

CHROM. 9886

NANOGRAMM-VERFAHREN

II. PRÄPARATIVE GASCHROMATOGRAPHIE IM MIKROMASSSTAB

I. KLIMES, W. STÜNZI und D. LAMPARSKY

Givaudan Forschungsgesellschaft AG, CH-8600 Dübendorf (Schweiz)

(Eingegangen am 9. Dezember 1976)

SUMMARY

Nanogram techniques. II. Micro-scale preparative gas chromatography

As we have shown in the first communication*, we have developed techniques in the nanogram range permitting the injection or re-injection of substances without losses. We now describe the methods we utilize for a nearly quantitative recovery of injected materials. Different parameters were evaluated in order to find the best suited operation conditions. We deduce from these experiments that the use of capillary tubes as trapping vials will give good results if the tube is filled with small cotton pieces and cooled by means of a mixture of dry ice and liquid nitrogen. In comparison to the normal preparative gas-liquid chromatographic (GLC) methods, we are now in the position to utilize the full range of resolution power given by the packed analytical or even the capillary GLC columns for preparative purposes.

EINLEITUNG

Die selektive Isolierung von einzelnen Substanzen oder ausgewählten Bereichen mittels Gaschromatographie (GC) ist so alt wie die GC selbst. Es existieren zwei Möglichkeiten, die mittels GC getrennten Substanzen im Mikromassstab zu sammeln: (a) Kondensation durch Abkühlen oder (b) Ad- bzw. Absorption auf einem Träger. Die Kondensation ist beliebter, sie ist einfacher und das besonders mit Rücksicht auf die Rückgewinnung der isolierten Substanz. Als Kühlmedium benutzen Tsuda und Ishii¹ Wasser, Stanley und Kennett² und Houghton³ das feste CO₂, Ballinger *et al.*,⁴ Burson und Kenner⁵, Odland *et al.*,⁶ Copier und Schutte⁷, Cronin⁸ und Kholkin *et al.*⁹ flüssigen Stickstoff, McGugan und Howsam¹⁰ das auf -150° abgekühlte Isopropanol. Manche Autoren^{6,8,10} verwenden als Kühlfalle ein U-Rohr, andere^{2,5,9} eine gerade Kapillare. Copier und Schutte⁷ füllen diese mit Quarzwatte, Tsuda und Ishii¹ haben eine spezielle Kühlfalle konstruiert, Badings und Wassink¹¹ eine gewundene Kapillare, Ballinger *et al.*⁴ sammeln direkt in die IR-Zelle. Karasek und Smythe¹², die ein

* Ref. 21.

spezielles Sammelgerät konstruiert haben, und Kane und Karasek¹³ benützen Fallen mit porösem Glas, Damico *et al.*¹⁴ benutzen Aktivkohle, Wittak *et al.*¹⁵ Kunststoffharz, Bierl *et al.*¹⁶ und Amy *et al.*¹⁷ ähnliche Füllungen wie für GC-Säulen. Eine Übersicht über andere Sammelmethode findet man bei Leathard und Shurlock¹⁸.

Als spezielle Verfahrensart müssen wir das sogenannte "heart-cutting"^{19,20} ansehen, bei dem die gewünschten Peaks direkt von einer auf die nächste Kolonne überführt werden, ohne in einer Kühlfalle kondensiert zu werden.

Die quantitativen Ergebnisse sind nur selten und meist unvollständig angegeben und deshalb untereinander nur schwer vergleichbar. Sie sind nicht nur von der Art des Sammelns abhängig, sondern u.a. auch vom Trägergasdurchfluss (zwischen 2 und 25 ml/min), von der Verteilung der Substanz zwischen Detektorweg und Kühlfallenweg und natürlich auch von der absoluten Menge der Substanz und ihrem Schmelz- bzw. Siedepunkt. Absolut höhere zur Verfügung stehende Substanzmengen begünstigen die erreichbare Ausbeute beträchtlich, und so finden wir bei Mengen, welche etwa 10^2 - 10^6 mal höher sind als die bei Nanogrammverfahren üblicherweise anzutreffenden Mengen, Ausbeuteangaben, die zwischen 32 und 120% schwanken¹⁶. Während aber für die normale präparative GC mit dem Ziel, Substanzen in Milligramm-Mengen in reiner Form zu isolieren, spezielle Kolonnen grösseren Durchmessers zum Einsatz gelangen, möchten wir im Folgenden einige präparative Abnahmetechniken beschreiben, die ausschliesslich auf der Verwendung von gepackten analytischen oder Kapillarkolonnen beruhen. Die isolierte Menge liegt hierbei in der Grössenordnung von 10^{-6} bis 10^{-8} g. Sie reicht aus für Massenspektrometrie (MS), für die Durchführung von Reaktionen und um die Einheitlichkeit, die Polarität und die Retentionszeiten auf verschiedenen stationären Phasen zu überprüfen. Unsere Methodik gestattet auch die Anreicherung vor allem sehr kleiner Peaks, die z.B. nach grossen Peaks eluiert werden und damit in einer GC-MS Kopplung kaum auswertbare Spektren ergeben. Wir haben versucht, eine Abnahmetechnik auszuarbeiten, die an sich nicht nur einfach ist, sondern es zugleich ermöglicht, ohne Übertragung der Substanz von einem in ein anderes Gefäss mit der isolierten Probe weitere Operationen vornehmen zu können. Die Glaskapillare als Kühlfalle dient hier als Allround-Gefäss, wobei wir ihre Verwendung zum Wiedereinspritzen bereits in der vorstehenden Mitteilung²¹ beschrieben haben, während die Durchführung von Nanogramm-Reaktionen einer späteren Mitteilung vorbehalten bleibt.

INSTRUMENTATION

Alle Versuche wurden mit einem Gaschromatographen Typ Carlo Erba GJ durchgeführt.

Anpassung des GC-Ausganges

Man benötigt einen Metallsockel des Flammenionisationsdetektors (FID), der jedoch noch nicht für die Quarzdüse vorgebohrt ist, und bohrt ihn leicht konisch aus. Vor der Abnahme schraubt man ihn anstelle des FID an das Gerät an. Die Kapillarfall mit der PTFE-Dichtung steckt man bei der Abnahme in diese Mündung ein (Fig. 1).

Die zweite Möglichkeit ist, ein T-Stück zwischen die Kolonne und den FID zu plazieren. Die Mündung des T-Stückes kann leicht konisch ausgebohrt sein, so

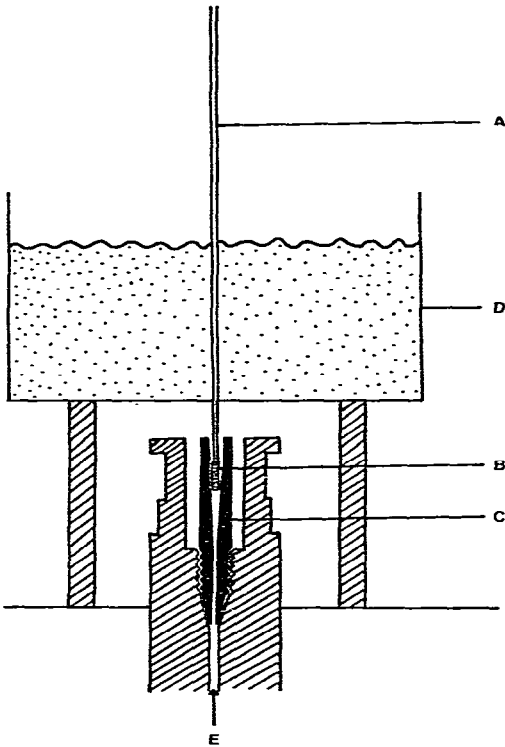


Fig. 1. Anpassung des GC-Ausgangs und Ersatz des FID. A = Kapillar-Kühlfalle, B = PTFE-Schrumpfschlauchdichtung, C = FID-Düsenersatz mit konischer Mündung, D = Schachtel mit Kühlmittel, E = Anschluss an GC-Kolonne.

dass die Kapillare mit der Dichtung hineinpasst. Es ist aber auch möglich, auf die Kapillarfalle ein Septum aufzustecken, welches man dann bei der Abnahme auf den T-Stückausgang drückt (Fig. 2).

Kapillarfalle

Als Sammelgefäß für die Abnahme von Peaks dient eine Schmelzpunktkapillare (Durchmesser: innen etwa 0.7 mm, aussen 0.9 mm, etwa 200 mm lang). Auf ein Ende dieser Kapillare fädelt man ein etwa 3 mm langes Stück PTFE-Schrumpfschlauch, welches nach dem Schrumpfen als Dichtung dient. Die Schmelzpunktkapillaren variieren in ihrem Durchmesser. Es ist daher nötig, jede einzeln zu überprüfen, ob sie im GC-Ausgang dichtet. Ist dies nicht der Fall, so kann ein zweites Stück Schrumpfschlauch ohne weiteres über den ersten geschoben werden.

Beschichten der Falle mit stationärer Phase

Die konzentrierte stationäre Phase (Silikonöl, UCON etc.) verteilt man auf den Wänden der Kapillare mit Hilfe einer Spritze mit verlängertem Kolben²¹. Die stationäre Phase soll die Kapillarwände nur auf einer Länge von 15 bis 30 mm benetzen und darf nicht die Teile, welche später zugeschmolzen werden, verunreinigen.

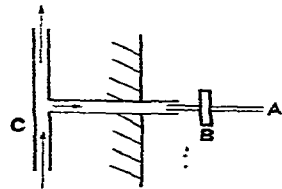
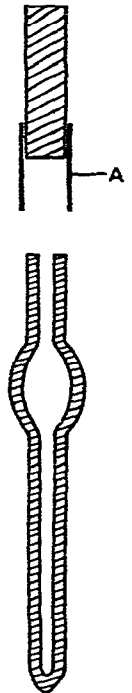


Fig. 2. Anpassung des GC-Ausgangs-Einbau eines T-Stücks. A = Kapillarfall, B = Septum, C = T-Stück (Strömungsrichtung eingezeichnet).

Fig. 3. Mikropruvette. A = PTFE-Schrumpfschlauch.



Das Zuschmelzen gestaltet sich sonst schwierig, und es können Zersetzungsprodukte und Verluste an gesammelten Substanzen entstehen. Die benutzte stationäre Phase darf natürlich keine flüchtigen Substanzen enthalten.

Füllen der Falle mit Watte

Man füllt die Kapillare mit einem etwa 5 mm langen Stück Watte, etwa 30 mm von dem mit der Dichtung versehenen Ende der Kapillare entfernt. Die Watte darf in der Kapillare nicht zu fest sitzen und diese verstopfen. Zur Reinigung stellt man die mit Watte gefüllte Kapillare in einen mit Dichlormethan gefüllten Messzylinder und saugt nachher die eingedrungene Flüssigkeit aus der Kapillare mit einem Saugpapier ab. Das wiederholt man 3 mal und trocknet die Kapillare nachher bei ca. 100° im Vakuumtrockenschrank.

Das Kühlen der Kapillarfall

Man führt die Kapillare durch ein Loch im Boden einer etwa 35 × 70 und 35 mm hohen mit einem Kühlmittel gefüllten Schachtel. Als Kühlmittel dient entweder frisches, fein gemahlene Trockeneis oder sein Gemisch mit flüssigem Stickstoff. Man legt frisch gemahlene pulvrige Trockeneis in einem Dewargefäß vor und gibt flüssigen Stickstoff im Überschuss zu. Man rührt und giesst den überflüssigen Stickstoff ab. So bekommt man ein körniges Gemisch mit der Temperatur des flüssigen

Stickstoffes, jedoch mit mechanischen Eigenschaften des Trockeneises, was die Arbeit wesentlich erleichtert.

Bei der Abnahme von hochsiedenden Substanzen kann man die Falle auch mit einem Band aus weichem saugfähigem Papier umwickeln und dieses mit Methylencchlorid befeuchten.

Mikroeprovette

Die Form ist aus Fig. 3 ersichtlich. Der untere enge Teil (Inhalt 5, 10 oder 20 μ l) macht es leicht, auch kleine Mengen von Lösungen mit der Spritze abzunehmen, der kugelförmige Teil in der Mitte unterbricht die kapillare Elevation zwischen der Wand und der Injektionsnadel. Er dient zugleich als Reservoir (Inhalt 50–100 μ l) und erleichtert das Aufkonzentrieren durch Abdampfen. Der Glasstopfen ist mit einem geschrumpften PTFE-Schlauch versehen. Vor dem Schrumpfen fettet man den oberen Teil des Mikrogefäßes ganz leicht ein und ermöglicht so das Abnehmen des Stopfens ohne dass der Schrumpfschlauch auf dem Gefäß hängen bleibt.

EXPERIMENTE UND DISKUSSION

Die Abnahme mit Kapillarfallen

Die Abnahme kann entweder bei der Mündung eines zwischen die Kolonne und den FID plazierten T-Stücks oder an der Stelle des FID stattfinden. Die erste Methode mit Hilfe eines T-Stückes ist bequemer, weil man gleichzeitig ein GC bekommt. Bei schwierigeren Problemen, besonders wenn kleine Spuren hinter einem oder mehreren Peaks abzutrennen sind, ist es uns nicht gelungen, die Fraktion ganz sauber zu erhalten. Das Heizen des vom T-Stück wegführenden Röhrchens oder der Ersatz des metallischen Röhrchens durch PTFE bzw. Glas hat zu keinem voll befriedigenden Resultat geführt. Um diese Störung zu eliminieren, setzen wir die Kühlfalle anstatt des FID ein, wobei die Elution der Peaks auf einem vorgelegten Vergleichs-GC verfolgt werden kann. Den FID ersetzt man in diesem Falle mit dem oben erwähnten Verbindungsstück und man führt die Kapillarfalle in seine konische Mündung ein. Es genügt ein leichter Druck, um eine ausreichende Dichtigkeit zu erreichen. Das Wechseln der Fallen ist leicht und schnell durchführbar, so dass auch schnell hintereinander aus einer Kapillarkolonne ausströmende Peaks leicht abzutrennen sind.

Die Kapillarfalle muss entweder mit einer stationären Phase beschichtet oder während der Abnahme gekühlt werden. Die Abnahme in eine mit stationärer Phase beschichtete Kapillare ist zwar nicht quantitativ, bringt jedoch manche Vorteile. Willkommen ist z.B., dass die in der stationären Phase gelöste Substanz nur langsam abdampft. Das schätzt man besonders bei der Durchführung von Reaktionen und beim Abriechen der angesammelten Substanzen. In der Regel ist es gleichgültig, welche stationäre Phase man benützt, so lange sie bei Raumtemperatur flüssig ist. Bei der Abnahme von Proben, welche für das Wiedereinspritzen vorgesehen sind, muss man aber hohe Ansprüche an die Reinheit der Phase stellen. Am bequemsten kann man die störenden Peaks der Verunreinigungen der stationären Phase durch das Benützen von Silikonphasen eliminieren, denn diese stören beim FID nicht. Bei GC-MS-Kopplungen ist es jedoch besser, auf die stationäre Phase zu verzichten und ausschliesslich mit einer gekühlten Kapillarfalle zu arbeiten.

Um das in der Kapillare angesammelte Produkt gegebenenfalls in Lösung zu überführen, bedienen wir uns folgender Arbeitstechnik. Mit einer Spritze führt man etwa $5 \mu\text{l}$ Lösungsmittel in den unteren Teil der Kapillarfallende ein und lässt den Tropfen durch die Kapillare wandern. Zur Aufnahme der so hergestellten Lösung der Substanz hat sich die Mikroeprovette (Fig. 3) bewährt. Man führt die Kapillare mit der Lösung in den kugelförmigen Teil ein und zwingt durch schnelle Handbewegung die Lösung, in das Aufnahmegefäß zu fließen. Dieses Ausspülen wird 2–3 mal wiederholt, um die quantitative Überführung der Substanz sicherzustellen.

Die quantitativen Verhältnisse

Um möglichst hohe Ausbeuten zu erhalten, haben wir den Einfluss von (1) Kühlungsart der Kapillarfallende, (2) Beschichtung mit stationärer Phase, (3) Geschwindigkeit des Trägergases und (4) Einfluss der Absolut-Menge der zu isolierenden Substanz geprüft.

Als Modellsubstanzen haben wir folgende Ester benutzt: Acetate: Methyl, Äthyl, Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Octyl, Nonyl, Decyl, und Cinnamate: Methyl, Äthyl, Propyl, Butyl, Pentyl. Die Siedepunkte liegen zwischen 56° und 310° .

Die quantitativen Ausbeutebestimmungen in Abhängigkeit von den genannten Parametern wurden mittels Flächenberechnung der reinjizierten Proben durchgeführt. Die dabei gewonnenen Resultate sind in den Fig. 4–7 graphisch dargestellt und sollen hier kurz diskutiert werden.

Einfluss des Kühlens. Es wurden zwei Kühlmittel untersucht und zwar frisches, feingemahltes Trockeneis (-78°) und Trockeneis mit flüssigem Stickstoff vermischt (-196°). Der Einfluss des tieferen Kühlens ist in den Fig. 4 und 5 gut sichtbar. Bei tieferer Kühlung sind die Ausbeuten—bezogen auf die eingespritzte Menge—bei den leichtflüchtigen Substanzen (Siedetemperatur bis etwa 120°) um 20–60% höher. Auf die gewonnene Menge berechnet, kann man also die Ausbeute bis auf das dreifache erhöhen. Bei manchen Substanzen, z.B. Methyl- und Äthylacetat in Mengen

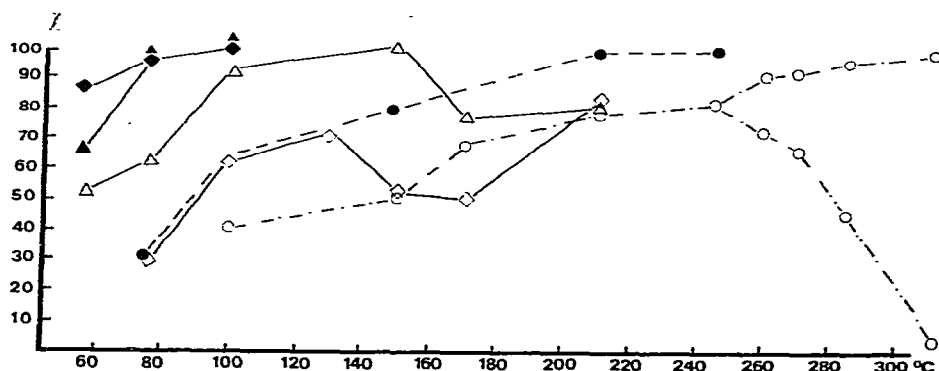


Fig. 4. Einfluss der Kühltemperatur auf die Rückgewinnung. x-Achse, Siedepunkte der geprüften Substanzen; y-Achse, % Rückgewinnung. ●—●, Trägergas 8 ml/min, 500 ng, Trockeneis; ▲—▲, 8 ml/min, 5000 ng, Trockeneis-flüssig N_2 ; ◆—◆, 8 ml/min, 5000 ng, Trockeneis-flüssig N_2 ; △—△, 22 ml/min, 500 ng, Trockeneis-flüssig N_2 ; ◇—◇, 40 ml/min, 500 ng, Trockeneis-flüssig N_2 ; ○---○, 40 ml/min, 500 ng, Trockeneis, Kapillare eingeworfen; ○-.-.-○, 40 ml/min, 500 ng, durch Septum eingeführt.

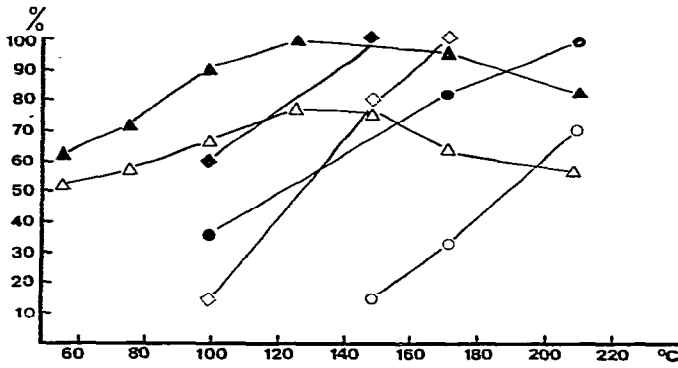


Fig. 5. Rückgewinnungsquote bei gleichbleibender Einspritzmenge von 50 ng in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren. x-Achse, Siedepunkte der geprüften Substanzen; y-Achse, % Rückgewinnung. ●, Trägergas 8 ml/min, Trockeneis; ○, 40 ml/min, Trockeneis; ▲, 8 ml/min, Trockeneis-flüssig N₂; △, 40 ml/min, Trockeneis-flüssig N₂; ◆, 8 ml/min, Trockeneis, Pentan als stat. Phase; ◇, 40 ml/min, Trockeneis, Pentan als stat. Phase.

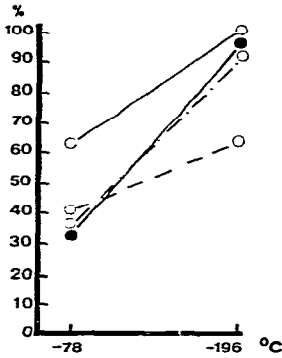


Fig. 6. Verbesserung der Rückgewinnungsquote bei niedrigsiedenden Substanzen. x-Achse, Temperatur (°C) des Kühlmittels; y-Achse, % Rückgewinnung. ●, Äthylacetat; ○, Propylacetat; — — —, Trägergas 8 ml/min, 50 ng; —, 8 ml/min, 500 ng; - - -, 40 ml/min, 500 ng.

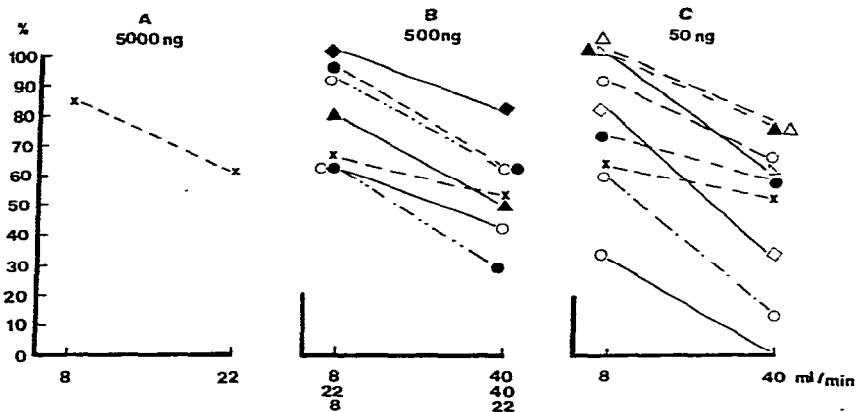


Fig. 7. Einfluss der Trägergasgeschwindigkeit. x-Achse; Strömungsgeschwindigkeit (ml/min); y-Achse, % Rückgewinnung. x = Methylacetat, ● = Äthylacetat, ○ = Propylacetat, △ = Butylacetat, ▲ = Amylacetat, ◇ = Hexylacetat, ▽ = Octylacetat, ◆ = Decylacetat. —, Trockeneis; - - -, Trockeneis-flüssig N₂ (8:22); - · - ·, Trockeneis-flüssig N₂ (22:40); · · · ·, Trockeneis, Pentan als stat. Phase.

von 50 ng sind die Ausbeuten bei der Kühlung mit flüssigem Stickstoff höher als 50%, bei Trockeneiskühlung allein aber gleich Null. Das gilt jedoch speziell nur für die leichtflüchtigen Substanzen.

Bei höhersiedenden Verbindungen sinken die Ausbeuten wegen der Aerosolbildung markant, sogar unter die mit Trockeneis erzielbaren Resultate und sind schwer reproduzierbar. In Fig. 6 ist der Einfluss des Kühlens überschaubarer gestaltet, wobei aber nur die niedrigsiedenden Substanzen berücksichtigt wurden.

Eine Bemerkung ist hier vielleicht noch wichtig. Falls man für die Kühlung ein altes, grobgemahlenes Trockeneis benutzt, bei welchem Kondenswasser eine Isolationsschicht gebildet hat, sind die Ausbeuten unbefriedigend.

Einfluss der Trägergasgeschwindigkeit. Es wurden besonders zwei Trägergasgeschwindigkeiten überprüft und zwar 8 ml/min und 40 ml/min, in einzelnen Fällen auch 22 ml/min. Die Resultate sind in den Fig. 4 und 5 und in übersichtlicherer Form in Fig. 7A–C eingetragen. Abgesehen von anderen Bedingungen sind die Ausbeuten bei grösserer Geschwindigkeit wesentlich kleiner. Besonders macht sich das bei der schwächeren Kühlung bemerkbar. So kann man z.B. bei 50-ng-Mengen und Köhlen mit Trockeneis bei 40 ml/min Durchfluss kein Propylacetat isolieren, während man bei 8 ml/min immerhin 35% Ausbeute erzielen kann. Auf die Ausgangsmenge bezogen sind die Ausbeuten beim niedrigeren Durchfluss um etwa 20–50% höher, und in absoluten Mengen gemessen bis viermal höher.

Einfluss der absoluten Mengen. Wir haben uns auf die im Nanogrammverfahren am häufigsten auftretenden Mengen konzentriert und zwar 50 und 500 ng, ausnahmsweise auch 5000 ng. In der Regel sind die relativen Ausbeuten bei den absolut grösseren Mengen günstiger (Fig. 8).

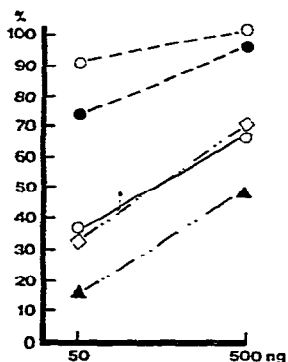


Fig. 8. Einfluss der absoluten eingespritzten Mengen. x-Achse, Menge (ng); y-Achse, % Rückgewinnung. ● = Äthylacetat, ○ = Propylacetat, ▲ = Amylacetat, ◇ = Hexylacetat. —, Trockeneis (8 ml/min); ---, Trockeneis-flüssig N₂ (8 ml/min); - · - ·, Trockeneis (40 ml/min).

Einfluss der stationären Phase. Es ist naheliegend, dass das Befeuchten der Kapillare mit einer stationären Phase höhere Ausbeuten bringen sollte. Bei den höhersiedenden Substanzen kann man das auch beobachten, bei den leichtflüchtigen Substanzen genügt jedoch die relativ kurze Strecke in der Kapillare nicht, um befriedigende Resultate zu erhalten. Die Kapillare erwärmt sich während der Abnahme und die Sorption ist dann unbefriedigend. Um bessere Ausbeute zu erzielen, müsste man

kühlen. Die üblichen stationären Phasen sind jedoch bei Temperaturen unter 0° meistens entweder sehr dickflüssig oder fest und verlieren ihre Sorptionseigenschaften. Deshalb haben wir Pentan, welches auch bei -78° flüssig ist, als "stationäre Phase" benutzt. Man spritzt in die mit Trockeneis gekühlte Kapillare etwa $1 \mu\text{l}$ Pentan ein und benützt diese als Kühlfalle. Auf diese Weise kann man die Ausbeute bei den leichtflüchtigen Substanzen bis auf etwa 60%, auf die eingespritzte Menge berechnet, erhöhen, in absoluten Mengen gesehen bis verfünffachen (Fig. 5 und 9). Befriedigende Resultate bekommt man aber nur bei Substanzen mit Siedepunkt über etwa 120° .

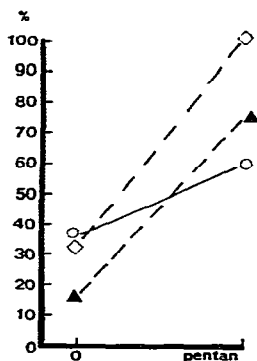


Fig. 9. Einfluss der Verwendung von Pentan als stationäre Phase. x -Achse, stationäre Phase; y -Achse, % Rückgewinnung. \circ = Propylacetat, \blacktriangle = Amylacetat, \diamond = Hexylacetat. —, Trockeneis, Trägergas (8 ml/min); ---, Trockeneis, Trägergas (40 ml/min).

Ausgewählte Technik. Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass keine der Methoden über das ganze Spektrum von Siedepunkten zwischen 50° und 310° befriedigende Resultate geliefert hat. Die besten Resultate würde das blosses Kühlen mit flüssigem Stickstoff liefern, falls man die Verluste durch Aerosolbildung unterbinden könnte. Die Lösung haben wir darin gefunden, dass man die Kapillare mit einem kleinen Stück Watte locker füllt.

Die Ausbeuten für Substanzen mit einem Siedepunkt über 80° sind nun praktisch 100%, aber auch bei denjenigen mit der Siedetemperatur bei etwa 50° sind sie noch befriedigend. In Fig. 10 sind die Ausbeuten dieser Technik (Kühlfalle mit Watte) mit derjenigen ohne Watte bei verschiedenen Kühlungen und Strömungsgeschwindigkeiten verglichen.

Ein Versuch, die Watte durch Glaswatte zu ersetzen, hat zu schlechten Ausbeuten geführt. Die Thermolabilität der Watte bringt beim Wiedereinspritzen gewisse Einschränkungen mit sich. Beim gewöhnlichen schnellen Einspritzen, wenn die Kapillare nicht länger als etwa 3 sec im Einspritzraum bleibt (vgl. Lit. 21) darf der Einspritzblock auf etwa 260° geheizt sein, ohne dass die Watte irgendwelche störenden Zersetzungsprodukte abgibt. Das ist eine für den grössten Teil uns interessierender Substanzen ausreichende Temperatur.

Bei längerzeitigem Einspritzen, bei welchem die Kapillare für etwa 30 sec im Einspritzblock bleibt, sollte dieser aber nicht höher als auf etwa 210° geheizt sein. Für das Einwerfen (vgl. Lit. 21) ist die Technik mit Wattefüllung ungeeignet.

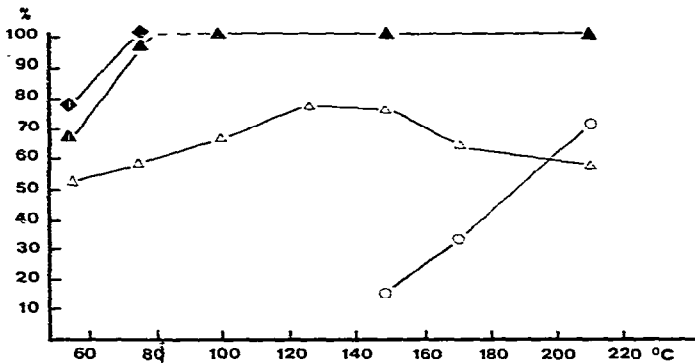


Fig. 10. Verbesserung der Rückgewinnungsquote durch Wattefüllung der Kapillarkühlfalle (Einspritzmenge 50 ng).: x-Achse, Siedepunkte der geprüften Substanzen; y-Achse, % Rückgewinnung. O, Trockeneis, Trägergas 40 ml/min, ohne Watte; Δ, Trockeneis-flüssig N₂, Trägergas 40 ml/min, ohne Watte; ▲, Trockeneis-flüssig N₂, Trägergas 40 ml/min, mit Watte; ◆, Trockeneis-flüssig N₂, Trägergas 8 ml/min, mit Watte.

Es bleibt natürlich immer die Möglichkeit, die Substanz zu extrahieren und dann wie eine Lösung einzuspritzen.

Die quantitative präparative GC aus einer Kapillarkolonne. Die oben beschriebenen Methoden kann man ohne jede Modifikation auch beim Aufsammeln von aus einer Kapillarkolonne ausströmenden Substanzen einsetzen. Nur wenn die Substanzmengen bis in den Bereich von einzelnen Nanogrammen sinken und man Wert auf hohe Ausbeuten legt, muss man einige zusätzliche Kleinigkeiten berücksichtigen:

Für die quantitative Rückgewinnung empfehlen wir die Technik des Kühlens mit Trockeneis-Stickstoffgemisch unter Verwendung der mit Watte gefüllten Kapillarfalle, welche auch bei gepackten Kolonnen die besten Resultate liefert. Bei Substanzen mit Siedepunkt über etwa 100° und Mengen von 5 ng kann man unter diesen Bedingungen praktisch eine hundertprozentige Ausbeute erwarten.

Die Dichtigkeit zwischen Kapillarfalle und dem GC-Ausgang muss einwandfrei sein.

Bei Trägergasgeschwindigkeiten unter ca. 8 ml/min erhöht man die Geschwindigkeit auf diesen Wert durch Zugabe von Wasserstoff in den GC-Ausgang (anstelle des FID). Bei zu niedrigen Geschwindigkeiten kondensiert sonst ein Teil der Substanz schon am Anfang der Kapillarfalle und geht beim Zuschmelzen verloren. Zwischen dem GC-Ausgang und der Schachtel mit Kühlmittel plaziert man einen Schutzschild in Form eines durchlöchernten Papierblattes, welches das Abkühlen des GC-Ausganges mildert (Fig. 1). Bei zu starker Abkühlung könnte ein Teil der Substanz zu früh kondensieren.

Für den Wiedereinspritzvorgang ist zu beachten, dass bei diesen kleinen Substanzmengen der Dampfdruck in der Kapillarfalle klein ist, so dass ein Teil der Substanz in der Kapillarfalle zurückbleibt. Um eine hundertprozentige Ausnutzung der vorhandenen Menge zu erzielen, appliziert man die Substanz auf eine kalte Kolonne und lässt die eingestochene Kapillarfalle für etwa 30 sec im Einspritzraum stecken. Unter diesen Bedingungen diffundiert praktisch die ganze Substanzmenge aus der Kapillarfalle auf die Kolonne.

Praktische Beispiele. Die vorstehend beschriebene präparative Gaschromato-

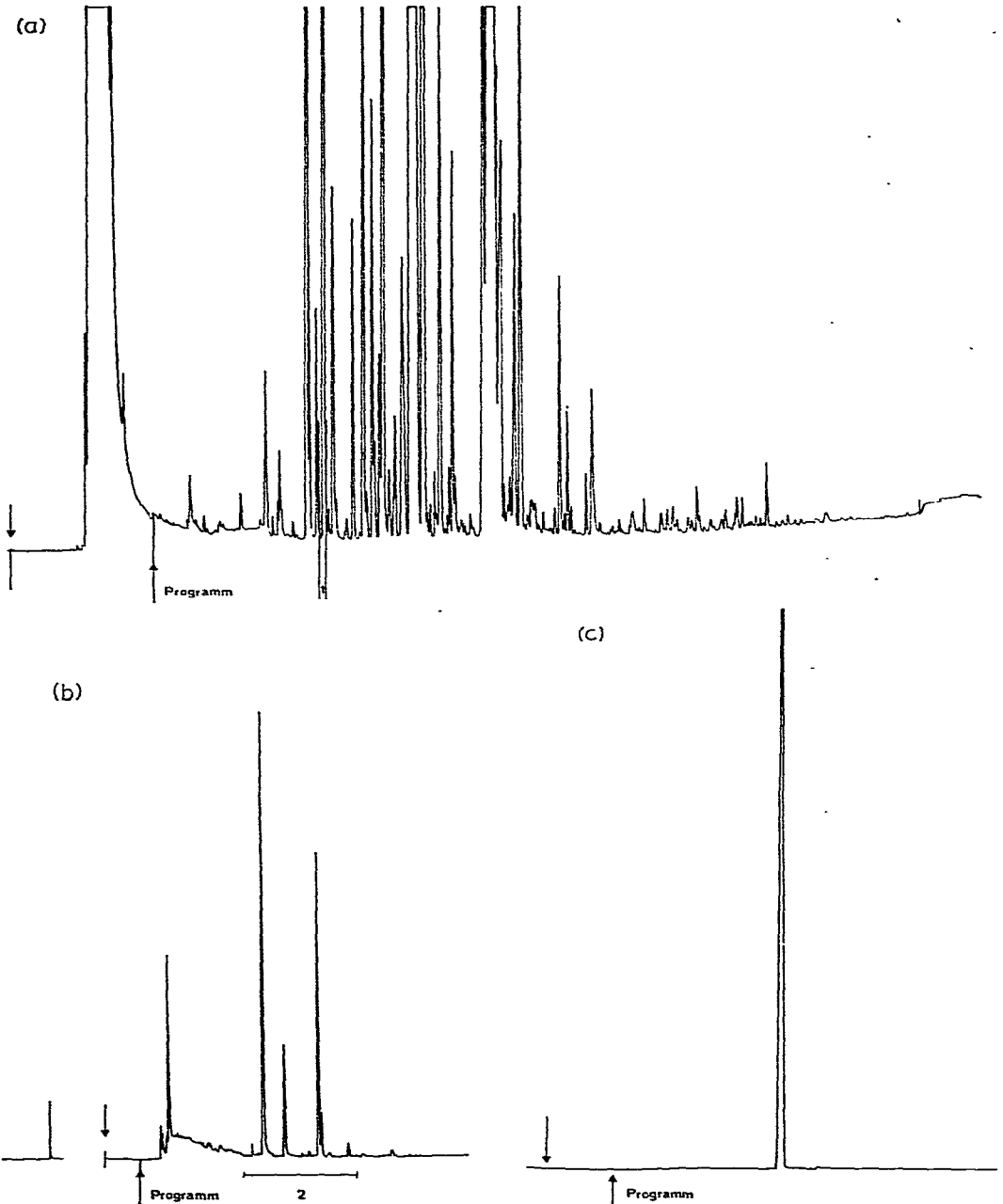


Fig. 11. Einheitlichkeitskontrolle durch Peakabnahme und Wiedereinspritzung. (a) Kapillarkolonne (50 m × 0.35 mm), belegt mit OV-01, 0.8 µl einer 0.5%igen Produktlösung in Äther auf kalte Kolonne eingespritzt, dann T-Programm 50–220° mit $\Delta T = 5^\circ/\text{min}$; Trägergas (Helium), 1.0 atü; Empfindlichkeit, 16×1 ; Bereich 1 abgenommen. (b) Kapillarkolonne (50 m × 0.33 mm), belegt mit UCON HB 5100, isolierte Substanz [Bereich 1 aus (a)] auf kalte Kolonne eingespritzt, 50–180° mit $\Delta T = 5^\circ/\text{min}$; Trägergas (Helium), 1.2 atü; Empfindlichkeit 16×1 . (c) Kapillarkolonne und Versuchsbedingungen wie unter (a), isolierter Bereich 2 aus (b) auf kalte Kolonne gespritzt.

graphie im Nanogrammereich und das direkte Einspritzen mit der Kapillarfalle werden seit Jahren in unserem Labor routinemässig bei der Analyse von Natursubstraten eingesetzt. Vorteile bieten sie naturgemäss besonders dort, wo nur kleine, für die meisten anderen Trenntechniken ungenügende Mengen Ausgangsmaterial zur Verfügung stehen oder aber die Verarbeitung grösserer Mengen zeitraubend und/oder mit schlechter Trennung verbunden ist.

Zum Beispiel liefert ein Natursubstrat auf einer 50-m-Kapillarkolonnen (OV-01) das Gaschromatogramm der Fig. 11a. Die GC-MS-Kopplung unter Verwendung dieser Kolonne hat gezeigt, dass der Peak 1 keine einheitliche Substanz darstellt. Die Massen-Spektren waren nicht interpretierbar. Dieser Peak wurde nunmehr auf die oben beschriebene Weise (Kapillarkühlfalle mit Watte gefüllt, Kühlung mit Gemisch aus Trockeneis und flüssigem Stickstoff) abgenommen. Die Kapillarfalle wurde zugeschmolzen und die Substanz auf eine zweite Kapillarkolonnen (50 m lang, UCON HB-5100) eingespritzt (Fig. 11b). Der auf OV-01 ungetrennte Peak hat sich auf der UCON-Kolonnen weiter getrennt. Zur Demonstration unserer Methode haben wir anschliessend alle Peaks aus der UCON-Kolonnen gemeinsam in eine Falle abgenommen und diese zurück auf die OV-01-Kolonnen eingespritzt. Alle auf UCON getrennten Substanzen geben wieder einen einzigen Peak (Fig. 11c) und täuschen damit wieder eine scheinbare Einheitlichkeit des fraglichen Peaks vor.

In einem anderen Beispiel wurde eine gepackte 3-m-Kolonnen (SF-96) dazu benutzt, die Eluate am Ausgang sensorisch zu beurteilen. Dabei wurden im Bereich 1 und 2 (Fig. 12) interessante Geruchsnoten festgestellt. Eine direkte Einspritzung der ganzen Fraktion auf eine polare bzw. apolare Kapillarkolonnen hat zu einem sehr

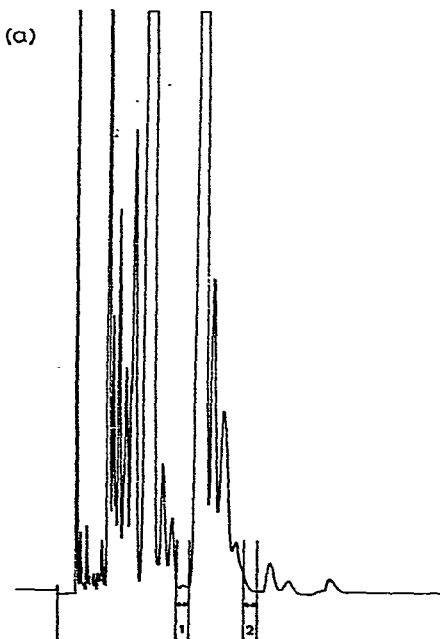


Fig. 12.

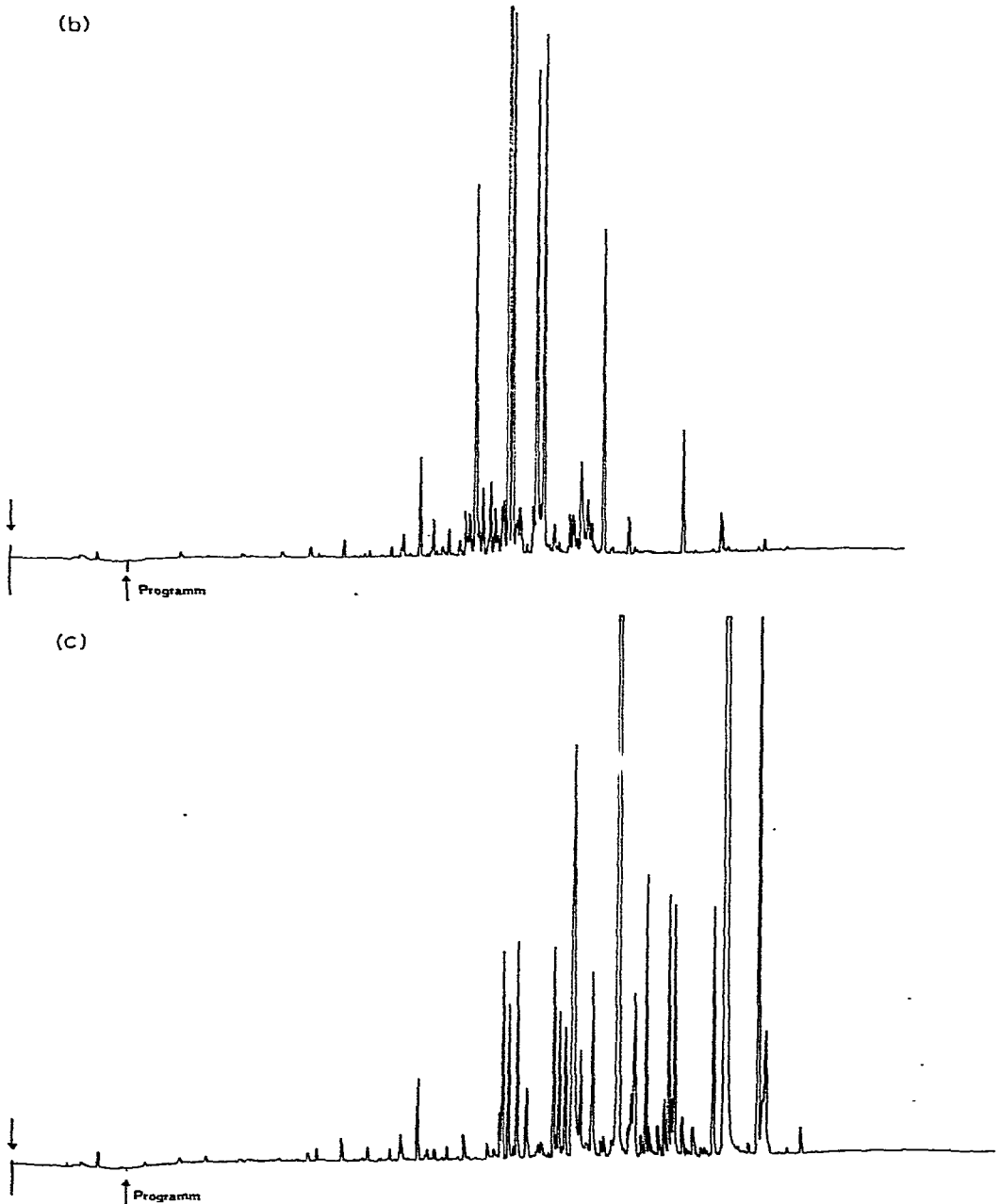


Fig. 12. Abnahme sensorisch interessanter Bereiche aus gepackten analytischen Kolonnen und deren GC-Verhalten auf Kapillar-Kolonnen. (a) Kolonne ($3\text{ m} \times 3\text{ mm}$), 3% SF-96 auf Chromosorb G AW DMCS (80–100 mesh) 120° isotherm, Trägergas (Helium) 3 atü, Empfindlichkeit 32×100 , $0.4\ \mu\text{l}$ Substanzgemisch kalt eingespritzt. (b) Kapillarkolonne ($50\text{ m} \times 0.3\text{ mm}$), belegt mit UCON HB 5100, Bereich 1 aus (a) auf kalte Kolonne eingespritzt, $50\text{--}180^\circ$ mit $\Delta T = 5^\circ/\text{min}$, Trägergas (Helium) 1.2 atü, Empfindlichkeit 8×1 . (c) Kolonne und Bedingungen wie unter (b), Bereich 2 aus (a) eingespritzt.

komplizierten Chromatogramm geführt, welches unauswertbar war. Die interessante Geruchsnote war kaum auffindbar, die kleinen Peaks wurden von den Hauptkomponenten überlappt und stark verunreinigt, die Konzentration für eine GC-MS-Analyse war zu klein. Wir konnten die Analyse erst fortsetzen, nachdem wir die beiden fraglichen Bereiche nach unserer Methode abgenommen und nur diese dann auf eine UCON-Kapillarkolonne (Fig. 12b und c) eingespritzt hatten.

ZUSAMMENFASSUNG

In der 2. Mitteilung einer Reihe, die Methoden zur einfachen Handhabung von Nanogramm-Mengen beschreibt, wird über die Abnahmetechnik aus GC-Kolonnen berichtet. Sie dient unter Ausnutzung der höheren Trennleistung analytischer gepackter oder Kapillarkolonnen der präparativen Isolierung von Kleinstmengen (10^{-6} – 10^{-8} g).

Die Überprüfung verschiedener Parameter führte zur Entwicklung einer Methode, die bei Verwendung einer Kapillarkühlfalle, Kühlung mit einem Gemisch Trockeneis-flüssiger Stickstoff und Einhaltung einer Trägergasgeschwindigkeit um 10 ml/min zu einer praktisch quantitativen Rückgewinnung der eingespritzten Substanzmenge führt, wie an Modellverbindungen mit Siedepunkten zwischen 56° und 310° gezeigt werden konnte.

LITERATUR

- 1 T. Tsuda und D. Ishii, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 469.
- 2 G. Stanley und B. H. Kennett, *J. Chromatogr.*, 75 (1973) 304.
- 3 E. Houghton, *J. Chromatogr.*, 90 (1974) 57.
- 4 J. T. Ballinger, T. T. Bartels und J. H. Taylor, *J. Gas Chromatogr.*, 6 (1968) 295.
- 5 K. R. Burson und C. T. Kenner, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 63.
- 6 R. K. Odland, E. Glock und N. L. Bodenhamer, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 187.
- 7 H. Copier und L. Schutte, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 464.
- 8 D. A. Cronin, *J. Chromatogr.*, 52 (1970) 375.
- 9 Yu. I. Khol'kin, G. S. Gridyushko und A. K. Potapovich, *J. Chromatogr.*, 53 (1970) 354.
- 10 W. A. McGugan und S. G. Howsam, *J. Chromatogr.*, 82 (1973) 370.
- 11 H. T. Badings und J. G. Wassink, *J. Chromatogr.*, 18 (1965) 159.
- 12 F. W. Karasek und R. J. Smythe, *Anal. Chem.*, 43 (1971) 2008.
- 13 D. M. Kane und F. W. Karasek, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 501.
- 14 I. N. Damico, N. P. Wong und J. A. Sphon, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1045.
- 15 J. L. Witiak, G. A. Junk, G. V. Calder, J. S. Fritz und H. J. Svec, *J. Org. Chem.*, 38 (1973) 3066.
- 16 B. A. Bierl, M. Beroza und J. M. Ruth, *J. Gas Chromatogr.*, 6 (1968) 286.
- 17 J. W. Amy, F. M. Chait, W. E. Baitinger und F. W. McLafferty, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 1265.
- 18 D. A. Leathard und B. C. Shurlock, *Identification Techniques in Gas Chromatography*, Wiley-Interscience, London, 1970.
- 19 D. R. Deans, *Chromatographia*, 1 (1968) 18.
- 20 K. Grob, *Chromatographia*, 8 (1975) 423.
- 21 I. Klimes, W. Stünzi und D. Lamparsky, *J. Chromatogr.*, 136 (1977) 13.