

Planta medica

Journal of
Medicinal
Plant Research

Editor - in - Chief

E. Reinhard, Univ. Tübingen
Pharmazeutisches Institut
Auf der Morgenstelle
7400 Tübingen

Editorial Board

H. P. T. Ammon, Tübingen
W. Barz, Münster
E. Reinhard, Tübingen
O. Sticher, Zürich
H. Wagner, München
M. H. Zenk, Bochum

Hippokrates Verlag
Stuttgart

April 1979
Vol. 35

No. **4**

Review Article

Chromatographische Kombinationstechniken bei der Analyse von Naturstoffen¹

The Combination of Chromatographic Techniques in Natural Product Analysis

K.-H. Kubeczka

Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg,
Bundesrepublik Deutschland.

Key Word Index: Combination techniques; GLC; Capillary-GLC; TLC; HPTLC; LC; HPLC.

Abstract

In the analysis of natural compounds, which represent very complex mixtures,

and in the determination of trace components a high separation power is needed. A substantial improvement in separation can be achieved by combination of two or more chromatographic systems with different characteristics. The possible combinations of the main chromatographic techniques such as

¹ Plenarvortrag

25. Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Zürich, 12.-16. Sept. 1977.

GLC, TLC and LC including high performance techniques by two-dimensional chromatography, column-switching (heart cutting) and other direct transfer techniques are described.

Unter den modernen Analysenverfahren spielen chromatographische Methoden eine dominierende Rolle. Die sprunghafte Zunahme unserer Kenntnisse über die Zusammensetzung komplexer Naturstoffgemische in den vergangenen 20 Jahren ist eng mit der Entwicklung chromatographischer Verfahren verknüpft. So ist es heute möglich mit Hilfe von Hochleistungs-Trennsäulen Substanzgemische gaschromatographisch in einem Arbeitsgang in mehrere hundert Einzelkomponenten zu zerlegen. Aber auch auf dem Gebiete der

Flüssigkeits-Säulenchromatographie (FSC) und der Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Hochleistungstechniken wie die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) entwickelt.

Trotzdem ist es bei der Kompliziertheit vieler Naturstoffgemische nicht möglich, alle Komponenten in *einem* chromatographischen System zu trennen. Dies ist im Wesentlichen auf drei Fakten zurückzuführen, die die Qualität einer Trennung maßgeblich beeinflussen und limitieren:

1. Bodenhöhe h und Bodenzahl n

Sie bestimmen die Anzahl Komponenten, die sich in einem chromatographischen System aufgrund der diffusiven Bandenverbreitung noch trennen und nachweisen lassen. Aus der von Van DEEMTER u. a. [1] erstellten Beziehung (Abb. 1.1) geht hervor, daß h von Ar-

Einflußgrößen auf die Trennqualität

$$(1) \quad h = A + \frac{B}{u} + C_m \cdot u + C_s \cdot u$$

$$n = \frac{L}{h}$$

$$(2) \quad \alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{t_{s2}}{t_{s1}} \quad (p_1 = p_2)$$

$$(3) \quad Q_s = \frac{b_{10} - b_0}{b_{10} + b_0}$$

Abb. 1: Einflußgrößen auf die Trennqualität.

beitsparametern wie der Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase u und der physikalischen Beschaffenheit der stationären Phase wie Teilchenform, Teilchengröße usw., die den A- und B-Term beeinflussen, abhängt; hinzu kommen stoffliche Eigenschaften, die den sog. Massentransport in der mobilen (C_m) und stationären Phase (C_s) bestimmen.

Durch enge Klassierung hochwertiger Sorbentien lassen sich heute in den meisten Fällen sehr zufriedenstellende Ergebnisse erzielen. In die Bodenzahl n geht neben der Bodenlänge h die Länge L des zur Verfügung stehenden Trennbettes ein, der sie direkt proportional ist.

2. Selektivität

Die zweite Größe, die die Qualität einer chromatographischen Trennung entscheidend beeinflusst ist die *Selektivität* des gewählten chromatographischen Systems. Sie ist der am stärksten die Trennung beeinflussende Parameter und setzt die richtige Wahl von statio-

närer und mobiler Phase für ein bestimmtes Trennproblem voraus. Hier soll unter der Selektivität α (= identisch mit der „relativen Retention“ σ) bzw. der „spezifischen Selektivität“ σ) das Verhältnis der Verteilungskoeffizienten K zweier Substanzen 1 und 2 verstanden werden, das bei isokratischen und isothermen, konst. apparat, Bedingungen zahlenmäßig dem Verhältnis der Netto-Retentionszeiten entspricht (Abb. 1.2). In der Gaschromatographie sind außerdem 2 Substanzen mit gleichen Dampfdrücken p_1 und p_2 zu betrachten. Abb. 2 verdeutlicht die Einflüsse von Selektivität und Bodenzahl auf die Trennqualität. In den Beispielen A und B ist eine geringere Bodenzahl für die größeren Peakbreiten

verantwortlich, während die Peakmaxima in den Beispielen A und C infolge höherer Selektivität weiter voneinander entfernt sind. Wie aus der Abbildung hervorgeht, wird die Trennung zweier Substanzen viel stärker durch die Selektivität als durch eine Erhöhung der Bodenzahl beeinflusst.

Hierbei zeigt sich aber bereits die Problematik der Optimierung eines chromatographischen Systems bei der Analyse von Naturstoffen, die in vielen Fällen in äußerst komplexen Mischungen vorkommen. Hohe Selektivität bezieht sich stets auf 2 Verbindungen, allenfalls auf 2 Gruppen von Verbindungen, nicht aber auf eine breitgestreute Palette verschiedenster Stoffe und Stoffklassen, wie sie z. B. bei ätheri-

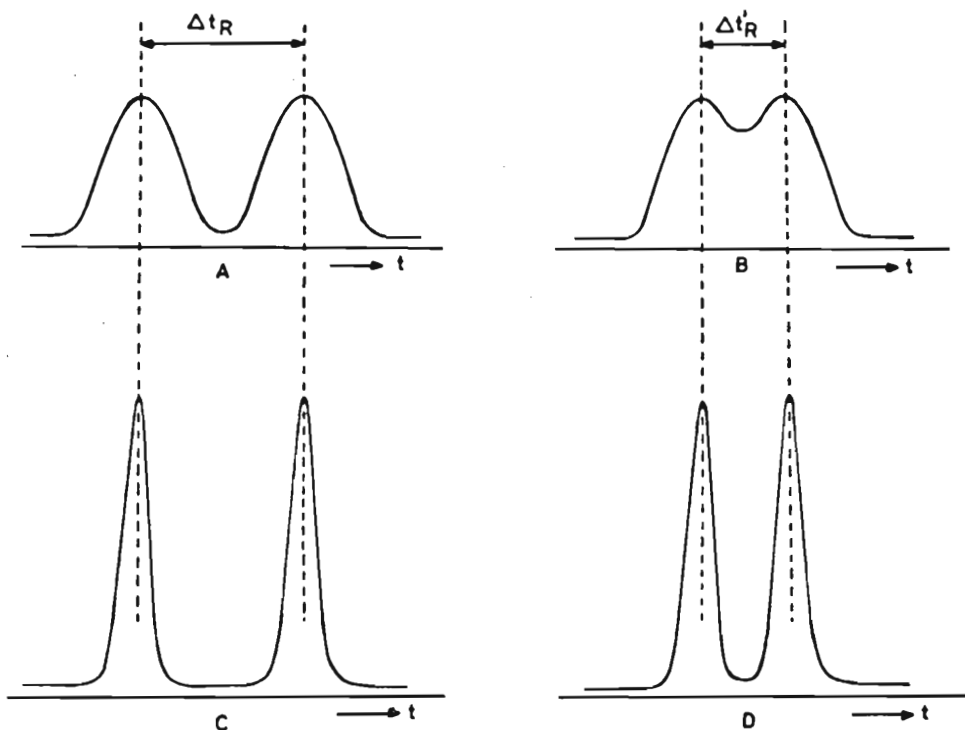


Abb. 2: Einfluß von Bodenzahl und Selektivität auf die Trennung zweier Substanzen.

schen Ölen vorliegt. Es ist daher stets – selbst bei Einsatz der leistungsfähigsten, chromatographischen Systeme mit Substanzüberlappung zu rechnen.

3. Dosierqualität

Eine dritte Größe, der meist nicht die erforderliche Aufmerksamkeit geschenkt wird, die ihr gebührt, die jedoch die Qualität einer Trennung ebenfalls stark beeinflussen kann, ist die sog. „Dosierqualität“ Q_s (Abb. 1.3) nach KAISER [2, 3]. Sie ist ein Maß für die Ausnutzung des verfügbaren Trennvermögens einer Säule bzw. einer Dünnschicht und ist vorrangig von der „Startbreite“ b_0 der einzelnen Komponenten in einer Analysenmischung abhängig. b_0 und b_{10} können aus isokratischen Chromatogrammen leicht durch Messung der $b_{0,5}$ -Werte und anschließende Extrapolation ermittelt werden. Für gute Trennungen sind demnach möglichst schmale Startbanden erforderlich, eine empirisch längst bekannte Tatsache, die es nur zu beachten gilt. Spezifische Schwierigkeiten der Naturstoffanalytik in diesem Zusammenhang sind häufig die hohe Verdünnung der Untersuchungsproben und die damit verbundene Dosierung von großen Probenvolumina.

Eine entscheidende Verbesserung der Trennqualität und eine Minderung der aufgezeigten Schwierigkeiten ist durch die Anwendung mehrerer chromatographischer Systeme möglich, eine Erkenntnis, der bereits lange bei der Analyse komplizierter Gemische Rechnung getragen wird. Vortrennung komplexer Gemische bzw. Anreicherung von Spurenkomponenten mittels eines chromatographischen Systems wie z. B. der Adsorptions-Flüssigkeits-Säulenchromato-

graphie und Feintrennung in einem zweiten System wie z. B. der DC oder GC sind lange geübte Verfahren; doch ist dieses Vorgehen sehr zeit- und arbeitsaufwendig, z. T. auch Ursache von Analysenfehlern, wenn beide Systeme für sich ohne Anpassung aneinander eingesetzt werden. Hier sollen deshalb ausschließlich Kombinationen zweier oder mehrerer aufeinander abgestimmter Chromatographiesysteme erörtert werden, die vor allem einer Steigerung der Trennleistung und Nachweisempfindlichkeit dienen, aber auch die Identifizierung der getrennten Stoffe erleichtern können.

Diese Kombinationstechniken werden im allgemeinen als zwei- oder mehrdimensionale Chromatographie, bzw. als Kopplungs- oder Transfertechnik bezeichnet. Wegen der in der Literatur vorkommenden unterschiedlichen Verwendung dieser Termini, sollen zunächst die Begriffe knapp erläutert werden.

Der Begriff der zweidimensionalen Technik wurde zuerst auf die planarchromatographischen Verfahren PC und DC angewandt, wenn nach Entwicklung in einer Fließrichtung und Zwischentrocknung mit einer anderen, zweiten mobilen Phase senkrecht dazu, also in einer zweiten Dimension weiter aufgetrennt wird.

Durch Hintereinanderschalten zweier Trennsäulen unterschiedlicher Qualität, z. B. gepackte und Kapillar-Trennsäule in der GC, lassen sich mit der zweidimensionalen Planarchromatographie prinzipiell vergleichbare Resultate erzielen, sodaß auch hier der Begriff der zwei- oder mehrdimensionalen Arbeitstechnik denkbar erscheint. Schließlich

lassen sich auch hier die Resultate „zwei-dimensional“ darstellen.

Zutreffend und eindeutiger ist es jedoch, von einer Kopplung zweier Trennsäulen zu sprechen, wie es sich bereits für die „on line“-Verbindung chromatographischer Trennsäulen mit Spektrometern eingebürgert hat. Die direkte Kopplung zweier chromatographischer Verfahren setzt voraus, daß bei der ersten Trennung die Elutionstechnik angewandt wird, da nur bei dieser Technik die getrennten Verbindungen kontinuierlich im Eluatstrom erhalten werden.

Nach einer entwicklungschromatographischen Arbeitstechnik liegen die getrennten Verbindungen sorbiert vor

und erfordern für die Überführung in das zweite chromatographische Trennsystem eine besondere Transfertechnik, welche die Desorption der zu untersuchenden Substanzen vom Sorbens mit einschließen muß.

Die in nachfolgender Aufstellung (Abb. 3) enthaltenen Anordnungen stellen – im Gegensatz zur geübten Sprachpraxis – unseres Erachtens keine mehrdimensionalen Methoden dar, wie durch Vergleich mit den entsprechenden DC-Techniken einzusehen ist: Der parallele Betrieb zweier Trennsäulen 1 und 2 entspricht der parallelen DC-Untersuchung eines Substanzgemisches in zwei verschiedenen Trennsystemen, z. B. in verschiedenen Fließmitteln FM1

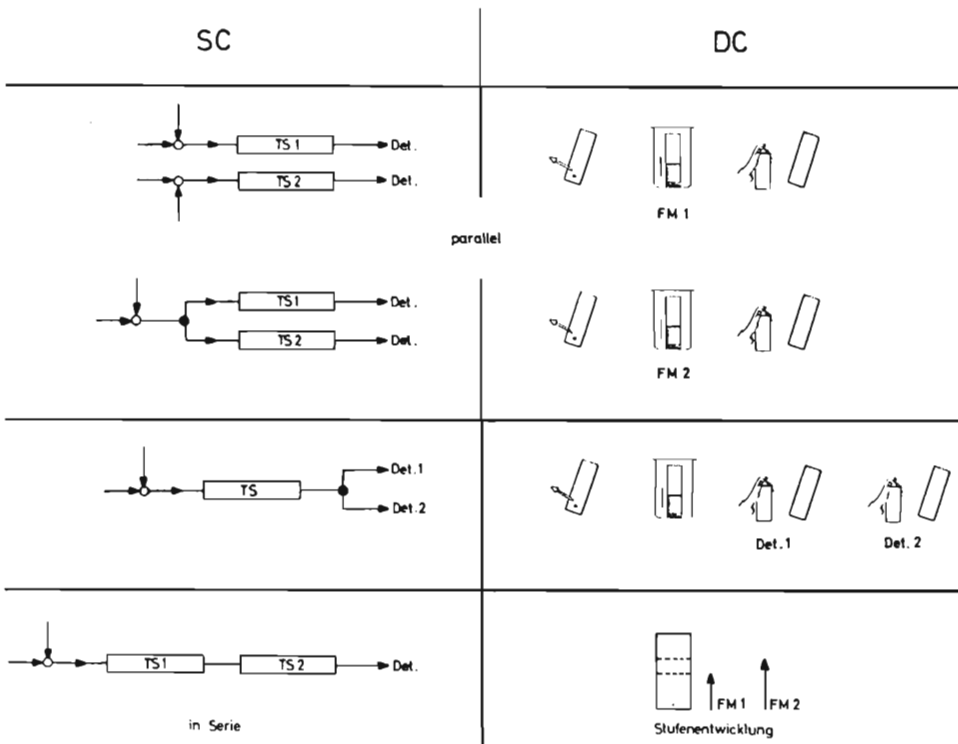


Abb. 3: Vergleich säulenchromatographischer Anordnungen mit dem entsprechenden eindimensionalen DC-Techniken.

und FM2. Die Aufteilung des Säuleneluates auf zwei verschiedene Detektoren hat in der DC im Besprühen mit zwei verschiedenen Detektionsmitteln 1 und 2 eine Parallele. Eine Serienschaltung zweier Trennsäulen kommt schließlich in der DC einer Zweifachentwicklung oder Stufenentwicklung in unterschiedlichen Fließmitteln gleich. In allen genannten Fällen wird bei planarchromatographischen Verfahren nicht von mehrdimensionaler Chromatographie gesprochen.

Tabelle 1

Kombinationsmöglichkeiten chromatographischer Verfahren

DC-DC	DC-FSC	DC-GC
GC-GC	GC-FSC	GC-DC
FSC-FSC	FSC-GC	FSC-DC

Tabelle I zeigt die Kombinationsmöglichkeiten der wichtigsten chromatographischen Verfahren, die in dieser Arbeit behandelt werden sollen. Dabei ist es aus Platzgründen nicht möglich, eine vollständige Zusammenstellung der

in der Literatur beschriebenen Varianten zu den einzelnen Kombinationen zu geben; vielmehr sollen die Grundlagen der einzelnen Techniken an einigen ausgewählten Beispielen erläutert und die sich für die Naturstoff-Analytik ergebenden Möglichkeiten aufgezeigt werden.

DC – DC

Die Kombinationen zweier dünn-schichtchromatographischer Entwicklungsprozesse in Form der zweidimensionalen DC kann als allgemein bekannt angesehen werden. Problematisch hierbei ist die in der Mehrzahl der Fälle erforderliche hohe Substanzkonzentration zu Beginn der Trennung, die vielfach zur Schichtüberladung und damit zu einer Trennleistungsminderung führt, da die nach der Chromatographie über die gesamte Plattenfläche verteilten Substanzen zunächst in einem Punkt konzentriert sind. Eine Verbesserung kann durch bandenförmiges Auftragen der Analyse erzielt werden (Abb. 4).

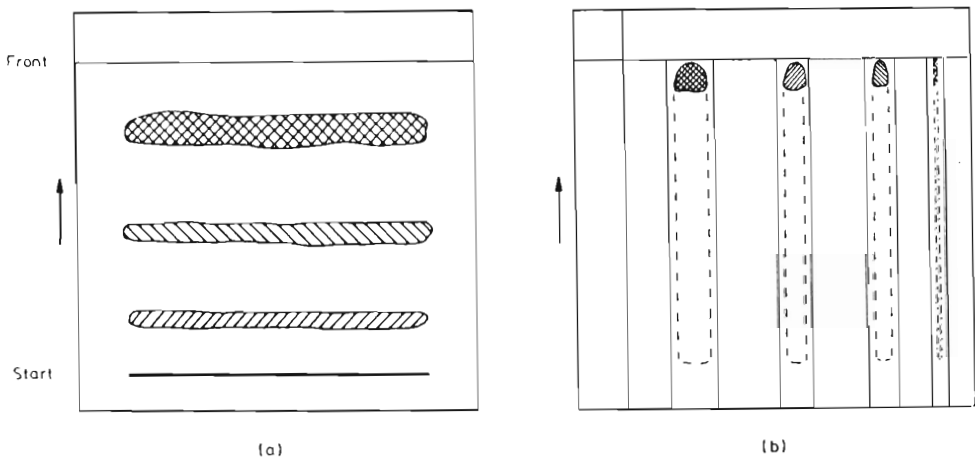


Abb. 4: Zweidimensionale DC nach bandenförmiger Probenaufgabe; a) DC-Platte nach erster Entwicklung; b) DC-Platte nach dem Zusammenziehen der Banden vor der zweiten Entwicklung.

Die nach der ersten Entwicklung ebenfalls bandenförmig vorliegenden Stoffe bzw. Stoffgemische werden anschließend senkrecht zur ersten Laufrichtung durch Verdrängungstechnik in der emporsteigenden Lösungsmittelfront zu schmalen Banden zusammengedrängt, die ihrerseits nach Zwischentrocknung als Startflecken für die Entwicklung in umgekehrter Richtung im eigentlichen zweiten Fließmittel dienen.

Leistungsfähiger, wenn auch höher in Zeit- und Arbeitsaufwand, ist die Kombination der konventionellen DC als erster Trennmethode mit nachfolgender HPTLC-Trennung, wobei vor allem der wesentlich niedrigere Substanzbedarf letzterer einen günstigen Einfluß auf die Trennleistung ausübt.

GC – GC

Die Kombination zweier oder mehrerer Trennsäulen in der Gaschromatographie, die sich in der Prozeßgaschromatographie seit langem bewährt hat, führt bei der Analyse von komplizierten Stoffgemischen zu einer erheblichen Steigerung der Selektivität. Durch Überführung einzelner ungetrennter Probenanteile vom Ende einer Trennsäule auf eine weitere Trennsäule anderer Selektivität läßt sich auch ein kompliziertes Stoffgemisch weitgehend in Einzelkomponenten zerlegen. Dazu werden zwei oder mehrere Trennsäulen in Serie geschaltet. Die in Trennsäule 1 aufgetrennten Verbindungen werden über ein Umschaltventil direkt in den Detektor geleitet. Nicht aufgelöste Peaks werden durch Betätigung des Ventils in eine zweite Trennsäule anderer Selektivität geleitet und gelangen nach erfolgter Trennung in den Detektor.

Auf diese Weise läßt sich ein in Trennsäule 1 nicht getrenntes Substanzpaar nach Umschalten auf eine zweite Säule durch Änderung der Selektivität der stationären Phase völlig trennen. Schwierigkeiten können bei dieser Arbeitsweise durch die begrenzte Temperaturbeständigkeit des Umschaltventils und durch vorhandene Totvolumina auftreten, die eine Trennleistungsmin- derung durch Bandenverbreiterung zur Folge haben.

Durch eine sog. ventillose Trennsäulenschaltung nach DEANS [4] lassen sich diese Schwierigkeiten jedoch völlig ausräumen, da bei dieser pneumatischen Schaltung die Analysenprobe mit den Ventilen nicht in Berührung kommt.

Erforderlich sind mehrere Regler und Ventile, deren Anordnung aus Abb. 5 hervorgeht. Das über das Magnetventil MV1 in den Einspritzblock eines Gaschromatographen strömende Trägergas transportiert die injizierte Analysenprobe in die Trennsäule 1, wo eine partielle Trennung eintritt. Diese kann vom Detektor A registriert werden, während Säule 2 über MV2 mit Trägergas versorgt und gespült wird. Durch Schließen der Ventile 2 und 4 lassen sich ungenügend getrennte Verbindungen in die zweite Säule überführen und weiter auftrennen. Ein Beispiel für eine derartige als „heart-cut“ bezeichnete Arbeitstechnik findet sich bei SCHOMBURG [5] (1975), der die verschiedensten gaschromatographischen Säulenschaltungen untersucht und auf diesem Gebiet Pionierarbeit geleistet hat. Der im Chromatogramm 1 (Abb. 6) eingezeichnete Bereich wurde durch eine entsprechende Schaltung in eine zweite Trennsäule geleitet und dadurch weiter aufgetrennt.

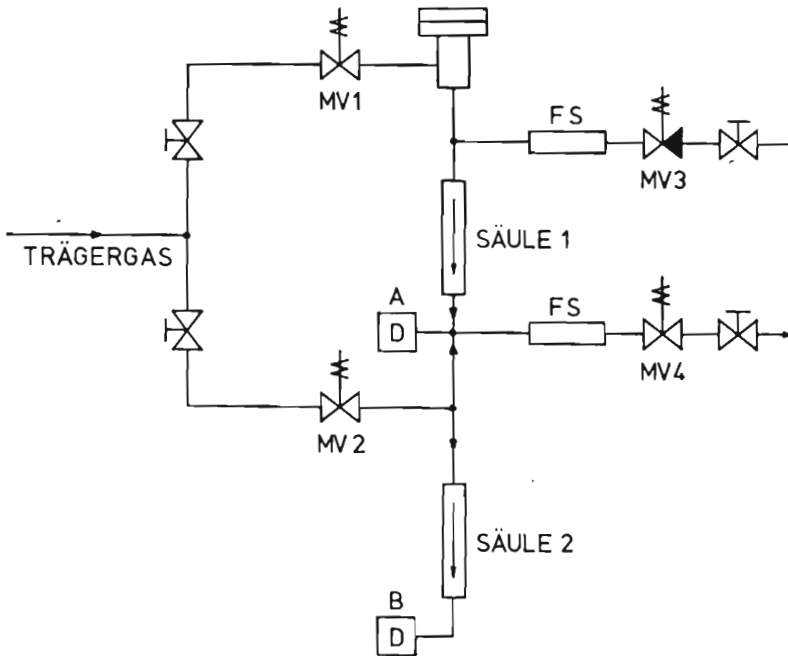


Abb. 5: „Ventillose“ Schaltung zweier gc-Trennsäulen (nach Daens, 1968 und SCHOMBURG et al., 1975). D = Detektor; MV = Magnetventil; FS = Filtersäule.

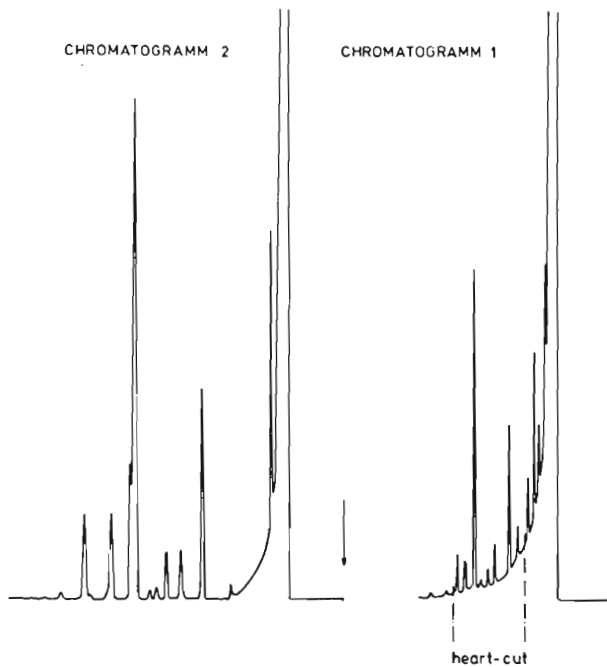


Abb. 6: „Heart cut“ einer Peakgruppe (Chromatogramm 1) und Auftrennung in einer zweiten Trennsäule (Chromatogramm 2).

Eine Steigerung der Trennqualität konnte derselbe Autor durch kurzfristiges Ausfrieren des „heart-cut's“ und anschließendes rasches Aufheizen dieser Zone vor bzw. am Anfang der zweiten Trennsäule erzielen, wodurch eine thermische Profilkomprimierung der Probe eintritt. Hierdurch wird auch für die zweite Trennsäule ein kleiner b_0 -Wert erzielt, was sich auf die Trennleistung günstig auswirkt. Die Kombination einer gepackten und einer Kapillartrennsäule erweist sich durch diesen Kunstgriff als ideale Anordnung bei der Untersuchung von Spurenkomponenten, ohne die empfindliche Kapillarsäule mit hohen Probenmengen belasten zu müssen. Das Ausfrieren bzw. Aufheizen der interessierenden Probenanteile geschieht durch Einleiten von kaltem bzw. heißem Stickstoff in ein über den Kapillarsäulen Anfang gestülptes kurzes Rohr. Uninteressante Probenanteile werden über ein Magnetventil entfernt.

Mit der „heart-cut“-Methode lassen sich auch Spurenkomponenten von stö-

renden Haupt- oder Lösungsmittelpeaks durch „Anschneiden“ derselben abtrennen, wie Abbildung 7 zeigt. Im linken Chromatogramm, das die Trennung einer Probe nach Passage zweier, hintereinandergeschalteter Trennsäulen darstellt, lassen sich neben dem Lösungsmittel zwei Komponenten registrieren. Durch Anschnitt des Lösungsmittelpeaks, d. h. durch Ableiten eines Teils des Lösungsmittels nach der ersten Trennsäule, lassen sich drei Komponenten (1–3) registrieren, die im normalen Chromatogramm vom Lösungsmittelpeak überdeckt und damit nicht nachweisbar sind. Spurenkomponenten, die unmittelbar nach Hauptkomponenten eluiert werden, lassen sich mit dieser Technik überhaupt erst erfassen und quantitativ exakt bestimmen.

FSC – FSC

Trennsäulenschaltungen in der Flüssigkeitschromatographie sind sowohl in der Niederdruck- [6] als auch in der Hochdruck-Säulenchromatographie [7]

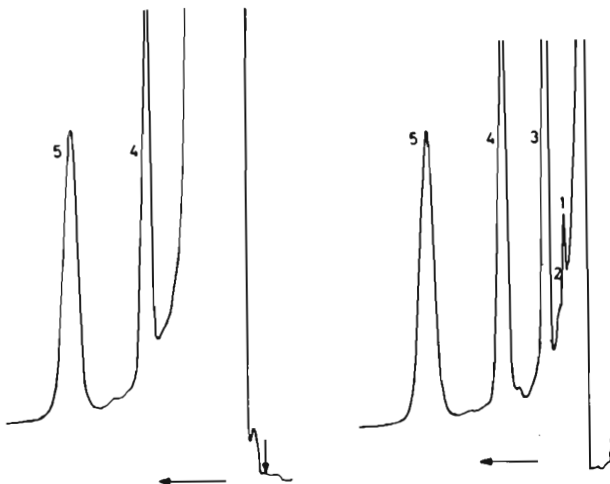


Abb. 7: Anschnitt eines Lösungsmittelpeaks nach der „heart cut“-Methode.

a) normale Trennung über Vor- und Trennsäule; b) Trennung nach Anschnitt des Lösungsmittels.

bekannt. Voraussetzung für den analytischen Einsatz dieser Technik im Hochdruckbereich war die Entwicklung eines geeigneten Schaltventils mit geringem Totvolumen, eine Aufgabe, die heute als weitgehend gelöst betrachtet werden kann [7, 8].

Die Serienschaltung von zwei Trennsäulen gleicher Packung aber unterschiedlicher Länge, wovon die kürzere vorzuschalten ist, dient der Abkürzung der Elutionsdauer langsam in einem Trennsystem wandernder Komponenten. Dazu werden die zuerst aus der Trennsäule 1 austretenden Komponenten in die zweite Trennsäule eingeleitet und dort zwischenzeitlich gespeichert, während die langsam wandernden und bereits genügend aufgelösten Komponenten direkt dem Detektor zugeleitet werden. Nach vollständiger Elution der Probe aus Trennsäule 1 erfolgt Umschaltung und Trennung bzw. Elution der in Trennsäule 2 gespeicherten Verbindungen. Diese Arbeitstechnik ist in der HPLC aufgrund der um den Faktor 10^4 niedrigeren Diffusionskoeffizienten in Flüssigkeiten gegenüber Gasen möglich, so daß selbst nach einigen Stunden noch keine meßbare Bandenverbreiterung der gespeicherten Komponenten auftritt.

Durch Kombination mehrerer Trennsäulen unterschiedlicher Selektivität werden auch komplexe Stoffgemische bei angemessenem Zeitaufwand in ihre Komponenten zerlegbar (Abb. 8). Chromatogramm 1 ist das Resultat einer Trennung zweier in Serie geschalteter unterschiedlicher Trennsäulen. Die Komponenten 7–10 werden nur sehr langsam eluiert und lassen sich infolge der Bandenverbreiterung nur noch sehr

unempfindlich detektieren. Leitet man dagegen nur die sehr unvollkommen in Trennsäule 1 getrennten Komponenten 1–6 (Chromatogramm 2) in die zweite Trennsäule und eluiert die restlichen Verbindungen nach Umschaltung direkt in den Detektor (Chromatogramm 3), so werden wesentlich schmalere, und damit empfindlicher detektierbare Peaks erhalten. Die in der zweiten Trennsäule gespeicherten Komponenten lassen sich anschließend eluieren. Neben einer Empfindlichkeitssteigerung wird so eine drastische Verkürzung der Analyszeit erreicht und häufig eine Gradientenelution umgangen.

Die direkten Kombinationen DC – FSC, GC – FSC und FSC – GC werden nach unserer Kenntnis nicht angewandt; doch erscheint zumindest die Verknüpfung der DC mit der FSC interessant, hätte sie doch gegenüber der zuvor erörterten Kombination den Vorzug, eine Variation von mobiler *und* stationärer Phase zu gestatten. Hierdurch ließe sich ein weiter Bereich unterschiedlicher Verteilungsverhältnisse abdecken und eine hohe Selektivität erzielen. So wäre im Anschluß an eine adsorptions-dünnschichtchromatographische Vortrennung in Stoffgruppen eine verteilungschromatographische Feintrennung denkbar und in vielen Bereichen der Naturstoffanalyse von Nutzen.

Die flüssigkeits-säulenchromatographische Vortrennung komplexer Naturstoffgemische in mehrere Fraktionen vor einer GC-Trennung wird bereits seit langem durchgeführt [9], setzt jedoch zeitaufwendige Probenanreicherungsschritte zwischen den beiden Trennverfahren voraus, da die erhaltenen Fraktionen in relativ hoher Verdünnung im Säuleneluat erhalten werden.

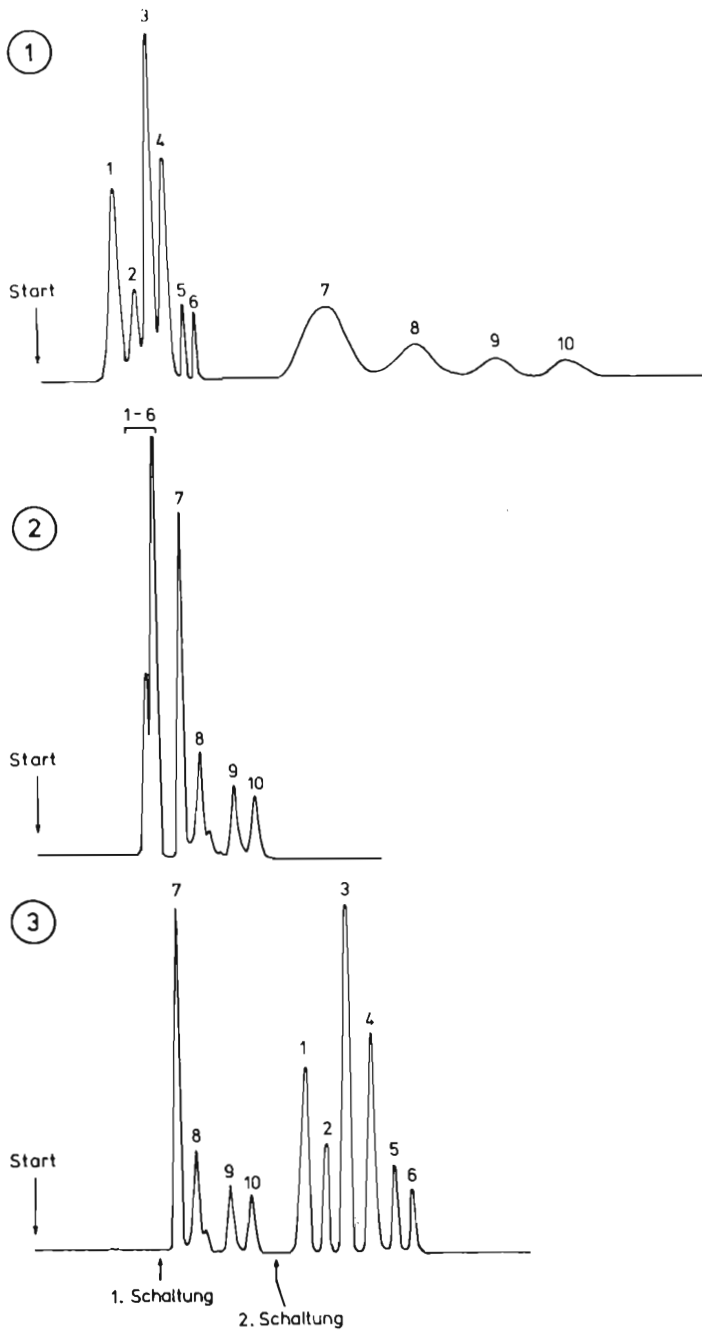


Abb. 8: Schaltung zweier HPLC-Trennsäulen.

1. Chromatogramm nach Serienschaltung beider Säulen.
2. Chromatogramm nach Passage der ersten Säule (Komponenten 1-6 ungetrennt).
3. Chromatogramm nach Passage der ersten Säule (Komponenten 7-10) und beider Säulen (Komponenten 1-6).

Eine merkliche Verbesserung, verbunden mit einer erheblichen Arbeitszeitverkürzung läßt sich durch Anwendung der „Trockensäulenchromatographie“ erreichen [10].

GC – DC

Die direkte Kopplung der GC mit der DC ist bereits seit geraumer Zeit bekannt [11, 12]. Sie bietet eine Reihe interessanter Möglichkeiten und führt zu sehr effektiven Trennungen, wenn man davon ausgeht, daß in der GC – zumindest in apolaren Trennflüssigkeiten – Unterschiede im Dampfdruck der einzelnen Komponenten zu ihrer Trennung führen, während die dünnschichtchromatographische Trennung im wesentlichen von Stoffpolarität und damit von den funktionellen Gruppen der Verbindungen beeinflusst wird.

Bei der direkten Kopplung eines Gaschromatographen mit der Dünnschichtchromatographie wird eine DC-Platte unmittelbar unter dem Ausgang einer GC-Trennsäule vorbeigeführt und das austretende heiße, gasförmige Eluat auf der kalten Schicht kondensiert. Dabei kann der Plattenvorschub entweder kontinuierlich erfolgen – dies geschieht am zweckmäßigsten mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Registrierung des Gaschromatogramms, um eine direkte Zuordnung der einzelnen Kondensatflecken zum Gaschromatogramm zu

erleichtern – oder man bewegt die DC-Platte schrittweise unter dem GC-Säulenende vorbei. Über ein T-Stück ist die Säule mit dem Detektor – z. B. einem FID – verbunden, dem etwa $\frac{1}{10}$ des Säuleneluats zugeleitet werden, während die verbleibenden 90% über ein beheiztes Dosierrohr auf die DC-Platte geleitet werden (Abb. 9). Die kontinuierlich aufgetragenen Flecken, die langgezogene Ellipsen darstellen und die daraus resultierenden Dünnschichtbahnen lassen sich direkt den einzelnen Peaks im Gaschromatogramm zuordnen.

Etwas aufwendiger ist die schrittweise Dosierung auf die DC-Platte, wobei das Detektorsignal zur Steuerung des Weitertransportes benutzt werden kann [12]. Spurenkomponenten lassen sich bei diesem Vorgehen unterdrücken bzw. in einem Fleck gemeinsam kondensieren, wodurch eine günstigere Ausnutzung der DC-Platte erzielt wird. Außerdem ist durch das punktförmige Kondensieren der einzelnen GC-Peaks eine lokal höhere Stoffkonzentration auf dem DC-Startfleck vorhanden (Abb. 10).

Durch die GC-DC-Kopplung läßt sich die Vollständigkeit der GC-Trennung überprüfen und gegebenenfalls ungetrennte Peaks weiter auftrennen. Umgekehrt können DC *nicht* trennbare Substanzen auf diese Weise getrennt er-

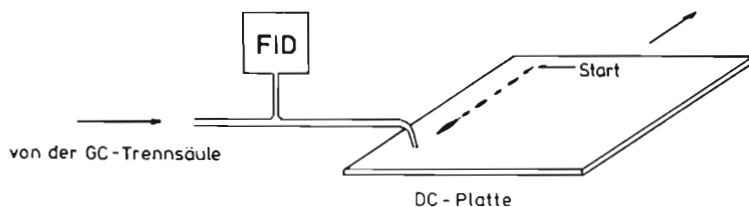


Abb. 9: Kopplung eines Gaschromatographen mit einer DC-Platte.

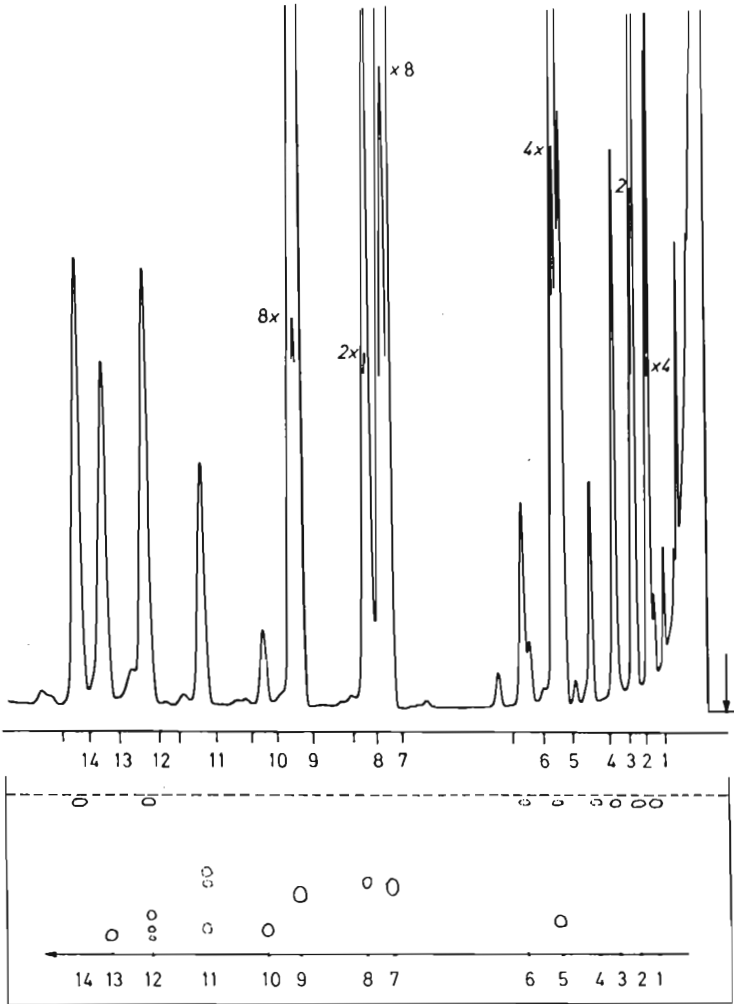


Abb. 10: Gaschromatogramm eines Salbeiöls und das entsprechende durch GC-DC-Kopplung erhaltene Dünnschichtchromatogramm.

halten werden. Ein Vergleich des Dünnschichtchromatogramms der gesamten Analysenprobe mit den durch Kondensation erhaltenen Flecken zeigt außerdem an, ob die gesamte Analysenprobe die GC-Trennsäule passiert hat oder sich eventuell einzelne Komponenten verändert bzw. zersetzt haben; eine speziell bei der qualitativen und quantitativen GC-Analyse von Naturstoffgemischen äußerst wichtige Fragestel-

lung, der nur selten die ihr gebührende Beachtung geschenkt wird. Durch Farbreaktionen auf der Dünnschicht können außerdem Hinweise auf die chemische Natur einzelner Komponenten des Gemisches erhalten werden. Unter Einsatz von HPTLC-Platten kann auch eine direkte Kombination mit gaschromatographischen Kapillarsäulen erfolgen. Die von uns dafür benutzte Anordnung ist in Abb. 11 wiedergegeben. Dabei

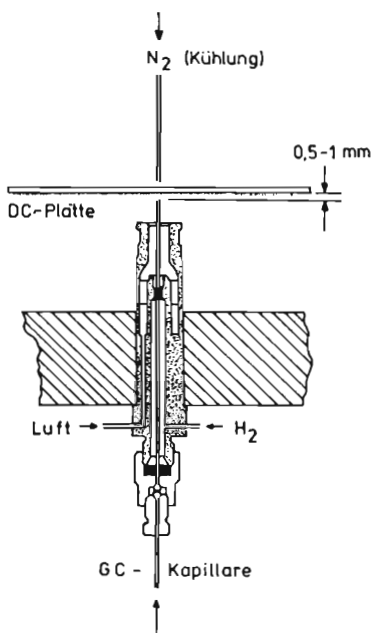


Abb. 11: Kopplung einer gc-Kapillarsäule mit einer HPTLC-Platte.

wird auf jegliche Leitungswege zur Vermeidung von Totvolumina völlig verzichtet und direkt aus einer Trennkapillare auf die DC-Platte kondensiert, deren Abstand vom Säulenende etwa 0,5–1 mm betragen muß. Der günstigste Abstand ist empirisch zu ermitteln, da er auf die Ausbeute einen starken Einfluß ausübt. Durch Kühlung des Kondensationspunktes mit kaltem Stickstoff auf der Rückseite der HPTLC-Platte lassen sich insbesondere bei relativ flüchtigen Verbindungen wie z. B. Monoterpenen bessere Ausbeuten erzielen und damit die Nachweisempfindlichkeit erhöhen. Ein schrittweiser Plattenvorschub ist hier aus den bereits zuvor dargelegten Gründen vorteilhaft.

DC – GC

Die Kombination DC – GC hat gegenüber der GC – DC-Kopplung den

Vorzug, daß die empfindlichere GC der weniger empfindlicheren DC nachgeschaltet ist und somit die Leistungsfähigkeit beider Verfahren voll ausgeschöpft werden kann. Für einen direkten Transfer dc-getrennter Verbindungen ohne gesonderte Elution der einzelnen DC-Flecken vom Sorbens verwenden wir einen speziellen GC-Probengeber, mit dem sich an Kieselgel sorbierte Substanzen direkt in einen Gaschromatographen dosieren lassen [13]. Am Gaschromatographen sind hierfür keine apparativen Veränderungen erforderlich.

Zur Dosierung wird die in einer Glaskapillare eingeschmolzene Probe mit einem Schubrohr in die heiße Zone des Injektorblockes gebracht (Abb. 12). Nach kurzer Aufheizzeit lassen sich die flüchtig gewordenen Anteile der Probe durch Zerdrücken der Kapillare momentan freisetzen und gelangen mit dem Trägergasstrom verlustfrei in die GC-Trennsäule. Die nichtflüchtigen Probenanteile sowie Glasreste der Kapillaren können unmittelbar danach ohne Unterbrechung des Trägergasstromes entfernt werden.

Bei dieser Arbeitstechnik werden im allgemeinen nur Bruchteile eines DC-Fleckens, nämlich ca. 1–2 mg Kieselgel (eine genügend hohe Substanzbelegung vorausgesetzt) benötigt, um gut auswertbare Gaschromatogramme zu erhalten. Die Temperatur im Injektorblock richtet sich nach den zu untersuchenden Substanzen und muß in der Regel nicht höher als bei der konventionellen Verdampfungs-technik gewählt werden. Die erforderliche Aufheizdauer der Probe beträgt 90 Sekunden; anschließend erfolgt die Dosierung durch Zertrümmern der Glasampulle. Nach

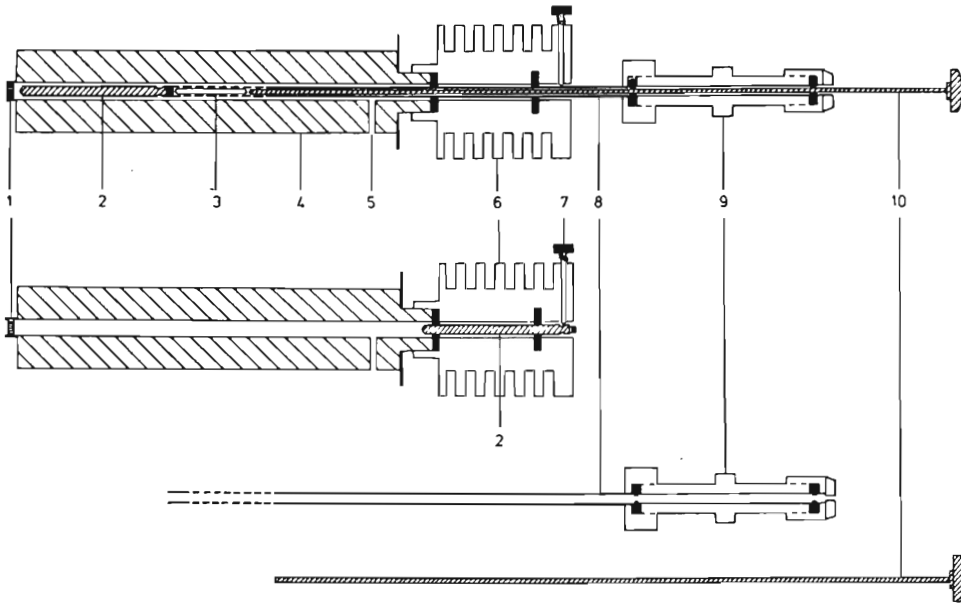


Abb. 12: gc-Probengeber für die direkte Dosierung eines DC-Fleckens.

1 = Metallfritte; 2 = Metallstab; 3 = Probenampulle; 4 = Einspritzblock; 5 = Trärgaseinlaß; 6 = Drehkörper; 7 = Bolzen; 8 = perforiertes Schubrohr; 9 = Halterung; 10 = Stößel.

weiteren 10 sec. können die Probenreste mit dem Schubrohr aus dem heißen Bereich des Injektorblockes ohne Unterbrechung des Trärgasstromes entfernt werden.

Auf diese Weise ließen sich die verschiedensten Substanzen vom Kieselgel thermisch desorbieren und gc weiteruntersuchen. Allerdings sind an Sorbens und Fließmittel besonders hohe Reinheitsforderungen zu stellen.

Bei Beachtung dieser Kriterien ergeben sich durch die Kombination der DC mit der GC eine Reihe neuer analytischer Möglichkeiten:

1. Unmittelbare GC-Überprüfung einer DC-Trennung.
2. Weitere Auftrennung dc nicht getrennter Substanzen durch GC.
3. GC-Identifizierung dc abgetrennter Verbindungen, gegebenenfalls in Ver-

bindung mit einem Massenspektrometer.

4. Chemische Veränderung bestimmter Stoffe nach der DC-Trennung und anschließende GC-Untersuchung der Reaktionsprodukte.

Am Beispiel eines ätherischen Öles läßt sich zeigen, daß nicht jeder Fleck des Dünnschichtchromatogramms eine Einzelsubstanz representiert, sondern bisweilen aus einer mehr oder minder großen Gruppe ähnlich polarer Verbindungen besteht. So ist der Hauptfleck des Dünnschichtchromatogramms von Fenchelöl (Abb. 13) in der Hauptsache aus trans-Anethol, enthält daneben aber auch die ähnlich gebauten Stoffe cis-Anethol und Methylchavicol. Der ebenfalls in diesem Fleck nachweisbare Anisaldehyd ist auf eine Oxydation des Anethols auf der Schicht nach erfolgter

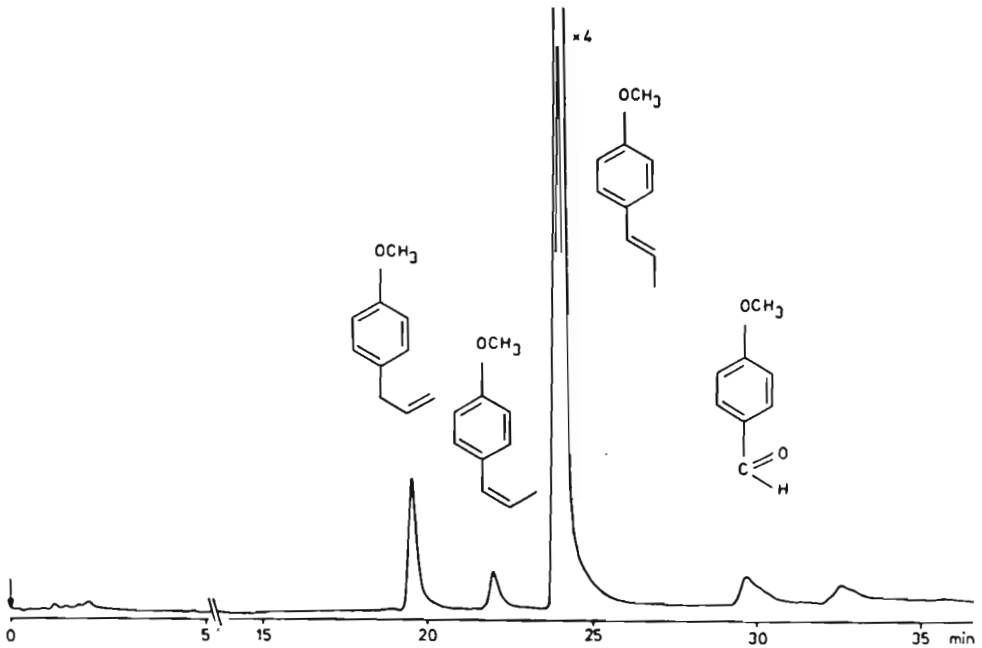


Abb. 13: Gaschromatogramm nach direkter Eingabe der „Anetholbande“ eines Fenchelöl-Dünnschichtchromatogramms.

DC-Trennung zurückzuführen. Mit derartigen Substanzveränderungen muß bei der DC – GC-Kombination gerechnet werden, was bei der Deutung der Resultate zu berücksichtigen ist.

FSC – DC

Die direkte Kopplung der Flüssigkeitssäulenchromatographie mit einer Planartechnik wie der DC bereitet wegen der verhältnismäßig hohen Probenverdünnung im Eluat der Trennsäule Schwierigkeiten, während bei Zwischenschaltung einer Probenkonzentration durch partielles Verdampfen des Lösungsmittels gute Resultate zu erhalten sind. Deshalb findet dieses Verfahren weite Anwendung: Nach säulenchromatographischer Probenvereinfachung bzw. – Reinigung läßt sich mit Hilfe der DC eine analytische Feintrennung durchführen [14].

Eine direkte Kombination der HPLC und der DC mit allerdings anderer Zielsetzung – die DC wurde hierbei lediglich als Detektionsprinzip für die HPLC eingesetzt – ist kürzlich beschrieben worden [15], doch erscheint die vorgeschlagene Anordnung prinzipiell für eine echte HPLC-DC-Kopplung geeignet (Abb. 14). Das aus der HPLC-Trennsäule austretende Eluat wird hierbei nach Passage eines UV-Detektors geteilt und partiell auf eine DC-Platte geleitet, die kontinuierlich unter der Dosieröffnung vorbeibewegt wird. Durch Aufheizen der Platte und Absaugen der Lösungsmitteldämpfe lassen sich bei geeigneter Plattengeschwindigkeit genügend kleine Substanzflecken erzielen und anschließend dünnschichtchromatographisch weiter auftrennen.

Bei Einsatz von HPTLC-Platten mit

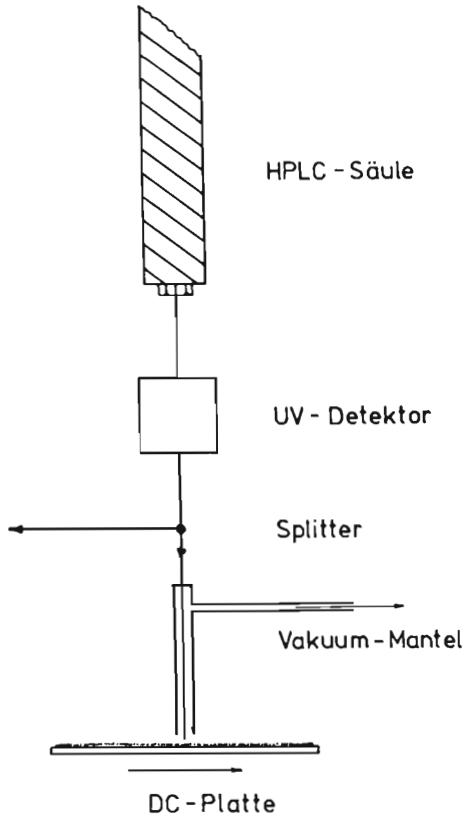


Abb. 14. Direkte Kopplung einer HPLC-Säule mit einer DC-Platte.

einer sog. Konzentrierungszone, wie sie bereits für die konventionelle DC handelsüblich sind, konnten wir vor allem durch den auftretenden „Bandenschärfungseffekt“ eine merkliche Trennleistungsteigerung erzielen und außerdem die DC-Plattentemperatur absenken, was insbesondere für die Untersuchung verhältnismäßig flüchtiger Verbindungen wie z. B. ätherischer Ölbestandteile von Wichtigkeit ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch die Kombination der verschiedenen chromatographischen Verfahren eine Reihe neuer analytischer Möglichkeiten eröffnet werden, die noch

bei weitem nicht ausgeschöpft sind. Hier sei besonders auf die Möglichkeiten intermediärer chemischer Umsetzungen zwischen den einzelnen chromatographischen Trennungen hingewiesen, durch die zusätzlich wichtige Informationen über die Struktur verschiedener Komponenten zu erhalten sind.

Literaturverzeichnis

1. Van Deemter, J. J., F. J. Zuiderweg und A. Klinkenberg: *Chem. Eng. Sci.* **5**, 271 (1956).
2. Kaiser, R.: *Chromatographia* **9**, 337 (1976).
3. Kaiser, R.: „Einführung in die Hochleistungs-DC“, Institut f. Chromatographie Bad Dürkheim 1976.
4. Deans, D. R.: *Chromatographia* **1**, 18 (1968).
5. Schomburg, G., H. Husmann und F. Weeke: *J. Chromatog.* **112**, 205 (1975).
6. Snyder, L. R.: *J. Chromatog. Sci.* **8**, 692 (1970).
7. Huber, J. F. K., R. van der Linden, E. Ecker und M. Oreans: *J. Chromatog.* **83**, 267 (1973).
8. Straub, H. und E. Ecker: *G-I-T-Fachzeitschrift Laboratorium* **19**, 13 (1975).
9. Miller, J. M. und J. G. Kirchner: *Anal. Chem.* **24**, 1480 (1952).
10. Kubezka, K.-H.: *Chromatographia* **6**, 106 (1973).
11. Janak, J.: *J. Chromatog.* **15**, 15 (1964).
12. Kaiser, R.: *Z. Analyt. Chem.* **205**, 284 (1964).
13. Kubezka, K.-H.: *Mitt. d. dtsh. Pharm. Ges.* **304**, 278 (1971).
14. Stahl, E.: „Dünnschichtchromatographie, Ein Laboratoriumshandbuch“, Berlin, Heidelberg, New York 1967, Springer-Verlag.
15. Boshoff, P. R., B. J. Hopkins und V. Pretorius: *J. Chromatog.* **126**, 35 (1976).

Anschrift:
 Prof. Dr. K.-H. Kubezka,
 D-8700 Würzburg,
 Mittlerer Dallenbergweg 64