

Probenvorbereitung in der GC – die Fallstricke

Dr. Ute Beyer

Restek GmbH

Die Probenvorbereitung richtet sich in erster Linie nach den Analyten und der Matrix, dann erst nach der anschließenden Messmethode. So können grundsätzlich viele verschiedene Methoden als Probenvorbereitung für die Gaschromatografie zum Einsatz kommen. Deren gemeinsames Ziel ist es aber, die Analyte in einem flüssigen Extrakt (z. B. durch Flüssig- oder Festphasenextraktion) oder einem Gas (z. B. durch die Headspace-Technik oder Thermodesorption) dem Gaschromatografen zur Bestimmung zuzuführen. Idealerweise liegen die Analyte am Ende der Probenvorbereitung aufkonzentriert und von der Matrix abgetrennt vor, doch das ist leider oft nur Wunschdenken.

Wahl des Lösemittels bei der Flüssiginjektion

Bei Probenvorbereitungstechniken, die am Ende einen flüssigen Extrakt liefern, könnte es zu diesem Problem kommen: Sie sind nicht sicher, ob das Lösemittel, in dem die Analyte nach der Probenvorbereitung vorliegen, zur GC-Methode mit Injektion in den heißen Injektor passt.

Lösung:

Das Lösemittel muss in erster Linie für die Probenvorbereitung geeignet sein, d.h. den Analyten optimal lösen bzw. extrahieren können und im Idealfall die Matrix zumindest zum Teil nicht mit erfassen. (Deshalb sollte die Lösemittelstärke auch nur so stark wie nötig gewählt werden, nicht so stark wie möglich, sonst wird zu viel Matrix mit extrahiert.)

Wenn man die Wahl hat, sind unpolare, leicht verdampfbare Lösemittel wie z. B. Hexan oder Ethylacetat für die GC vorzuziehen, da sie nur kleine Dampfvolumina bilden, die nahezu jeder Liner komplett aufnehmen kann. Das ist wichtig für eine gute Peakform und vermeidet Probleme mit Verschleppungen und Verunreinigungen z. B. der Splitleitung durch Backflash.

Hier ein paar Beispiele für das Dampfvolumen verschiedener Lösemittel unter

Standard GC-Bedingungen (Injektortemperatur 250°C, Druck 100 kPa, Injektionsvolumen 1 µL, Splitinjektion):

Tab. 1: Dampfvolumina verschiedener Lösemittel

Lösemittel	Dampfvolumen*
Hexan	166 µL
Toluol	203 µL
Ethylacetat	220 µL
Aceton	294 µL
Dichlormethan	337 µL
Acetonitril	414 µL
Methanol	534 µL
Wasser	1196 µL

*Berechnet mit Restek's Solvent Expansion Calculator

Grob lässt sich sagen: je polarer das Lösemittel, desto größer die Ausdehnung beim Verdampfen.

Je nachdem welchen Liner man verwendet (Beispiele siehe Tabelle 2), wird das Dampfvolumen schnell kritisch. Insbesondere da das effektiv für die Dampf Wolke zur Verfügung stehende Volumen viel kleiner ist, als das theoretisch berechnete Leervolumen des Liners. Verengungen, Glaswolle und das im Liner befindliche Trägergas müssen ebenfalls berücksichtigt werden.

Tab. 2: Volumen verschiedener Liner (Beispiele)

Linerdimension (Länge x ID)	Volumen physikalisch*
78,5 x 4 mm	990 µL
78,5 x 2 mm	250 µL

*Berechnet mit Restek's Solvent Expansion Calculator

Backflash durch Überladung des Liners sollte unbedingt vermieden werden. Also am besten immer zuerst das Linervolumen und das

„erlaubte“ Injektionsvolumen des geplanten Lösemittels berechnen, um keine unliebsamen Überraschungen, insbesondere bei Splitinjektion zu erleben.

Was tun, wenn die Probenvorbereitung aber ein (polares) Lösemittel erfordert, das sich bei der Injektion stark ausdehnt und ein hohes Dampfvolumen erzeugt?

- So wenig wie möglich injizieren!
- Mit Druckstoß injizieren, um die Dampf Wolke zu komprimieren
- Falls möglich das Lösemittel wechseln (z. B. durch Eindampfen d.h. die Analyte dürfen nicht zu flüchtig sein und müssen sich im neuen Lösemittel gut genug lösen)
- Die Probe 1:1 mit einem „Co-Solvent“ verdünnen, das leichter verdampft, z.B. Isopropanol bei Wasserproben
- Kaltaufgabesysteme benutzen

Fazit:

Das Lösemittel, das am Ende der Probenvorbereitung die Analyte beinhaltet, bestimmt entscheidend die Injektionsbedingungen der GC-Messung. Dies ist nicht nur bei der Methodenentwicklung zu beachten, sondern auch später, denn bei jedem Wechsel des letzten Lösemittels der Probenvorbereitung muss die GC-Methode entsprechend angepasst werden.

Flüssiginjektion, Minderbefunde

Problem: Sie entwickeln gerade eine Probenvorbereitungsmethode und haben mit zu geringer Wiederfindung bei der GC-Messung zu kämpfen. Sie zweifeln schon an der Probenvorbereitung, wissen aber nicht so recht, wo das Problem genau liegt.

Lösung: Rückwärts tasten

Zunächst einmal muss die GC-Methode zur Quantifizierung der reinen Analyte einwandfrei funktionieren, empfindlich genug und robust sein, sonst braucht man gar nicht mit der Entwicklung der Probenvorbereitung anzufangen.

Minderbefunde müssen nicht unbedingt durch die eigentliche Probenvorbereitung verursacht werden, sondern können noch danach entstehen, z. B. durch:

Verluste beim Einengen eines Extraktes (z. B. aus Flüssig- oder Festphasenextraktion)

Dies können Sie testen, in dem Sie einen passenden Standard im Extraktionslösemittel ansetzen, die eine Hälfte sofort für den Autosampler abfüllen, die andere Hälfte einengen und anschließend mit dem gleichen Lösemittel wieder auffüllen (auf das gleiche Volumen wie vor dem Einengen bzw. wie die zweite Hälfte des Standards im Autosampler).

Der Vergleich der Peakflächen der anschließenden Messungen zeigt Verdampfungsverluste auf. (In dem Fall unter schonenderen Bedingungen einengen, oder einen Keeper zusetzen, der die Analyte in Lösung hält (z. B. 100 µL eines schwerer flüchtigen Lösemittels, das die Analyte ebenfalls gut löst, z.B. iso-Octan bei Hexan-Extrakten).

Verluste beim Einengen zur Trockne und Wiederaufnahme in einem anderen Lösemittel

Das können neben Verdampfungsverlusten auch Probleme mit schlechter Löslichkeit im neuen Lösemittel sein. Manchmal muss man einfach beim Lösen etwas „nachhelfen“ in Form von Vortexen, Ultraschall, Zeit lassen und ähnliches. Aber auch hier bitte Vorsicht bei flüchtigen Substanzen. Wenn auch das nicht hilft, muss ein anderes Lösemittel verwendet werden.

Wenn die Analyte vor der Injektion derivatisiert werden müssen, kann auch eine unvollständige Derivatisierungsreaktion Ursache für Minderbefunde sein.

Überprüfen Sie, ob die Reaktionsparameter genau eingehalten werden und machen Sie Tests mit Standards im gleichen Lösemittel, in dem auch die Analyte nach der Probenvorbereitung vorliegen.

Bei Derivatisierungsreaktionen spielt das Lösemittel eine wichtige Rolle, es darf selbst nicht mit dem Reagenz reagieren können. Je nach Art der Reaktion können z. B. auch Spuren von Wasser schon Probleme bereiten.

Matrixeffekte

Die sind weniger stark ausgeprägt als in der LC-MS, aber auch in der GC-MS ein ernstes Thema. Der einfachste Fall sind da noch Verschmutzungen im Injektor, durch die Adsorptionseffekte stattfinden und zwar nicht am Liner selbst, sondern am Schmutz, der auf der Lineroberfläche sitzt.

Falsches Lösemittel beim Spiken einer „Testprobe“ ganz zu Anfang der Probenvorbereitung.

Wenn z. B. Wasser mit organischen Kontaminanten gespikt wird, um eine Extraktionsmethode zu entwickeln, macht man gerne den Fehler, dafür die Stammlösung des Messstandards zu nehmen. Das ist in Ordnung, so lange das Lösemittel mit Wasser vollständig mischbar ist. Doch das ist es im Falle von GC-Standards meist nicht. Spiken einer Wasserprobe mit einem Standard z. B. in Hexan geht schief, da der Hexan-Tropfen lieber irgendwo an der Glaswand im Probengefäß hängen bleibt, als sich mit dem Wasser zu mischen.

Also bitte zum Spiken immer Standards in Lösemitteln nehmen, die mit der Probenmatrix vollständig mischbar sind oder zumindest eine ausreichende Menge eines Lösungsvermittlers zusetzen.

Fazit:

Bei der Suche nach der Ursache mangelnder Wiederfindungsraten sollte nicht vergessen werden, neben der Probenvorbereitung selbst zunächst die Schritte vorher (z. B. das Spiken von Modelllösungen) und nachher (z. B. Einengen des Extraktes) zu überprüfen. Je schneller man das Problem eingrenzen kann, desto schneller kann die Fehlerquelle identifiziert werden.

Weiterführende Literatur

„GC-Tipps“ – Die schnelle Hilfe für jeden Anwender (S. Kromidas, Hrsg.)

