

SOLUTIONS BY



Automatisierte Bestimmung ausgewählter Süßstoffe

Sebastian Wierer (LCTech GmbH),
Dr. Hans Rainer Wollseifen
(MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG)

Inhalt

1	Einleitung	3
1.1	Analyten.....	4
2	Methodenentwicklung	5
2.1	Chemikalien.....	5
2.2	Standards	5
2.3	Probenmaterial	5
2.4	Festphasenextraktion (manuell)	5
2.5	Festphasenextraktion (automatisiert durch LCTech).....	6
2.6	Verdünnen	10
2.7	Messung mittels LC-MS/MS.....	11
2.8	Konfiguration FREESTYLE XANA.....	12
2.9	Verbrauchsmaterialien von Macherey & Nagel	12
3	Ergebnisse.....	13
3.1	Wiederfindungen	13
3.2	Chromatogramme	14

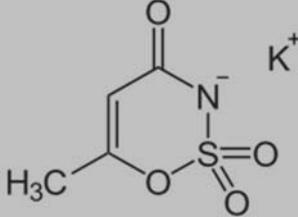
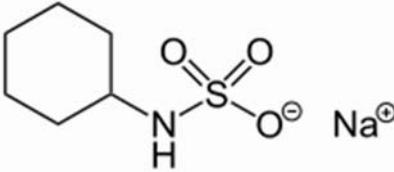
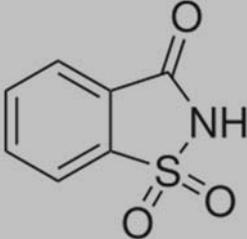
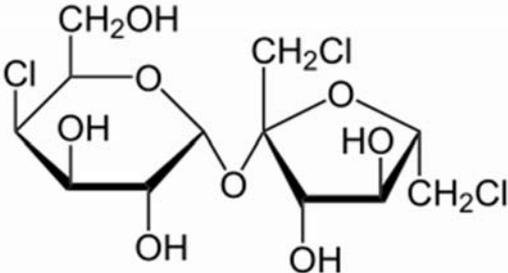
1 Einleitung

Weltweit werden Süßstoffe als Zuckerersatz in verschiedensten Lebensmitteln verwendet. Diese werden vom menschlichen Organismus gering bis gar nicht metabolisiert und gelangen so in kommunale Abwässer. Bei den Reinigungsprozessen in der Kläranlage werden jedoch Acesulfam, Cyclamat, Saccharin und Sucralose meist nicht erfasst und finden somit den Weg ins Grundwasser. Sie sind daher auch Indikatoren für die Wasserqualität. Aufgrund dieser Tatsache beschränkt sich diese Applikationsnote, von den sieben gängigsten, auf eben genannte umweltrelevanten Süßstoffe.

Nachfolgend wird aufgezeigt, wie die Proben mittels Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction – SPE) sowohl manuell als auch automatisiert mit dem Robotiksystem FREESTYLE XANA für die nachfolgende Analytik vorbereitet werden. Aufgrund der Möglichkeit, das System rund um die Uhr zu nutzen, der Parallelisierung der einzelnen Arbeitsschritte sowie der gleichzeitigen Bearbeitung mehrerer Proben kann bei der automatisierten Bearbeitung ein sehr hoher Probendurchsatz realisiert werden. Der Anwender ist dadurch deutlich entlastet und ihm steht mehr Zeit für andere Aufgaben zur Verfügung.



1.1 Analyten

Analyt	Strukturformel	Summenformel	Molare Masse
Acesulfam-K		$C_4H_4KNO_4S$	$201,24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Cyclamat		$C_6H_{12}NNaO_3S$	$201,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Saccharin		$C_7H_5NO_3S$	$183,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Sucralose		$C_{12}H_{19}Cl_3O_8$	$397,63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

2 Methodenentwicklung

2.1 Chemikalien

- Ameisensäure 99 %, ULC/MS Biosolve B.V.
- Acetonitril, ULC/MS Biosolve B.V.
- Ammoniumhydroxidlösung ≥ 25 %, Eluenten Additiv für LC-MS, Fluka
- Wasser, bidest. Milli-Q von Millipore

2.2 Standards

- Sucralose ≥ 98 % (HPLC) SIGMA (Life Science)
- Acesulfam K, puriss. ≥ 99 % (HPLC) Fluka
- Saccharin Natriumsalz-Dihydrat zur Synthese, Merck Schuchardt
- Natriumcyclamat, 99,9 % SUPELCO

2.3 Probenmaterial

Als Probenmaterial wird 1 L Leitungswasser verwendet, das mit 50 ng/L eines jeden Analyten gespikt wird.

2.4 Festphasenextraktion (manuell)

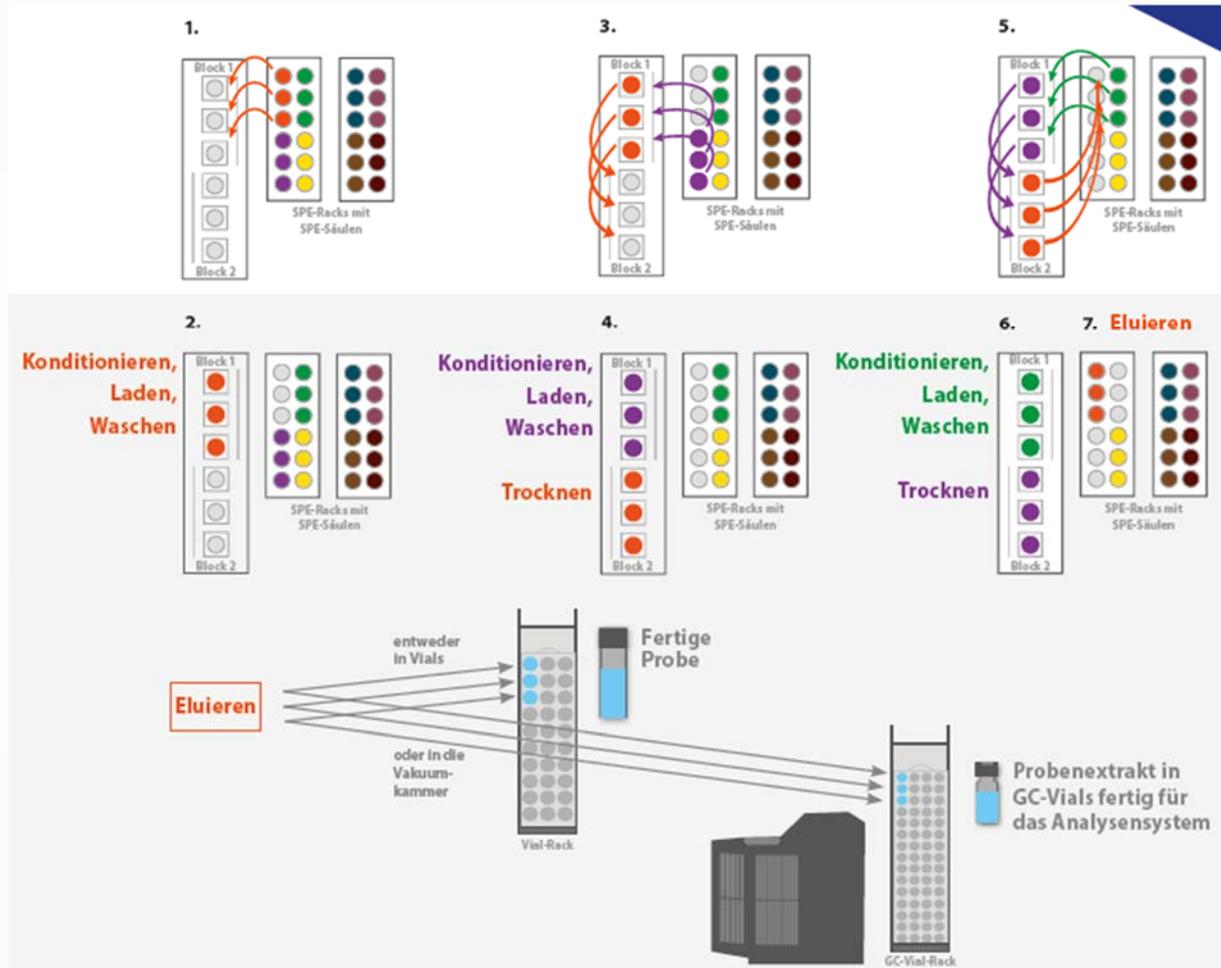
SPE - Schritte	CHROMABOND® HR-XAW 45 μ m, 3 mL, 200 mg
Konditionieren	3 mL Methanol 3 mL Wasser
Laden	Probenaufgabe mit 5-10 mL/min.
Waschen	4 mL Wasser
Trocknen	Luft mittels Spritze
Elution	3 mL Methanol 3 mL Methanol + 1 % NH ₃

2.5 Festphasenextraktion (automatisiert durch LCTech)

2.5.1 FREESTYLE XANA

Das Robotiksystem FREESTYLE XANA ist für die automatisierte Probenvorbereitung großvolumiger Wasserproben von 1 L bis 10 L besonders geeignet. Durch eine durchdachte Parallelisierung der einzelnen Bearbeitungsschritte und die gleichzeitige Bearbeitung von bis zu 3 Proben kann ein sehr hoher Probendurchsatz erzielt werden.

Funktionsweise FREESTYLE XANA



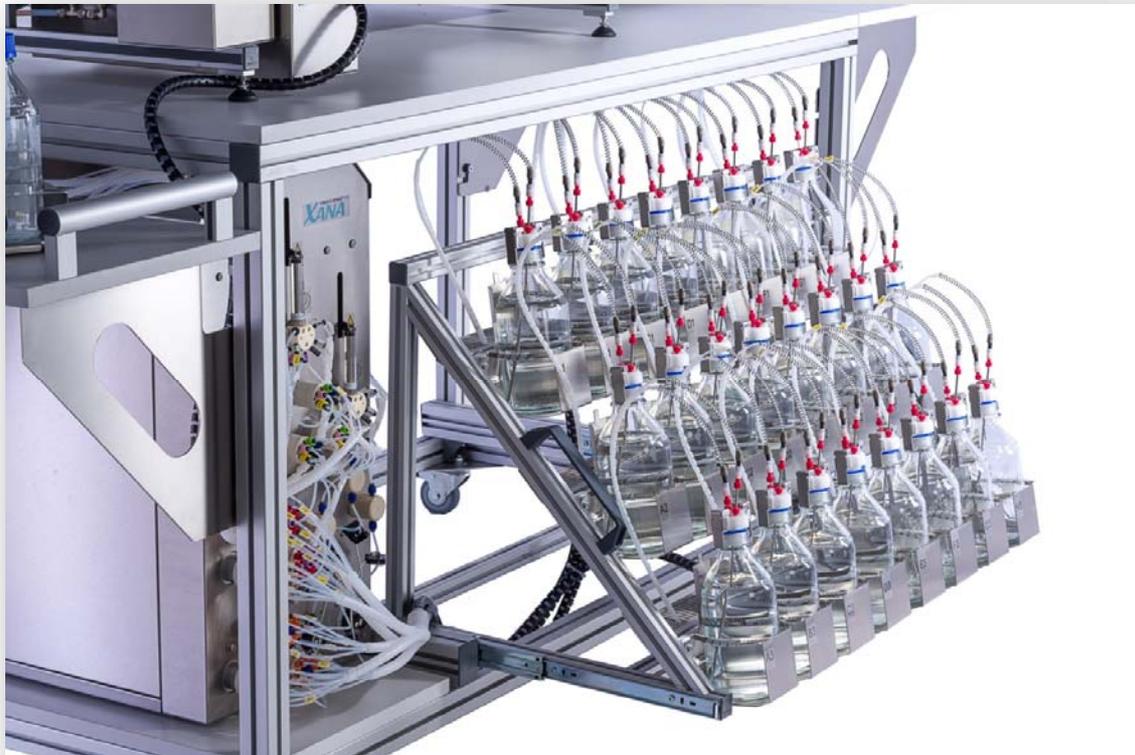
1. SPE-Greifer stellt bis zu 3 Säulen vom SPE-Rack in Block 1 der Bearbeitungsstation:
2. Konditionieren, Laden und Waschen dieser 3 Säulen gleichzeitig
3. Der SPE-Greifer setzt die bearbeiteten 3 Säulen aus Block 1 in Block 2 der Bearbeitungsstation. SPE-Greifer nimmt die nächsten Säulen (bis zu 3) vom SPE-Rack und stellt sie in Block 1 der Bearbeitungsstation.
4. Block 1: Konditionieren, Laden und Waschen von bis zu 3 Säulen gleichzeitig.
Block 2: Trocknen der ersten 3 Säulen

5. SPE-Greifer stellt die 3 getrockneten Säulen von Block 2 zurück auf das SPE-Rack. Der SPE-Greifer setzt 3 geladene und gewaschene Säulen aus Block 1 in Block 2 der Bearbeitungsstation. SPE-Greifer nimmt die nächsten Säulen (bis zu 3) vom SPE-Rack und stellt sie in Block 1 der Bearbeitungsstation.
6. Block 1: Konditionieren, Laden und Waschen von bis zu 3 Säulen gleichzeitig.
Block 2: Trocknen von bis zu 3 Säulen gleichzeitig.
7. Die ersten 3 Säulen werden sequentiell in Vials oder in die Vakuumkammer des EVaporations-Moduls eluiert. Nach der EVaporation auf das gewünschte Endvolumen erfolgt die Abfüllung in GC-Vials; damit ist die Wasserprobe fertig vorbereitet für die nachfolgende Analytik.



Bearbeitungsstation auf der FREESTYLE Plattform

Das Probenrack des FREESTYLE XANA bietet Platz für 24 x 1 L Probengefäße. Die Bestückung des ausziehbaren Probenracks mit den Probengefäßen ist einfach, da jede Position leicht erreicht werden kann.



Jedes Probengefäß wird mit einem einhändig zu bedienenden Verschluss versehen. Dieser bewirkt eine Schrägstellung der Absaugkapillare. In Kombination mit der Schrägstellung des Probengefäßes im Rack ist dadurch ein größtmögliches Laden der Probe möglich



2.5.2 Automatisierte Bearbeitung mit FREESTYLE XANA

Die manuelle Festphasenextraktion kann ganz leicht auf das Robotiksystem zur automatisierten Probenvorbereitung FREESTYLE XANA übertragen werden.

Die einfach zu bedienende Software des Systems bietet einen vorgefertigten Baukasten, der Methodenentwicklung auf dem System schnell und unkompliziert macht.

Folgende Schritte werden vom FREESTYLE XANA vollautomatisiert durchgeführt:

SPE-Schritte	vollautomatisiert
Konditionieren	3 mL Methanol, 10 mL/min. 3 mL Wasser, 10 mL/min.
Laden	1000 mL Probe, 8 mL/min.
Waschen	4 mL Wasser, 8 mL/min.
Trocknen	1 min., Stickstoff
Elution	3 mL Methanol, 2 mL/min. 3 mL Methanol + 1% NH ₃ , 2 mL/min
Trocknen	20 mL Luft, 20 mL/min



Elution

Die genauen Parametereinstellungen der Methode am FREESTYLE XANA sind im nachfolgenden Methodenreport dargestellt.

Konditionieren 1:	EIN				
Volumen:	3 ml	Abgabe Geschwindigkeit:	10 ml / min		
Ansaug Geschwindigkeit:	15 ml / min	Wartezeit:	0 min	Port :	W2 Methanol
Konditionieren 2:	EIN				
Volumen:	3 ml	Abgabe Geschwindigkeit:	10 ml / min		
Ansaug Geschwindigkeit:	15 ml / min	Wartezeit:	1 min	Port :	W4 Wasser
Konditionieren 3:	AUS				
Laden 1:	EIN				
Volumen:	Anzahl Flaschen: 1	Transfer Geschwindigkeit	8 ml / min		
mit Nachspülen					
Nachspülvolumen:	20 ml	Ansaug Geschwindigkeit:	20 ml / min		
Nachspülvolumen:	100 ml / min			Port :	W4 Wasser
Waschen 1:	EIN	verbleibe an Ort und Stelle			
Volumen:	4 ml	Abgabe Geschwindigkeit:	8 ml / min		
Ansaug Geschwindigkeit:	15 ml / min	Wartezeit:	1 min	Port :	W4 Wasser
Waschen 2:	AUS				
Trocknen 1:	EIN	verbleibe an Ort und Stelle			
Zeit:	1 min				
Waschen 3:	AUS				
Elution 1:	EIN				
Volumen:	3 ml	Abgabe Geschwindigkeit:	2 ml / min		
Ansaug Geschwindigkeit:	10 ml / min	Wartezeit:	1 min	Port :	1 MeOH
		Glas Typ:	Type1@4		
Trocknen 2:	EIN				
definiert über Volumen		Trocknungsvolumen 20 ml	Geschwindigkeit: 20 ml / min		
Waschen 4:	AUS				
Trocknen 3:	AUS				
Elution 2:	EIN				
Volumen:	3 ml	Abgabe Geschwindigkeit:	2 ml / min		
Ansaug Geschwindigkeit:	10 ml / min	Wartezeit:	1 min	Port :	9 MeOH_1%NH3
		Glas Typ:			
Trocknen 4:	EIN				
definiert über Volumen		Trocknungsvolumen 20 ml	Geschwindigkeit: 20 ml / min		
EVA :	AUS				
Schlauchfüllvolumen vor Elution			1 ml		

Methodenreport

2.6 Verdünnen

- Die jeweiligen Eluate werden mit Methanol auf 5 mL aufgefüllt.
- Danach werden jeweils 100 µL entnommen und mit Wasser/Acetonitril (95/5 v/v) + 0,1 % Ameisensäure auf 1 mL aufgefüllt.
- Anschließend werden die Eluate injiziert.

2.7 Messung mittels LC-MS/MS

Die Messung wurde an einem Agilent 1290 Infinity II System mit folgender Konfiguration vorgenommen:

Konfiguration	Bezeichnung
Pumpe	G7120A
Autosampler	G7167B
Ofen	G7116B

Säule	EC 100/2 NUCLEOSHELL® RP 18plus, 2.7 µm
Eluent A	0,1% Ameisensäure in Wasser
Eluent B	0,1% Acetonitril in Wasser
Gradient	5 % B auf 55 % B (5 min.); 55 % B auf 95 % B (1 min.), 95 % B (für 2 min. halten) 95 % B auf 5 % B (0,1 min.) 5 % B (für 4,9 min. halten)
Flussrate	0,3 mL/min
Injektionsvolumen	20 µL
Säulentemperatur	30 °C
Detektion	MS/MS, AB Sciex QTRAP 5500 Ion source: Turbo Spray (ESI) Scan type: MRM Polarity: negative Curtain gas: 15 psig Ion spray voltage: 4500 V Temperature: 650 °C Gas 1 (nebulizer): 40 psig Gas 2 (turbo gas): 50 psig CAD gas: 3 psig

2.8 Konfiguration FREESTYLE XANA

1.	FREESTYLE BASIC	Bestellnr.	12663-12
2.	FREESTYLE SPE	Bestellnr.	12668
3.	Rack für Lösungsmittelversorgung	Bestellnr.	13156
4.	FREESTYLE XANA	Bestellnr.	15082
5.	Greifring (3 mL)	Bestellnr.	14892
6.	Kappen (3 mL)	Bestellnr.	14862
7.	Träger (100 mm)	Bestellnr.	11915
8.	Probenrack (4 mL)	Bestellnr.	11926
9.	Dosiernadel	Bestellnr.	13382
10.	Gewindeflasche (4 mL)	Bestellnr.	V0004

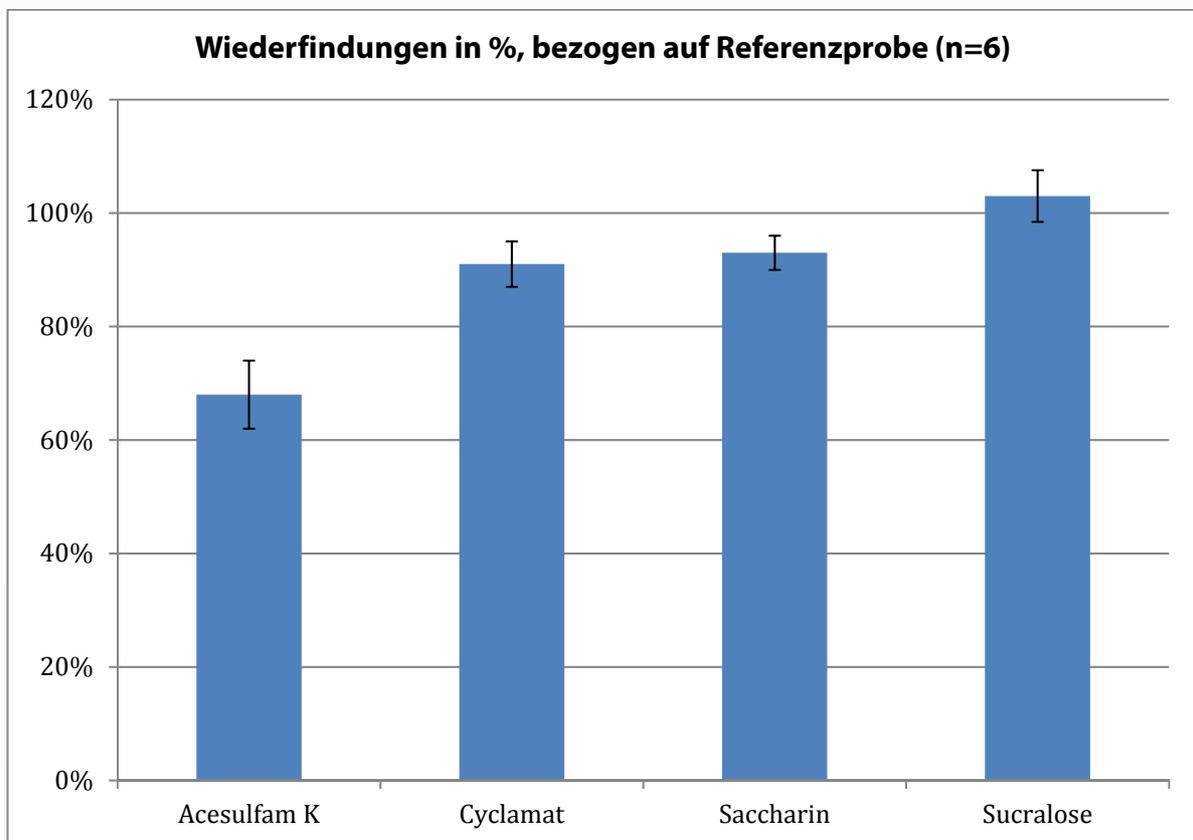
2.9 Verbrauchsmaterialien von Macherey & Nagel

1.	EC 100/2 NUCLEOSHELL® RP 18plus, 2.7 µm	Bestellnr.	763234.20
2.	CHROMABOND® HR-XAW (45 µm) PP-Säulen, 3 mL, 200 mg	Bestellnr.	730748P45

3 Ergebnisse

3.1 Wiederfindungen

Analyt (n=6)	Mittelwert (in %)	RSD (in %)
Acesulfam-K	68 %	6 %
Cyclamat	91 %	4 %
Saccharin	93 %	3 %
Sucralose	103 %	5 %

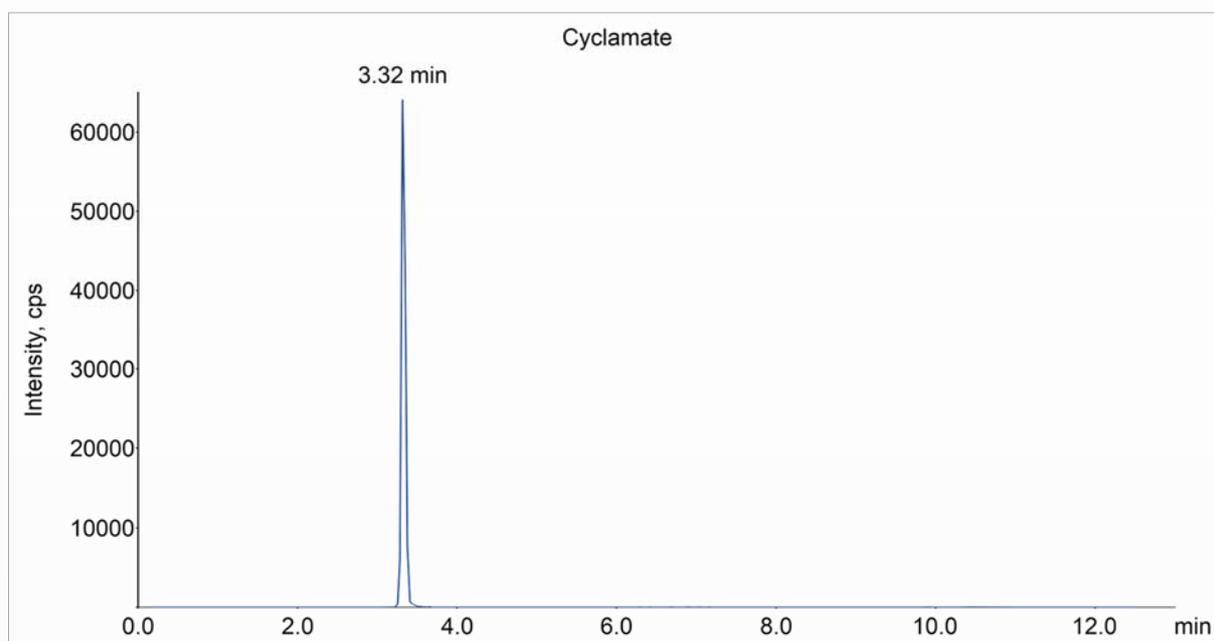
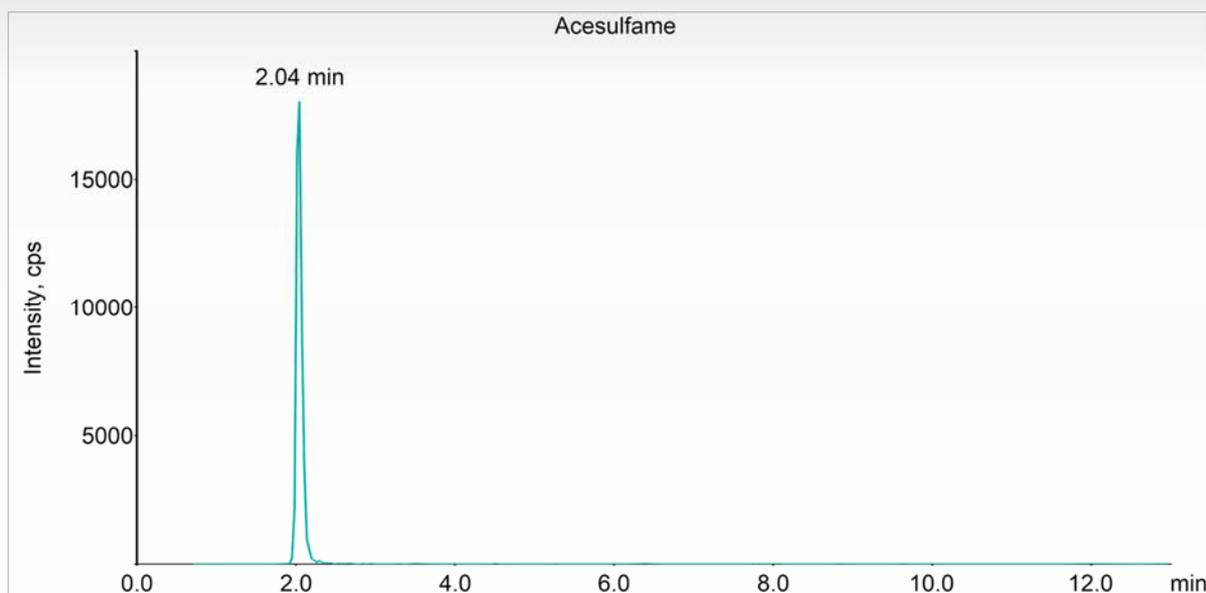


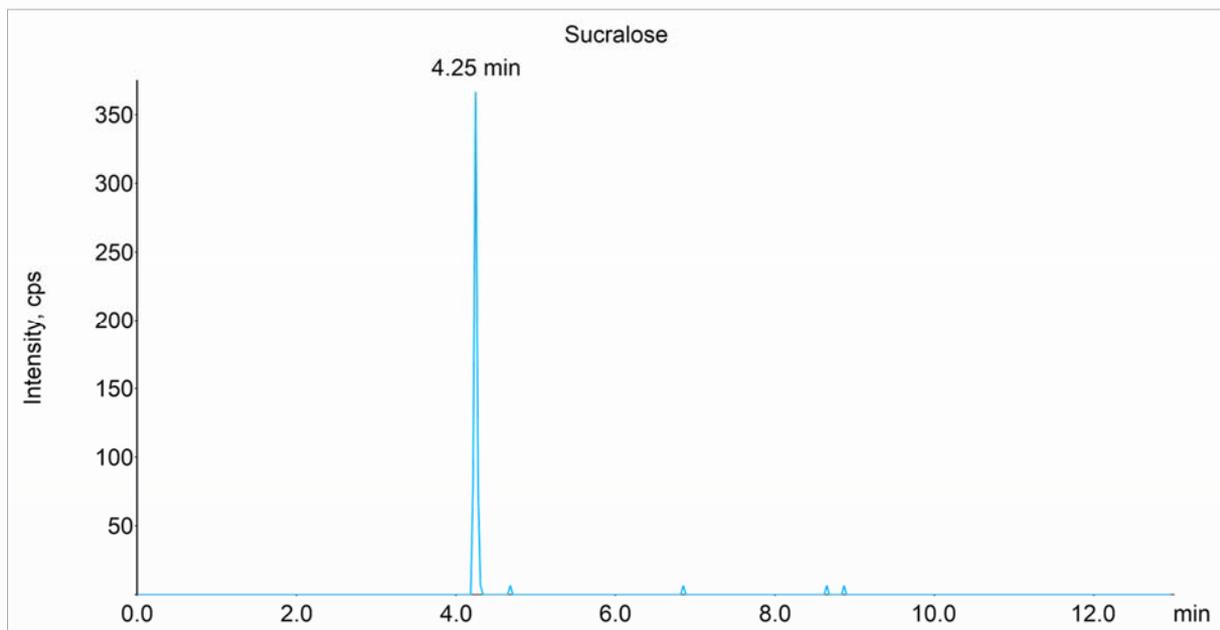
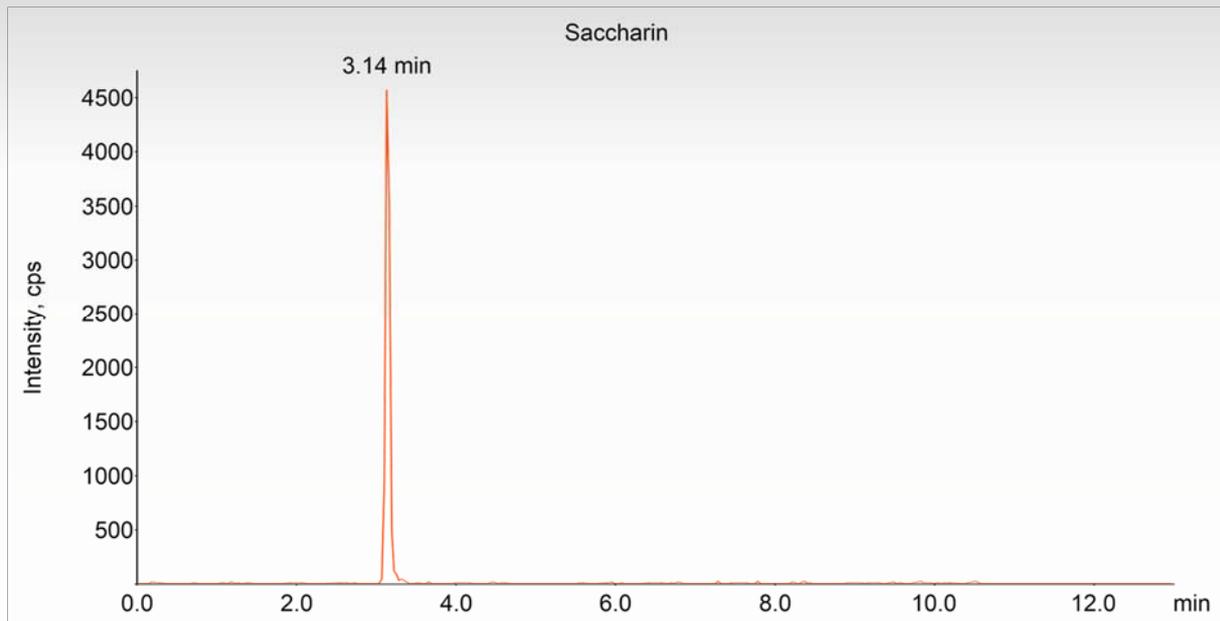
Zusammenfassung

Mit dem FREESTYLE XANA können Süßstoffe in Wasserproben mittels vollautomatisierter und paralleler SPE-Anreicherung zuverlässig mit hoher Reproduzierbarkeit bestimmt werden.

Unbeaufsichtigt bearbeitet das System 24 Stunden an 7 Tagen / Woche die Proben. Durch Parallelisierung der einzelnen Bearbeitungsschritte und gleichzeitiger Bearbeitung mehrerer Proben wird ein hoher Probendurchsatz realisiert.

3.2 Chromatogramme





Retentionszeit	Analyt	Polarität	Quantitativer Übergang [m/z]	Qualitativer Übergang [m/z]
2.04 min.	Acesulfam-K	(-)	162.0/82.1	162.0/77.9
3.14 min.	Saccharin	(-)	182.0/42.1	182.0/105.9
3.32 min.	Cyclamat	(-)	178.0/80.0	178.0/79.0
4.25 min.	Sucralose	(-)	395.0/35.2	395.0/395.1

Kontakt

LCTech GmbH
Daimlerstraße 4
84419 Obertaufkirchen
Deutschland

Tel.: +49 8082 2717-0
Fax: +49 8082 2717-100
E-Mail: info@LCTech.de

www.LCTech.de
www.LCTech-online.com

SOLUTIONS BY

