten dazu eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 µg/mL. Zusätzlich benötigen Sie eine Blindprobe von 1 mL Acetonitril/Wasser (1:9).

Tag 2

Nutzen Sie eine Ihrer hochkonzentrierten Standardlösungen zur Entwicklung einer Trennmethode für Ihre drei Verbindungen. Ziel ist es, einen Gradienten zu entwickeln, mit der alle drei Verbindungen in einem Zeitraum von maximal 15 Minuten basisliniengetrennt vorliegen.

Zur Methodenentwicklung steht Ihnen eine Pentafluorophenyl-Säule (PFP) sowie folgende Lösemittel zur Verfügung

Eluent A: H₂O/ACN (98:2) mit 400 µL/L Ameisensäure

Eluent B: H₂O/ACN (2:98)

Mit der von Ihnen entwickelten Methode messen Sie über Nacht Ihre Standardreihe in Doppelbestimmung, außerdem Ihre Proben jeweils in dreifach-Bestimmung. Wählen Sie eine der Standard-Lösungen aus und messen Sie diese fünf Mal zur Bestimmung der Wiederholbarkeit. Ihre Blindprobe messen sie zehn Mal.

Tag 3

Erstellen Sie mithilfe des Assistenten/der Assistentin eine *processing methode* zur automatisierten Auswertung Ihrer Messungen.

Mithilfe Ihrer Kalibrierung sind sie in der Lage den Gehalt der drei Verbindungen in Ihrer nicht dotierten Probe zu bestimmen (beachten Sie den Anreicherungsfaktor und geben Sie den Fehler an). Bestimmen Sie weiterhin folgende Parameter der Methodvalidierung: Wiederholbarkeit, Wiederfindung, Matrix-Effekte, sowie Detektionsgrenze und Quantifizierungsgrenze. Diskutieren Sie Ihre Methodenentwicklung und Ihre Ergebnisse in Ihrem Protokoll und beantworten Sie die Fragen und Aufgaben, die unten aufgelistet sind.

Anmerkungen zur Bestimmung der Parameter der Methodvalidierung:

1. Wiederholbarkeit

In diesem Versuch bestimmen wir ausschließlich die Messpräzision innerhalb einer Tagesserie.

2. Wiederfindung

In diesem Versuch soll die Wiederfindung der vor der SPE dotierten Probe mit der Wiederfindung der nach der SPE dotierten Probe verglichen werden. Verwenden Sie folgende Formel für die Berechnung:

$$\text{Wiederfindungsrate } W = \frac{S_1 - S_2}{S_3} \cdot 100 [\%]$$

Hierbei bezeichnet S_1 die Konzentration der entsprechend vor oder nach der SPE dotierte Probe. S_2 ist die undotierte Probe. S_3 ist die Konzentration einer Standardlösung, welche der Soll-Endkonzentration Ihrer Dotierung entspricht. Berechnen Sie ebendiese und beachten Sie bei dem Ansetzen Ihrer Kalibrierlösungen, dass Sie diese Konzentration ebenfalls benötigen.

Anmerkungen zur Auswertung im Allgemeinen:

Beachten Sie, dass sie den ermittelten Blindwert (Mittelwert der 10 Messungen Ihrer Blindprobe) von allen Werten, die Sie verwenden, vorher subtrahieren. Bei der Bestimmung der Detektions- und Quantifizierungsgrenze kann der Blindwert nicht subtrahiert werden.

Fragen und Aufgaben für das Protokoll:

- Begründen Sie die Wahl Ihres Festphasenmaterials und der Trennsäule.
- Welchen Zweck hat eine Festphasenextraktion neben der Anreicherung noch?

- Warum ist auch bei der Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers eine vorherige chromatographische Trennung sinnvoll?
- Welche Vorteile hat die hochauflösende Massenspektrometrie im Vergleich zu gewöhnlichen Massenspektrometern?
- Erläutern Sie die Relevanz Ihrer Analyten in der Umwelt.