

5. Methodenvergleiche, Material und ausgewählte Methoden

5.1 Methodenvergleich – Fettextraktion

Die Anreicherung der zu untersuchenden Schadstoffe erfolgt wegen ihrer starken Lipophilie im Fettgewebe. Aus diesem Grunde war es notwendig, das extrahierbare Fett von der restlichen Matrix zu isolieren.

Ziele des Methodenvergleiches - Verglichen wurden in diesem Kapitel das Soxhlet-Verfahren und die Mikrowelle zur Extraktion des Fettes aus biologischer Matrix (Ganzfischhomogenat). Die Soxhlet-Apparatur kann zur Extraktion von Fett aus organischer Substanz eingesetzt werden und ist seit langer Zeit bewährt, leider jedoch zeit- und kostenintensiv. Die Mikrowellentechnik, als Alternative, ist der Soxhlet-Methodik hinsichtlich Arbeits- und Zeitaufwand und der Kosten zur Betreibung der Anlage klar überlegen. Ziel dieses Methodenvergleiches ist es, die Bedingungen zur Extraktion mit der Mikrowelle zu optimieren und die optimierte Mikrowellentechnik mit den Ergebnissen der Soxhlet-Extraktion zu vergleichen. Dabei wird für die Methodenoptimierung kein Absolutheitsanspruch erhoben, sondern lediglich eine Verbesserung der für die nachfolgenden Untersuchungen notwendigen Extraktionen angestrebt.

Vorbereitung - Ganzfischhomogenat diente als Ausgangsmaterial. Dazu wurden Brassen mit Hilfe eines Waring Blendor Labormixers unter Zusatz einer definierten Menge bidestillierten Wassers zu einer breiförmigen Masse homogenisiert, diese in Petrischalen abgefüllt und zwecks Wasserentzugs gefriergetrocknet.

Analyse - Die fettfreie Matrix wurde post extractionem mittels Faltenfilter von dem Lösungsmittel getrennt, das Lösungsmittel mit einem Rotationsverdampfer bis auf etwa 2 ml eingengt und unter Stickstoff bis zur Lösungsmittelfreiheit abgedampft. Durch Rückwaage des verwendeten Glaskolbens konnte der Fettgehalt der Probe ermittelt werden.

Bei einigen Optimierungsversuchen war es möglich, allein durch die Quantität der ermittelten Fettrückwaage auf den Grad der Optimierung zu schließen. Bei anderen Versuchen wurde es notwendig, mittels Gelchromatographie im Autoprep 1002 A und anschließender gaschromatographischer Bestimmung mittels GC/ECD die Schadstoffsubstanzen im extrahierten Fett zu analysieren, um die Qualität der Methode abschätzen zu können.

5.1.1 Extraktionssystem Mikrowelle

Beschreibung des Gerätes - Bei der Mikrowellen-Technik wird ein Gerät verwendet (MSP-1000 der Firma CEM), welches speziell für die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln ausgestattet ist. Die Mikrowellen-Apparatur enthält, über ein mit einem Sensor ausgestattetes Referenzgefäß, eine integrierte Steuerungsmöglichkeit für Druck und Temperatur und arbeitet mit einer Höchstleistung bis zu 630 Watt und einer Frequenz von 2450 MHz.

Bis zu 12 druckstabile Gefäße aus Polytetrafluorethylen mit einem Fassungsvermögen von etwa 100 ml stehen als Extraktionsbehälter zur Verfügung. Da die Extraktion unter Druck und bei zum Teil hohen Temperaturen von 70 °C bis 140 °C stattfindet, sind verschiedene Sicherungssysteme notwendig. Der Ofenraum selbst ist gegenüber der Umgebung nach außen explosionsgeschützt und die transparente Türscheibe durch eine zusätzliche Klappe geschützt. Alle Probengefäße sind an einen Auffangbehälter angeschlossen, dessen probengefäßnaher Teil durch eine Berstscheibe bis zu einem definierten Druck das Probengefäß vom Auffangbehälter trennt. Ein Lösungsmitteldetektor sorgt für eine sofortige Abschaltung der Heizung im Falle einer Störung.

Während der Extraktion befinden sich die Probengefäße auf einem rotierenden Karussell, um die Energie der Mikrowellen gleichmäßig auf alle 12 Gefäße zu verteilen.

Die Abkühlzeit ist variabel und abhängig unter anderem von der Ventilator Kühlung des Gerätes und der vorgegebenen Temperatur. Sie betrug in den vorgenommenen Versuchen zwischen 20 und 50 Minuten und konnte über ein Display kontrolliert werden, wobei der Kühlmechanismus bei 24 °C Lösungsmitteltemperatur automatisch ausgeschaltet wird. Die Polytetrafluorethylenbehälter des Gerätes wurden nicht bei Temperaturen über 30 °C geöffnet, da generell die Gefahr des Abdampfens leichtflüchtiger Schadstoffe besteht.

5.1.1.1 Optimierung der Mikrowellenextraktion

Um optimale Extraktionsbedingungen für die Mikrowellen-Technik im Temperatur- und Zeitprogramm, mit der Lösungsmittelmenge und –art und mit der Trennung von Lösungsmittel und Matrix post extractionem zu erreichen, waren Optimierungsarbeiten notwendig, die im folgenden beschrieben werden.

Interne Standards - In allen Versuchen, die in diesem Kapitel beschrieben werden, fanden Aldrin und Mirex als interne Standards Verwendung.

ART DES LÖSUNGSMITTELS

Die Verwendung der Lösungsmittelart ist abhängig von der Siedetemperatur und von der Polarität der zu extrahierenden Substanzen. Des Weiteren besitzen einige Lösungsmittelgemische ungünstig lange Aufheizzeiten, wie etwa Toluol-Methanol im Gemisch 10:1 (ENDERS, 1996).

Anders als bei der Extraktion mit der Soxhlet-Apparatur ist darauf zu achten, daß der Anteil einer durch Mikrowellen anregbaren Komponente nicht zu gering ausfällt. Hierzu ist zur Wärmeübertragung eine bestimmte Polarität Voraussetzung. Aus diesem Grunde war es unumgänglich, ein unpolares Lösungsmittel (Extraktion der lipophilen Matrixanteile) mit einem relativ polaren Lösungsmittel (Mikrowellenwärmeübertragung) zu mischen.

4 verschiedene Lösungsmittelgemische fanden Verwendung.

Tabelle 5.1: Variationen von Lösungsmittelgemischen bei der Fettextraktion mit der Mikrowellentechnik

Lösungsmittelkonditionen			ramp
1.	n-Hexan und Aceton im Gemisch	1:1	ca. 1,5 min
2.	n-Hexan und Aceton im Gemisch	3:1	ca. 2,5 min
3..	n-Hexan und Aceton im Gemisch	9:1	ca. 5 min
4.	Chloroform und Methanol im Gemisch	1:1	ca. 1,5 min

ramp = Zeitspanne bis zum Erreichen der eingestellten Extraktionstemperatur

Da Chloroform einen Siedepunkt von 61,7 °C, Methanol einen von 64,5 °C, n-Hexan einen von 68,7 °C und Aceton einen Siedepunkt von 56 °C hat, wurde in Bezug auf die möglicherweise stattfindende Siedepunktverschiebung bei Lösungsmittelgemischen eine Temperatur von 100 °C vorgegeben, die eine Stunde gehalten wurde.

Art des Lösungsmittels – Dateninterpretation - Es konnte beobachtet werden, daß die Zeit bei einer für die Mikrowellen-Technik ungünstigen Verschiebung der Lösungsmittelpolarität (bei einem n-Hexan-Aceton-Gemisch 9:1 beispielsweise) zur Erreichung der eingestellten Temperatur (ramp) sich zum Teil erheblich verlängerte. Diese Verlängerung der Aufwärmphase wurde zur Veranschaulichung in Tabelle 5.1 dargestellt.

Bei der Extraktion mit den verschiedenen n-Hexan-Aceton Gemischen ist kein signifikanter Unterschied in der Fettgewinnung zu verzeichnen.

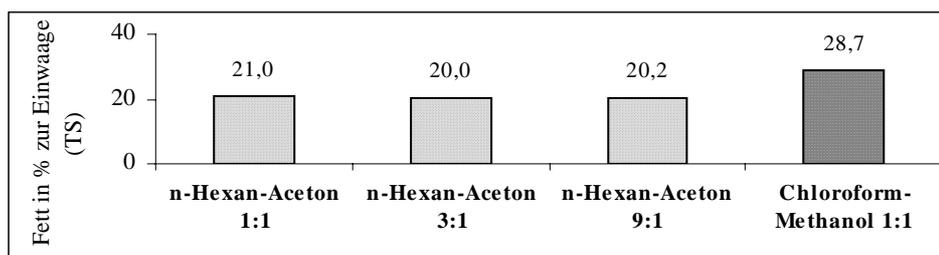


Abbildung 5.1: Ergebnisse der Fettextraktion nach der Verwendung verschiedener Lösungsmittelgemische bei der Extraktion mit der Mikrowellen-Technik

Die Menge des durch das Chloroform-Methanol-Gemisch extrahierten Rückstandes übersteigt mit annähernd 30 % das Gewicht, welches mit einem n-Hexan-Aceton-Gemisch extrahiert werden konnte (Abbildung 5.1). Da die Schadstoffe im zu extrahierenden Fett angereichert werden, wurde zur Klärung dieser Differenz eine Schadstoffanalyse aller Proben durchgeführt.

Die Ergebnisse dieses Analysevergleiches zeigten deutlich eine mindere Schadstoffbelastung in dem Rückstand, der aus der Chloroform-Methanol-Extraktion gewonnen wurde. Da es sich um Ausgangsmaterial desselben Matrixpools handelte, konnte darauf geschlossen werden, daß neben den Fetten noch schadstoffarme bzw. -freie Fraktionen (Proteine) bei der Extraktion durch das Chloroform-Methanol Gemisch aus der Matrix herausgelöst wurden.

Ergebnis: Als das günstigste Lösungsmittelgemisch erwies sich n-Hexan-Aceton zu gleichen Teilen.

TEMPERATUR WÄHREND DER EXTRAKTION

Zur Optimierung wurden Programme mit 5 verschiedenen Temperaturen gewählt.

Tabelle 5.2: Temperaturvariationen zur Fettextraktion mit der Mikrowellen-Technik

70 °C	80 °C	100 °C	120 °C	140 °C
-------	-------	--------	--------	--------

30 ml eines n-Hexan-Aceton-Lösungsmittelgemisches im Verhältnis 1:1 dienten für 1 g Einwaage als Extraktionsflüssigkeit. Die Anlaufzeit (ramp) betrug 3 min und die Laufzeit (hold) 30 min.

Auf mehr als 140 °C wurde nicht erhitzt, da trotz des geschlossenen Systems ein Verlust von Schadstoffen durch deren Zerstörung bei zu hohen Temperaturen erwogen werden mußte. Des weiteren war auf die Leistungsfähigkeit des Gerätes Rücksicht zu nehmen, zumal sich eine höhere Schadstoffausbeute durch Temperaturen >140 °C nicht abzeichnete. 70 °C als Mindesttemperatur ergab sich aus den Siedetemperaturen der verwendeten Lösungsmittel.

Temperaturprogramm – Dateninterpretation - Die extrahierte Menge Fett fiel bei der Extraktionstemperatur von 70 °C um 6 % geringer aus, als bei Temperaturen von 80 °C, 100 °C, 120 °C und 140 °C. Zwischen 80 °C und 140 °C gab es keine signifikanten Unterschiede in der Ausbeute der Fettrückwaage.

Eine Schadstoffanalyse der Proben ergab, daß eine Abnahme der Schadstoffkonzentration der Erhöhung der Temperatur umgekehrt proportional entgegenstand.

Ergebnis: Das günstigste Temperaturprogramm lag bei 80 °C zur Fettextraktion mit der Mikrowellen-Technik und einem Lösungsmittelgemisch aus n-Hexan und Aceton zu gleichen Teilen. Diese Temperatur bot zudem die Vorteile der Energiekostensenkung, der schnelleren Abkühlzeit und der sichereren Handhabung.

LÖSUNGSMITTELMENGE ZUR EXTRAKTION

Um eine Fettsättigung des Lösungsmittelgemisches auszuschließen und gleichzeitig das Minimum des Lösungsmittelleinsatzes zu erproben, wurden die vier in Tabelle 5.3 aufgeführten Mengen eines Lösungsmittelgemisches von n-Hexan und Aceton im Verhältnis 1:1 benutzt.

Tabelle 5.3: Lösungsmittelmengenvariation (n-Hexan-Aceton zu gleichen Teilen) zur Fettextraktion mit der Mikrowellen-Technik

20 ml	30 ml	40 ml	50 ml
-------	-------	-------	-------

Die Extraktion mit 10 ml war nicht möglich, da bei dem Einsatz von 1 g Einwaage (TS) durch den zu geringen Lösungsmittelleinsatz kein Flüssigkeitsspiegel vorhanden war, der das Aufheizen der Probenmatrix auf eine Temperatur von 80 °C gewährleisten konnte.

Die Anlaufzeit (ramp) der Mikrowellen-Technik belief sich auf 3 min, die Laufzeit (hold) auf 30 min.

Lösungsmittelmenge – Dateninterpretation - Bei einer Einwaage von etwa 1,5 g wasserfreier Matrix und bei einem zu erwartenden Fettgehalt von ca. 16 % waren 20 ml Lösungsmittelgemisch ausreichend. Dieses Ergebnis hatte auch bei starker Steigerung der Probeneinwaage bis 5 g bei fixer Lösungsmittelmenge von 20 ml Bestand. Einwaagen von mehr als 5 g des wasserfreien Fischhomogenates waren für den Methodenvergleich nicht relevant.

Ergebnis: Die Lösungsmittelmenge wird aufgrund technischer Parameter auf 20 ml limitiert, welche ausreichen um 5 g Probeneinwaage (TS) mit einem zu erwartenden Fettgehalt von bis zu 30 % zur Einwaage (TS) zu extrahieren. Dabei kann ein Faktor von

$$8 \text{ ml Lösungsmittelgemisch/g Einwaage (TS)}.$$

ermittelt werden.

EXTRAKTIONSDAUER

4 unterschiedliche Zeitvorgaben dienten zur Ermittlung der niedrigsten Extraktionszeit ohne Substanzverluste.

Tabelle 5.4: Zeitvariationen (hold) bei der Fettextraktion mit der Mikrowellen-Technik

10 Minuten	20 Minuten	30 Minuten	60 Minuten
------------	------------	------------	------------

Extraktionsdauer – Dateninterpretation - Weder in der Fettrückwaage noch in der Schadstoffanalyse ließen sich Unterschiede erkennen.

Ergebnis: Nach einer Anlaufzeit von 3 Minuten (ramp), 10 Minuten Extraktionszeit und der entsprechenden Abkühlzeit bis < 30 °C war eine optimale Fettextraktion bei der Mikrowellen-Technik zu erreichen.

PRINZIP DER EINFACH- UND DOPPELEXTRAKTION

Hierbei sollte der Frage nachgegangen werden, ob es durch eine Zweitextraktion mit gleicher Fischmatrix aber ausgetauschtem Lösungsmittelgemisch zur zusätzlichen Fettextraktion und einer eventuell gesteigerten Schadstoffgewinnung kommt.

Tabelle 5.5: Prinzip der Einfach- und der Doppelextraktion von Fett mit der Mikrowellen-Technik

1. Einfachextraktion	10 Minuten
2. Doppelextraktion	2 x 10 Minuten

Einfach- und Doppelextraktion – Dateninterpretation - Die Analyse zeigte, daß weder ein signifikanter Verlust noch ein Zugewinn, sondern lediglich die Konstanz der Substanzen in Quantität und Qualität zu verzeichnen war. Somit ist der Aufwand und der Kostenfaktor einer Doppelextraktion nicht zu rechtfertigen.

Ergebnis: Die Doppelextraktion führt im Vergleich zur einmaligen Extraktion zu keiner Optimierung.

TRENNUNG VON MATRIX UND LÖSUNGSMITTEL POST EXTRACTIONEM

Die Trennung von Matrix und Lösungsmittel nach erfolgter Extraktion kann zu Verlusten oder fehlerhaften Ergebnissen führen.

Die Ziele für eine möglichst erfolgreiche Trennung beider Kompartimente stellen sich wie folgt dar:

- a.) vollständige Trennung von Lösungsmittel (fetthaltig) und Restmatrix
- b.) kein Verlust an Lösungsmittel bei der Trennung
- c.) kein Verlust der Lösungsmittelbestandteile nach der Extraktion (Fett)
- d.) keine Verunreinigung durch an der Trennung beteiligte Komponenten

Um diese Voraussetzungen zu erfüllen, wurden mehrere Möglichkeiten zur Abfiltrierung der Restmatrix überprüft:

- Trennung durch Glasfaserhülsen, wie sie für die Soxhlet-Apparatur verwendet werden (wobei sich die Probe schon während der Extraktion im Polytetrafluorethylenbecher der Mikrowelle in dieser Glasfaserhülse befindet)
- Trennung mit Hilfe eines Glastrichters, in dessen Verjüngung eine etwa 1 cm starke, dichtgestopfte Schicht Glaswatte als Filtermaterial eingebracht wird
- Trennung wie vorhergehend mit dem Zusatz der Übersichtung der Glaswatte mit einer etwa 1 cm starken Schicht aus wasserfreiem Natriumsulfat
- Trennung mit Hilfe eines Glastrichters und eines Faltenfilters (Durchmesser: 125 mm, 595 ½)

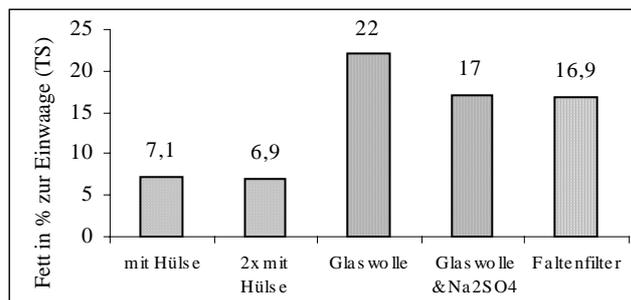


Abbildung 5.2: Fettrückwaage in % zur Einwaage (TS) nach Verwendung verschiedener Möglichkeiten zur Trennung von Lösungsmittel und Matrix nach der Fettextraktion mit der Mikrowellen-Technik

Extrakttrennung – Dateninterpretation -

Die Trennung mittels Soxhlet-Hülse führte zur Adsorption des Fettes, welche auch durch eine Doppelextraktion nicht aufzuheben war.

Eine Trennung durch Glaswolle zeigte die deutliche Sedimentierung von Fremdstoffen aus der Matrix, welche zu höheren Rückwaagewerten führte.

Die Abtrennung der Restmatrix vom Lösungsmittel durch Glaswolle mit überschichtetem Natriumsulfat und die Trennung durch Faltenfilter zeigten gleichwertige Ergebnisse, wobei die Arbeit mittels Faltenfilter einer einfacheren Handhabung unterliegt und als gesundheitsunbedenklicher zu betrachten ist. Graphisch ist diese Analyse in der Abbildung 5.2 dargestellt.

Alle Aussagen wurden in der Schadstoffanalyse bestätigt.

Ergebnis: Zur Trennung von Matrix und Lösungsmittel nach der Fettextraktion mit der Mikrowellen-Technik hat sich der Faltenfilter als die günstigste Methode erwiesen.

5.1.2 Optimierte Bedingungen der Mikrowellen-Technik und die Soxhlet-Apparatur

- eine Gegenüberstellung -

Soxhlet-Methodik - Die Soxhlet-Apparatur wurde mit 150 ml eines Lösungsmittelgemisches aus n-Hexan und Aceton im Verhältnis 9:1 gefüllt. Vorbereitete Glasfaserhülsen wurden mit jeweils 1,3 g wasserfreier Probe versehen, und die Extraktion erfolgte für 8 Stunden (etwa 12 Umläufe pro Stunde) bei etwa 90 °C.

Das so gewonnene fetthaltige Lösungsmittelgemisch wurde mittels Rotationsverdampfer auf 1 bis 2 ml eingengt und unter Stickstoff lösungsmittelfrei eingedampft. Anschließend konnte die gewonnene Fettmenge rückgewogen werden.

Mikrowellen-Methodik - Als Methode für die Extraktion durch die Mikrowelle wurde das während der Optimierung ermittelte Verfahren verwandt, das so gewonnene fetthaltige Lösungsmittelgemisch in gleicher Weise wie der Fettextrakt aus der Soxhlet-Apparatur aufbereitet und die Fettgewichte entsprechend bestimmt.

Methodenvergleich – Dateninterpretation - Die Abbildung 5.3 steht exemplarisch für eine ganze Reihe von Versuchen, wobei die Werte beider Systeme zwischen 11,5 % und 12,7 % extrahierbarem Fett in Bezug auf die Einwaage (TS) schwankten, ohne erkennbare Vorteile eines der beiden Systeme.

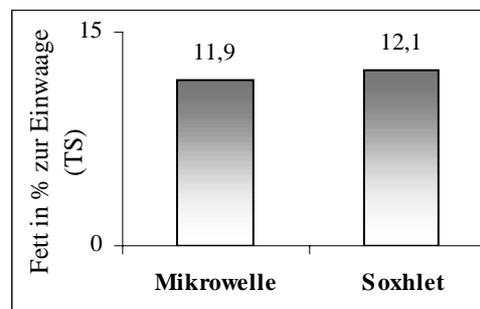


Abbildung 5.3: Ergebnisse der Fettrückwaage post extractionem im Vergleich zwischen Mikrowellen-Technik und Soxhlet-Apparatur

Beide Methoden unterlagen auch einer Schadstoffüberprüfung, die ebenfalls zu keiner Differenz im Ergebnis führte.

Ergebnis: Beide Systeme können in der Schadstoffanalyse als gleichwertig betrachtet werden.

SCHLUSSBETRACHTUNG DES MIKROWELLEN – SOXHLET-METHODENVERGLEICHES

Die Fettextraktion von wasserfreiem Fischhomogenat mit der Mikrowellen-Technik kann empfohlen werden. Bei gleichen Wiederfindungsraten ist die Mikrowelle der Soxhlet-Apparatur technisch überlegen (siehe dazu Tabelle 5.6). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von GRAMANN und SCHARENBERG (1996), die die Extraktion von Fett aus Hechtfilet mittels beider Prozeduren zur Fett- und Schadstoffextraktion verglichen hatten.

Tabelle 5.6: Vorteile der beiden überprüften Extraktionsmethoden für wasserfreies Fischhomogenat

Soxhlet-Apparatur	Labor-Mikrowelle
1. abgesicherte Methodik	1. sparsamer Lösungsittelverbrauch
2. reine Kohlenwasserstoffe für Extraktion verwendbar	2. schnelle Extraktion
	3. leichte Handhabung
	4. bis zu 12 Proben gleichzeitig extrahierbar