

Afdeling OCON 1984-11-19

RAPPORT 84.100 Pr.nr. 505.0070

Onderwerp: Het onderzoeken van de mogelijkheden om de begintemperatuur van de GC-kolom te verhogen door het gebruik van hoger kokende oplosmiddelen.

Verzendlijst: directeur, sectorchefs, direktie VKA, afdeling OCON
(4x), Projektbeheer, circulatie, projekteider

Afdeling OCON

1984-11-19

RAPPORT 84.100

Pr.nr. 505.0070

Projekt: Ontwikkelen methoden voor het verrichten van identificaties
c.q. confirmaties

Onderwerp: Het onderzoeken van de mogelijkheden om de begintemperatuur
van de GC kolom te verhogen door het gebruik van hoger
kokende oplosmiddelen.

Doel:

Het verkorten van de meettijd op de GCMS door het verhogen van de initial (begin) temperatuur.

Samenvatting:

Op een gaschromatograaf met vlamionisatie detectie en op de GCMS zijn een aantal metingen verricht met als variabelen het oplosmiddel (isooctaan, decaan, undecaan, dodecaan, tetradecaan en mengsels daarvan) en de begintemperatuur van de kolom.

Conclusie:

Uit het onderzoek komt duidelijk naar voren, dat de toepassing van hogere alkanen als oplosmiddel zinvol is. Er is een duidelijke winst aan kortere meettijd, aan kortere afkoeltijd van de oven en aan stabiliteit van de begintemperatuurinstelling. Voor HFB-derivaten van stilbenen kan b.v. de begintemperatuur veranderd worden van 80°C naar 140°C zonder verlies aan piekvorm en scheiding. De meettijd gaat daarmee terug van 13,5 min naar 9,5 min.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra *tb*

Medewerker/Samensteller: ing. P.G.M. Kienhuis *P.G.M. Kienhuis*

Projectleider: W.A. Traag *W.A. Traag*

1. Inleiding

Bij de analyse van o.a. hormonen op de GCMS wordt gebruik gemaakt van iso-octaan (kpt 99,2°C) als oplosmiddel. Het gebruikelijke temperatuur traject is daarbij: 80°C 4 min, 80°C 15°C/min, 260 → 260.

Bij splitloze injectie moet de oven gedurende enige tijd (2-4 min.) na de injectie op 10 à 20°C onder het kookpunt van het oplosmiddel blijven, zodat een deel van het oplosmiddel, dat uit het injectieblok van + 250°C komt, in een smalle plug kan condenseren bij het begin van de kolom. De te bepalen componenten lossen hierin op. Vervolgens wordt de temperatuur zo snel mogelijk verhoogd, zodat de gevormde prop snel verdampt en de componenten in een smalle plug achterblijven. Afhankelijk van de temperatuur van de kolom beginnen de componenten zich vervolgens door de kolom te verplaatsen en kunnen aansluitend gedetecteerd worden.

Uit het bovenstaande blijkt, dat de begintemperatuur van de kolom mede bepaald wordt door het oplosmiddel. Aangezien de componenten zich pas bij 160°-200°C gaan verplaatsen, moet het dus mogelijk zijn om met een hoger kokend oplosmiddel te werken, met als doel een kortere meet- en afkoeltijd.

Ter orientatie zijn een aantal proeven met TMS-derivaten van hormonen op een GC met vlamionisatiedetectie (FID) uitgevoerd, waarna verder is gewerkt met HFB-derivaten op de GCMS.

Als oplosmiddel zijn een aantal n-alkanen onderzocht.

2. Apparatuur

2.1 GC met vlamionisatiedetectie (FID):

Packard Becker 429 met een fused silica CP Sil 5 CB kolom van 25 m, interne diameter 0,32 mm en een filmdikte van 0,12 µm.

2.2 GCMS: Finnigan 4500 met een fused silica CP Sil 19 CB kolom van 25 m, interne diameter 0,25 mm en een filmdikte van 0,39 µm.

3. Reagentia/standaarden

3.1 Alkanen van p.a. kwaliteit (Merck):

iso-octaan	(C 8)	kookpunt	99,2°C
n-decaan	(C10)	kookpunt	174°C
n-undecaan	(C11)	kookpunt	196°C
n-dodecaan	(C12)	kookpunt	216°C
n-tetradecaan	(C14)	kookpunt	253°C.

3.2 TMS-derivaten

De hormonen hexa-deutero diethylstilboestrol (DES D6), nortestosteron (NOR) en zearalenon (Zea) zijn gederivatiseerd met een mengsel van trimethylchlorosilane (TMCS), N.O-bis (trimethylsilyl) trifluoroaceta-
mide (BSTFA) en pyridine p.a. in de verhouding 1:10:90, gedurende 1
uur bij 60°C (7.2).

3.3 HFB-derivaten

De hormonen diethylstilboestrol (DES), dienoestrol (DE) en hexoestrol
(HEX) met hun gelabelde (deuterium) verbindingen (DES D6, DE D2 en
HEX D4) zijn gederivatiseerd in een mengsel van 200 µl aceton en 50 µl
heptafluorboterzuuranhydride (HFBA) gedurende 1 uur bij 60°C (7.2).

4. Experimenten

4.1 Packard Becker 429

De proeven met de Packard Becker zijn uitgevoerd met de TMS derivaten
van DES D6, NOR en ZEA. Injectievolume 2,5 µl dat wil zeggen 62,5 ng
per injectie van elke component. Als oplosmiddel zijn verschillende
hogere alkanen gebruikt. De variatie in de temperatuur van de kolom is
als volgt:

T begin $\xrightarrow{4 \text{ min}}$ T begin $\xrightarrow{15^\circ\text{C}/\text{min}}$ 260°C \longrightarrow 260°C
T injectieblok = 250°C

met als T begin:

iso-octaan	:	90°C; 110°C; <u>130°C</u> ; 150°C.
n-decaan	:	160°C; <u>170°C</u> ; 180°C; 190°C; 200°C.
n-dodecaan	:	<u>190°C</u> ; 200°C; 210°C.
n-tetradecaan:		<u>190°C</u> ; <u>200°C</u> ; 210°C; 230°C.

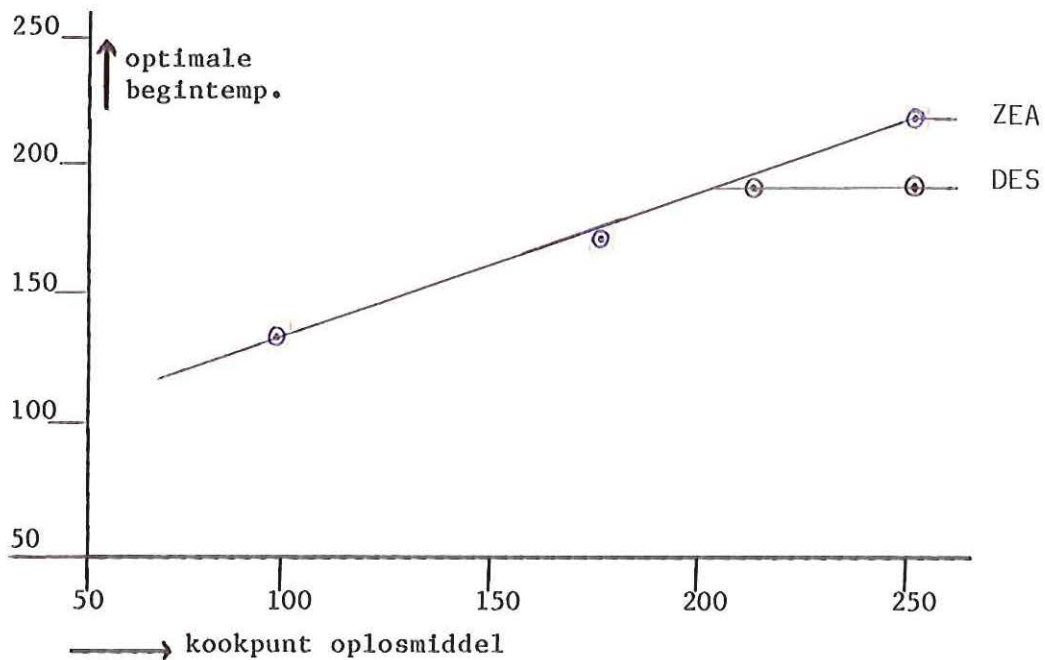
Door onderlinge vergelijking van piekhoogte en piekvorm is een optimale temperatuur vastgesteld. Deze waarden zijn onderstreept.

Bij tetradecaan doet zich het probleem voor, dat niet de piekvorm bepalend is, maar het aanwezig zijn van de componenten.

De standaarden blijven nl. afhankelijk van de begintemperatuur in de oplosmiddelpiek zitten (zie figuur 1, blz. 10). Opmerkelijk is, dat de oplosmiddelpiek een constante breedte heeft van iets meer dan 5 min. Aangezien het kookpunt bij 253°C ligt, is het zeer aannemelijk, dat een deel van het oplosmiddel als vloeistof door de kolom gaat.

Afhankelijk van de temperatuur van de kolom blijven daarbij een of meerdere hormonen in de tetradecaan opgelost. Wel blijkt de piekvorm blijvend goed te zijn, zodat bij interesse in alléén zearalenon een begintemperatuur van b.v. 220°C het goed zal doen.

Bij de proeven met iso-octaan en n-decaan is de piekvorm wel bepalend voor het vaststellen van het optimum. Daarbij blijkt er een duidelijke relatie te bestaan tussen het kookpunt van het oplosmiddel en de optimale begintemperatuur (zie figuur 2).



Figuur 2: Verband tussen kookpunt oplosmiddel en de optimale begintemperatuur voor TMS derivaten op de Packard Becker 429.

Het is duidelijk een rechte, die "afbreekt" bij resp. $\pm 190^{\circ}\text{C}$ (DES D6) en $\pm 220^{\circ}\text{C}$ (ZEA) waar de effecten uit figuur 1 een rol gaan spelen.

In ieder geval blijkt uit het bovenstaande dat voor DES D6 een maximale temperatuur van 190°C haalbaar is met zowel dodecaan als tetradecaan. Aangezien aan tetradecaan diverse nadelen kleven, zoals stroperigheid bij kamertemperatuur en verontreiniging van het MS gedeelte (vnl. de bron bij gebruik van de GCMS) door het hoge kookpunt, is besloten om verder te gaan op de GCMS met dodecaan.

4.2 GCMS

De proeven met de GCMS zijn uitgevoerd met de HFB-derivaten van DES, DES D6; DE, DE D2, HEX en HEX D4. Het injectievolume is $5 \mu\text{l} - 5 \text{ng}$ per component.

De MS is ingesteld op 3 scans per sec. Per scan wordt alleen een aantal massa's bekeken, die specifiek zijn voor de te meten componenten (Multiple ion detection = MID) (zie tabel 1).

Tabel 1

Massa's HFB derivaten stilbenen		
Hormoon	M+	te detecteren massa's
DES	660	660; 631; 447; 341
DES D6	666	666; 634; 453; 344
DE	658	658; 629; 445; 341
DE D2	660	660; 631; 447; 343
HEX	662	331; 303
HEX D4	666	333; 304
Massa's oplosmiddelen		
decaan	142	142
undecaan	156	156

Op deze wijze wordt een grotere gevoeligheid verkregen. Per scan wordt de totale intensiteit gedurende $0,025 \text{ sec}$ per massa gemeten. Deze meetwaarde wordt straks weergegeven als het aantal counts per scan per massa.

De variatie in de temperatuur is als volgt:

T begin $\xrightarrow{4 \text{ min}}$ T begin $\xrightarrow{15^\circ\text{C/min}}$ $260^\circ\text{C} \longrightarrow 260^\circ\text{C}$
(temp. injectieblok = 250°C , op één meting na)

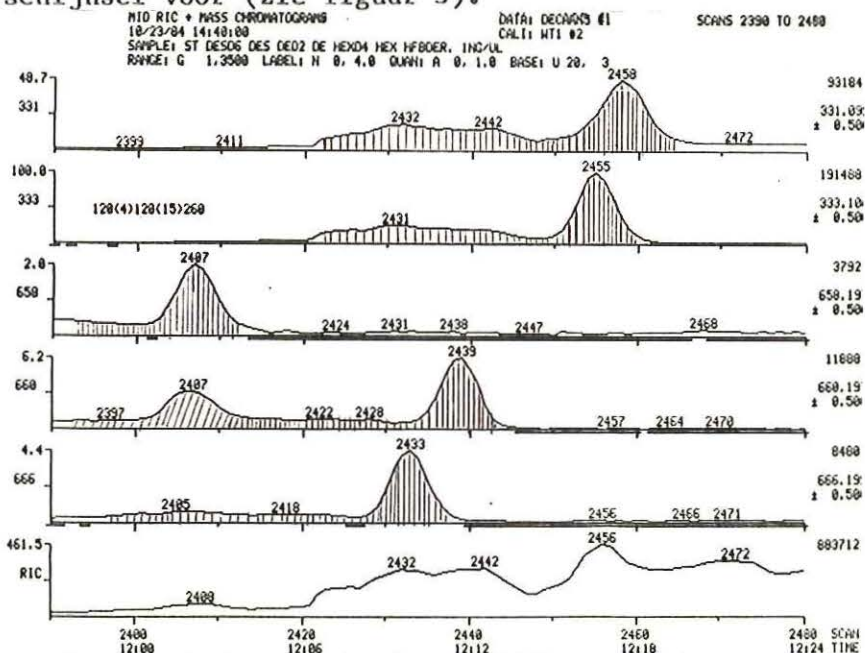
met als T begin

dodecaan: 180; 160; 160 (temp. injectieblok 270°C);
undecaan: 80; 90; 100;
decaan : 80; 90; 100; 110; 120; 130.

Na 2 injecties met dodecaan werd al duidelijk, dat het "injectieblok" sterk wordt verontreinigt door de dodecaan. Er komt gedurende langere tijd ($\gg 1$ uur) een stroom van dodecaan in het MS gedeelte, van een zodanig niveau, dat de meting gestoord wordt en het meetgedeelte vervuild.

Ook verhoging van de temperatuur van het injectieblok van $250 - 270^\circ\text{C}$ om de dodecaan er sneller uit te krijgen biedt geen soelaas.

Als 2de valt op, dat de optimale begintemperatuur een stuk lager ligt dan bij de Packard Becker. Zelfs 160°C blijkt nog te hoog te zijn. Bij undecaan is de nasleep al beduidend kleiner ten opzichte van dodecaan, maar nog wel duidelijk aanwezig. Er komt tevens een ander probleem naar voren, namelijk dat de piek wordt uitgesmeerd over een tijdsbestek van 15 tot 20 sec. Ook bij decaan doet zich dit verschijnsel voor (zie figuur 3).



Figuur 3. HFB derivaten in decaan bij een begintemperatuur van 120°C .

Met voor elke component een specifieke massa.

De oorzaak ligt in de combinatie van een groot injectievolume met een relatief hoog kookpunt van het oplosmiddel. Een deel van de componenten gaat zich al verplaatsen in de kolom, terwijl het oplosmiddel nog niet verdampt is (7.1). Bij de Packard Becker is dit verschijnsel niet waargenomen. Buiten het feit, dat het een ander apparaat is, met een andere kolom en een ander derivaat, zal voornamelijk het injectievolume (2,5 μ l) hieraan ten grondslag liggen.

Op grond van bovenstaande resultaten is overgegaan naar een aantal mengsels van undecaan en decaan met iso-octaan.

Voor de resultaten zie tabel 2.

Hierin zijn de meetresultaten voor een tweetal massa's nader uitgewerkt.

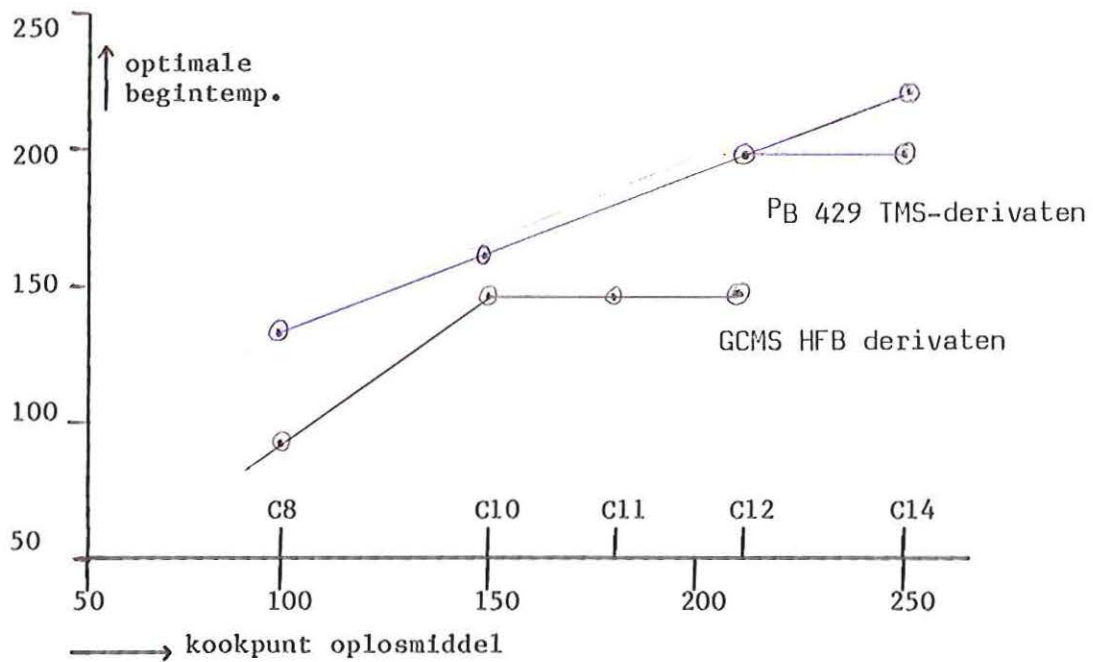
5. Discussie

In tabel 2 (blz. 9) zijn de resultaten van een 4-tal combinaties van iso-octaan, decaan en undecaan als oplosmiddel weergegeven. De redenen voor het testen van deze mengsels zijn tweërlei. Ten eerste wordt de absolute hoeveelheid hoogkokend oplosmiddel verminderd, waardoor de MS minder wordt vervuild, en ten tweede wordt het propvolume kleiner doordat geïnjecteerd wordt bij een oventemperatuur boven het kookpunt van iso-octaan, zodat alleen de hogerkokende alkaan condenseert. Uit de resultaten blijkt, dat problemen, die veroorzaakt worden door een te groot injectievolume (figuur 3) door de toepassing van een mengsel worden voorkomen.

Verder blijkt, dat een verhouding van 4:1 (injectievolume = 5 μ l, fraktie decaan of undecaan is 1 μ l) bij decaan beter voldoet dan de verhouding 9:1. Bij decaan is dit precies andersom. Dit hangt waarschijnlijk samen met de fraktie, die condenseert aan het begin van de kolom. Bij undecaan zal dit meer zijn dan bij decaan.

Zowel bij undecaan als decaan ligt de optimale temperatuur bij 140°C à 150°C. Aangezien de piekvorm bij beide omstandigheden vrijwel identiek is, gaat de voorkeur uit naar decaan, aangezien dit de MS minder vervuilt.

Omdat de piekvorm bij 150°C nog vrij sterk varieert per meetdag, kan 140°C bij HFB derivaten van stilbenen het beste als optimum genomen worden. Op grond van de huidige gegevens kan figuur 2 verder uitgebreid worden (figuur 4).



Figuur 4.

De optimale begintemperaturen blijken beduidend lager te liggen bij de GCMS. De oorzaak zal grotendeels aan het verschil in apparatuur liggen (grootte injectieblok; plaats temperatuurmeting van de oven, andere kolom, temperatuurverdeling in de oven, enz.) en minder aan het feit dat het TMS-derivaten zijn. Daarom zal de optimale temperatuur voor TMS-derivaten ook in de buurt van de 150°C liggen. Het is in ieder geval wel duidelijk dat per apparaat en per component een optimum gezocht zal moeten worden.

Tenslotte kunnen de voor en nadelen op een rijtje gezet worden:

Voordelen:

- De begintemperatuur is verhoogd van 80 naar 140°C. Met een opwarm snelheid van 15°C per min houdt dit een tijdwinst in van 4 min per analyse. Dit komt goed overeen met het verschil aan retentietijd van 757 scans 250 sec 4 min.
- De afkoelperiode van de oven kan aanzienlijk bekort worden.
- De instelling van de oven wordt stabielier gezien het grotere verschil tussen de begintemperatuur en de omgevingstemperatuur.
- Er is geen verlies aan resolutie. Op de 3e meetdag (tabel 2) zijn de 80°C met iso-octaan en de 140°C met iso-octaan-decaan 4:1 vlak na elkaar gemeten. Het verschil in retentietijd tussen massa 331 en 666 is gelijk gebleven (beide 23 scans) met gelijkblijvende piekvorm. De eerste 60° temperatuurstijging blijkt dus voor de scheiding niet van belang te zijn.

- De toepassing van een mengsel maakt het mogelijk grotere volumina te injecteren. Het zou op zich interessant zijn om na te gaan of nog grotere volumina mogelijk zijn.

Nadeel:

- Het meetgedeelte van de MS krijgt meer hoogkokende componenten te verwerken. Bij decaan als oplosmiddel is dit echter acceptabel. Bij gebruik van andere detectiesystemen vervalt dit nadeel zelfs grotendeels.

6. Conclusie:

Uit het onderzoek komt duidelijk naar voren, dat de toepassing van hogere alkanen als oplosmiddel zinvol is. Er is een duidelijke winst aan meettijd, aan afkoeltijd van de oven en aan stabiliteit van de begintemperatuurinstelling. Voor HFB-derivaten van stilbenen kan b.v. het temperatuurtraject veranderd worden van 80°C 4 min, 80°C 15°C/min, 260°C naar 140°C 4 min, 140°C 15°C/min, 260°C zonder verlies aan scheiding. De meettijd gaat daarmee terug van 13,5 naar 9,5 min.

7. Literatuur

7.1 K. Grob Jr. Solvents effects in capillary gaschromatografy. Proceedings of the Fifth International Symposium on capillary gaschromatografy. 1983, blz. 254-265.

7.2 Intern voorschrift F 74:

Een op massaspectrometrie gebaseerde bevestigingsmethode voor exogene steroïden in runderurine op het $\mu\text{g}/\text{l}$ niveau.

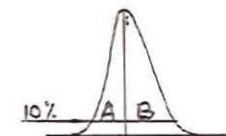
Tabel 2. Resultaten verkregen met verschillende oplosmiddelen, bij verschillende temperatuurtrajecten gemeten gedurende meerdere dagen met

scannr. = retentietijd in scans (3 scans/sec)

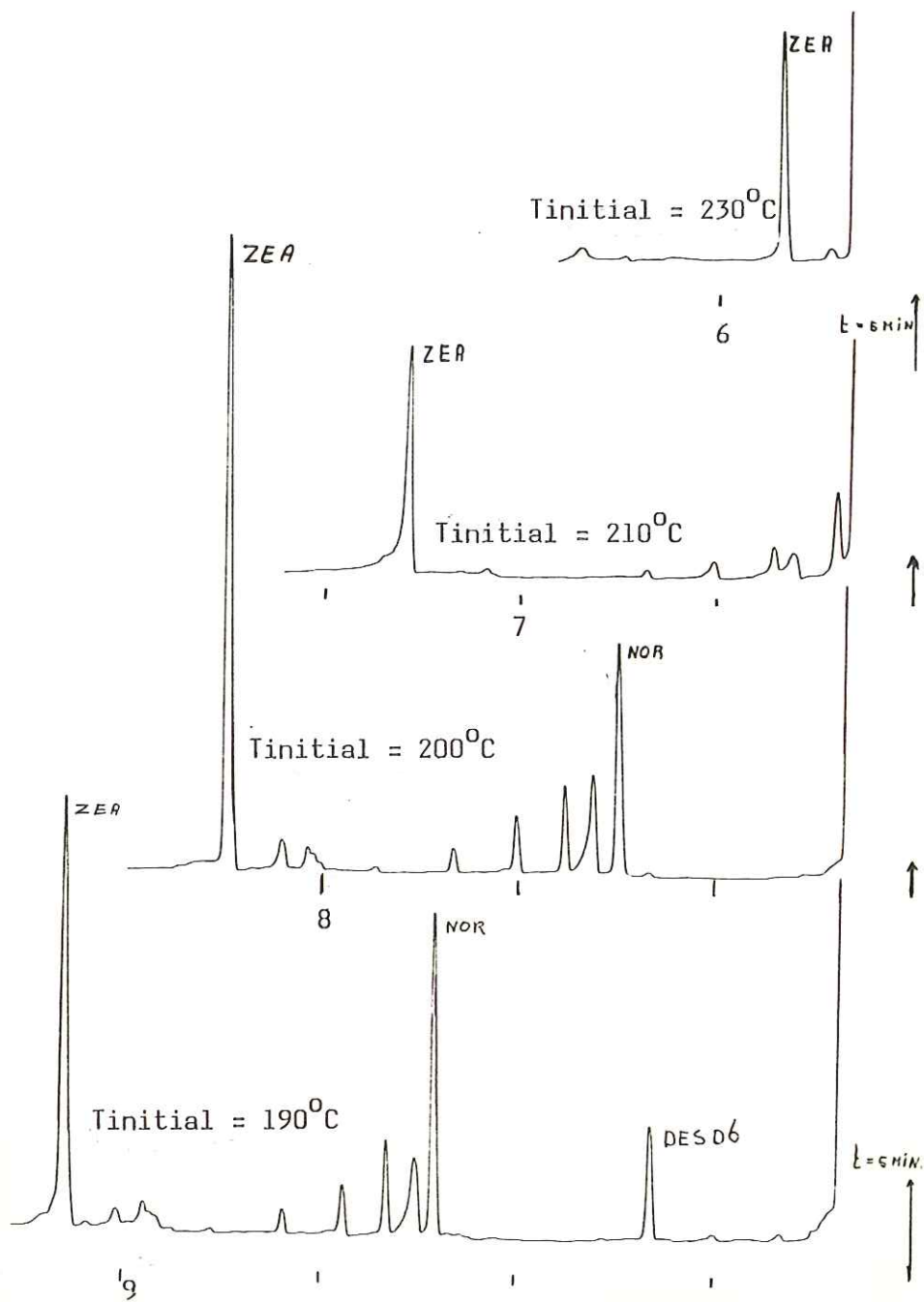
counts = gemeten intensiteit per scan per massa

W 1/2 h = piekbreedte op halve hoogte

A en B = piekbreedte t.o.v. de hoogtelijn op 10% van de hoogte.



temperatuur traject	Massa 331					Massa 666				
	scannr.	counts	W 1/2 h	A	B	scannr.	counts	W 1/2 h	A	B
iso-octaan:undecaan = 4:1	meetdag 1									
100(4)100(15)260	2623	115.840	6	6	5,5	2599	29.792	5	4	5
140(4)140(15)260	2205	54.912	9	7	10,5	2180	11.104	8,5	6	10
150(4)150(15)260	1994	53.888	11	7,5	15	1969	10.624	10,5	5,5	15,5
160(4)160(15)260	1857	30.688	14,5	8,5	25	1831	5.784	14	7,5	25
iso-octaan:undecaan = 9:1	meetdag 2									
150(4)150(15)260	1786	90.100	7	6,5	7,5	1763	15.400	6,5	4,5	8
170(4)170(15)260	1551	83.700	7,5	6,5	10,5	1529	13.700	7,5	5,5	10
180(4)180(15)260	1428	44.400	12,5	8,5	20	1403	6.730	13,5	6	24
160(4)160(15)260	1670	97.500	7,5	6,5	11	1647	17.060	7	5	11
iso-octaan:decaan = 4:1	meetdag 3									
110(4)110(15)260	2239	107.600	6	6,5	6	2218	16.300	6	6	5,5
130(4)130(15)260	2023	148.700	6	5,5	5,5	2003	24.200	5,5	4,5	5
150(4)150(15)260	1800	96.250	6	5,5	6,5	1778	14.800	6	4,5	6,5
170(4)170(15)260	1552	23.400	9,5	6,5	15	1531	3.200	9	7	15
iso-octaan:decaan = 9:1	meetdag 4									
150(4)150(15)260	1786	104.800	7,5	6,0	9	1764	16.000	7	5,5	8,5
170(4)170(15)260	1547	75.900	10,5	7	19	1526	11.000	10	6,5	20
iso-octaan	meetdag 5									
80(4)80(15)260	2719	119.808	6	5,5	6	2696	4.728	6	4,5	6
iso-octaan:decaan = 4:1	meetdag 6									
140(4)140(15)260	1962	207.616	7	6	7,5	1939	9.584	7	5,5	7,5
150(4)150(15)260	1813	132.096	10,5	6	13	1789	6.008	10,5	5,5	13
150(4)150(15)170(5)170(15)260	2485	89.216	10,5	8	11	2456	3.361	11,5	6,5	14



Figuur 1. Inhaaleffect van de oplosmiddelpiek op de componenten met de begintemperatuur als variabele (oplosmiddel tetradecaan) 2,5 µl injectie van DES D6, NOR en ZEA TMS-derivaten 62,5 ng elk. Att. = 16.