

Macro-injectie op capillaire kolommen

Inleiding gehouden tijdens het op 28 november 1978 door KIWA en VWN georganiseerde colloquium over Methodenontwikkeling ten behoeve van water kwaliteitsmeting.

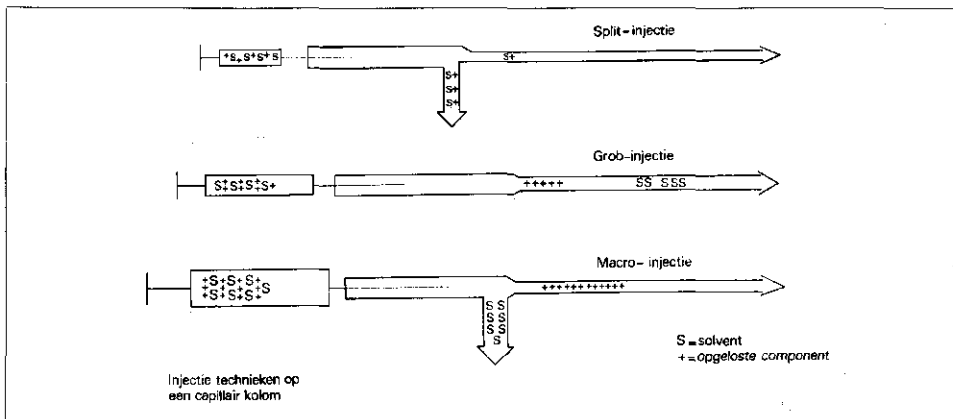
Het analyseren van individuele componenten zal ook in de toekomst noodzakelijk blijven, enerzijds om informatie te verkrijgen over de samenstelling van een gemeten somparameter, anderzijds omdat de belangstelling blijft bestaan voor een aantal verbindingen waarvan het voorkomen vanwege hun specifieke eigenschappen gecontroleerd moet worden. Voor de vluchtige en matig vluchtige stoffen is gaschromatografie, eventueel in combinatie met massaspectrometrie, de aangewezen techniek. Voor de hoogmoleculaire en



A. NOORDSIJ
KIWA NV

thermisch instabiele verbindingen is de hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC) een mogelijkheid. Speciaal de analyse van polycyclische aromaten (PCA) lijkt met HPLC zeer goed uitvoerbaar. Voor spoorwerkdoeleinden kan met behulp van HPLC de scheiding van macromoleculen op grond van het moleculair gewicht gerealiseerd worden. Door het KIWA werd een eenvoudige vlloeistofchromatograaf geconstrueerd waarmee bijv. de PCA-analyse goed uitvoerbaar is. Het toepassingsgebied van de HPLC voor de wateranalyse is nog slechts klein. De toekomst zal moeten leren welke mogelijkheden deze analysetechniek nog in zich bergt. Gaschromatografie daarentegen wordt uitgebreid toegepast en de ontwikkelingen in deze techniek hebben dan ook grote betekenis voor het wateronderzoek.

Naarmate meer bekend wordt over mogelijk schadelijke effecten, vooral op de lange termijn, van organische microverontreinigingen ontstaat meer en meer de behoefte aan het analyseren en meten in zeer lage concentraties. De constructie van het analytisch instrumentarium wordt aan die behoefte aangepast. Het is vooral de analyse in de medische en biologische sfeer, die steeds hogere eisen stelt aan de meetgevoeligheid. In kleine monstervolumina moeten hoeveelheden in het subnanogramgebied gemeten worden. Signalen, die beneden het ruisniveau liggen worden met behulp van computertechnieken verwerkt. De mogelijkheden om te meten worden zeer groot. De mogelijkheid om foutief te meten eveneens. In de medische en biologische analyse is deze ontwikkeling echter noodzakelijk. Vergroting van het monstervolume, om



Afb. 1 - Injectietechnieken op een capillairkolom.

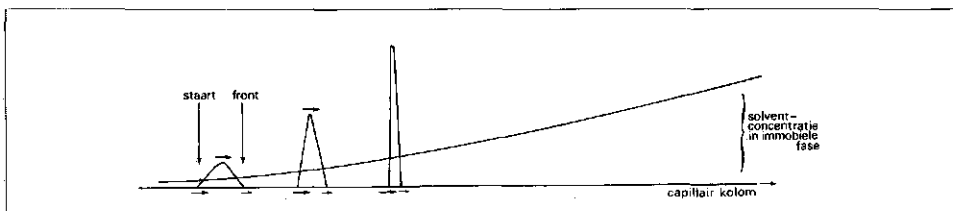
daarin lagere concentraties te kunnen meten, is niet mogelijk. Het is te begrijpen dat de produktie van analyse-apparaatuur vooral afgestemd wordt op het zeer grote afzetgebied van de micro analyse.

Bij het wateronderzoek is de monsterhoeveelheid echter niet een beperkende factor. Natuurlijk is het mogelijk om de monstervolumina sterk te verkleinen en vervolgens daarin uiterst gevoelige meettechnieken toe te passen. Analytisch zeer interessant, maar het is de vraag of daarmee het doel, namelijk betrouwbare informatie, altijd gediend wordt. Het verband tussen monsterhoeveelheid en daaruit beschikbaar komende analytische informatie speelt een grote rol bij de gaschromatografie, de meest toegepaste techniek voor de analyse van organische microverontreinigingen.

De gepakte kolommen, 1 à 2 meter lang, met een doorsnede van 2 tot 5 millimeter, maken steeds meer plaats voor de capillaire kolommen met een lengte van 25 tot 100 meter, een inwendige diameter van enkele tiende millimeters, en een beter scheidend vermogen.

De capillaire kolommen met hun geringe inhoud per lengte-eenheid vereisen echter bijzondere aandacht voor de wijze van injecteren van het monster (2 μ l pentaan vullen een 0,3 mm capillair kolom over een afstand van 5 meter). Het te scheiden monster moet op een zo gering mogelijk aantal schotels van de kolom aangebracht worden ten einde het scheidend vermogen van de kolom optimaal te kunnen benutten.

Afb. 2 - Invloed van solvent op de piekvorm van een component.



De goede eigenschappen van een kolom, hetzij capillair hetzij gepakt, kunnen door een slechte injectie volkomen teniet gedaan worden. Een kolom is niet beter dan de injectie!

De veelal toegepaste injectietechniek is die via een splitter. Van het geïnjecteerde monster wordt slechts een zeer klein deel (1/100 tot 1/25) in de capillair kolom gebracht (zie afb. 1). Hierdoor is het mogelijk zeer kleine hoeveelheden (0,01 μ l) redelijk kwantitatief te analyseren. Voorwaarde is dat in de expansieruimte geen aerosolvorming optreedt waarvan niet-lineaire splitting en discriminatie volgens molecuulgrootte het gevolg is. Een tweede vereiste is dat de te meten stoffen in redelijk hoge concentraties aanwezig zijn, om ze na de splitting nog te kunnen detecteren.

De injectie volgens de split-methode is dan ook voor het wateronderzoek meestal niet toepasbaar.

De splitloze injectie, door Grob [1] geïntroduceerd, betekent een zeer grote verbetering van de capillair-gaschromatografie. Kort gezegd komt deze techniek daar op neer, dat direct bij de injectie een scheiding wordt gemaakt tussen het oplosmiddel en de daarin opgeloste componenten. Door juiste keuze van de kolomtemperatuur tijdens de injectie kan worden bereikt dat het oplosmiddel in dampvorm de kolom ingevoerd wordt, terwijl de te meten componenten op de eerste schotels van de kolom condenseren, oplossen in de mobiele fase.

Zodra de programmering van de kolom-

temperatuur start zullen de gecondenseerde of geadsorbeerde componenten zich door de kolom gaan bewegen en van elkaar gescheiden worden. Deze scheiding wordt behalve door de immobiele fase ook nog mede begunstigd door het daarin opgeloste solvent (afb. 2). Vanwege de in de kolom oplopende solventconcentratie ontmoet iedere component aan het front van de piek een hogere retentie van het solvent dan aan de staartkant. Hierdoor zal de staart van de piek zich sneller door de kolom willen bewegen dan het front. Piekversmalling en dus betere resolutie is hiervan het gevolg.

Met de Grob-injectietechniek kunnen enkele microliters op de capillairkolom gebracht worden. Oplosmiddelen die uitstekend voldoen bij deze techniek zijn zwavelkoolstof en dichloormethaan. Ook hexaan en 2,3-dimethylbutaan geven goede resultaten. Benzeen, toluen en polaire oplosmiddelen zijn minder goed of kunnen in het geheel niet gebruikt worden, omdat de kolomcoating wordt aangetast, wat aanleiding geeft tot onacceptabele bleeding of zelfs volledige vernietiging van de capillaire kolom.

De Grob-injectie en de Grob-striptechniek vormen een goede combinatie. CS₂ wordt gebruikt voor de extractie van het bij de striptechniek gebruikte koolfiltertje, het extract kan zonder dat vergaande concentratie door indampen nodig is via de Grob-injectie op de capillaire kolom gebracht worden.

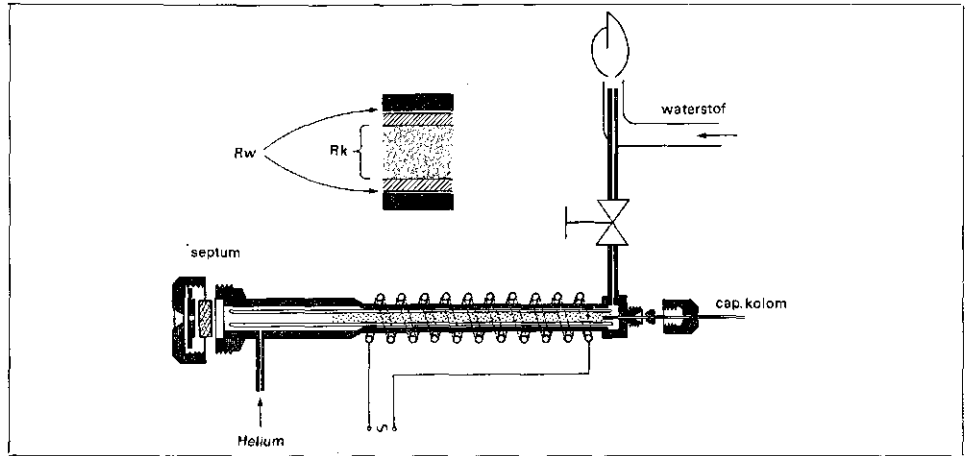
Doordat bij de striptechniek alleen betrekkelijk laagkokende verbindingen geïsoleerd zijn, behoeft de capillairkolom niet tot hoge temperatuur geprogrammeerd te worden, waardoor hinderlijke bleeding voorkomen kan worden.

Macro-injectie

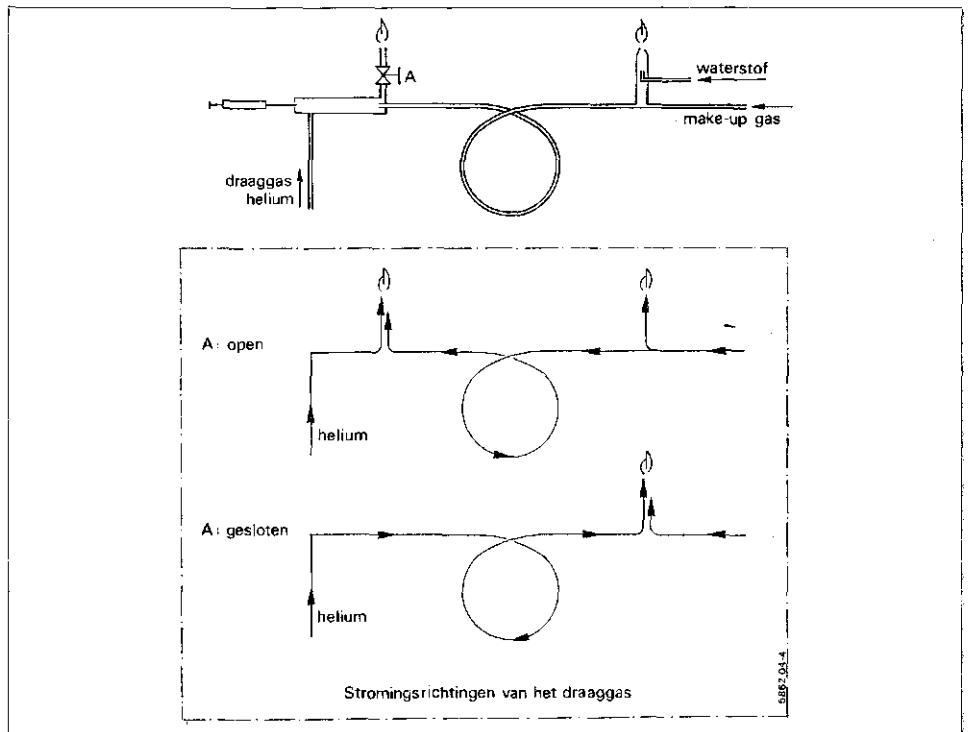
Het essentiële kenmerk van het bij het KIWA ontwikkelde macro-injectiesysteem voor capillairkolommen is, dat vóór de capillairkolom een scheiding gemaakt wordt tussen het solvent en de daarin opgeloste componenten. Het oplosmiddel wordt na scheiding afgevoerd, waarna de te analyseren stoffen in de capillairkolom gebracht worden.

De injectiehoeveelheid kan enkele honderden microliters zijn, terwijl geen beperkingen gelden aangaande het type oplosmiddel, aangezien het oplosmiddel in principe niet in aanraking komt met de capillairkolom. De hoeveelheden die bij de drie genoemde injectietechnieken split-, Grob- en macro-injectie op de kolom gebracht kunnen worden verhouden zich als 1 : 300 : 10.000 (afb. 1).

In afb. 3 wordt de constructie van het



Afb. 3 - Macro-injectie-apparaat.
Rw = stromingsweerstand tussen glazen en stalen wand.
Rk = stromingsweerstand van de kolom.



Afb. 4 - Principe macro-injectie op capillairkolom.
A = afsluiter naar vlamdetector.

macro-injectiesysteem getoond, terwijl afb. 4 het werkingsprincipe van het totale systeem weergeeft.

Een monster bestaande uit een solvent met daarin opgeloste componenten wordt via een septum geïnjecteerd in een gepakte glazen vóórkolom van ca. 10 cm. lengte. Op deze kolom vindt de scheiding plaats tussen het solvent en de overige componenten. Door middel van het draaggas helium wordt het solvent via de geopende kraan A (afb. 4) naar een waterstofvlammetje gevoerd en aldaar verbrand en gedetecteerd. Nadat het solvent de vóórkolom heeft verlaten wordt kraan A gesloten, de vóórkolom verwarmd waardoor

de daarop aanwezige componenten geadsorbeerd en de capillairkolom ingevoerd worden. Doordat de capillairkolom op lage temperatuur gehouden wordt, zullen de componenten op de eerste schotels geadsorbeerd worden.

Het macro-injectie-apparaat bestaat uit een roestvrijstalen buis waar de passende glazen vóórkolom via de septumhouder wordt ingeschoven (afb. 3). De gasweerstand RW tussen de glaswand en de stalen buiswand is mede door het grote aanrakingsoppervlak groot ten opzichte van de inwendige kolomweerstand RK. Hierdoor zal, ondanks het feit dat de vóórkolom niet door middel van pakkingen of iets dergelijks is bevestigd,

toch het grootste deel van het draaggas door en niet langs de voorkolom stromen. De glazen voorkolom is zeer gemakkelijk uitwisselbaar, waardoor het mogelijk is de voorkolom qua type vulling snel aan te passen aan het type monster dat geanalyseerd moet worden. Ook kan gemakkelijk een Tenax-buisje waaraan headspace-producten zijn geadsorbeerd met behulp van dit injectiesysteem geanalyseerd worden. Tijdens de injectie en analyseprocedure treedt er een verandering op in het stromingspatroon van het draaggas. Bij de injectie, waarbij kraan A geopend is, zal door de overdruk van het make-up gas in de detectorruimte een gasstroom optreden van de detector naar de injector via kraan A. Hierdoor wordt voorkomen dat er aan het begin van de capillairkolom een vorm van splitting optreedt waardoor een gedeelte van het solvent toch in de capillairkolom zou binnendringen. Tijdens de analyse stroomt het draaggas in de gewenste richting door de kolom.

Met dit macro-injectiesysteem is een reeks experimenten uitgevoerd waarmee de bruikbaarheid van het systeem werd getest. Enkele interessante conclusies zijn uit dit onderzoek af te leiden.

De injectie nauwkeurigheid is bij injectie van 100 microliter uiteraard groter dan bij injectie van slechts enkele microliters.

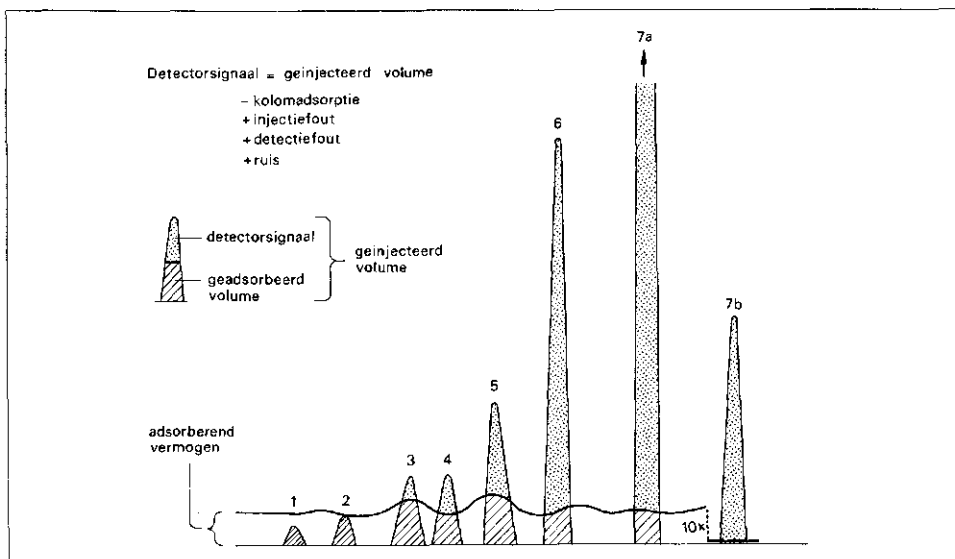
De levensduur van de kolom

Gedurende de proeven is gebleken dat de werking van de capillairkolom door toepassing van het macro-injectiesysteem gunstig werd beïnvloed. De voorkolom fungeert als een filter, dat voorkomt dat hoog moleculaire stoffen op de capillairkolom gebracht worden.

Ook het feit dat slechts weinig oplosmiddel op de kolom gebracht wordt is een verklaring voor de grote stabiliteit van de kolom. Na ruim een jaar intensief gebruik, waarbij voortdurend grote hoeveelheden PE, hexaan, benzeen, aceton, DCM en chloroform werden geïnjecteerd, was geen enkele teruggang van de kolom te bespeuren, programmering tot 320 °C was routine.

De retentietijden waren na een jaar nog exact reproduceerbaar en het scheidend vermogen was niet merkbaar veranderd. De kwantitatieve interpretatie van het chromatogram is beter realiseerbaar door het terugdringen van het adsorptie-effect. De adsorptie is per component bepaald door zijn fysische eigenschappen, namelijk de affiniteit ten opzichte van het kolommateriaal (zie afb. 5).

Het adsorberend vermogen van een kolom is een door de kolom bepaald gegeven. De filmdikte, de kolomlengte en de diameter, en 'de staat van dienst' zijn bepa-



Afb. 5 - Verband tussen detectorsignaal en geïnjecteerd volume.

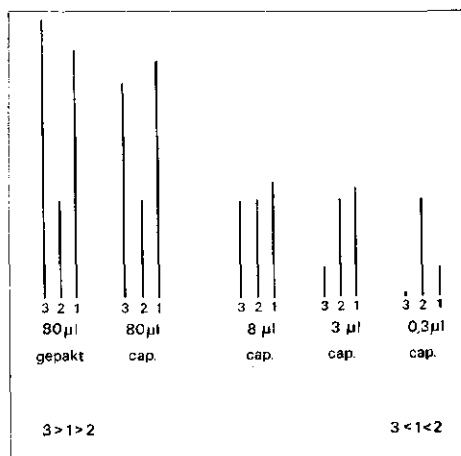
lende factoren. Het maakt verschil of een kolom gedurende lange tijd niet belast is, of dat juist zeer frequent monsters geïnjecteerd worden.

Het adsorberend vermogen is dan ook als een variërende grootte voor te stellen. Naarmate meer van een component wordt geïnjecteerd zal het detectorsignaal steeds meer het geïnjecteerd volume weergeven, met andere woorden: zal de invloed van de kolomadsorptie minder worden (piek 5 en 6).

De variatie in adsorptie wordt zeer duidelijk bij de pieken 3 en 4 (afb. 5), die gelijke injectievolumina voorstellen, maar door de variërende adsorptie verschillende detector-signalen opleveren.

Zeer kleine geïnjecteerde hoeveelheden worden volledig geadsorbeerd (piek 1 en 2 in afb. 5). Wanneer grote hoeveelheden van een component op de kolom gebracht worden, zal de meetversterker met een lagere gevoeligheid moeten werken, waardoor de ruisfactor wordt teruggebracht,

Afb. 6 - Responsfactoren bij verschillende injectievolumina.



maar ook de adsorptie-invloed minder zichtbaar is (piek 7a en 7b). Eventueel optredende bleedingverschijnselen zijn daarmee ook minder duidelijk geworden, wat blijkt uit een betere basislijn in het chromatogram.

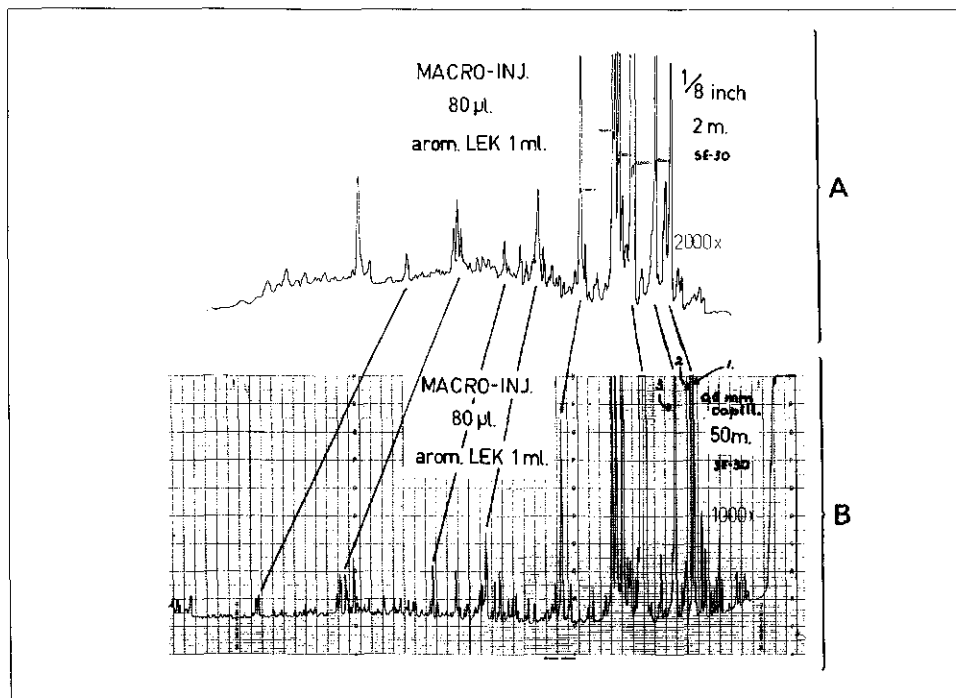
Een en ander wordt duidelijk gedemonstreerd met een aantal experimenten waarbij een aromatenfractie van een Lekmonster werd gebruikt om de verschillende injectie- en kolomtechnieken met elkaar te vergelijken. Een 20 liter watermonster werd geëxtraheerd met PE. Van het PE-extract werd kolomchromatografisch de aromatenfractie afgezonderd, die werd ingedampd tot 10 ml en later tot 1 ml. Van zowel de 10 ml fractie als de 1 ml fractie werden een aantal metingen verricht.

In de chromatogrammen vallen een aantal zaken op:

1. De MI-chromatogrammen vertonen een meer gedifferentieerd beeld dan de met Grob-injectie verkregen chromatogrammen.
2. De onderlinge piekverhoudingen variëren sterk bij de verschillende injectiehoeveelheden.
3. De totale signaalindruk heeft geen lineair verband met de injectievolumina. Het MI-1 ml signaal is duidelijk meer dan het tienvoudige van het MI-10 ml signaal. Hetzelfde geldt voor de Grob-injectie van het 1 ml en 10 ml monster.

Met behulp van drie pieken, die in de chromatogrammen van de diverse metingen aanwezig waren, is een en ander duidelijk toe te lichten (de pieken 1, 2 en 3 in afb. 7).

De piekgrootten zijn, gecorrigeerd voor de geïnjecteerde volumina en de toegepaste versterkingsfactoren, weergegeven in afb. 6. Piek nr. 2 blijkt bij alle injectietechnieken en hoeveelheden een gelijkblijvende respons-



Afb. 7 - Chromatogrammen met behulp van macro-injectie van een aromatenfractie.

A = gepakte kolom; 2 m x 1/8 inch SE30.

B = capillairkolom; 50 m x 0,5 mm SE30.

factor te hebben. De respons van piek 3 neemt duidelijk af naarmate minder geïnjecteerd wordt, evenals piek nr. 1, zij het op een andere wijze. De adsorptie blijkt bij piek 1 en 3 een zeer belangrijke rol te spelen, wat ook aan de tailende piekvorm goed te zien is. Piek nr. 2 heeft een zeer symmetrische vorm, en wordt dan ook niet waarneembaar door de kolom geadsorbeerd.

Bij injectie van een geringe hoeveelheid van het monster zou de indruk kunnen ontstaan dat component 2 hoofdcomponent en 3 een nevencomponent is, terwijl bij macro-injectie blijkt dat het omgekeerde het geval is.

Uit de afbeelding blijkt ook dat de pieken 3 en 1 op de gepakte kolom het grootst zijn, en dus het dichtst het geïnjecteerde volume benaderen.

Afb. 7 toont een vergelijking tussen de injectie op een gepakte en een capillairkolom van 50 meter met een diameter van 0,5 mm. Het verschil in scheidend vermogen is zichtbaar. Evenwel de prestaties van de gepakte kolom zijn vergeleken met de capillair bijzonder goed, terwijl de gepakte kolom zonder speciale voorzorgen voor wat betreft het buismateriaal en de kolomvulling is gemaakt. De ervaring is dat een gepakte kolom met macro-injectie beduidend betere resultaten levert dan bij normale 'oncolumn' injectie. Een goede injectietechniek maakt een gepakte kolom beter dan tot nu toe mogelijk werd geacht!

chromatografie en de vloeistofchromatografie. In de vloeistofchromatografie was een ontwikkeling waarneembaar die een parallel vertoonde met de gaschromatografie. De kolommen werden voortdurend langer en dunner, ten einde betere scheidingen te verkrijgen (hoge druk-pompen werden daardoor noodzakelijk!). Totdat in de HPLC ontdekt werd dat niet de kolomlengte, maar de exacte definiëring van de kolomvulling bepalend was voor een goede scheiding. De HPLC-kolommen zijn dan ook weer kort en betrekkelijk breed, maar ze bezitten een hoog kwalitatieve vulling.

Bij de gaschromatografie bestaat de gedachte dat capillairkolommen de enige weg zijn om de scheiding te verbeteren. Het chromatogram van de gepakte kolom (afb. 7) wettigt het vermoeden, dat met een gepakte kolom, mits gevuld met beter kolommateriaal van een exact gedefinieerde samenstelling en vorm, een veel betere scheiding mogelijk zal zijn waardoor het verschil in prestaties met de capillairkolom minder groot zal worden.

In ieder geval is er aanleiding genoeg aanwezig om behalve voortgezet onderzoek naar de mogelijkheden van de capillair gaschromatografie, ook veel aandacht te blijven besteden aan de verbetering van de gaschromatografie met gepakte kolommen.

Literatuur

1. Grob, K.; *Chromatographia* 5 (1972).



KOMO stelt commissie voor rioleringen van thermoplastische kunststoffen in

Een dezer dagen heeft ir. F. Wagenmaker, directeur van de Stichting KOMO, de kwaliteitseisencommissie E.36 'Rioleringen van thermoplastische kunststoffen' geïnstalleerd. Zij heeft als taak het opstellen van kwaliteitseisen, keuringsmethoden, maatreeksen en praktijkrichtlijnen en het begeleiden van daarop gericht onderzoek, voor buizen, dubbele moffen en hulpstukken van thermoplastische kunststoffen voor binnen- en buitenrioleringen.

De instelling van deze commissie was noodzakelijk, doordat de tot nu toe op dit gebied werkzame KOMO-commissie E.21 'Binnenriolering van kunststof' en E.22 'Buitenriolering van thermoplastische kunststoffen' onlangs werden opgeheven na publicatie van de door hen opgestelde NEN 7045 en NEN 7046 voor resp. buizen- en hulpstukken van ongeplastificeerd PVC voor binnen- en buitenrioleringen.

OQSI

Op het opschriftenplaatje van een motor stond geschreven: $P = 3 \text{ pk}$.

Bedoeld is kennelijk dat het vermogen van die motor (het juiste symbool van de grootheid vermogen is de hoofdletter P) 3 paardekrachten bedraagt.

De paardekracht is als eenheid voor vermogen al lang uit de tijd; met de verplichte invoering van het SI wordt daar nu helemaal mee afgerekend.

Omdat vermogen wordt gedefinieerd als arbeid per tijdseenheid en arbeid als kracht maal weg, kunnen we vermogen aangeven — in het SI — met:

N (kracht) $\times m$ (weg) / s (tijd) ofwel $N \cdot m/s$.

De eenheid $N \cdot m/s$ heeft een eigen naam in het SI: watt (symbool W).

Omgerekend naar het SI heeft de motor een vermogen van $3 \times 735,49875 \text{ W} = 2206,49625 \text{ W} = 2,20649625 \text{ kW}$.

Omdat de '3 pk' meer als nominale aanduiding is te zien, zou nu op het motorplaatje moeten staan: $P = 2 \text{ kW}$.

(Overigens: de Engelse 'horsepower' (hp) was niet gelijk aan de paardekracht want $1 \text{ hp} = 745,7 \text{ W}$).



Tot slot lijkt het zinvol een vergelijking te maken tussen de ontwikkeling in de gas-