

CHROM. 9885

NANOGRAMM-VERFAHREN

I. DAS VERLUSTLOSE EINSPRITZEN AUF EINE KAPILLARKOLONNE

I. KLIMES, W. STÜNZI und D. LAMPARSKY

Givaudan Forschungsgesellschaft AG, CH-8600 Dübendorf (Schweiz)

(Eingegangen am 9. Dezember 1976)

SUMMARY

Nanogram techniques. I. Injection without losses on capillary gas-liquid chromatographic columns

Several techniques to handle easily nanogram quantities are described within this series. First, a simple double-cone device prepared from a glass capillary tube and placed in the injection port on top of a glass capillary gas-liquid chromatographic column enables the injection of the total amount of material on to the column without losses by by-pass splitters. A syringe with lengthened piston permits the injection of material without prior dilution. This modified syringe is also well suited for handling of head-space samples and for rapid detection of polarity of unknown components in the analyzed substrate. The re-injection of small quantities of material trapped from the GLC effluent by means of a capillary tube will be dealt with in the third part of this series.

EINLEITUNG

Im Lauf der letzten Jahre hat sich immer mehr gezeigt, dass neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung von Naturprodukten wie z.B. ätherischen Ölen nur dann noch gewonnen werden können, wenn man in den Bereich der Spuren- und Ultra-spurenkomponenten vordringt, die nicht selten einen wichtigen Beitrag zum sensorischen Gesamteindruck des jeweiligen Naturproduktes leisten. Ein deutlicher Trend zur Arbeit mit sehr kleinen Mengen ist daher unverkennbar. Die Kopplung der Gaschromatographie (GC) mit der Massenspektrometrie ist dabei wohl in apparativer Hinsicht der wichtigste Schritt gewesen. Die hohe Empfindlichkeit dieser Methode wird aber nur selten voll ausgenutzt, da die allgemeine Technik der Proben-vorbereitung, der Reaktionsdurchführung im Mikromasstab usw. noch nicht den gleichen Entwicklungsstand erreicht hat. So wurde es bei der Kapillar-GC anfänglich nicht als störend empfunden, dass 90% und mehr des eingespritzten Materials nutzlos durch den Splitter abgeführt wurden. Erst die Entwicklung der Headspace-Analyse steigerte die Ansprüche hinsichtlich sparsamerem Umgang mit dem Ausgangsmaterial. Dass diese Ansprüche nicht notwendigerweise mit aufwendigen oder zeit-

raubenden Techniken verbunden sein müssen, wenn man in den Bereich sehr kleiner Mengen vordringt, hat einer von uns schon früher gezeigt¹⁻⁵.

Wir haben nunmehr eine Reihe von einfachen Techniken entwickelt, mit deren Hilfe wir gute Erfolge bei der Lösung schwieriger Aufgabenstellungen auf dem Gebiet der Analyse komplexer Naturstoffgemische erzielen konnten. Die ausgearbeiteten Methoden umfassen neben der verlustlosen Abnahme einer Substanz aus dem GC⁶ und der Durchführung von Reaktionen mit der so isolierten Probe vor allem auch die Einspritztechnik, über deren verschiedenartige Möglichkeiten wir nachfolgend berichten möchten. Die erste vollständige Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Probenmenge gelang Grob und Grob⁷ durch das splitlose Einspritzen auf eine kalte Säule, Verzele und Mitarbeiter⁸ und vor ihm auch Cronin⁹ haben Modifikationen des Einspritzraumes vorgeschlagen, die eine splitlose Einspritzung auf eine heiße Säule ermöglichen. Wir erreichen die verlustlose Einspritzung auf drei verschiedenen Wegen, die jeweils den gegebenen Ausgangsbedingungen angepasst sind: (1) Einspritzen mit einer Spritze mit verlängertem Kolben, (2) "Einspritzen" mit einer Glaskapillare, und (3) "Einspritzen" durch Einwerfen einer Glaskapillare in den Einspritzraum. Die ersten beiden Möglichkeiten sind für gepackte und Kapillarsäulen, die letztgenannte dagegen nur für Kapillarsäulen geeignet.

METHODISCHE HILFSMITTEL

Abänderung des Einspritzraumes

Während bei Verwendung von gepackten Säulen keine Modifizierung des Einspritzraumes nötig ist, muss dieser bei dem Gebrauch von Kapillarsäulen mit einem doppelt konischen Einsatz (Fig. 1) ausgerüstet werden.

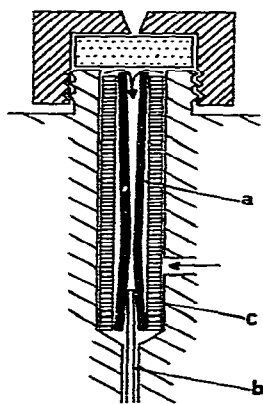


Fig. 1. Modifizierter Einspritzraum. a = Doppeltkonischer Einsatz; b = Kapillarkolonne; c = Stützrohr.

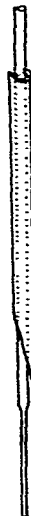


Fig. 2. Spritze mit verlängertem Kolben.

Aus einem Glasrohr (6 mm O.D., 4 mm I.D.) zieht man langsam eine Kapillare von etwa 65 mm Länge, die in der Mitte schmaler (1 mm I.D.) als an den Enden (1.5–2 mm I.D. bei 0.5 mm Wandstärke) ist. Man kann die Verengung im mittleren Teil auch nachträglich mit Hilfe eines Mikrobrenners vornehmen. Der Innendurchmesser des verengten mittleren Teiles sollte mit dem Aussendurchmesser der im Gerät verwendeten Kapillarkolonne fast übereinstimmen, so dass man den Doppelkonus a leicht auf die Kolonne b aufsetzen kann. Ein dickwandiges, nicht starr mit einem anderen Geräteteil verbundenes Glasrohr, c dient der mechanischen Festigkeit des Einsatzes und sorgt gleichzeitig für dessen zentralen Sitz. Der Doppelkonus sitzt nur locker auf der Kolonne und kann daher zur Reinigung leicht herausgenommen werden.

Spritze mit verlängertem Kolben

Bei einer 1 μ l-Spritze (z.B. Hamilton o.ä.) schleift oder sägt man ca. 10 mm vom Nadelende ab. Der nunmehr herausragende Teil des Kolbens wird mit Schmirgelpapier rundum regelmässig abgeschliffen. So entsteht zwischen der Nadel und dem eingezogenen Kolben eine schmale, etwa 10 mm lange Spalte, die für die Aufnahme der geringen Substanzmenge ausreicht (Fig. 2).

RESULTATE UND DISKUSSION

Das splitlose Einspritzen von Lösungen

Der Doppelkonus auf dem Eingang der Säule verkleinert das Totvolumen im Einspritzraum so wesentlich, dass eine direkte Einspritzung auf eine heisse Kapillarsäule die gleiche Trennleistung gewährleistet, wie sie bei der Verwendung eines Splits üblich ist. Die gesamte eingespritzte Menge gelangt hierbei auf die Kolonne, so dass man bei wertvollem Material vergleichsweise 90% und mehr Substanz einsparen und ausserdem die quantitative Auswertung verbessern kann.

Die absolute Menge von eingespritzten Substanzen ist durch die Belastbarkeit der Kolonne und die Empfindlichkeit des Detektors gegeben und bleibt bei Kapillarkolonnen gewöhnlich im Nanogramm- bis in dem unteren Mikrogramm-Bereich. Wenn ein Lösungsmittel verwendet wird, dann sollte seine Menge erfahrungsgemäss zwischen 0.05 und 0.1 μ l liegen. Die üblichen Lösungsmittel (Pentan, Diäthyläther, Schwefelkohlenstoff) geben aus 0.1 μ l Flüssigkeit unter den apparativen Bedingungen im Einspritzblock (1 atü, 200°) etwa 20–30 μ l Dämpfe. Da der Inhalt des doppelkonischen Einsatzes je nach Bauart zwischen 50 und 100 μ l schwankt, werden die beim Einspritzvorgang entwickelten Dämpfe also ohne Schwierigkeiten von ihm aufgenommen. Bei einem Trägergasdurchfluss von ca. 3 ml/min (entsprechend 50 μ l/sec) gelangt die Substanz in weniger als einer Sekunde auf die Kolonne. Dies ist eine ausreichend kurze Zeitspanne, um eine gute Trennung zu gewährleisten. Mengen über 0.2 μ l sollten auf eine kalte Kolonne eingespritzt werden, wobei aber der Doppelkonus nicht entfernt zu werden braucht. Bei grösseren Mengen eingespritzter Lösungsmittel kann ein Teil derselben im Septum sorbiert werden und führt zu unangenehm breiten Lösungsmittelpicks. Man erreicht in diesem Fall eine bessere Form, wenn man nach 30 sec eine Lecknadel einsteckt und gegebenenfalls den eingebauten Splitter öffnet. Messbare Verluste an zu analysierenden Substanzen haben wir auch so nicht beobachtet. Der doppelkonische Einsatz muss ab und zu gereinigt werden, da kleine

Stückchen des Septumgummis sofort eine krasse Peakverbreiterung verursachen können. Ansonsten haben wir auch nach Tausenden direkter Einspritzungen keinen erhöhten Verschleiss der Kapillarkolonne feststellen können, die auf unsere Einspritztechnik zurückzuführen wäre.

Verwendung einer Spritze mit verlängertem Kolben

Bei der Arbeit im Nanogramm-Bereich tritt häufig der Fall ein, dass die Substanz als kaum sichtbarer Beschlag an den Wänden einer Kapillare o.ä. haftet. Falls man das Produkt mit einer normalen Einspritzvorrichtung weiterverarbeiten möchte, erscheint eine Verdünnung mit einem Lösungsmittel unumgänglich. Diese Operation ist jedoch nicht immer erwünscht, da gewisse Verluste bei der nachfolgenden Aufkonzentrierung praktisch unvermeidlich sind. Bei sehr kleinen Mengen konzentrierter Lösungen treten Verluste auch schon auf der Oberfläche der Nadel und durch Kriechvorgänge (kapillare Elevation) ein.

Die Spritze mit verlängertem Kolben gestattet es uns nunmehr, die Substanz ohne vorherigen Lösevorgang in den Gaschromatographen einzuführen. Man berührt zunächst die Gefässwand mit dem verlängerten ausgefahrenen Kolben, zieht diesen dann in die Nadel zurück und durchsticht anschliessend wie gewöhnlich das Septum, während die Substanzspuren gut geschützt in dem Spalt zwischen Kolben und Nadelwand ruhen. Der verlängerte Kolben wird jetzt herausgedrückt, die Probenmenge dampft sofort ab, und man kann den Kolben in normalem Arbeitstempo ein- und die Nadel aus dem Septum herausziehen. Diese Einspritzart kann auch bei anderen Aufgaben mit Vorteil eingesetzt werden, von denen wir hier nur einige Beispiele geben.

Bei der Analyse von Naturprodukten, speziell Extrakten aus pflanzlichem oder tierischem Material, liegt sehr oft ein Gemisch von flüchtigen und nichtflüchtigen Substanzen vor, wobei die zur Verfügung stehende Menge keine Destillation erlaubt. Der Analytiker belastet aber nur ungern seine GC-Kapillarkolonnen mit Ballaststoffen, die er später nicht mehr entfernen kann. Hier hilft die Spritze mit dem verlängerten Kolben weiter und ermöglicht eine rasche Auftrennung. Man nimmt das Gemisch auf den verlängerten Kolben und spritzt auf die oben beschriebene Art ein. Die flüchtigen Komponenten dampfen sofort ab, während die nichtflüchtigen Anteile auf dem Kolbendraht haften bleiben und zu keiner Verschmutzung der Kapillarsäule führen.

Nach dem gleichen Prinzip kann man auch flüchtige Substanzen aus verdünnten Lösungen einspritzen, ohne den Lösungsmittelpeak zu erhalten. Man taucht den verlängerten Kolben in die Lösung ein, lässt das Lösungsmittel an der Luft während etwa 5 sec abdampfen und spritzt anschliessend den im Vergleich zum Lösungsmittel schwerer flüchtigen Teil wie oben beschrieben ein.

Wenn man den verlängerten Kolben mit einer der üblichen stationären Phasen der GC belegt, so kann man auf sehr elegante Weise auch den Headspace von einzelnen Gewürzen oder Blüten mit einer starken Duftabgabe, z.B. Hyazinthen, abnehmen. Man gibt das pflanzliche Substrat in ein mit Septum verschlossenes Fläschchen und führt den präparierten verlängerten Kolben für etwa 30 sec in den Kopfraum ein. Dann spritzt man die sorbierten Substanzen in der oben beschriebenen Weise in den Gaschromatographen ein. Die Fig. 3a, b und c zeigen das Ergebnis einer solchen Headspace-Abnahme von Muskatnüssen, Ingwerwurzeln und Friesienblüten. Die so

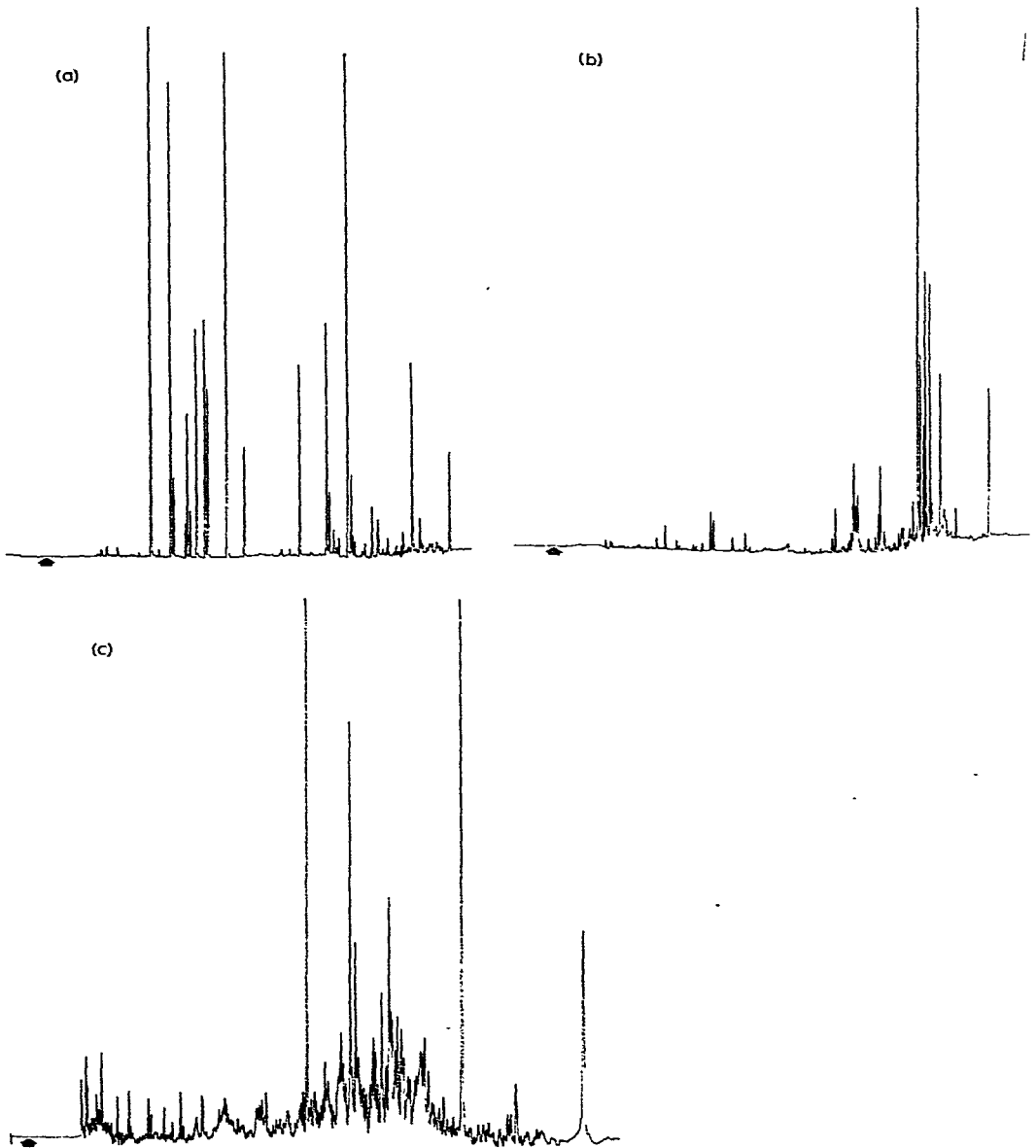


Fig. 3. Headspace-Abnahme mittels Spritze mit verlängertem Kolben nach Beschichtung mit stationärer Phase Ucon-HB 5100. (a) Muskatnuss, (b) Ingwer, (c) Friesenblüten. GC-Bedingungen: 50 m Glaskapillarsäule (Durchmesser 0.32 mm), belegt mit Ucon-HB 5100; Einspritzraum mit doppelkonischem Einsatz versehen; 80° während 9 min. dann 80–180° (6°/min); Trägergas (Helium), 2.9 ml/min; Papiervorschub, 0.5 cm/min.

gewonnenen Substanzmengen reichen bei den Gewürzen mit relativ starker Emanation sogar für die Erfassung der Hauptkomponenten mit einer GC-MS-Kopplung aus, während die meisten Blütenarten gerade nur so viel Produkt emittieren, dass man sich an der Grenze der Empfindlichkeit eines Flammenionisationsdetektors bewegt.

Für das Gelingen derartiger Versuche ist es naturgemäss erforderlich, dass die stationäre Phase frei von flüchtigen Substanzen, die Spritze absolut dicht und der Kolben eventuell oben leicht gefettet ist. Die Phasenreinigung kann man notfalls noch auf dem verlängerten Kolben selbst vornehmen, dann aber unter Verwendung eines anderen Gaschromatographen mit gepackter Säule zur Vermeidung von Verschmutzungen der für die Analyse zu benutzenden Kapillarsäule.

Interessante Effekte ergeben sich aus der Wahl der stationären Phase und eröffnen damit dem Analytiker die Möglichkeit, sich rasch über die Polarität von Einzelsubstanzen in einem Gemisch zu orientieren (Fig. 4).

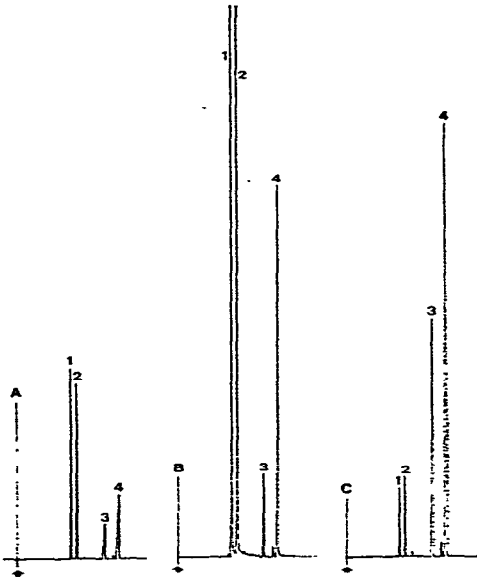


Fig. 4. Headspace-Abnahme von Modellgemischen. A, Abnahme mit unbeschichteter Spritze; B, Abnahme mit polar beschichteter Spritze; C, Abnahme mit apolar beschichteter Spritze. 1 = Isoamylalkohol; 2 = *n*-Amylalkohol; 3 = Dodecan; 4 = *p*-*tert*-Butyltoluol.

Die Sorption einzelner Substanzen kann nämlich weitgehend durch die Verwendung einer polaren oder apolaren stationären Phase beeinflusst werden. So stiegen bei Verwendung von Ucon o.ä. die Peakhöhen der polaren Verbindungen im Gemisch beträchtlich an, während umgekehrt SF 96, Apiezon L o.ä. zu einem Wachstum der apolaren Komponenten im Gaschromatogramm führten. Die Ergebnisse unserer Versuche mit Modellgemischen und später auch mit ätherischen Ölen waren weitgehend reproduzierbar unter der Voraussetzung, dass man die Spritze mit ausgefahrenem verlängertem Kolben, der mit stationärer Phase belegt war, in die zu analysierenden Dämpfe für 1–30 sec oder aber länger als 15 min eingeführt hatte. Zwischen 30 sec und 15 min Expositionszeit können dagegen Unregelmässigkeiten auftreten, die wir uns in erster Näherung mit unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten erklärt haben.

Das "Einspritzen" mit einer Glasskapillare

Es ist üblich, dass man eine Substanz bei der Isolierung mittels GC in einer Kühlfalle kondensiert und sie anschliessend in ein anderes Gefäss überführt, z.B. zum Zweck einer Folgereaktion oder Kontrolleinspritzung auf eine andere GC-Kolonne. Bei derartigen Überführungen treten umso höhere Verluste auf, je kleiner die verarbeitete Menge ist. Um die Verluste niedrig zu halten, benutzen wir im Nanogramm-Bereich eine einzige Kapillare für alle Operationen (Auffangen, Reaktion, Einspritzen). In der vorliegenden Mitteilung wollen wir nur die Einspritztechnik beschreiben. Man kühlt den die Substanz aus der Auffangoperation enthaltenden Teil der Kapillare, z.B. einer Schmelzpunkt-Kapillare (Durchmesser ≤ 1.0 mm) mit Trockeneis ab. Das längere Ende der Kapillare stützt man mit einer geeigneten Unterlage ab und schmilzt nun die Kapillare in der Nähe der Substanz mit einem Mikrobrenner zu. Das andere Ende der Kapillare zieht man zu einer Spitze aus (Fig. 5).

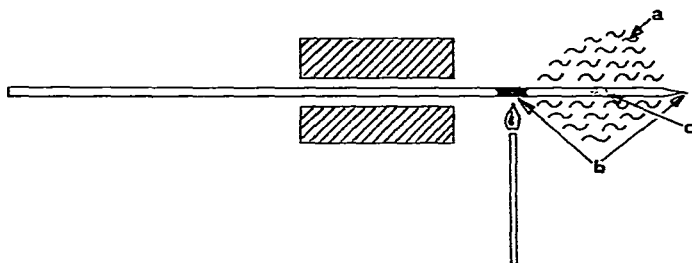


Fig. 5. Vorbereitung einer Auffangkapillare als Einspritzvorrichtung. a = Trockeneis; b = Abmelzzonen; c = Substanz.

Vor dem nächsten Einspritzen bricht man die Spitze der Kapillare ab und führt sie durch das Septum in den Einspritzblock ein (Fig. 6). Die Temperatur sollte etwa 50° über dem Siedepunkt der eingeführten Substanz liegen. Die Substanz dampft in diesem Fall sofort ab und geht auf die Kolonne. Die Kapillare kann man nach etwa 0.5 sec wieder herausziehen. Das Septum sollte nicht mehr als zur Abdichtung unbedingt nötig zugezogen sein und noch weich bleiben, um die Kapillare besser einführen zu können. Die Kapillare beschädigt naturgemäss das Septum stärker als eine normale Spritzenadel, so dass ein häufigeres Auswechseln des Septums und Reinigen des Einsatzstückes von Gummipartikeln notwendig ist.

Das Abbrechen der Kapillarspitze benötigt etwas Gefühl, denn eine zu kleine Öffnung kann sich leicht verstopfen und verhindert das Abdampfen der Substanz, während eine zu grosse Öffnung das Septum stärker beschädigt.

"Einspritzen" durch Einwerfen einer Glasskapillare

Bei hochsiedenden Substanzen mit Siedepunkt etwa ab 220° gibt die oben beschriebene Einspritzart zu geringe Ausbeuten, weil die Abdampfgeschwindigkeit zu klein ist. In derartigen Fällen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, das Stück der Kapillare mit der Substanz als Ganzes in den Einsatz einzuwerfen. Zu diesem Zweck stellt man bei abgekühlter Kolonne den Trägergasstrom ab, öffnet den Einspritzraum, wirft die Kapillare mit Substanz ein, dichtet wieder mit dem Septum ab, stellt den

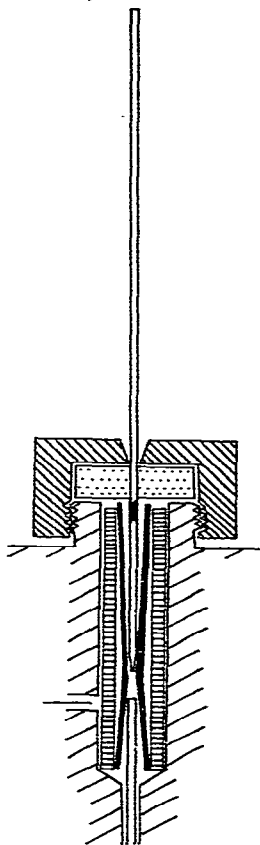


Fig. 6. Einführung der Substanz auf die Kapillarsäule mittels der "Einspritzkapillare".

Trägergasdruck auf den gewünschten Wert ein und fährt mit der Operation wie bei einer Einspritzung auf die kalte Säule fort.

Die Temperatur des Einspritzblocks sollte in diesem Spezialfall niedriger sein als der Siedepunkt der eingeworfenen Substanz. Sie liegt erfahrungsgemäss bei etwa 150° . Das Schliessen des Einspritzraumes nach dem Einwurf braucht nicht hastig zu erfolgen, sollte jedoch ohne überflüssige Verzögerung vorgenommen werden. Der Trägergasstrom wird durch die Konstruktion des Einsatzes gezwungen, durch die eingeworfene Kapillare zu strömen. Wie die Erfahrung gezeigt hat, nimmt er auch bei der relativ niedrigen Temperatur des Einspritzblockes die Substanz quantitativ mit auf die GC-Kolonnen. Wir konnten selbst bei dieser Art von "Einwurf" statt Einspritzung keine messbaren Verluste feststellen, obwohl gerade diese Technik uns zunächst verlustverdächtig erschien.

SCHLUSSFOLGERUNG

Alle vorstehend beschriebenen Methoden des verlustlosen Einspritzens können aus einer mehrjährigen Laboratoriumserfahrung heraus auch für die Kopplung des

Gaschromatographen mit dem Massenspektrometer empfohlen werden. Sie sind für den sparsamen Umgang mit geringen Substanzmengen ausgearbeitet worden. Falls jedoch genügend Substanz vorhanden ist, bringen sie dem Analytiker keinen Vorteil.

ZUSAMMENFASSUNG

In der ersten Mitteilung einer Reihe, die sich mit verschiedenen Techniken für den einfachen Umgang mit Nanogramm-Mengen beschäftigt, wird über mehrere Methoden zum verlustlosen Einspritzen von Substanzen auf GC-Kapillar-Kolonnen berichtet. Eine Spritzenkonstruktion mit verlängertem Kolben gestattet die Substanzüberführung ohne jede Verdünnung und ist ausserdem bei Belegung der Kolbennadel mit stationärer Phase zur Abnahme eines Headspace, z.B. von einzelnen Blüten, und zur schnellen Kontrolle der Polarität von Substanzen in einem Gemisch geeignet. Schliesslich wird die Verwendung einer Glasskapillare, die zuvor als Kühlfalle gedient hat, zur Wiedereinführung der gesammelten Substanz in einen Gaschromatographen ohne Benutzung einer Spritze beschrieben.

LITERATUR

- 1 I. Klimes, K. Kantorova und J. Janák, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 32 (1967) 443.
- 2 I. Klimes, O. Perinkova und J. Janák, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 32 (1967) 1273.
- 3 I. Klimes und M. Betusova, *Anal. Biochem.*, 23 (1968) 102.
- 4 I. Klimes und J. Janák, *Microchem. J.*, 13 (1968) 534.
- 5 I. Klimes, K. Stepankova und J. Janák, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 34 (1969) 776.
- 6 I. Klimes, W. Stünzi und D. Lamparsky, *J. Chromatogr.*, 136 (1977) 23.
- 7 K. Grob und G. Grob, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 584.
- 8 M. Verzele, M. Verstappe, P. Sandra, E. van Luchene und A. Wuyt, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 668.
- 9 D. A. Cronin, *J. Chromatogr.*, 52 (1970) 375.