

## 5.2 Methodenvergleich - Schadstoffextraktion

Nachdem das Fett aus der homogenisierten Fischmatrix extrahiert wurde, war es notwendig, die Schadstoffe aus diesem Fettextrakt zu isolieren, um sie gaschromatographisch messen und auswerten zu können.

Methoden, die hierfür zur Verfügung stehen, sind zum Teil aufwendig und teuer.

Die Gelchromatographie mit Hilfe des Autoprep 1002 A gehört zu den standardisierten Methoden, wie sie in vielen Laboratorien in der Routine eingesetzt werden.

Eine der Alternativmethoden zur Isolierung dieser Schadstoffe ist die Aufarbeitung mittels Florisil-Kieselgel-Säulen. Aus laborinterner Mitteilung war bekannt, daß an anderen Instituten mit der Schüttung von Silikatgemischsäulen aus Florisil und Kieselgel zur Trennung von Fettmolekülen und Schadstoffen erfolgreich gearbeitet wurde (EBELING, mündliche Mitteilung, 1997).

Kieselgel fand aufgrund der Arbeit von SPECHT und TILLKES (1980) Verwendung.

Neue vielversprechende Methoden zur Schadstoffisolierung werden durch mehrere große Firmen als Produkte zur Festphasenextraktion angeboten und vertrieben. Eine dieser Methoden stellt die „solid phase extraction“ (SPE) dar, die mittels eines neuen Verfahrens, bezeichnet als „matrix solid phase dispersion“ (MSPD), Pestizide aus einer Vielzahl von Matrices schnell und einfach isoliert.

Alle drei Methoden wurden in diesem Kapitel eines Vergleiches unterzogen.

**Ziele des Methodenvergleiches** - Zielsetzung dieses Methodenvergleiches war es, eine Methode zu erstellen, die qualitativ mindestens gleichwertige Ergebnisse erbringt wie die der Gelchromatographie im Autoprep, jedoch eine schnellere, technisch weniger anspruchsvolle und kostengünstigere Handhabung erlaubt. Zusätzlich sollten chlorierte Kohlenwasserstoffe ebenso wie Nitromoschusduftstoffe gleichzeitig eluiert werden können. Bei der Einspritzung in den Autoprep zur Gelchromatographie werden nur 50 % der Probe vom Gerät zur Trennung genutzt, somit die oftmals ohnehin geringen Schadstoffgehalte der Proben zwangsläufig halbiert. Auch dieser Verlust sollte nach Möglichkeit bei einer Alternativmethodik umgangen werden.

Um diese Zielsetzung zu erreichen, wurden sowohl verschiedene Materialien, als auch die Konzentrationsverschiebungen innerhalb unterschiedlicher Gemische in die Untersuchungen einbezogen.

**Vorbereitung** - Ein wie im Kapitel „5.2. Methodenvergleich – Fettextraktion“ aufbereitetes Fischhomogenat diente als Ausgangssubstanz, aus dessen Matrix das zu eluierende Fett mittels Mikrowellen-Technik extrahiert wurde.

**Analyse** - Ausgewertet wurden Probengruppen von mindestens 6 Einzelproben, deren Median als Ergebnis diente.

Das aufgefangene Eluat wurde mit 1 ml Dodecan versetzt, mit dem Rotationsverdampfer auf etwa 2 ml eingengt, mittels Stickstoff auf 0,5 bis 1 ml abgedampft, mit Isooctan auf 1 ml aufgefüllt, in Mini-Vials abgefüllt und gaschromatographisch im GC/ECD analysiert und quantifiziert.

**Interne Standards** - Aldrin und Mirex dienten bei allen Nativproben als interne Standards. Während der Optimierungsversuche im Bereich der Sorptionsmaterialien und der Lösungsmittel, wurden Referenzsubstanzen von Chlorkohlenwasserstoffen und Nitromoschusduftstoffen in der Konzentration von 10 pg/µl benutzt, welche in Isooctan gelöst oder zur Überprüfung von Matrixeffekten in Nativproben Verwendung fanden.

### 5.2.1 SPE-Säulchen

**Beschreibung der Methode** - Das zerkleinerte, homogenisierte oder extrahierte Material wird auf eine „Bond Elut Kartusche“ gegeben, die spritzenförmig das Sorptionsmaterial enthält. Anschließend erfolgt die Spülung mit 5 ml Dichlormethan in der Geschwindigkeit von 5 ml/min. Dieser Schritt wird wiederholt und kann unter Vakuum (spezielle Vorrichtung notwendig) oder durch leichten Druck mittels Spritzenstempel im „flow“ gesteuert werden. Anschließend wird das Eluat entsprechend eingengt und gaschromatographisch ausgewertet.

**Dateninterpretation** - Die Affinität des Probenmaterials war nicht ausreichend, um die 50 mg des verwendeten Fettextraktes, die ein Minimum zur Messung der Schadstoffkonzentration darstellten, vollständig zu binden, so daß eine Auswertung mittels GC/ECD durch Fettkontamination im Eluat nicht möglich war.

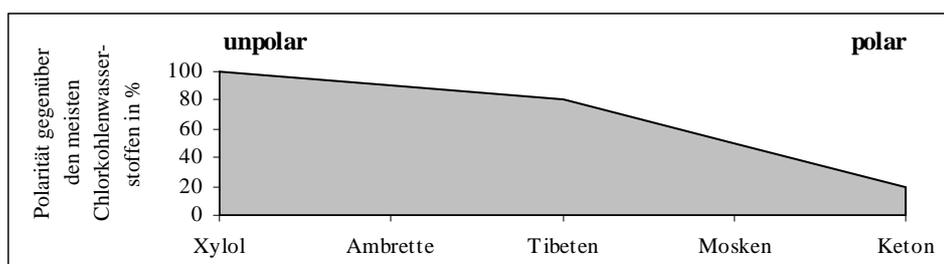
**Ergebnis:** Eine Elution von extrahiertem Fett oder wasserfreiem Fischhomogenat war nicht erfolgreich.

### 5.2.2 Florisil-Kieselgelgemische

Da für die gemeinsame Elution von Nitromoschusduftstoffen und chlororganischen Schadstoffen mit Florisil-Mini-Säulen noch keine Erfahrungen zur Verfügung standen, wurde vor dem Methodenvergleich mit dem Autoprep-1002A eine Optimierung dieser Florisil-Mini-Säulen-Chromatographie durchgeführt.

**Bedingungen für die Elution der verschiedenen Substanzklassen** - Die Überprüfung der Bedingungen zur Elution schloß die Menge und das Verhältnis des Adsorptionsmaterial-Gemisches, die Art und die Menge der Lösungsmittel und die Elutionsgeschwindigkeit ein.

Da für die Elution eine Polarität erforderlich war, die den zu eluierenden Stoffen entsprach, war es notwendig, diese Polarität je nach Bedarf zu variieren. Eine besondere Schwierigkeit bestand in der Elution von Moschus-Keton, da diese Substanz sich als signifikant polarer erwies als die zu isolierenden Chlorkohlenwasserstoffe. Insgesamt konnte nur Moschus-Xylol mit der Polarität von Chlorkohlenwasserstoffen verglichen werden (Abbildung 5.4).



**Abbildung 5.4:** Schema zur Polaritätsbeschreibung der Nitromoschusduftstoffe

#### Möglichkeiten der Polaritätsvariation

- Mischung unterschiedlicher Lösungsmittel differenter Polarität
- Desaktivierungsgrad des Sorptionsmaterials (Florisil)
- Konditionierungsart der geschütteten Säule

### ART UND MENGE DES ADSORBENS

Grundlage dieses Methodenversuches war die Schadstoffgewinnung aus 1g extrahiertem Fett, da diese Menge ein Optimum an zu analysierender Schadstoffkonzentration im Fischfett darstellt, wie in Vorversuchen festgestellt werden konnte. Zur Bindung dieses 1 g Fettes waren 8 g Silikatgemisch notwendig. Aufbauend auf den Erfahrungen von SPECHT und TILLKES (1980), die 2 g Kieselgel zur Aufreinigung des Eluates verwendeten, erfolgte die Schüttung der Säulen mit Florisil und Kieselgel im Verhältnis 5:1.

### ART UND MENGE DES LÖSUNGSMITTELGEMISCHES

Die in Tabelle 5.7 vorgestellten Lösungsmittelgemische und deren Konzentrationen wurden in diesem Vergleich ausgewertet.

Polaritätsüberprüfungen fanden über die Variation bei der Konditionierung, über die Konzentrationsverschiebungen zwischen n-Hexan und Dichlormethan zueinander und über deren zeitliche Abfolge bei der Elution statt.

**Tabelle 5.7: Lösungsmittelgemische und deren Konzentrationsvariablen im Methodenvergleich bei der Aufarbeitung mittels Florisil-Mini-Säulen zur Chromatographie**

n-Hexan-Dichlormethan	n-Hexan-Toluol	n-Hexan-Aceton	Toluol-Aceton	Cyclohexan-Ethylacetat	Chloroform-Methanol
80:20	80:20	95:05	95:05	90:10	90:10
50:50	65:35	90:10	90:10	80:20	70:30
30:70	35:65	80:20	80:20	70:30	50:50
0:100	0:100	50:50	50:50	50:50	30:70

**Lösungsmittelgemische und deren Konzentration – Dateninterpretation** - Für die meisten dieser Lösungsmittelgemische mußte festgestellt werden, daß die optimale Polarität, um chlorierte Kohlenwasserstoffe und Nitromoschusduftstoffe gleichzeitig zu eluieren, ebenfalls Störkomponenten von der Säule spülte, die keine gaschromatographische Auswertung mehr erlaubten. Eine Polarität, die Störkomponenten im Eluat vermied, führte zur Wiederfindung von < 50 % Moschus-Keton.

Abhängigkeiten von Konditionierung und Wechsel der Konzentrationsverhältnisse während der Elution konnten festgestellt werden.

**Ergebnis:** Eine begrenzte Auswahl an Lösungsmittelgemischen (n-Hexan-Dichlormethan 80:20, 50:50 und n-Hexan-Toluol 65:35, 35:65) eignete sich erfolgreich, um chlorierte Koh-

lenwasserstoffe und die meisten Nitromoschusduftstoffe zu eluieren. Moschus-Keton 1\*) konnte ohne Störkomponenten nicht isoliert werden.

1\*) ermittelt mit Nativprobe und Referenzsubstanz

### ELUTIONSGESCHWINDIGKEIT

Die Elutionsgeschwindigkeit hängt unter anderem von der Fließeigenschaft des verwendeten Lösungsmittels, von der Schüttungsart der Säule (Naß- oder Trockenschüttung), von der Schüttungsbeschaffenheit (Florisil-Kieselgel im Gemisch oder in getrennten Schichten) und von einem wahlweise vollzogenen Kompressionsdruck ab.

**Ergebnis:** Die günstigste Elutionsgeschwindigkeit wird durch die Verwendung von n-Hexan-Dichlormethan im Gemisch (die besten Fließeigenschaften), Florisil-Kieselgel im Gemisch durch Trockenschüttung und ohne Kompressionsdruck erreicht.

### DESAKTIVIERUNGSGRAD DES ADSORBENS

Nach der Aktivierung des Adsorbens (Florisil und Kieselgel) im Muffelofen wurde schrittweise durch bidestilliertes Wasser desaktiviert.

Als Fixgröße wurde das benutzte Kieselgel mit bidestilliertem Wasser 1,5 %ig desaktiviert.

Florisil, als Variable, wurde

- 3 %ig,
- 5 %ig und
- 10 %ig desaktiviert.

**Desaktivierungsgrad des Adsorbens – Dateninterpretation** - 5 %ige und 10%ige Desaktivierung des Florisils ist durch Polaritätsverschiebung zugunsten von Störkomponenten, die bei der säulenchromatographischen Aufarbeitung von Fischfett aus Nativproben eluiert werden, nicht zu empfehlen. Die Elution von Moschus-Keton (Wiederfindung > 50 %) gelang bei 3%iger Florisildesaktivierung nicht.

**Ergebnis:** Für Kieselgel kann die 1,5 %ige und für Florisil die 3 %ige Desaktivierung als das günstigste Desaktivierungsniveau zur Isolierung von Chlorkohlenwasserstoffen und den meisten Nitromoschusduftstoffen gelten.

### KONDITIONIERUNG DES ADSORBENS

Da weder der Desaktivierungsversuch des Adsorbens, noch die Änderung der Polaritäten im Lösungsmittelgemisch erfolgreich waren, um Moschus-Keton ohne Störkomponentenelution zur Schadstoffanalyse im GC heranzuziehen, wurde die Konditionierung der Säule mit verschiedenen Lösungsmitteln und –gemischen vor Auftragen des Probenmaterials untersucht (Tabelle 5.8).

**Tabelle 5.8: Konditionierungsvariablen der Florisil-Mini-Säulen im Methodenvergleich**

n-Hexan	n-Hexan- Dichlormethan 80:20	n-Hexan- Dichlormethan 50:50	n-Hexan- Dichlormethan 20:80	Dichlormethan
---------	------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	---------------

**Ergebnis:** Als Optimum für die Konditionierung der Säulen zur Schadstoffelution aus Fett ergab sich die Kombination von n-Hexan und Dichlormethan im Verhältnis 80:20. Dies gilt unter der Voraussetzung, daß als Elutionsspülflüssigkeit dieses Lösungsmittelgemisch ebenfalls Verwendung findet und unter der Einschränkung, daß Moschus-Keton nicht erfolgreich eluiert werden konnte.

### 5.2.3 Autoprep-Gelchromatographie und Florisil-Mini-Säulen-Chromatographie – eine Gegenüberstellung -

Beide Systeme wurden mit Proben versehen, die aus dem gleichen Matrixpool stammten.

**Gelchromatographie mit dem Autoprep-1002 A** - Von der in 10 ml gelösten und eingespritzten Probe wurden durch ein automatisches Ventilsystem mit Pumpmodul 5 ml auf die mit Bio-beads SC3 gefüllte Gelsäule verbracht.

Die Spülung der Säule des Autoprep erfolgte mit einem Gemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat zu gleichen Teilen, mit einer Spülmenge von 5ml/min und unter einem Druck von 5 psi, wobei das Eluat in den ersten 20 min verworfen, in den sich anschließenden 19 Minuten zur Auswertung aufgefangen und in den weiteren 10 Minuten zur Spülung der Bio-Beads-Säule genutzt wurde (Tabelle 5.9).

Diese zeitliche Abfolge der Spülmethode wurde in Voruntersuchungen durch Fraktionierung mit Standardlösungen verifiziert.

Tabelle 5.9: Übersicht der Spülschritte während der Gelchromatographie im Autoprep-1002-A

Arbeitsschritt (lfd. Nr.)	Zeitintervall min	Verwendung des Lösungsmittelgemisches
1.	1. – 20.	verworfen
2.	21. – 39.	zur Messung aufgefangen
3.	40. – 49.	Spülung der Säule

Die Wiederfindung lag abhängig vom Schadstoff zwischen 87% (PCB-28) und 98% ( $\gamma$ -HCH). Weder vor der 23. Minute noch nach der 37. Minute konnten bei Vorversuchen zu analysierende Schadstoffe gaschromatographisch nachgewiesen werden.

**Florisil-Mini-Säulen-Chromatographie** - Die Aufarbeitung der Proben mittels Florisil-Mini-Säulen erfolgte wie bei der Optimierung ermittelt.

**Methodenvergleich – Dateninterpretation** - Aus Gründen der Polaritätsunterschiede werden die Ergebnisse, die Chlorkohlenwasserstoffe und Nitromoschusduftstoffen betreffend, getrennt voneinander dargestellt und interpretiert.

**Dateninterpretation - Chlorkohlenwasserstoffe** - Die Ergebnisse wurden aus jeweils 12 Proben gewonnen, aus denen der Median gebildet wurde.

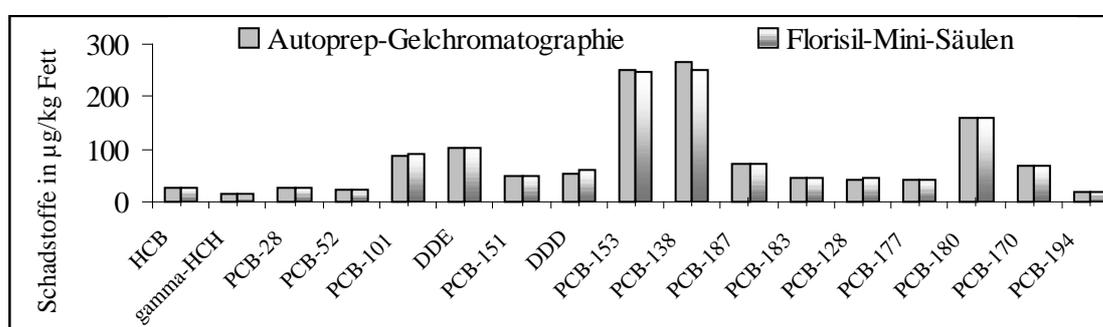


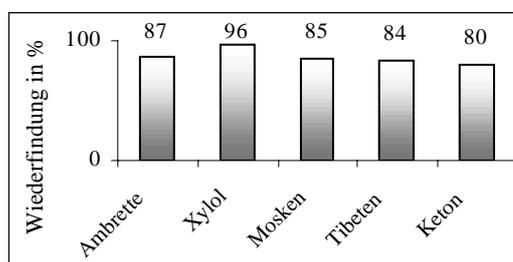
Abbildung 5.5: Konzentration von Chlorkohlenwasserstoffen im Methodenvergleich zwischen Gelchromatographie (Autoprep) und der Säulenchromatographie mittels Florisil-Mini-Säulen bei Verwendung von Nativproben, bezogen auf µgSchadstoff/kg extrahierbarem Fett

Unter der Voraussetzung, daß die nach Anwendung des Autoprep gemessenen Werte auf 100% festgelegt wurden, beträgt die Wiederfindung bei der Aufarbeitung mit den Florisil-Mini-Säulen für die einzelnen Chlorkohlenwasserstoffe zwischen 96 und 111 %. Alle Werte waren reproduzierbar.

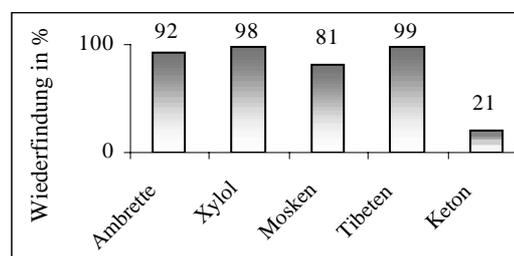
Eine durchschnittliche Gesamtwiederfindungsquote von 101 % konnte ermittelt werden.

**Ergebnis – Chlorkohlenwasserstoffe** - Es ist kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der isolierten Schadstoffquantität und -qualität zwischen beiden Methoden erfaßbar.

**Dateninterpretation Nitromoschusduftstoffe** - Die Wiederfindung von Moschus-Ambrette, Moschus-Xylol, Moschus-Tibeten und Moschus-Mosken kann bei beiden Methoden mit Werten zwischen 80 und 99 % als gleichwertig angesehen werden. Moschus-Keton wird nur durch die Gelchromatographie im Autoprep-1002 A in vertretbarer Quantität eluiert (Abbildungen 5.6 und 5.7).



**Abbildung 5.6:** Wiederfindung von Nitromoschusduftstoffen (Referenzsubstanzen) nach der Eluierung durch Autoprep-Gelchromatographie



**Abbildung 5.7:** Wiederfindung von Nitromoschusduftstoffen (Referenzsubstanzen) nach der Eluierung durch Florisil-Mini-Säulen-Chromatographie

**Ergebnis – Nitromoschusduftstoffe** - Eine erfolgreiche Wiederfindung aller Nitromoschusduftstoffe kann nur durch die Gelchromatographie im Autoprep-1002 A gewährleistet werden. Florisil-Mini-Säulen eignen sich unter den beschriebenen Methoden nicht zur Elution von Moschus-Keton.

### ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG

Vor- und Nachteile beider Methoden sollen im Folgenden dargestellt werden.

**Tabelle 5.10: Vor- und Nachteile der Gelchromatographie mittels Autoprep 1002 A**

Die Nachteile der Autoprep-Gelchromatographie:

- hoher Zeitaufwand
- kostenintensive Anschaffung
- hoher Lösungsmittelverbrauch und damit hohe Kosten
- sehr kleine Mengen an Schadstoff sind kaum meßbar/auswertbar 2\*)

Die Vorteile der Autoprep-Gelchromatographie:

- Gerät läuft nach Probenbeladung durch automatische Ventilumschaltung selbständig
- sehr zuverlässige Ergebnisse
- Variation der Zeiten für die Selektion der Schadstoffe nach Molekülgröße möglich

2\*) Durch das Verwerfen von 50 % der in den Autoprep eingespritzten Proben durch das Gerät wird der Schadstoffgehalt in µg/kg extrahierbarem Fett bei gaschromatographischer Messung halbiert)

**Tabelle 5.11: Vor- und Nachteile der Gelchromatographie mittels Florisil-Mini-Säulen**

Die Nachteile der Florisil-Mini-Säulen:

- ständige Kontrolle während der Chromatographie notwendig
- nur bis 120 mg Fettextrakt pro Säule können unter den beschriebenen Bedingungen ein fettfreies Eluat garantieren

Die Vorteile der Florisil-Mini-Säulen:

- relativ geringe Lösungsmittelmenge notwendig (im Vergleich zum Autoprep 1002 A)
- schnelle und leichte Handhabung
- geringer Geräteaufwand
- preiswertes Material