

## VORRICHTUNG ZUR ISOLIERUNG, ANREICHERUNG UND CHEMISCHEN CHARAKTERISIERUNG GASCHROMATOGRAPHISCH GETRENNTER KOMPONENTEN IM $\mu\text{g}$ -BEREICH\*

K.-H. KUBECZKA

*Botanisches Institut der Techn. Hochschule Karlsruhe (Deutschland)*

(Eingegangen den 2. Juni 1967)

Für die exakte Identifizierung völlig unbekannter GC-getrennter Komponenten ist der Aussagewert von Retentionsdaten unzureichend. Zusätzliche Informationen über die Struktur einzelner Verbindungen lassen sich durch Kopplung der Gaschromatographie mit physikalischen und chemischen Untersuchungsmethoden erhalten. Für die Kombination von Gaschromatographen mit Spektrometern sind auch bereits eine Reihe leistungsfähiger Anordnungen entwickelt worden, wobei jeweils die bereits GC-getrennten Komponenten untersucht werden.

Die Identifizierung einzelner Peaks mit Hilfe chemischer Methoden kann sowohl *vor* als auch *nach* der GC-Trennung durchgeführt werden. Die dafür brauchbaren Reaktionen *vor* der GC-Trennung beschränken sich vorwiegend auf die Abtrennung verschiedener Substanzkategorien aus dem Analysengemisch. Dabei können entweder die nichtumgesetzten Verbindungen (Differenzanalyse) oder die nach der Reaktion flüchtigen Produkte gaschromatographisch bestimmt werden. In beiden Fällen wird häufig eine kontinuierliche Arbeitsweise angewandt, bei der die Eliminierungsreaktion in der Gasphase durchgeführt wird. Für diese als Reaktionsgaschromatographie bekannte Technik<sup>1</sup> ist eine Fülle von Möglichkeiten ausgearbeitet worden<sup>2</sup>, die jedoch nur z.T. für die Identifizierung unbekannter Substanzen von Bedeutung sind. Reaktionen, die das Retentionsverhalten einzelner Verbindungen verändern (Hydrierung, Verseifung, Veresterung usw.) scheiden nämlich bei komplizierten Substanzgemischen aus, da hier eine sichere Zuordnung der erhaltenen Peaks in der Regel nicht möglich ist, sofern man nicht zuvor die betreffenden Einzelsubstanzen in reiner Form gewinnt. Dies erforderte jedoch bislang neben beachtlichen Substanzmengen, wie sie aus analytischen Trennsäulen nicht auf einmal erhalten werden können, auch zeitraubende Manipulationen.

Durch die Adsorption des gaschromatographischen Eluats in kurzen, unbeheizten oder gekühlten GC-Säulen, haben wir eine Möglichkeit gefunden, einzelne Verbindungen in  $\mu\text{g}$ -Mengen zu isolieren. Nach thermischer Desorption lassen sich diese ohne Zwischenmedium erneut in den Gaschromatographen einführen. Dazu benutzen wir folgende Anordnung (Fig. 1).

Ein 10 cm langes Edelstahlrohr (1/4" a.Ø) (4), dessen rückwärtiges Ende mit einer Metallfritte (5) verschlossen ist, wird durch eine Ermeto-Verschraubung (6) über eine flexible Gasleitung (7) mit dem Gasprobenventil eines Gaschromatographen verbunden.

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

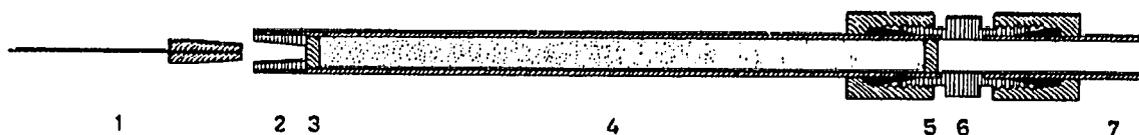


Fig. 1. Querschnitt durch die "Kurzsäule". (Erläuterungen siehe Text.)

Die Füllung bestand bei unseren Versuchen aus Kieselgur (60–80 mesh), die mit 15 % Silikongummi SE 30 belegt war. Diese Phase hatte sich wegen ihrer Thermostabilität und geringen Empfindlichkeit gegenüber Spuren von Luftsauerstoff bei einer Reihe von Versuchen als besonders geeignet erwiesen. Gegenüber polaren Trennflüssigkeiten wie Carbowax ist hierbei zwar die Substanzausbeute geringer, doch wurde dieser vermutlich durch irreversible Adsorption am Trägermaterial bedingte Verlust<sup>3</sup> in Kauf genommen, da er durch Erhöhung der Anzeigeempfindlichkeit weitgehend kompensiert werden kann.

In die vordere Öffnung der Adsorptionssäule wird ein Teflon-Konus (2) eingesetzt, der auf den Gasauslass des Fraktometers passt und einen zu starken Wärmeübergang auf die kurze Säule verhindert. In diesen Konus wird später eine Injektionsnadel gesteckt, die mit einem entsprechenden Aussenkonus versehen werden muss (1).

Nach Adsorption einer GC-getrennten Komponente (Fig. 2) in der mit dem Gasauslass (A) eines Gaschromatographen verbundenen kurzen Säule (KS) wird die Verbindung zu A gelöst (gestrichelte Linie) und unmittelbar danach die Nadel, deren

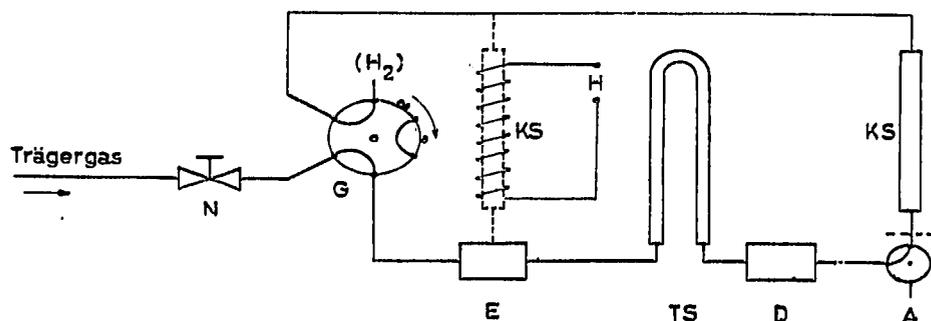


Fig. 2. Schaltschema zum Auffangen und Dosieren (gestrichelt) gaschromatographisch getrennter Komponenten mit Hilfe der "Kurzsäule". A = Gasauslass des Chromatographen; D = Wärmeleitfähigkeitsdetektor; E = Einspritzblock; G = Gasprobenventil; H = Heizwicklung; KS = Kurzsäule; N = Nadelventil; TS = Trennsäule.

Spitze mit einem kleinen Silikonstopfen verschlossen ist, aufgesteckt. Nach raschem Aufheizen der Säule auf 250° (mit einer 50 W LötKolbenheizpatrone (H) 45 sec) kann die adsorbierte Substanz durch rasches Einstechen der Nadel in das Einspritzgummi und Umschalten des Gasprobenventils (G) erneut in die GC Kolonne gespült werden (gestrichelt).

Mit dieser Methode lassen sich an Einzelkomponenten Identifizierungsreaktionen durchführen, unter denen vor allem die von BEROZA u. Mitarb.<sup>4–8</sup> entwickelte Kohlenstoffskellett-Chromatographie wegen ihrer vielseitigen Anwendbarkeit besonders hervorgehoben werden soll.

Zur Identifizierung einzelner Komponenten nach erfolgter GC-Trennung mit Hilfe chemischer Reaktionen sind verhältnismässig wenig Methoden beschrieben. Dies dürfte wohl auf die schwierige Handhabung der geringen Substanzmengen, die

zudem in Gasform und mit Trägergas verdünnt erhalten werden, zurückzuführen sein. Trotzdem hat es an Versuchen nicht gefehlt und durch Modifikation bereits bekannter mikroanalytischer Verfahren konnten z.T. äusserst wirksame Kombinationen erzielt werden. Hier ist vor allem die auf WALSH UND MERRITT<sup>9</sup> zurückgehende und von zahlreichen Autoren verfeinerte Gruppenanalyse zu erwähnen; leider ist dieses Verfahren jedoch nur auf die Vertreter homologer Reihen mit niedriger C-Zahl (bis etwa C<sub>9</sub>) anwendbar, da Wasserlöslichkeit und Reaktivität der höheren Homologen rasch absinken.

Weitreichendere Informationen lassen sich bisweilen durch die Kopplung der GC mit der DC erhalten, wobei die aus der GC-Trennsäule austretenden Substanzen direkt auf eine Dünnschicht kondensiert<sup>10-13</sup> und anschliessend mit den in der Dünnschichtchromatographie üblichen Methoden weiteruntersucht werden<sup>14,15</sup>.

Dem erneuten Einsatz der Gaschromatographie nach der chemischen Umsetzung einzelner GC-getrennter Komponenten zu deren Charakterisierung steht vor allem die schwierige Handhabung der geringen Substanzmengen im Wege, sofern man von einer kontinuierlichen Arbeitsweise absieht, die ihrerseits andere technische Schwierigkeiten mit sich bringt, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Bislang mussten daher die einzelnen Komponenten zunächst aus dem Gasstrom gewonnen und meist in Lösung umgesetzt werden. Erst nach Entfernen eines Grossteils des Lösungsmittels konnten die Verbindungen erneut gaschromatographisch untersucht werden, wobei häufig merkliche Verluste an flüchtigen Reaktionsprodukten unvermeidbar waren.

Durch geeignete Beschichtung des Trägermaterials in der bereits zuvor beschriebenen "Kurzsäule" gelang es uns, einzelne GC-getrennte Komponenten nach dem Auffangen bereits *in der Adsorptionsvorrichtung* umzusetzen. Infolge der diskontinuierlichen Arbeitsweise lassen sich dabei auch langsam ablaufende Reaktionen durchführen. Zudem wird die Technik stark vereinfacht. Das Lösen der Substanzen in einem Lösungsmittel und die damit verbundene umständliche Anreicherung der Reaktionsprodukte vor dem Einführen in den Gaschromatographen fallen bei dieser Arbeitsweise völlig weg, da die adsorbierten Verbindungen nach thermischer Desorption — wie bereits beschrieben — ohne Zwischenmedium erneut in den Gaschromatographen eingeführt werden können.

Im Anschluss soll an zwei Beispielen die Technik im einzelnen erläutert werden.

Ester lassen sich ohne weitere Manipulationen in einer mit NaOH-haltiger Kieselgur\* gefüllten Kurzsäule durch Auffangen und anschliessende thermische Desorption verseifen. Unter diesen Bedingungen wird lediglich die Alkoholkomponente flüchtig. Sie liefert im Gaschromatogramm einen häufig leicht zu identifizierenden Peak (Fig. 3). Aus der Differenz zwischen der Retentionszeit dieses Alkohols und der des ursprünglich vorhandenen Esters kann ausserdem ein Hinweis über die Säurekomponente erhalten werden. Das bei kontinuierlicher Arbeitsweise notwendige Einspeisen von Wasserdampf in das Trägergas zur Aufrechterhaltung der Feuchtigkeit<sup>16</sup> entfällt. Allerdings muss nach mehreren Verseifungen die durch die freigesetzten Säuren teilweise neutralisierte Säulenfüllung erneuert werden.

Fast ebenso mühelos lassen sich mit Hilfe der Kurzsäule aliphatische Doppelbindungen hydrieren, indem das mit Silikongummi SE 30 beschichtete Trägermaterial

\* Kieselgur (60-80 mesh) wird mit 10% NaOH belegt und unmittelbar vor dem Gebrauch nach Einfüllen in die Kurzsäule im Stickstoffstrom bei etwa 300° wenige Minuten getrocknet.

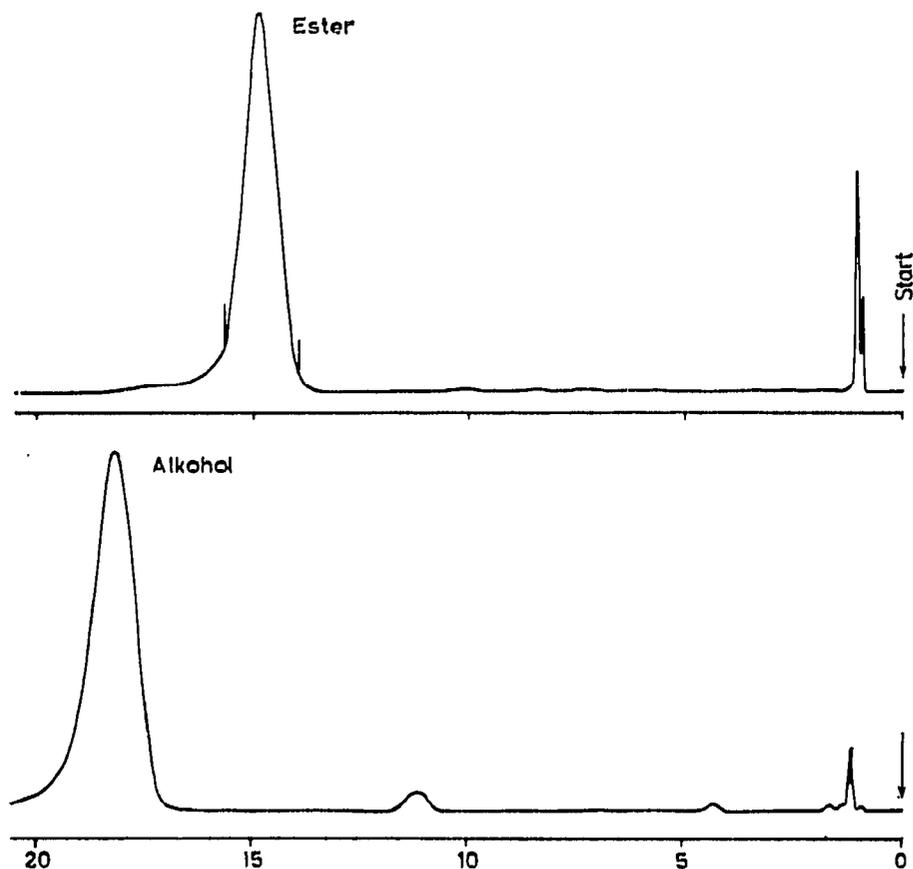


Fig. 3. Gaschromatogramm von  $0.1 \mu\text{l}$  6-Methyl-5-heptenyl-2-acetat und des daraus erhaltenen Verseifungsproduktes 6-Methyl-5-hepten-2-ol. Bedingungen: 15 % Carbowax 1500; 2 m,  $1/4''$ , 96 ml He/min;  $125^\circ$  (FID).

eine zusätzliche Auflage von 1 % feinverteiltem Palladium erhält. Nach dem Auffangen der zu hydrierenden Verbindung, wird die Adsorptionssäule vom Gasauslass des Chromatographen getrennt und das noch in der Leitung befindliche Trägergas durch Wasserstoff über das Gasprobenventil (G in Fig. 2) verdrängt. Nach dem Durchtritt von wenigen Millilitern  $\text{H}_2$  wird eine verschlossene Injektionskanüle (s.o.) aufgesetzt und 5 min unter leichtem Überdruck hydriert. Anschliessend wird wie auf Seite 320 beschrieben wieder thermisch desorbiert.

Auf diese Weise ist eine schonende Hydrierung von  $\mu\text{g}$ -Mengen — selbst bei Verwendung von Inertgasen zur GC-Trennung — möglich. Ausserdem werden Einflüsse durch verschiedene Hydrierungstemperatur bzw. Aktivität des Trägermaterials<sup>18</sup> ausgeschaltet, da stets bei Zimmertemperatur hydriert und durch die Imprägnierung der Kieselgur mit Silikongummi eine Desaktivierung des Trägers erreicht wird. So lassen sich selbst ungesättigte tertiäre Alkohole hydrieren, die unter den sonst in Verbindung mit der Gaschromatographie üblichen Methoden stets Wasser abspalten und über das intermediär entstehende Olefin schliesslich einen gesättigten Kohlenwasserstoff liefern.

Am Beispiel des ungesättigten tertiären Alkohols Linalool kann gezeigt werden, dass mit unserer Methode fast ausschliesslich der entsprechende gesättigte Alkohol und nicht der Kohlenwasserstoff entsteht (Fig. 4).

Schliesslich lassen sich in Anlehnung an die "head space"-Technik z.B. aus

Pilzkulturen gewonnene Duftstoffe in einer mit Kieselgur/Silikongummi gefüllten Kurz-Säule anreichern und anschliessend gaschromatographieren.

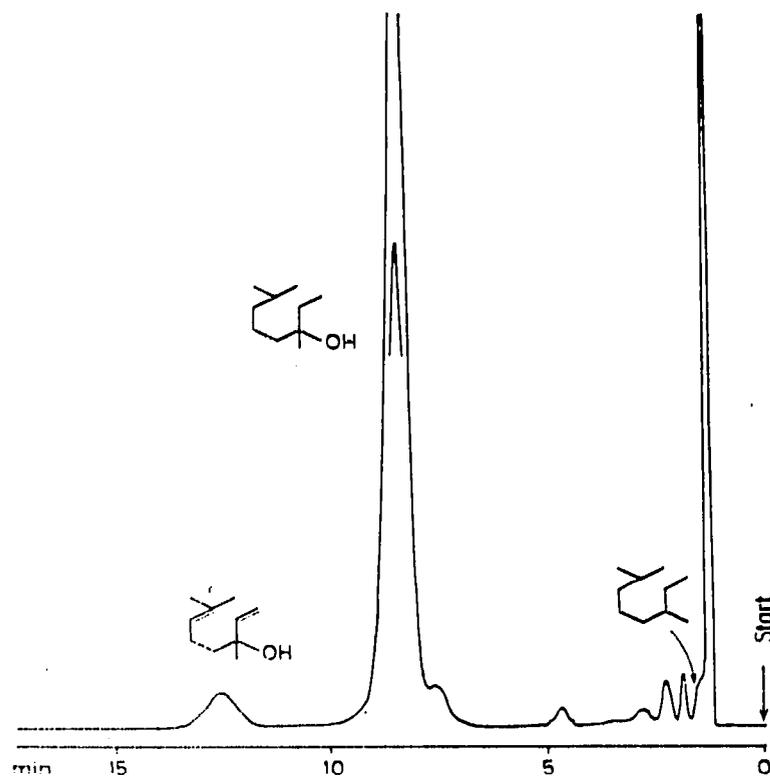


Fig. 4. Gaschromatogramm der Hydrierungsprodukte von 0.1  $\mu$ l Linalool (Bedingungen wie bei Fig. 3).

Hierzu wird aus dem zu untersuchenden Gasgemisch eine bestimmte Menge, die sich nach dem Retentionsvolumen der am schnellsten auf dieser Phase wandernden Verbindung richtet, durch die Adsorptionssäule gesaugt. Dies geschieht durch Anlegen eines Vakuums am Ende des Adsorptionsrohres, während an dessen anderem Ende eine lange Injektionskanüle aufgesteckt ist, die durch den Wattestopfen des Kulturgefässes in den Gasraum über der Kulturflüssigkeit hineinragt. Vor dem Dosieren wird die in Säule und Leitungen befindliche Luft durch kurzes Umschalten des Gasprobenventils mit Trägergas verdrängt.

Auf diese Weise lassen sich z.B. flüchtige Ausscheidungsprodukte aus Pilzkulturen, die im darüber befindlichen Luftraum entsprechend ihrer Partialdrucke verteilt sind, mehrfach aus einer einzigen Kultur z.B. während verschiedener Wachstumsphasen gewinnen. Die nach dem beschriebenen Verfahren aus 200 ml Kopfraum-Atmosphäre einer Kultur von *Ceratocystis virescens* erhaltenen flüchtigen Sekundärprodukte (Fig. 5) zeigten mit dem Wasserdampfdestillat gleichalter Kulturen eine ähnliche Übereinstimmung wie bei der Kühlfallentechnik<sup>18</sup>.

Im Gegensatz zu bereits in der Literatur beschriebenen Verfahren<sup>10</sup> ist bei unserer Technik eine isotherme GC-Trennung möglich; ausserdem entfällt der dort erforderliche häufige Säulen-Ein- und -Ausbau.

Schliesslich können in der beschriebenen "Kurzsäule" Spurenkomponenten nach der GC-Trennung durch wiederholtes Auffangen des entsprechenden Peaks angerei-

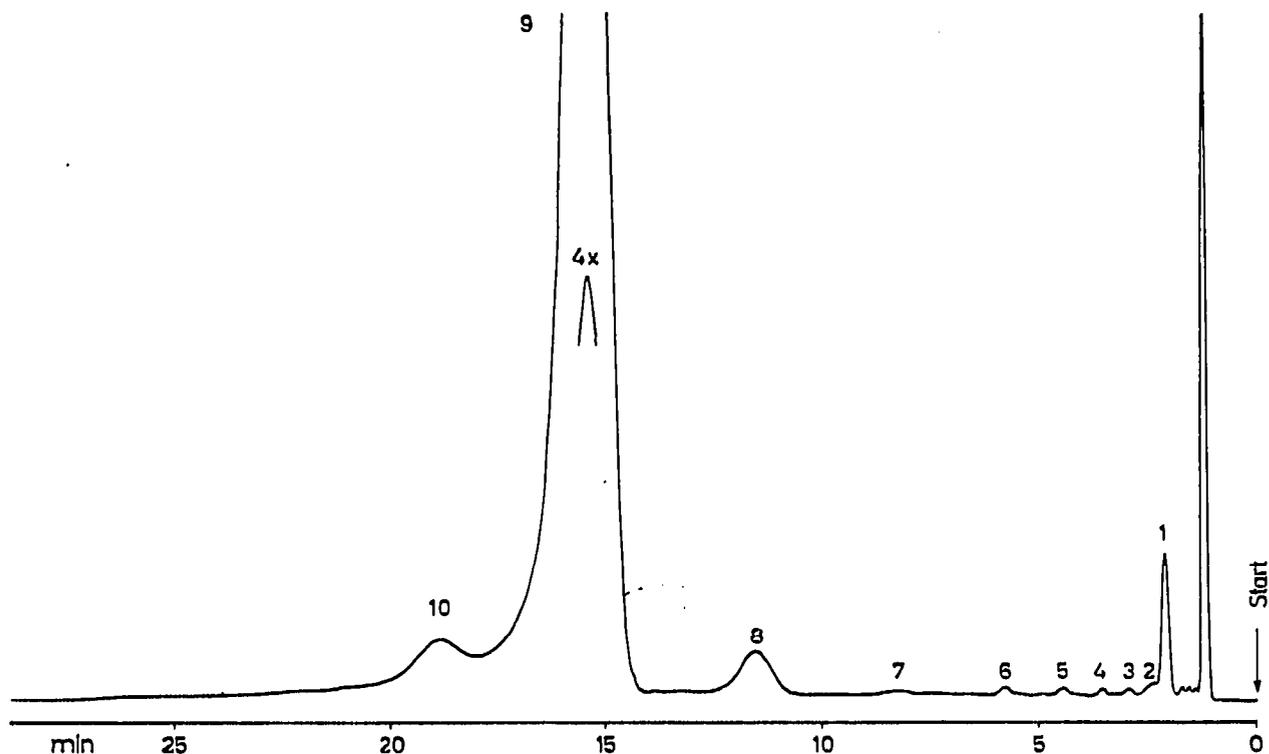


Fig. 5. Gaschromatogramm von 200 ml Kopfraum-Atmosphäre einer Pilzkultur (*Ceratocystis vivescens*) (Bedingungen wie bei Fig. 3). 1-7 = Niedere Alkohole und deren Ester; 8 = 6-Methyl-5-hepten-2-on; 9 = 6-Methyl-5-heptenyl-2-acetat; 10 = 6-Methyl-5-hepten-2-ol.

chert werden. Nach thermischer Desorption lassen sich diese mit Trägergas in einem nun wesentlich günstigeren Konzentrationsverhältnis z.B. in eine zuvor evakuierte Gasküvette eines Spektroskopes spülen und zur Messung bringen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Technik beschrieben, mit der GC-getrennte Komponenten durch Adsorption in kurzen, gepackten Säulen isoliert und durch wiederholtes Auffangen auch angereichert werden können.

Darüberhinaus ist es mit der beschriebenen Vorrichtung möglich, Duftstoffe z.B. über Pilzkulturen entsprechend der "head space"-Technik jedoch ohne Verwendung von Kühlfallen in einer für die GC-Untersuchung ausreichenden Konzentration zu gewinnen.

Durch geeignete Beschichtung des Füllmaterials der "Kurzsäule" können bereits in der Adsorptionsvorrichtung unabhängig von den Chromatographiebedingungen chemische Identifizierungsreaktionen an Einzelkomponenten stationär durchgeführt werden (z.B. Esterverseifungen, Hydrierungen trotz Verwendung von Inertgasen bei der GC-Trennung usw.).

Nach thermischer Desorption lassen sich die in der Säule adsorbierten Verbindungen ohne Zwischenmedium in einen Gaschromatographen einführen.

## SUMMARY

A technique is described whereby compounds separated by gas chromatography can be isolated by adsorption on short, packed columns and subsequently concentrated by repeated collection of the material adsorbed.

In addition, with the apparatus described and using the "head space" technique but without cooling traps, it is possible to obtain odorous compounds, e.g. above fungus cultures, in sufficient concentration for gas chromatographic examination.

By suitable coating of the packing of the "short column" chemical identification reactions for individual components (e.g. saponification of esters, hydrogenation even when inert gases are used for the gas chromatographic separation, etc.) can be carried out under stationary conditions in the adsorption device independent of the gas chromatographic conditions.

After thermal desorption, the compounds adsorbed on the column can be introduced into a gas chromatograph without using an intermediary.

## LITERATUR

- 1 F. DRAWERT, R. FELGENHAUER UND G. KUPFER, *Angew. Chem.*, 72 (1960) 555.
- 2 M. BEROZA UND R. A. COAD, *J. Gas Chromatog.*, 4 (1966) 199.
- 3 V. KUSY, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 1748.
- 4 M. BEROZA, *Nature*, 196 (1962) 768.
- 5 M. BEROZA, *Anal. Chem.*, 34 (1963) 1801.
- 6 M. BEROZA UND R. SARMIENTO, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 1353.
- 7 M. BEROZA UND F. ACREE, JR., *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 47 (1964) 1.
- 8 M. BEROZA UND R. SARMIENTO, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 1040.
- 9 J. T. WALSH UND C. MERRITT, JR., *Anal. Chem.*, 32 (1960) 1378.
- 10 I. C. NIGAM, M. SAHASRABUDHE UND L. LEVI, *Can. J. Chem.*, 41 (1963) 1535.
- 11 J. JANÁK, *J. Chromatog.*, 15 (1964) 15.
- 12 R. KAISER, *Z. Anal. Chem.*, 205 (1964) 284.
- 13 K. H. KUBECZKA, *Planta Med.*, 14 (1966) 381.
- 14 E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, 1962.
- 15 K. RANDEARTH, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1965.
- 16 J. JANÁK, J. NOVÁK UND J. SULOVSÝ, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 27 (1962) 2541.
- 17 M. SINGLIAR UND M. SESTRIENKOVA, *Gas Chromatographie 1965*, Band I, Akademie-Verlag, Berlin, 1966, S. 549.
- 18 E. SPRECHER UND K. H. STRACKENBROCK, *Z. Naturforsch.*, 18b (1963) 195.
- 19 H. BINDER, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 189.