

„Online SPE-LC mit unterschiedlichen Detektoren als integrierte Probenvorbereitungsmethode von wässrigen Proben“



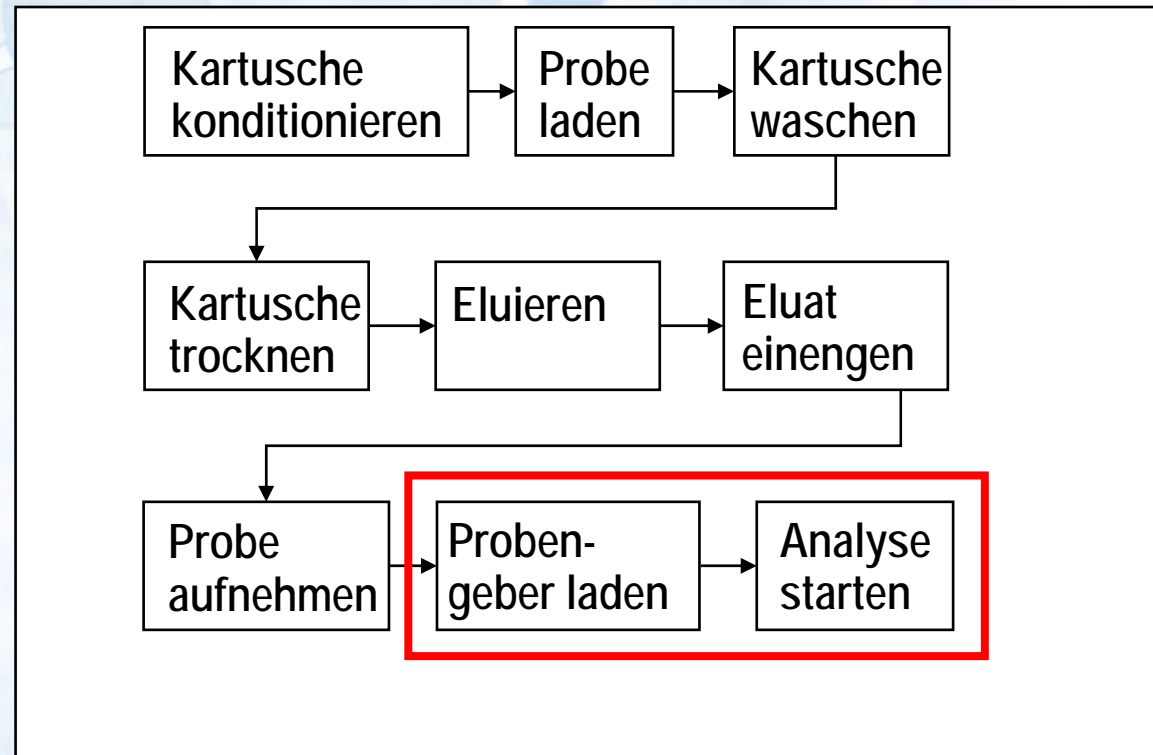
Dionex GmbH, Field Support, Idstein, DE

Dionex Europe, Customer Support Center, Olten, CH

# Warum automatisierte Probenvorbereitung?

- ◆ Matrixeffekte
  - Beeinflussung der Chromatographie
  - Belegung der Trennsäule
- ◆ Vereinfachung der Probenkomplexität
- ◆ Anreicherung niedrig abundanter Spezies
  
- ◆ Reduktion manueller Präparationsschritte
- ◆ Zeit- und Kostenersparnis

# Wert der On-line Probenvorbereitung



## Konventionelle SPE (12 Proben)

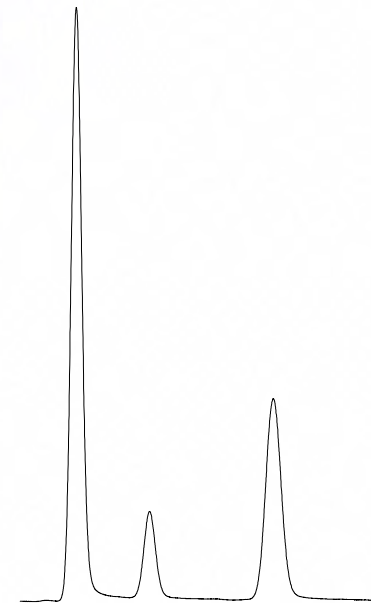
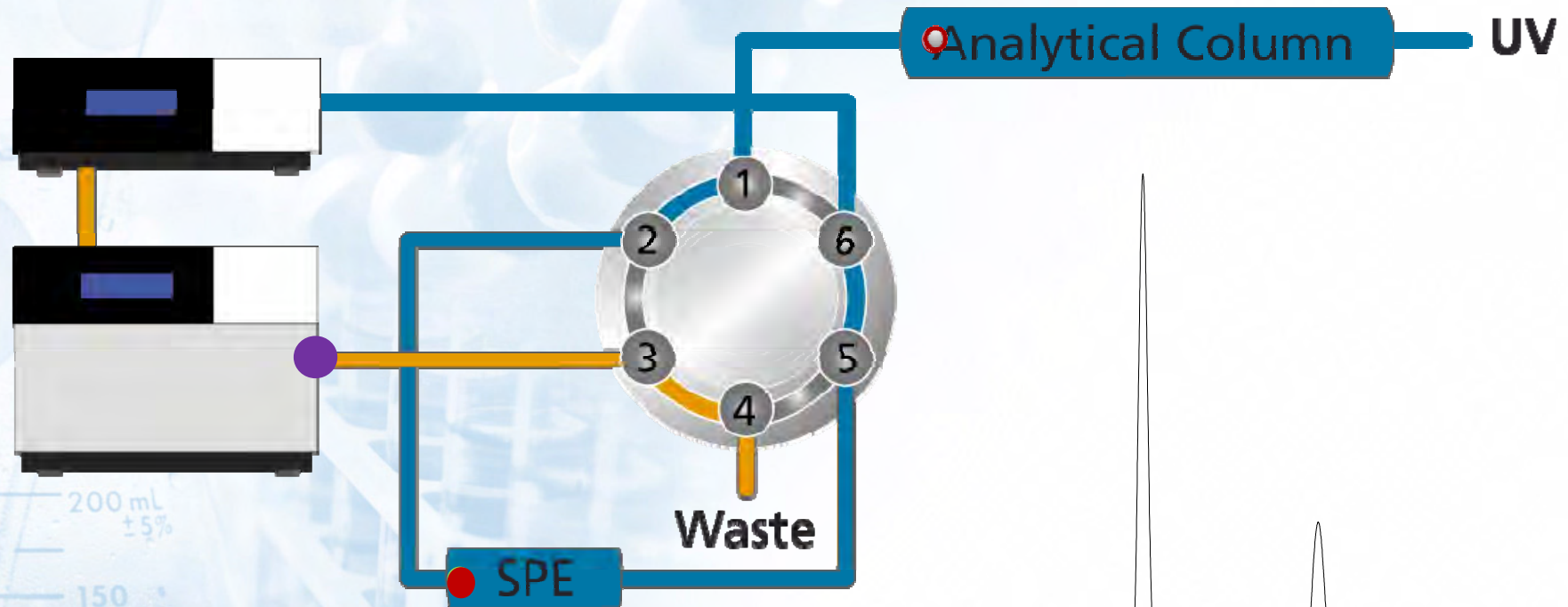
- 240 Minuten manuelle Arbeit
- 480 Minuten Gesamtanalysenzeit

## Automatisierte on-line SPE-LC

- 24 Minuten manuelle Arbeit (90 % Ersparnis)
- 324 Minuten Gesamtanalysenzeit (33% Ersparnis)

# Online SPE LC

1. Probeninjektion und Extraktion auf der SPE-Phase
2. Transfer der Analyte zur Trennsäule
3. Chromatographische Trennung und Reäquilibrierung der SPE Säule



# System für Online SPE-LC-MS/MS

## Dionex Ultimate™ 3000 x2 Dual Gradient LC System

- ◆ DPG-3600 Duale ternäre Gradientenpumpe
- ◆ WPS-3000TSL Probengeber
- ◆ TCC-3200 Säulenthermostat mit 2-position 6-port Ventilen
- ◆ Koppelbar mit MS, MS/MS Detektoren (AB, Thermo, Bruker)
- ◆ Datenaufnahme und Verarbeitung; Chromeleon® oder Chromeleon DCMS Link mit Analyst® - / Xcalibur- / Hystar- Software

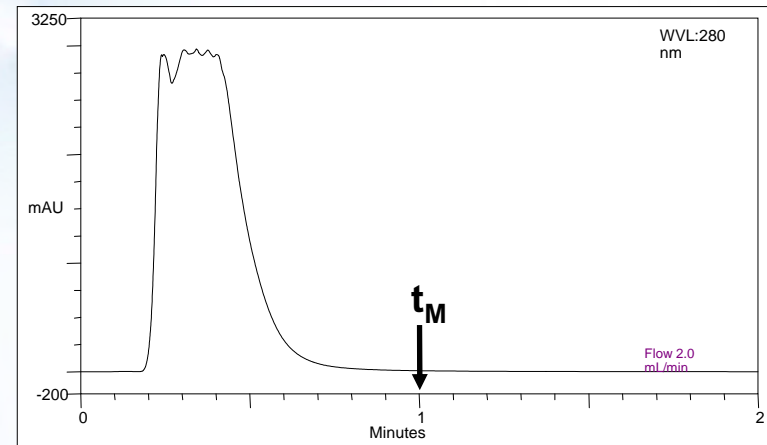
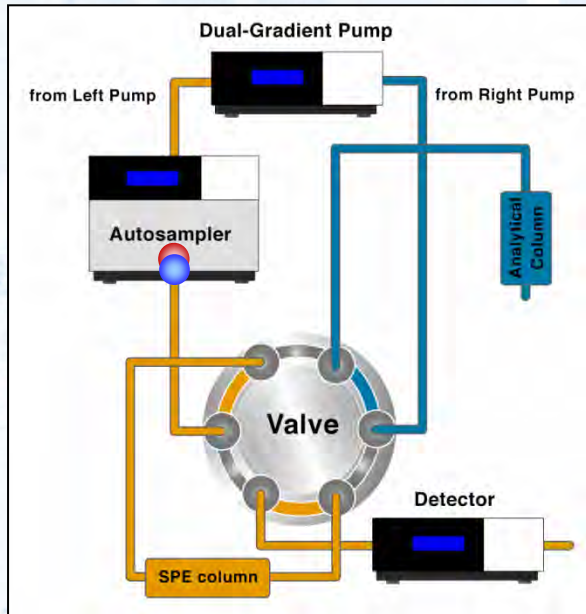


# Herausforderungen

- ◆ Wahl der geeigneten SPE und analytischen Säulen
- ◆ Optimierung von Eluenten, Gradientenprofilen, Temperatur , pH usw.
- ◆ Vorbereitung der Instrumenten Methode
  - Synchronisierung der Pumpenbefehle für beide Gradientenpumpen
  - Definition der korrekten Ventilschaltzeiten
  - Prozess Überwachung und Dokumentation

# Bestimmung der Matrix Elutionszeit, $t_M$

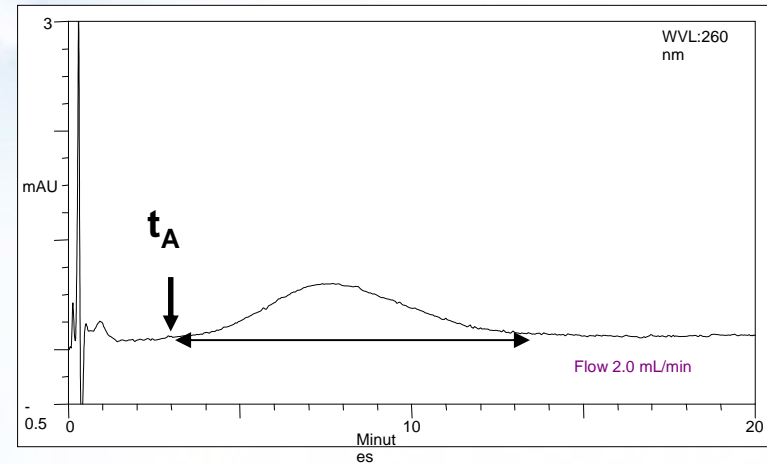
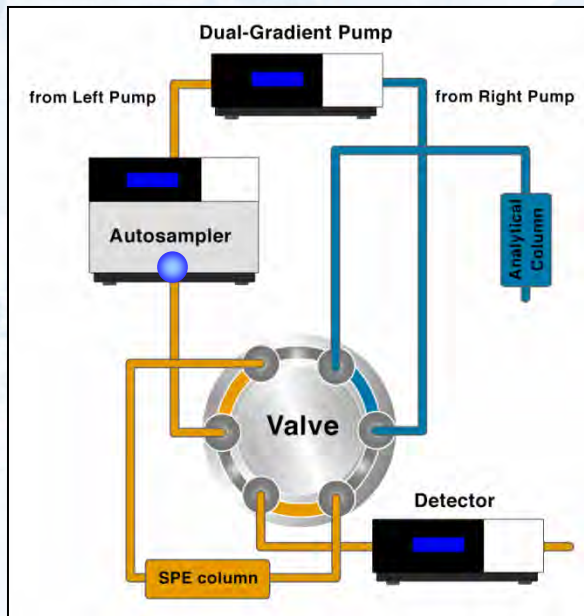
$t_M$ : Die Zeit, die benötigt wird um die Matrix vollständig von der SPE-Säule zu eluieren



- ◆ SPE-Säule mit dem Detektor fluidisch verbinden (Ventilschaltung)
- ◆ Aufnahme des Matrix-Elutionsprofils nach der Injektion der Probe
- ◆ UV-Detektor ist hierfür i.d.R. gut geeignet
- ◆ Matrix ist vollständig eluiert, wenn die Basislinie wieder erreicht ist

# Bestimmung der Elutionszeit für Analyten, $t_A$

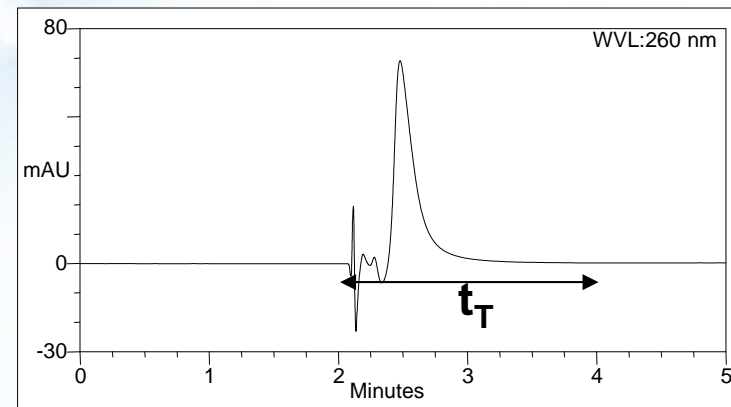
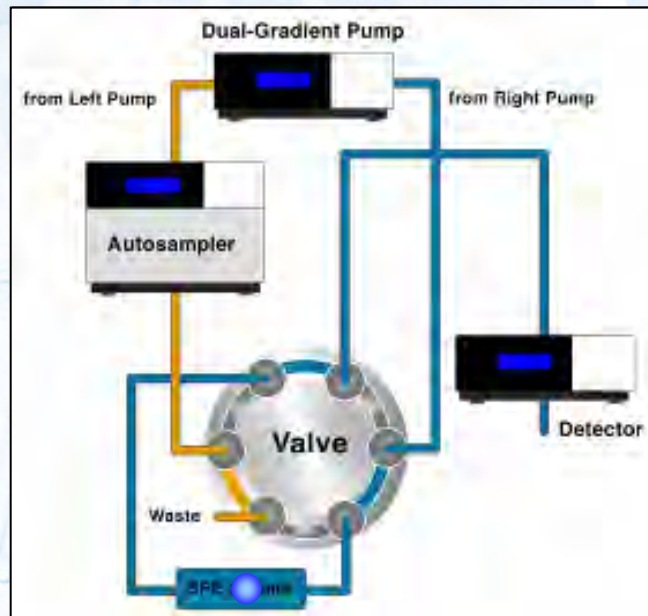
$t_A$ : Der Zeitpunkt, bei dem die Analyten auf der SPE-Säule durchbrechen



- ◆ Verbindung der SPE-Säule mit dem Detektor (mittels Schaltventil)
- ◆ Injizieren eine Analyten-Standards auf die SPE-Säule und Aufnahme des Elutionsprofils
- ◆ Nutzung der gleichen mobilen Phase und Flussrate wie für die Bestimmung von  $t_M$
- ◆ Analytenkonzentration sollte im Bereich der erwarteten Konzentration der Realproben liegen
- ◆ Für eine hinreichende Extraktion und Wiederfindung muss gelten  $t_A > t_M$

# Bestimmung der Analytentransferzeit, $t_T$

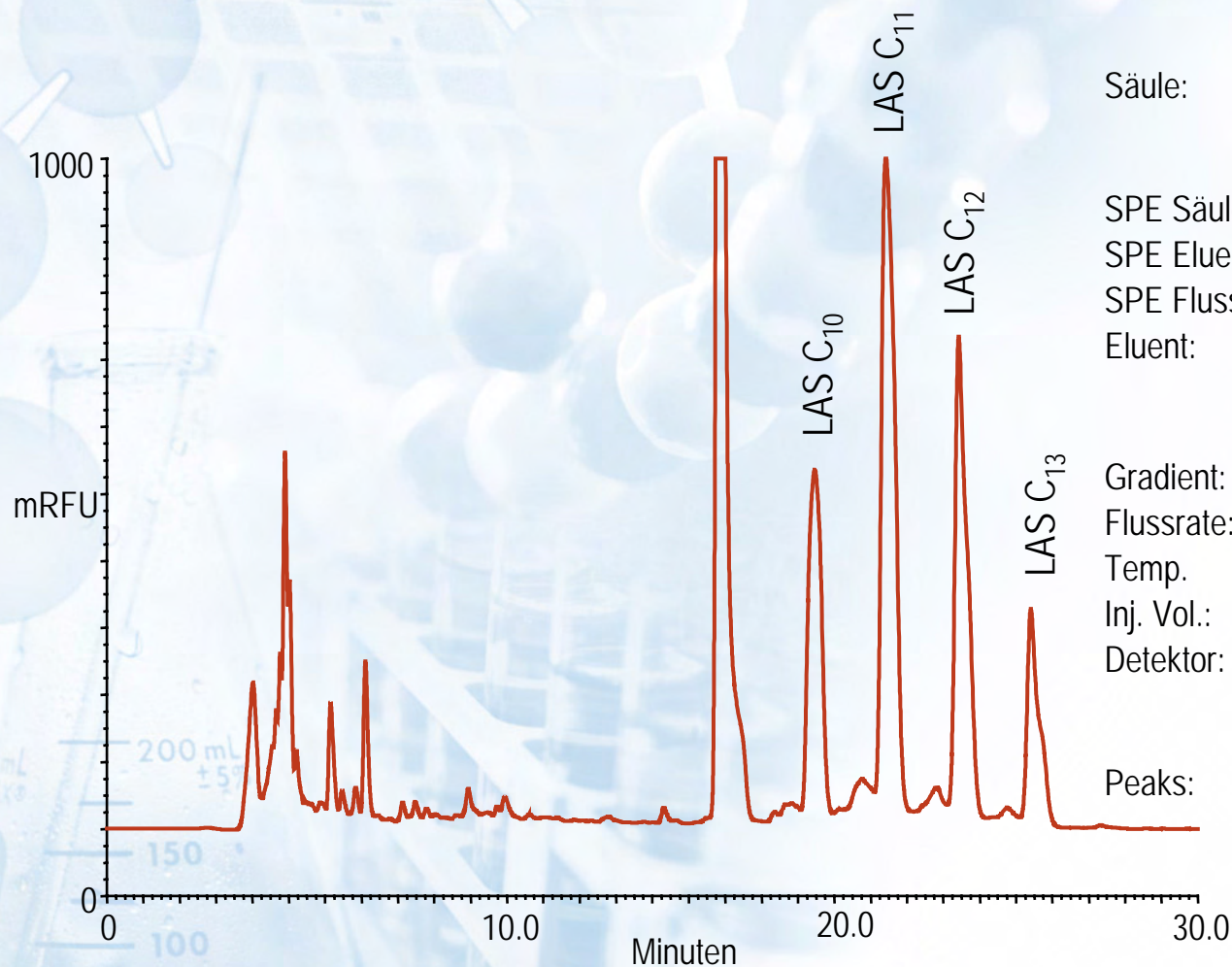
$t_T$ : Benötigte Zeitspanne für die vollständige Elution der Analyten auf die Trennsäule



- ◆ Verbindung des Detektors mit dem Ausgang des zweiten Flussweges (ohne Trennsäule)
- ◆ Injizieren eines Standards auf die SPE-Säule
- ◆ Schaltung des Ventils
- ◆ Analyse des Eluates von Pumpe 2 über die SPE-Säule



# Bestimmung von LAS\* bei Ausleitungen eines Industrieklärwerks mittels online SPE und HPLC mit Fluoreszenz-Detektion



Säule: Acclaim Surfactant, 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm + Acclaim Surfactant Guard 4.3  $\times$  10 mm

SPE Säule: IonPac NG1, 5  $\mu$ m, 4  $\times$  35 mm

SPE Eluent: Water

SPE Flussrate: Rinse/Loading: 2 mL/min

Eluent: A. CH<sub>3</sub>CN

B. 100 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (pH 5 with HCl)

Gradient: 50 to 15% B in 20 min

Flussrate: 1.0 mL/min

Temp. 30 °C

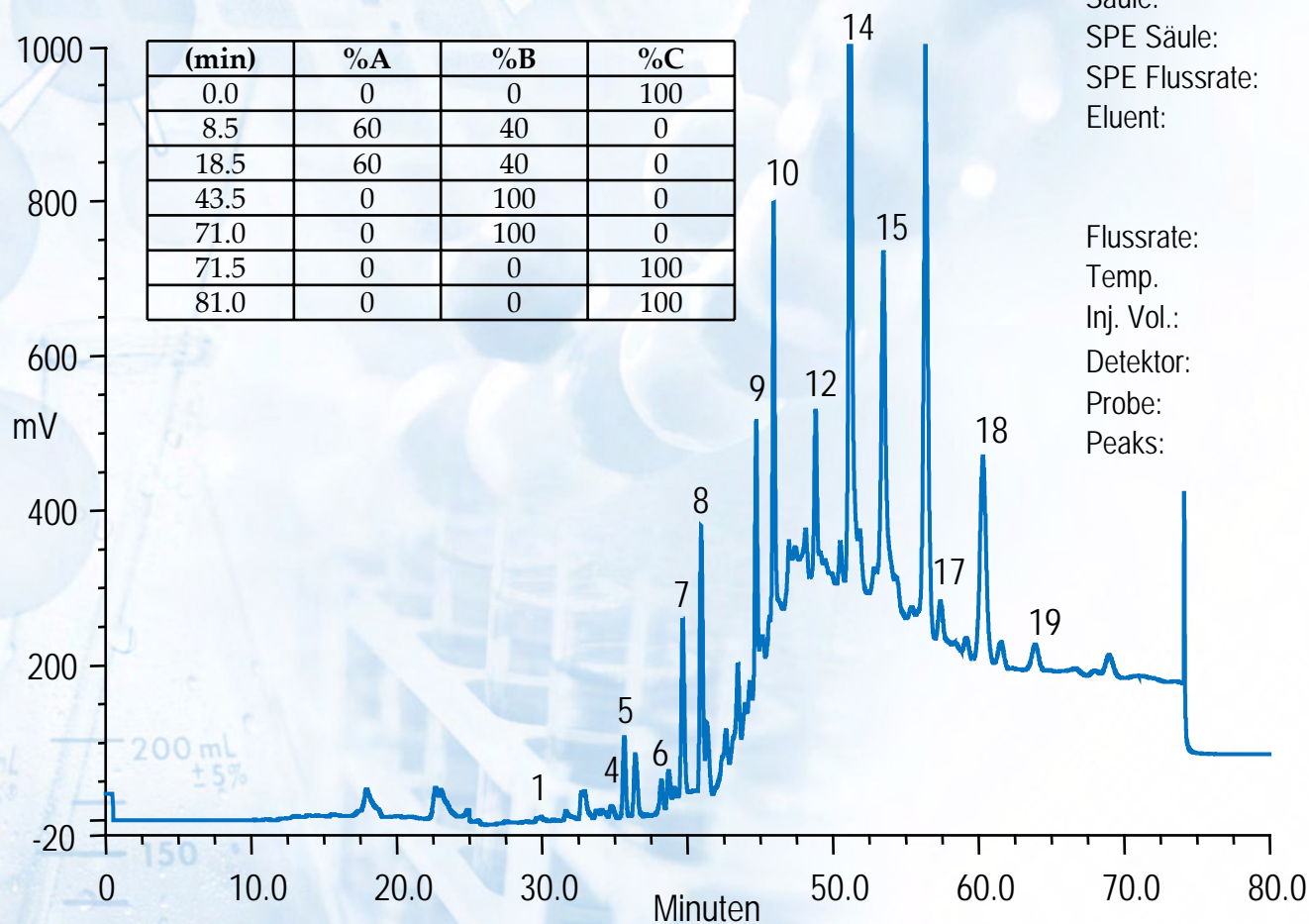
Inj. Vol.: 500  $\mu$ L

Detektor: Fluoreszenz, 0 min: Ex 230 nm  
Em 302; 18 min: Ex 221 nm Em 284 nm

Peaks: Total LAS 8689  $\mu$ g/L

\*Linear Alkylbenzene Sulphonates (LAS)

# Online Bestimmung von PAK's in Bodenextrakten



Säule: Supelcosil LC-PAH 4.6 x 250 mm  
 SPE Säule: ChromSpher Pi 3.0 x 80 mm  
 SPE Flussrate: 0.35 mL/min  
 Eluent: A: Water  
 B: ACN  
 C: Methanol/Water 40/60 (v/v)

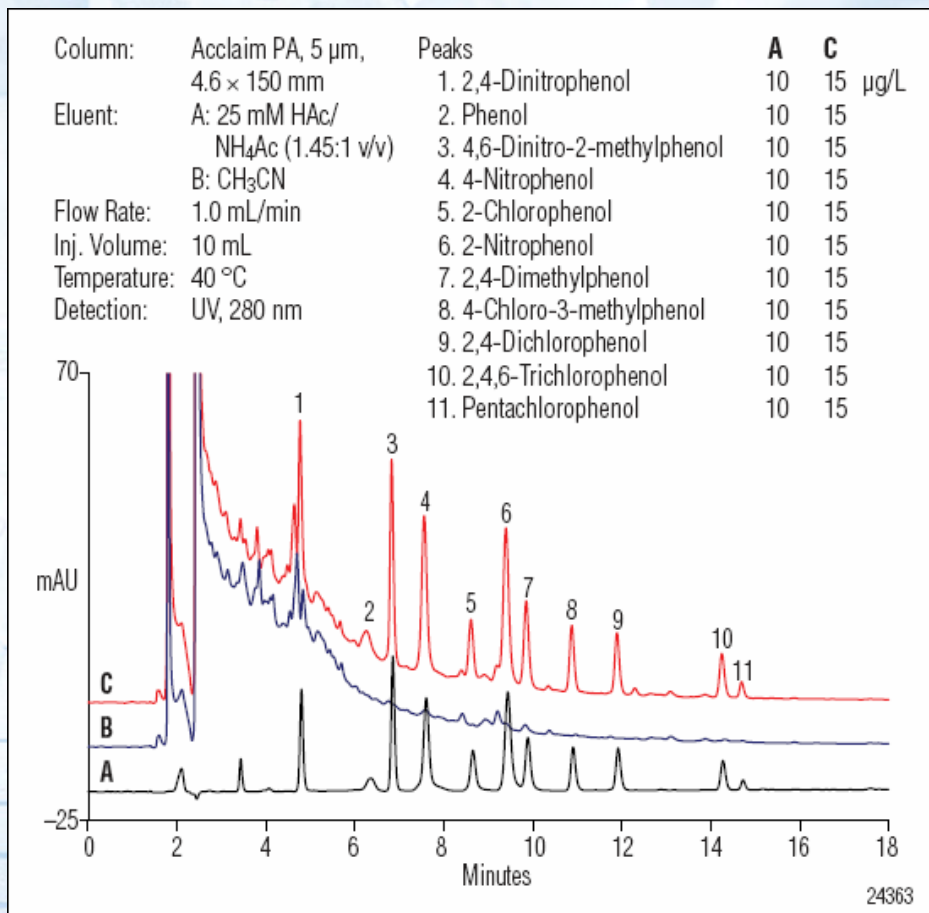
Flussrate: 1.0 mL/min  
 Temp. 30 °C  
 Inj. Vol.: 80 µL

Detektor: **Fluoreszenz**  
 Probe: ASE Bodenextrakt  
 Peaks:

- 1 Naphtalene
- 4 Fluorene
- 5 Phenanthrene
- 6 Anthracene
- 7 Fluoranthene
- 8 Pyrene
- 9 Benzo(a)anthracene
- 10 Chrysene
- 12 Benzo(b)fluoranthene
- 14 Benzo(k)fluoranthene
- 15 Benzo(a)pyrene
- 17 Dibenzo(a,h)anthracene
- 18 Benzo(g,h,i)perylene
- 19 Indeno(1,2,3-c,d)pyrene

# Bestimmung von Phenolen in Wasser

Online SPE - HPLC mit UV Detektion (U.S. EPA Methode 604, AN 191)



Überlagerung von folgenden  
Chromatogrammen

- A) 10  $\mu$ g/L Phenolstandard,
- B) Nicht dotiertes Leitungswasser
- C) Mit 15  $\mu$ g/L Phenolen dotiertes  
Leitungswasser

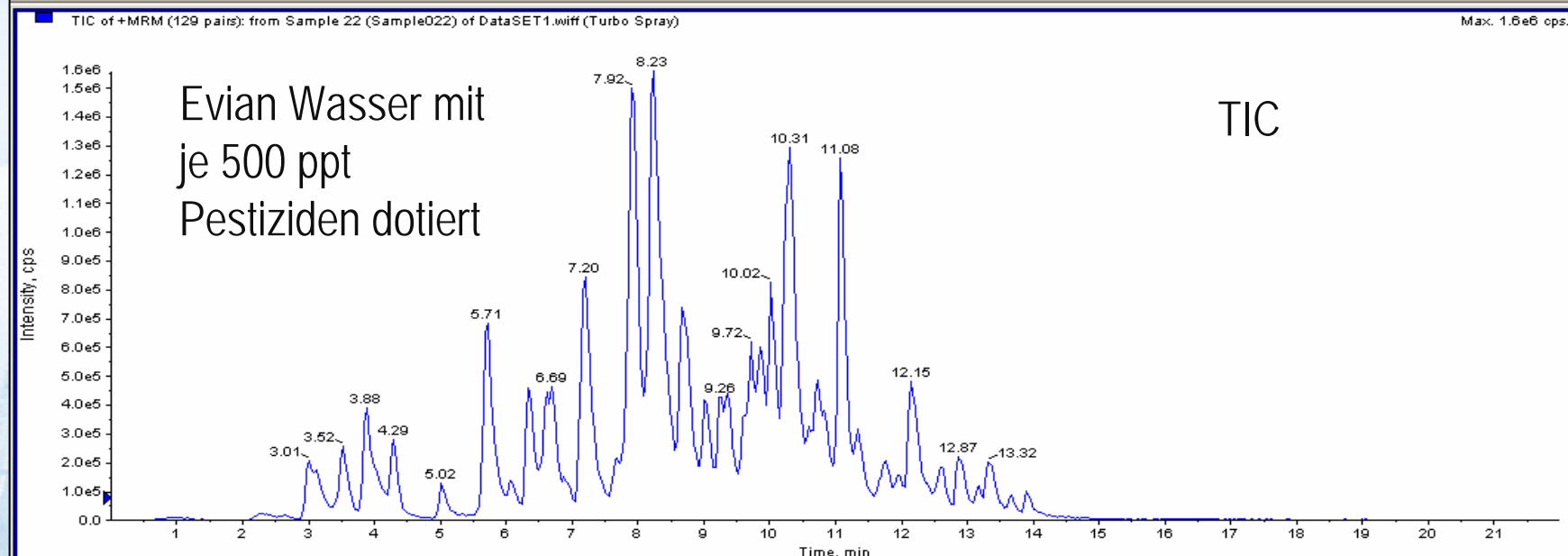
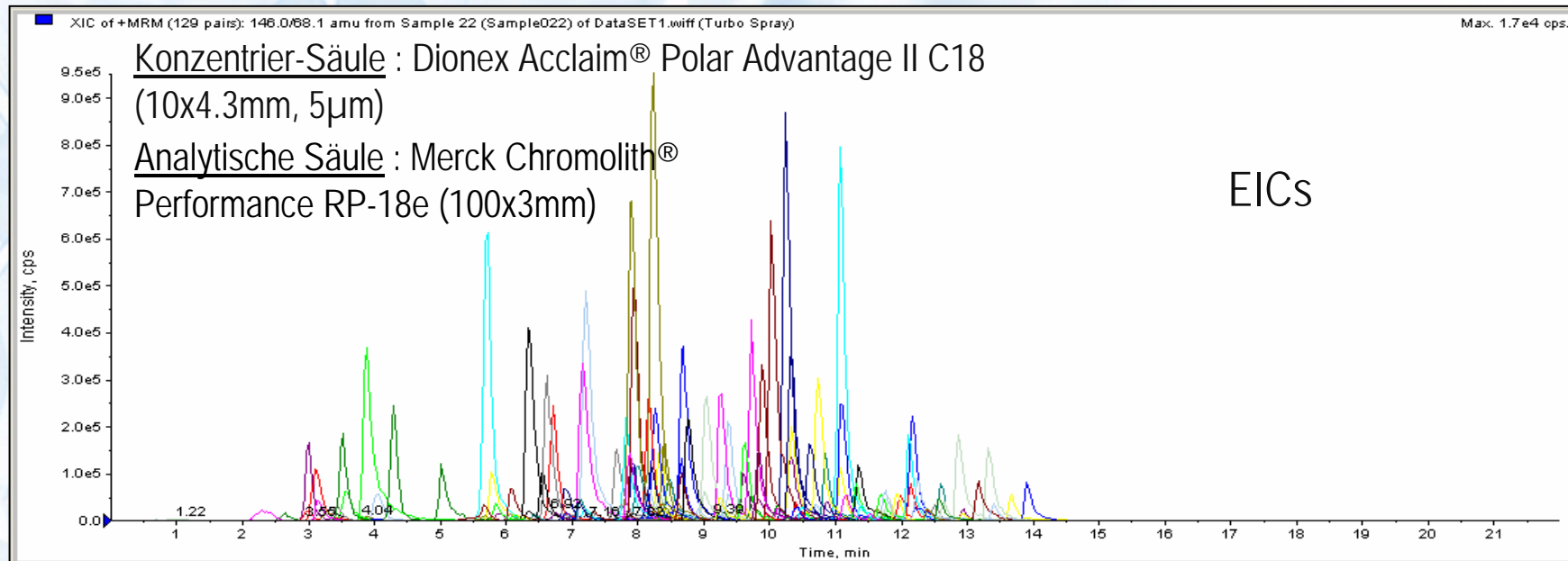
Gesamtanalysenzeit beträgt 18 min. Während der SPE wird die Trennsäule für die nächste Trennung äquilibriert.

# Analyse von 132 Pestiziden in Mineral- und Fluss Wasser

Triazines	Ureas	Chloroacetamides
<i>2-hydroxyatrazine</i>	<i>Buturon</i>	<i>Acetochlore</i>
<i>2-hydroxyterbuthylazine</i>	<i>Chloroxuron</i>	<i>Alachlore</i>
<i>Ametryne</i>	<i>Chlortoluron</i>	<i>Dimethachlor</i>
<i>Atrazine</i>	<i>DCPMU</i>	<i>Dimethenamide</i>
<i>Cyanazine</i>	<i>DCPU</i>	<i>Metazachlore</i>
<i>DEA</i>	<i>Diflubenzuron</i>	<i>Metolachlore</i>
<i>DEDIA</i>	<i>Diuron</i>	<i>Propachlore</i>
<i>Desmetryne</i>	<i>Ethidimuron</i>	
<i>DETA</i>	<i>Fenuron</i>	<b>Sulfonylureas</b>
<i>DIA</i>	<i>Flufenoxuron</i>	
<i>Hexazinone</i>	<i>IPPMU</i>	<i>Amidosulfuron</i>
<i>Metamitron</i>	<i>IPPU</i>	<i>Chlorsulfuron</i>
<i>Metribuzin</i>	<i>Isoproturon</i>	<i>Flazasulfuron</i>
<i>Prometon</i>	<i>Linuron</i>	<i>Metsulfuron-Me</i>
<i>Prometryne</i>	<i>Methabenzthiazuron</i>	<i>Nicosulfuron</i>
<i>Propazine</i>	<i>Metobromuron</i>	<i>Rimsulfuron</i>
<i>Sebuthylazine</i>	<i>Metoxuron</i>	<i>Sulfosulfuron</i>
<i>Secbumeton</i>	<i>Monolinuron</i>	<i>Thifensulfuron-methyl</i>
<i>Simazine</i>	<i>Monuron</i>	<i>Triasulfuron</i>
<i>Simetryne</i>	<i>Monuron</i>	<i>Triflusulfuron-methyl</i>
<i>Terbumeton</i>	<i>Neburon</i>	
<i>Terbumeton Desethyl</i>	<i>Pencycuron</i>	
<i>Terbuthylazine</i>	<i>Siduron</i>	
<i>Terbutryne</i>	<i>Tebuthiuron</i>	

Triazoles	Other	
<i>Azaconazole</i>	<i>2,6-dichlorobenzamide</i>	<i>Mefenacet</i>
<i>Bromuconazole</i>	<i>Azinphos-ethyl</i>	<i>Mepronil</i>
<i>Cyproconazole</i>	<i>Azinphos-methyl</i>	<i>Metalaxyl</i>
<i>Diclobutrazole</i>	<i>Azoxystrobine</i>	<i>Napropamide</i>
<i>Difenoconazole</i>	<i>Benalaxyl</i>	<i>Norflurazon</i>
<i>Diniconazole</i>	<i>Benoxacor</i>	<i>Norflurazon Desmethyl</i>
<i>Epoxiconazole</i>	<i>Bitertanol</i>	<i>Ofurace</i>
<i>Fenbuconazole</i>	<i>Chloridazone</i>	<i>Oxadixyl</i>
<i>Fluquinconazole</i>	<i>Clomazone</i>	<i>Prochloraz</i>
<i>Flusilazole</i>	<i>Coumaphos</i>	<i>Propanil</i>
<i>Flutriafol</i>	<i>Cyprodinil</i>	<i>Propyzamide</i>
<i>Hexaconazole</i>	<i>Diazinon</i>	<i>Pyraclostrobine</i>
<i>Metconazole</i>	<i>Diflufenicanil</i>	<i>Pyrazophos</i>
<i>Metosulam</i>	<i>Dimethoate</i>	<i>Pyrifenox</i>
<i>Myclobutanil</i>	<i>Dimetomorph</i>	<i>Pyrimethanil</i>
<i>Penconazole</i>	<i>Fluazifop-p-buthyl</i>	<i>Quinalphos</i>
<i>Propiconazole</i>	<i>Fluroxypyr Meptyl</i>	<i>Quizalofop-ethyl</i>
<i>Tebuconazole</i>	<i>Flurtamone</i>	<i>Rotenone</i>
<i>Tetraconazole</i>	<i>Fluthiamide</i>	<i>Tebufenozide</i>
<i>Triadimefon</i>	<i>Haloxypop-methyl</i>	<i>Tebutame</i>
<i>Triadiménole</i>	<i>Imazamethabenz-methyl</i>	<i>Thiabendazole</i>
	<i>Imidacloprid</i>	<i>Trifloxystrobine</i>
	<i>Isoxaben</i>	<i>Vamidothion</i>

# On-line SPE-LC-MS/MS von 132 Pestiziden in Mineralwasser mit der UltiMate 3000



# Vorteile der Online SPE-LC

- ◆ Für einen breiten Applikationsbereich anwendbar, einschließlich:
  - Pharmazeutischer und klinischer Labore; biologische Flüssigkeiten
  - Lebensmittel und Getränke Laboratorien
  - Umweltlabore
- ◆ Ermöglicht automatisierten (unbeaufsichtigten) Betrieb mit folgenden Resultaten:
  - Reduzierter Arbeitsaufwand
  - Direkte Probeninjektion
  - Minimaler Kontakt mit biologisch gefährlichen Proben
- ◆ Hoch reproduzierbare Probenvorbereitung
- ◆ Schnell und kosteneffizient