

Von Athula B. Attygalle und E. David Morgan*

Was kann ein Chemiker mit ein paar Nanogramm einer wertvollen organischen Substanz – rein oder unrein – anfangen? In jedem Fall eine ganze Menge, muß hier die Antwort lauten. Die Komponenten eines Gemisches können quantifiziert, getrennt, isoliert, durch Reaktionen abgebaut oder derivatisiert sowie extrahiert werden; außerdem lassen sich Massenspektren aufnehmen. Wenn die Substanz nicht durch einen hohen Anteil an Lösungsmittel verunreinigt ist, sind Manipulationen ohne größeren Substanzverlust oder größere Verdünnung möglich. Not macht eben erfinderisch. Die in dieser Übersicht behandelten Beispiele zeigen, was heute in der Nanogramm-Chemie erreicht werden kann. Sie sollen als Anregung dienen und dazu führen, neue Anwendungsmöglichkeiten zu entwickeln. Die Beispiele stammen zwar zum großen Teil aus der Insektenchemie, doch sei ihre allgemeine Anwendbarkeit hier betont. Die vorliegende Übersicht veranschaulicht, daß Gaschromatographie und Reaktionsgaschromatographie, jede für sich oder in Kombination mit der Massenspektrometrie, in den Händen des Chemikers wertvolle Werkzeuge für die Strukturaufklärung flüchtiger organischer Verbindungen sind, von denen nur Nanogramm-Mengen zur Verfügung stehen.

1. Einleitung

Seit den Anfängen der Organischen Chemie haben sich die Chemiker mit großem Geschick und Einfallsreichtum der Strukturaufklärung organischer Moleküle gewidmet. Der Fortschritt spektroskopischer Techniken im letzten Vierteljahrhundert hat die Anwendung mancher klassischer Abbau- und Derivatisierungsmethoden überflüssig gemacht. Als Ergebnis dieser „spektroskopischen Revolution“ ist die Strukturbestimmung eines Naturstoffes heute fast schon zur Routine geworden.

Die Kernresonanz(NMR)-Spektroskopie leistet sicherlich den größten Beitrag zur Strukturzuordnung der meisten neuen Naturstoffe. Beim Versuch, die Geheimnisse der Natur zu lüften, findet der Chemiker interessante Stoffe aber oft nur in Mengen, die bei weitem zu klein für NMR-Untersuchungen sind. So ist es z. B. für den Pheromonchemiker schwierig, genug reine Substanz für die Aufnahme eines NMR-Spektrums zu isolieren. Mit Ausnahme der Massenspektrometrie benötigen alle spektroskopischen Analysetechniken üblicherweise Probenmengen im Mikro- bis Milligramm-Maßstab (Tabelle 1). Es wurden zwar bereits ^1H -NMR-Spektren von Proben in der Größenordnung von 1–2 μg ^[1,2] aufgenommen; für komplexere Verbindungen ist jedoch etwa 1 mg nötig. Mit der Fourier-Transform-Infrarot(FT-IR)-Spektroskopie in Kombination mit der Gaschromatographie erreicht man die Nano-

gramm-Nachweisgrenze, doch ist die Menge an Strukturinformation, die man durch IR-Spektroskopie erhält, beschränkt.

Wenn nur Nanogramm-Mengen eines Naturstoffes vorliegen, sind meistens chromatographische Trennoperationen vor oder während der spektroskopischen Strukturbestimmung erforderlich. Die wichtigste spektroskopische Technik in der Nanogramm-Chemie ist die Massenspektrometrie (MS), und vor allem ihre „Ehe“ mit der Gaschromatographie (GC-MS) ist eine überaus wirksame Methodik der Trennung, Detektion und Analyse. Und obwohl die Massenspektrometrie neben dem Molekulargewicht und der Summenformel auch Strukturinformationen liefert und manchmal zur Charakterisierung einer Substanz ausreicht, läßt sich die chemische Struktur eines neuen Naturstoffes in den meisten Fällen so nicht ermitteln. Beispielsweise steht der Pheromonchemiker oft vor der Wahl, entweder eine große Anzahl von Insekten zu sammeln und NMR-Spektren aufzunehmen (etwa tausendfacher Substanzbedarf gegenüber dem für ein Massenspektrum), oder andere Wege zu finden, um aus der geringen vorhandenen Substanzmenge möglichst viele Strukturinformationen zu erhalten.

Der Chemiker, der in der Gaschromatographie (GC) nur ein hochauflösendes Trennverfahren und eine Quantifizierungstechnik sieht, erkennt ihr Potential als Quelle für Strukturinformationen. Im einfachsten Fall läßt sich mit spezifischen GC-Detektoren (Tabelle 1) die Anwesenheit von Stickstoff, Phosphor und Schwefel anzeigen. Das Retentionsverhalten der Substanz auf polaren und unpolaren stationären Phasen gibt Hinweise auf das Molekulargewicht und die Polarität der Verbindung. Nach Abbaureaktionen oder Umwandlungen in Derivate liefert die Gaschromatographie zusätzliche Informationen, und bei Kopplung mit der Massenspektrometrie (GC-MS) nimmt das Ausmaß an Strukturinformationen sogar erheblich zu.

[*] Doz. Dr. E. D. Morgan
Department of Chemistry, University of Keele
Staffordshire ST5 5BG (England)
Dr. A. B. Attygalle
Institut für Organische Chemie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Henkestraße 42, D-8520 Erlangen
Derzeitige Adresse: Department of Chemistry,
University of Houston
Central Campus, Houston, TX 77004 (USA)

Tabelle 1. Grenzen für die praktische Anwendung gaschromatographischer und spektroskopischer Methoden [a].

Methode	Ab- kür- zung	Selektivität	nachweisbare Menge		Bemerkungen: Substanz wird
			minimal	normal	
Gaschromatographie [3]					
mit Flammenionisations- detektor	FID	nicht-selektiv gegenüber allen organischen Verbindungen, spricht jedoch kaum auf hoch oxidierte Verbindungen wie HCHO und CS ₂ an	100 pg für Alkane	10 ng	zersetzt
mit Elektroneneinfang- detektor	ECD	selektiv; spricht auf elektronenabsorbierende Verbindungen an, z. B. Halogen- und Nitroverbindungen sowie konjugierte Carbo- nylverbindungen	0.1 pg für Lindan	100 pg	nicht zersetzt
mit Wärmeleitfähigkeits- detektor	WLD	nicht-selektiv	100 ng	1 µg	nicht zersetzt
mit Stickstoff-Phosphor- Detektor	NPD	hoch selektiv; Detektion von Kohlenstoff kann variiert werden	1 pg	1 ng	zersetzt
mit Flammenphotometer als Detektor	FPD	selektiv für Schwefel und Phosphor	100 pg	10 ng	zersetzt
Spektroskopie					
Kernmagnetische Resonanz	¹ H-NMR	selektiv für ¹ H	75 µg [b] 1 µg [c]	1 mg	nicht zersetzt
	¹³ C-NMR	selektiv für ¹³ C	500 µg [d]	5 mg [e]	nicht zersetzt
Infrarot-	IR	selektiv	1 ng [f]	1 mg	nicht zersetzt
Ultraviolett-	UV	hoch selektiv bezüglich der Anwesenheit von Chromophoren	unterschiedlich, je nach Substanz		nicht zersetzt
Massenspektrometrie	MS	im allgemeinen nicht-selektiv	200 pg	5–50 ng	zersetzt

[a] Die Tabelle dient nur zum groben Vergleich; Absolutwerte sind von der Art der untersuchten Substanz, von den Analysenbedingungen und von Ausführung und Modell des Analyseninstruments abhängig. [b] Vitamin B₁₂ (5.5×10^{-8} mol); Akkumulationszeit 10 min. [c] Cortison-21-acetat; Akkumulationszeit 13.9 h. [d] Cholesterin (1.3×10^{-6} mol); Akkumulationszeit 10 h. [e] Cholesterin (1.3×10^{-5} mol); Akkumulationszeit 10 min. [f] Unter Anwendung der Fourier-Transform-IR-Spektroskopie.

Die Abbau- oder Derivatisierungsreaktionen können in einem unabhängigen Schritt, zweckmäßigerweise jedoch direkt in Kombination mit einer gaschromatographischen Trennung, durchgeführt werden, z. B. im Einspritzblock des Gaschromatographen oder in einem Vorsäulen- oder Nachsäulenreaktor. Diese Techniken werden als Reaktionsgaschromatographie bezeichnet.

2. Techniken zur Feststoffprobenaufgabe

2.1. Nachteile von Lösungsmitteln

Im allgemeinen werden Substanzgemische für die chromatographische Trennung in einem Lösungsmittel verteilt, doch Lösungsmittel sind der Fluch des „Nanogramm-Chemikers“. Die Injektion eines Lösungsmittels mit 99.9proz. Reinheit in ein Kapillar-GC-System mit hoher Empfindlichkeit zeigt erst richtig die Verunreinigungen solcher Solventien. Überdies werden Weichmacher, Stabilisatoren und Antioxidantien beim Kontakt mit Kunststoff und Gummi mit Leichtigkeit aufgenommen. Leichtflüchtige Komponenten können durch den Lösungsmittelpeak überdeckt werden, was besonders die Suche nach kleinen Fragmentmolekülen aus Abbaureaktionen erheblich beeinträchtigt. Das gewählte Lösungsmittel kann für einzelne Verbindungen des Gemisches selektiv sein, so daß die Zusammensetzung der Lösung und damit das Gaschromatogramm nicht die ursprüngliche Mischung repräsentiert; gelegentlich kann das Solvens auch mit Komponenten reagieren und diese verändern. Daher sollte man bei derart anspruchsvollen Arbeiten am besten auf Lösungsmittel verzichten.

2.2. Lösungsmittelfreie Probenaufgabe

Es gibt mehrere Methoden zur lösungsmittelfreien Probenaufgabe; die erste davon ist bereits 1958 beschrieben worden^[4]. Dabei scheint jede Methode – je nach den Bedingungen und der Art der Probe – ihre Vorteile zu haben. Lösungsmittelfreie Injektionstechniken wurden im allgemeinen mit gepackten Säulen praktiziert, doch gibt es keine prinzipiellen Schwierigkeiten in der Anpassung an Kapillarsäulen.

Bridges und *Guinn* plazierten bei ihren Untersuchungen von Borkenkäferpheromonen einen Drahtkäfig mit einem ganzen Käfer in den Einspritzblock eines Gaschromatographen^[5a]. Eine ähnliche Methode wurde zur Einführung von Käfer-Wehrsekreten angewendet; hier lag die Probe in einer kleinen Vertiefung eines kalten Stempels^[5b]. In einem anderen Fall befand sich die Probe im offenen Ende einer Kapillare, die durch ein Loch im Septum des Injektors gestoßen wurde. Diese Methode führte jedoch zu nichtreproduzierbaren Retentionszeiten^[5c].

Techniken zur Feststoffprobenaufgabe wurden zur Untersuchung von pflanzlichem Gewebe angewendet, das etherische Öle enthielt^[5d,e]. *Weatherston* und *MacLean* benutzten einen handelsüblichen Feststoffprobengeber („solid sampler“) (Perkin-Elmer MS-41) in Kombination mit gepackten Säulen, um die Sexualpheromone von Lepidopteren zu analysieren^[5f]. Dazu wurde das Insektenmaterial in Aluminium- oder Goldkapseln eingeschlossen, die im Probengeber des Gaschromatographen erhitzt und anschließend mit einem Stahldorn aufgestochen wurden. Die Arbeitsgruppe von *Descoins* in Frankreich hat mit dieser Methode mit gepackten GC-Säulen die Pheromone von

Lepidopterenweibchen eingehend untersucht^[6]. Und obwohl das System modifiziert und zusammen mit Kapillarsäulen benutzt wurde^[7], hat man es nicht zur Analyse von Naturstoffen herangezogen.

Eine andere Technik zur lösungsmittelfreien Probenaufgabe besteht in der Verwendung von Vorsäulen, wie sie von *Ställberg-Stenhagen*^[8a] entwickelt wurde. Flüchtige Substanzen aus Insekten oder pflanzlichem Material werden in einer mit Adsorbens (z. B. Tenax-GC) gefüllten Vorsäule aufgefangen. Anschließend wird diese Vorsäule an eine Kapillarsäule angeschlossen und schnell erhitzt, um die gesammelten flüchtigen Verbindungen zu desorbieren^[8b,c].

2.3. Feststoffprobengeber für Naturstoffanalysen

Ein Feststoffprobengeber wird in unserem Laboratorium bereits seit 1970 für Insektenuntersuchungen angewendet^[9]. Offensichtliche Vorteile sind neben der einfachen Handhabung, daß die Möglichkeit der Probenkontamination verringert ist und daß die Probe nicht verdünnt wird. Die gesamte Menge an Analysenmaterial kann mit einem Minimum an Manipulationen auf die Säule aufgegeben werden. Selbst leichtflüchtige Substanzen wie Methanol oder Acetaldehyd können detektiert und quantitativ bestimmt werden. Besonders vorteilhaft ist jedoch, daß der Gaschromatograph bei höchster Empfindlichkeit betrieben

werden kann, so daß sich selbst Nebenbestandteile quantitativ bestimmen lassen, ohne daß die Gefahr von Selektivitätseffekten durch eine etwaige Extraktion besteht.

Die Probe wird in einer Weichglaskapillare eingeschmolzen und wenige Minuten im heißen Einspritzblock eines Gaschromatographen erhitzt, damit sie verdampft oder – im Falle biologischen Materials – sich aufheizt (Abb. 1). Anschließend wird die Glaskapillare mit einem Stempel zerbrochen und das flüchtige Material mit dem Trägergas direkt auf die Säule aufgebracht^[9, 10].

2.3.1. Anwendung in der Kapillarsäulentechnik

Das Feststoffprobengeber-System ist auch für Kapillar-GC-Säulen anwendbar, wenn es innerhalb des Glas-Insertliners eines Splitlos-Injektors montiert wird. Dies gelingt z. B. sehr einfach beim Splitlos-Injektor des Carlo Erba Fractovap durch Aufbohren des Loches in der Metallkappe, die das Septum hält. Zu enge Glas-Insertliner, wie sie in vielen anderen Kapillargaschromatographen verwendet werden, lassen sich einfach durch ein Glasrohr mit 4 mm Innendurchmesser ersetzen.

Zum Betrieb wird für den Fall der splitlosen Probenaufgabe das Splitventil vor dem Zerburchen der Probenkapillare geschlossen und etwa 30 Sekunden danach wieder geöffnet. Anfangs wird die Ofentemperatur für einige Minuten möglichst niedrig gehalten und anschließend schnell zum Start des Temperaturprogramms erhöht. Die flüchtigen Verbindungen werden im Probengeber verdampft, kondensieren am Säulenanfang und werden dann selektiv mit steigender Säulentemperatur wieder verdampft. Dies führt zu einem besseren „Peakfokussieren“ und damit zu scharfen Signalen im Chromatogramm. Bei besonders flüchtigen Komponenten kann es erforderlich sein, den Säulenkopf oder den Anfang der Säule zu kühlen.

2.3.2. Anwendung bei biologischem Gewebe

Vorratsdrüsen wie die Dufour-Drüse oder der Giftapparat von Ameisen werden für die gaschromatographische Analyse zweckmäßigerweise durch Zerschneiden unter Wasser präpariert. Anschließend legt man das Gewebe auf einen kleinen Glassplitter, tupft überschüssiges Wasser mit einem Stück Filterpapier oder Zellstoff ab, gibt das Glasstück mit der Probe in eine Weichglaskapillare und schmilzt diese zu^[9, 11]. Wird das biologische Gewebe in der zugeschmolzenen Kapillare erhitzt und diese dann zerstoßen, so platzen die Gewebezellen durch Verdampfung der Zellflüssigkeit. Damit wird auch die komplette Freisetzung der flüchtigen Inhaltsstoffe gewährleistet. Will oder muß man beweisen, daß die untersuchte Substanz aus dem Inneren des Drüsensacks und nicht aus Tröpfchen im Gewebe stammt, sticht man am besten die Drüse mit einer feinen Glaskapillare an, deren Durchmesser kleiner ist als der der Drüse. Der Drüseninhalt wird durch Kapillarkräfte hochgezogen; die feine Kapillare wird dann in einer Weichglaskapillare eingeschmolzen und gaschromatographisch analysiert^[12].

Einige Blattläuse sekretieren aus einem Paar tubulärer Strukturen (Siphone) am hinteren Abdomen ein Alarmpheromon, wenn sie gestört werden. Die Tropfen aus den

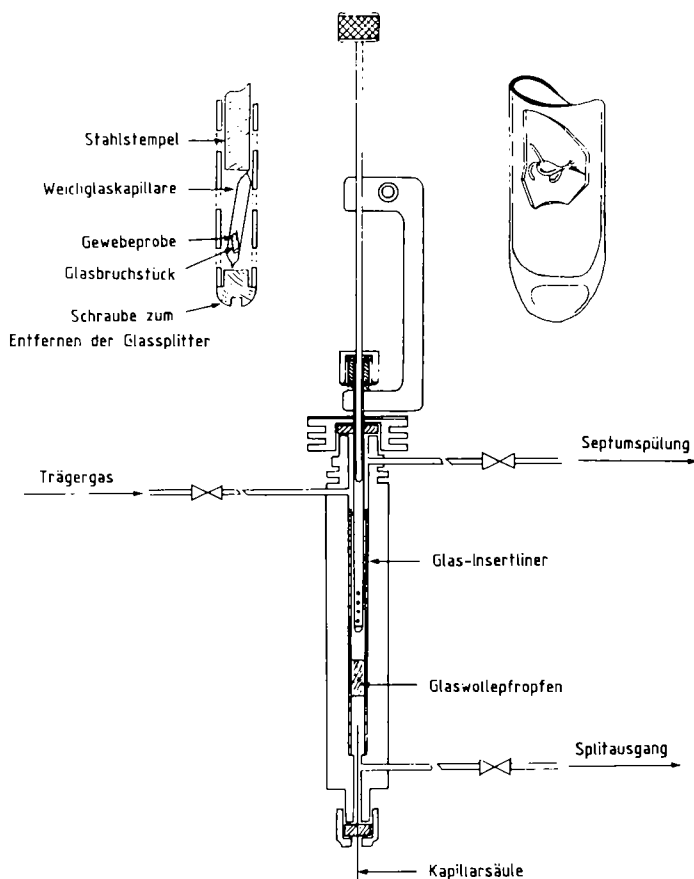


Abb. 1. Feststoffprobengeber zur lösungsmittelfreien Probenaufgabe auf die GC-Trennsäule, ausgelegt für Kapillarsäulen; die Anordnung für gepackte Säulen ist einfacher. Die Probengeberspitze (links oben) und die biologische Gewebeprobe auf dem Glasbruchstück (rechts oben) sind vergrößert dargestellt.

Siphonen kann man in ähnlicher Weise in Kapillaren sammeln und nach dem Einschmelzen in größere Kapillaren chromatographieren. Auf diese Art können ferner Gewebeproben oder ganze Insekten, wenn sie genügend klein sind, untersucht werden. So zeigt z.B. Abbildung 2 das Gaschromatogramm der Mandibeldrüsen-Inhaltsstoffe aus dem Kopf einer *Myrmica*-Ameise.

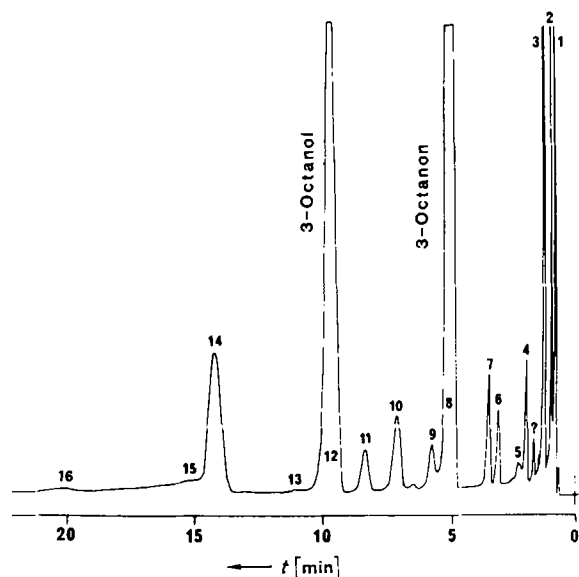


Abb. 2. Gaschromatogramm des Mandibeldrüsen-Inhalts einer Arbeiterin der Ameise *Myrmica albuferensis* bei Anwendung der Feststoffprobenaufgabetechnik mit gepackter Säule (2,75 m \times 4 mm, 10% PEG 20 M auf Chromosorb W, 130°C). 1, Ethanol; 2, Aceton; 3, 2-Methylpropanal; 4, 3-Hexanon; 5, 3-Pentanol; 6, 3-Heptanon; 7, 3-Hexanol; 8, 3-Octanon; 9, 3-Heptanol; 10, 6-Methyl-3-octanon; 11, 3-Nonanon; 12, 3-Octanol; 13, 6-Methyl-3-octanol; 14, 3-Decanon; 15, 3-Nonanol; 16, 3-Undecanon.

Die Feststoffprobenaufgabetechnik wurde intensiv in Keele (England) zum Studium der Drüseninhaltsstoffe von Ameisen eingesetzt, wobei im allgemeinen mit gepackten Säulen gearbeitet^[13] und nur einige Anwendungen von Kapillarsäulen versucht wurden^[14]. Der Vorteil von Kapillartrennsäulen für diese Arbeiten zeigte sich bei der Neuuntersuchung der Substanzen aus der Dufour-Drüse der Ameise *Lasius niger*. Mehr als 50 Komponenten wurden mit der Kapillarsäule nachgewiesen^[15a], während vorher unter Verwendung gepackter Säulen nur 15 Komponenten identifiziert werden konnten^[15b]. Das Kapillarchromatogramm einer Dufour-Drüse von *Lasius fuliginosus* wird in Abbildung 3 vorgestellt.

Die Feststoffprobenaufgabetechnik mit Kapillarsäulen wurde vor allem bei der Analyse von intakten Sexualpheromon-Drüsen angewendet, die aus mehreren Arten weiblicher Schmetterlinge stammten^[16]. Die Sexualpheromone sind in einem kleinen Drüsenbereich der Abdomenspitze lokalisiert, und das Weibchen emittiert sie nur während der Lockzeit („Calling“). Daher sollte die Probe nur während dieser Periode präpariert werden. Abbildung 4 zeigt das Gaschromatogramm des Pheromondrüseninhalts eines einzigen Weibchens von *Cryptophlebia leucotreta* (Tortricidae, Lepidoptera)^[16c]. Diese Technik hat sich auch bei einer Studie zur Bestimmung des Verbleibs einer Biosynthese-Vorstufe nach lokaler Applikation bewährt^[17].

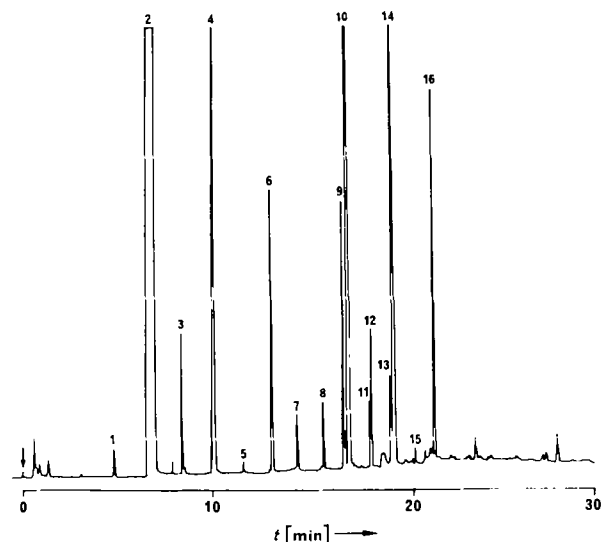


Abb. 3. Gaschromatogramm des Inhalts der Dufour-Drüse einer Arbeiterin der Ameise *Lasius fuliginosus* bei Anwendung der Feststoffprobenaufgabetechnik mit Kapillarsäulen. 1, Decan; 2, Undecan; 3, Dodecan; 4, Tridecan; 5, Tetradecon; 6, Pentadecon; 7, 2-Tridecanon; 8, 2-Tetradeconon; 10, 2-Pentadeconon; 11, Heptadecon; 12, 2-Hexadeconon; 14, 2-Heptadeconon; 15, 2-Octadeconon; 16, 2-Nonadeconon. Die Peaks 9 und 13 sind zwei nicht identifizierte Carbonylverbindungen.

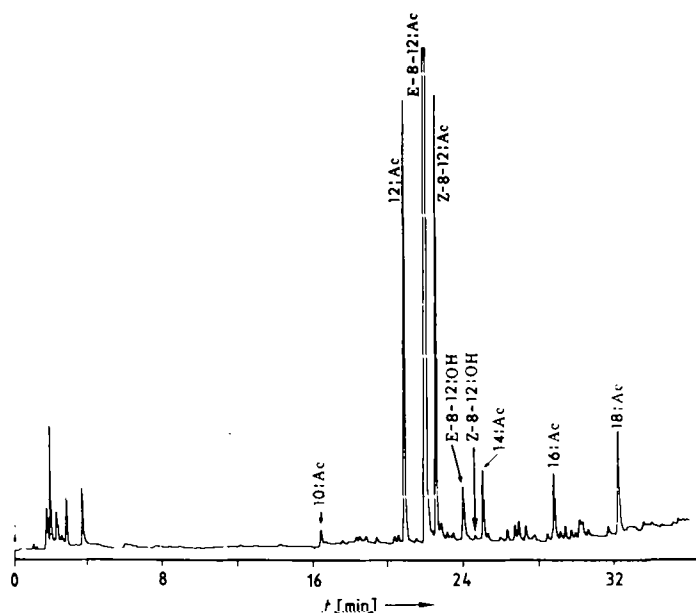


Abb. 4. Gaschromatogramm einer Sexualpheromon-Drüse eines erwachsenen Weibchens von *Cryptophlebia leucotreta*. Feststoffprobenaufgabetechnik mit Fused-Silica-Kapillarsäule (25 m \times 0,22 mm) mit SP-2340-Beschichtung. Die Ofentemperatur wurde 2 min bei 60°C gehalten und dann mit 4°C/min auf 195°C erhöht. 10:Ac, Decylacetat; 12:Ac, Dodecylacetat; 14:Ac, Tetradecylacetat; 16:Ac, Hexadecylacetat; 18:Ac, Octadecylacetat; E-8-12:Ac, (E)-8-Dodecenylacetat; Z-8-12:Ac, (Z)-8-Dodecenylacetat; E-8-12:OH, (E)-8-Dodecen-1-ol; Z-8-12:OH, (Z)-8-Dodecen-1-ol.

3. Kondensation und Rechromatographie

Die Homogenität eines GC-Peaks, von dem man vermutet, daß er ein unaufgelöstes Signal eines Substanzgemisches ist, kann durch Chromatographie auf mehreren stationären Phasen mit unterschiedlicher Polarität geprüft werden. Ist jedoch die Probenmischung komplex, so treten dabei möglicherweise neue heterogene Peaks im Chroma-

togramm auf. Die Lösung besteht einfach darin, jeweils nur einen Peak oder einen zeitlich engen Ausschnitt aus dem Chromatogramm zu rechromatographieren. Dieses Prinzip der multidimensionalen Gaschromatographie (MDGC) wurde zum erstenmal durch Deans^[18] vorgestellt, hat aber bis zum Erscheinen von Kapillarsäulen kein besonderes Aufsehen erregt^[19]. Nur ein einziges Doppelofen-Instrument ist im Handel erhältlich (Siemens SiCHROMAT). Damit kann z. B. jeder Peak auf einer unpolaren, gepackten Säule im ersten Ofen aufgelöst und zur weiteren Auflösung zu einer zweiten Säule, vorzugsweise einer Kapillarsäule, im zweiten Ofen umgeschaltet werden^[20, 21]. Für Säulenschaltungen wurden noch viele andere Systeme entwickelt. MDGC sollte auch zur Bestimmung des Enantiomerengehalts chiraler Pheromone nützlich sein. Für solche Analysen wurden Säulen verwendet, die mit optisch aktiven chromatographischen Trennphasen belegt waren^[22]. Diese GC-Phasen sind sehr empfindlich, und daher müssen die rohen Substanzproben zunächst vorgereinigt werden. Eine chirale Phase als Belegung der zweiten MDGC-Säule vereinfacht die notwendigen Manipulationen^[23].

Ein Doppelofengerät dürfte jedoch die Finanzmittel und die Anforderungen der meisten „Chromatographen“ übersteigen; das gleiche Resultat erhält man durch Kondensieren und Rechromatographieren des Peaks an einer anderen Phase.

3.1. Effluent-Splitten

Einzelne Peaks können durch Kondensation für Biotests herangezogen werden, außerdem gelingt so die Anreicherung von reinem Material für NMR- oder UV-Spektren. Strukturinformationen können ferner durch chemische Reaktionen vor oder während des Rechromatographierens erhalten werden. Bei Verwendung des Wärmeleitfähigkeitsdetektors (WLD) wird die Probe nicht zersetzt und kann nach dem Detektor wieder vollständig gesammelt werden; dieser Detektor scheidet jedoch für viele Zwecke aus, weil er relativ unempfindlich ist. Der Flammenionisationsdetektor (FID) wird zusammen mit Effluent-Teilern (Split) benutzt, bei denen nur ein kleiner Teil des Trägergases und der Probe den Detektor erreicht, während der Großteil in den gekühlten Auffänger gelangt. Allglas-Splits sollte man gegenüber den früher verwendeten Metall-Splits den Vorzug geben^[24, 25], um katalytisch induzierte Umwandlungen auf der heißen Metalloberfläche zu vermeiden. Einen einfach herzustellenden und zu bedienenden Allglas-Split für die Verwendung mit gepackten Säulen^[26] haben wir in unserem Laboratorium jahrelang mit Erfolg eingesetzt (Abb. 5).

Für die üblicherweise bei gepackten Säulen verwendeten Trägergasströme ($30\text{--}60\text{ mL min}^{-1}$) wird kein Make-up-Gas zur Nachbeschleunigung benötigt. Die kleinen Ströme in Kapillarsäulen ($0.5\text{--}2\text{ mL min}^{-1}$) erfordern jedoch ein Make-up-Gas, wenn das Effluent geteilt wird, um den Peak zu sammeln. Es gibt einige sorgfältig ausgearbeitete Systeme für die präparative Kapillar-Gaschromatographie^[27], aber meistens genügt ein so einfaches System wie das von Williams und Vinson^[28].

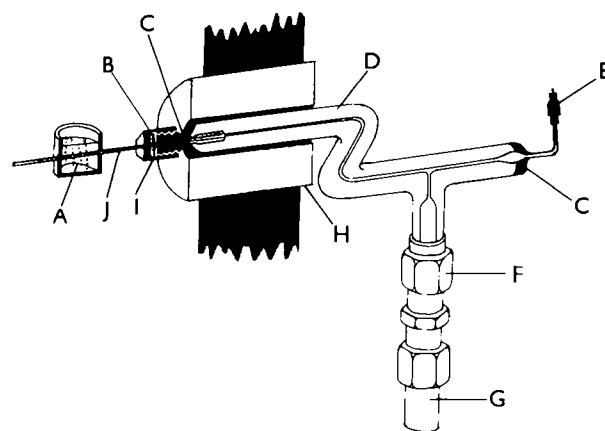


Abb. 5. Effluent-Teiler (Split) für gepackte Säulen mit angeschlossener Kapillare als Falle. A, Kühlmittel flüssiger Stickstoff; B, Silicongummi-Septum; C, Glas-Metall-Verschmelzung; D, Glaskapillare; E, Detektoranschluß mit Restriktionsdraht; F, Röhrenkupplung („Swagelokunion“); G, GC-Trennsäule; H, Heizblock; I, Sechskant-Überwurfmutter; J, Glaskapillare.

3.2. Selektive Kondensation („Peak-Trapping“)

Eine Vielfalt von Kollektoren mit mannigfaltigem Design der Kühlfallen ist für die Gaschromatographie beschrieben worden^[29]. Zur Kondensation größerer Substanzmengen (bis in den μg -Bereich) verwendeten wir U-förmig gebogene Stahlkapillaren, die mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden^[24]. Einige Anwender bevorzugten Glasrohre, weil sie chemisch relativ inert sind, geben Säulenfüllmaterial, Quarz- oder Baumwolle in den Kapillarkollektor, oder belegen die Innenwände. Andere Autoren konnten jedoch auch mit leeren Glaskapillaren unter optimalen Bedingungen 90% zurückgewinnen^[25]; unsere Experimente bestätigen dies. Wegen der Gefahr der Kontamination ist es angebracht, auf Kühllösungen zu verzichten und stattdessen besser mit gekörntem Trockeneis^[30, 31] oder flüssigem Stickstoff^[32] zu kühlen.

Die Faktoren, die zur Effektivität der Kondensation beitragen, werden noch nicht recht verstanden. Sowohl Siedepunkt, Polarität und Molekülgestalt der Verbindung als auch Dimensionen der Kapillare und Trägergasfluß spielen eine Rolle. Ebenso scheinen die Temperatur der Falle und der Temperaturgradient^[25] vor der Kühlfalle die Effektivität zu beeinflussen. Klimes et al.^[33] untersuchten den Einfluß einiger dieser Parameter auf die Kondensationsausbeuten.

Zum Kondensieren von ng-Mengen reiner Verbindungen aus gepackten Säulen oder Kapillarsäulen erwies sich eine einfache Anordnung als geeignet und ausreichend effektiv^[32]. Sie besteht aus einer Glaskapillare, die durch zwei Löcher in der Plastikkappe eines Probenfläschchens gesteckt ist. Der Innendurchmesser des Kapillarrohrs scheint dabei die kritische Größe zu sein. Bei Rohren mit größerem Innendurchmesser kann es zur Aerosolbildung kommen. Das eine Ende der Kapillare wird durch ein kleines Loch in einer Silicongummiplatte gestoßen, die durch eine Verschraubung oder durch ein weibliches Luer-Fitting, das auf den Split von Abbildung 5 paßt, fixiert ist. Als Beispiel zeigt Abbildung 6 das Kondensieren von Myristinsäure in einer solchen Kapillare. Auf der Eingangsseite erkennt man klar die scharfen Temperaturgrenzen.

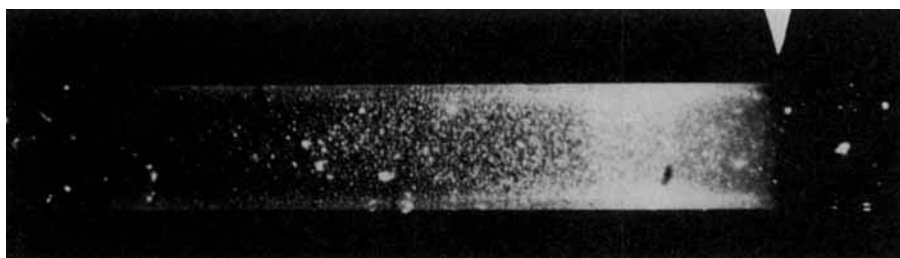


Abb. 6. Kondensieren weniger μg Myristinsäure in einer Glaskapillare (ähnlich wie in Abb. 7) im Anschluß an eine Säule ($1\text{ m} \times 4\text{ mm}$, 15% FFAP). Gasfluß von rechts. Der Pfeil markiert die Grenze der gekühlten Zone und die abgeschiedenen Myristinsäure-Kristalle.

3.3. Rechromatographie ohne Lösungsmittel; Schmelzpunktsbestimmung

Die Glaskapillaren für die Kondensation können an beiden Enden zugeschmolzen und direkt für die Rechromatographie auf unterschiedlichen stationären Phasen verwendet oder bis zum Gebrauch gelagert werden. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse eines Kondensations- und Rechromatographieexperiments mit einem Gemisch von Tetradecan und Pentadecan. In einem zweiten GC-Durchlauf wurde das Pentadecan kondensiert. Nur 5% der Probe gingen durch den Detektor. Das in der zugeschmolzenen Glaskapillare gesammelte Material wurde direkt rechromatographiert; damit erhielten wir Ausbeuten bis zu 85%^[32].

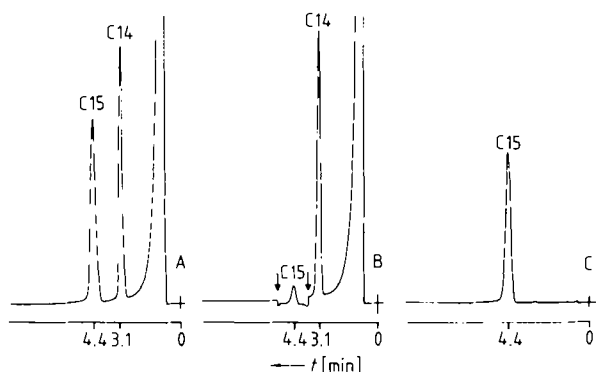


Abb. 7. Effektivität der Kondensation. A) Tetradecean und Pentadecan (je 250 ng) in $0.5\text{ }\mu\text{L}$ Hexan, chromatographiert auf einer Trennsäule ($1.5\text{ m} \times 4\text{ mm}$, 5% SE-30, 145°C). B) Injektion der gleichen Menge; Effluent zwischen den durch Pfeile gekennzeichneten Zeiten kondensiert. C) Die kondensierte Probe wurde mit einem Feststoffprobengeber reinjiziert.

Bei der gaschromatographischen Analyse der Dufour-Drüse der Ameise *Myrmica rubra* an einer polaren stationären Phase wurden zwei Komponenten des Sekrets, Heptadecadien und (Z,E)- α -Farnesen, gemeinsam eluiert. Dieser Peak konnte durch Kondensieren und Rechromatographieren an einer unpolaren SE-30-Siliconphase in seine Komponenten aufgelöst werden^[32].

Viele Naturstoffe, die durch Gaschromatographie analysiert werden, sind bei Raumtemperatur flüssig, einige jedoch, darunter auch Insektenpheromone, sind fest. Die Schmelzpunkte der Feststoffe (vgl. Myristinsäure aus Abb. 6), die in einer Glaskapillare kondensiert wurden, können mit großer Genauigkeit mit einem Heiztisch-Mikroskop bestimmt werden^[34]. Die dafür benötigte Substanzmenge wird vornehmlich durch die Vergrößerung des Mikroskops bestimmt. Diese Methode kann auch zur Bestimmung der Chiralität verwendet werden, wenn beide Enantiomere ei-

nes chiralen Naturstoffs verfügbar sind. Nach Coinjektion jeweils eines Enantiomers mit der unbekannten Probe und Kondensieren des Effluents gibt sich das Racemat durch einen veränderten Schmelzpunkt zu erkennen.

3.4. Rechromatographie mit Lösungsmittel

Die in den Glaskapillaren kondensierten Substanzen müssen nicht unbedingt mit dem Feststoffprobengeber rechromatographiert werden. Oft ist es bequemer, $1\text{ }\mu\text{L}$ eines geeigneten Lösungsmittels mit einer Injektionsspritze mit feiner Nadel in das Kapillarende zu injizieren (Abb. 8),

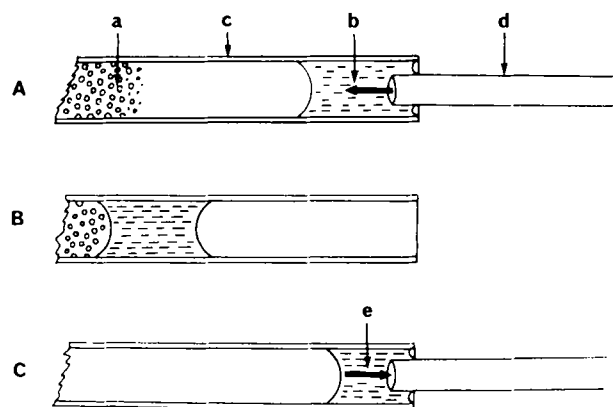


Abb. 8. Reaktion in einer Glaskapillare. A) $1\text{ }\mu\text{L}$ Reagenslösung b wird in einer Kapillare c zum kondensierten Material a gegeben, und zwar mit einer feinen Spritze d ($75\text{ mm} \times 0.17\text{ mm}$ äußerer Durchmesser). B) Die Reagenslösung wird mit dem kondensierten Material durch Neigen der Kapillare gemischt. C) Die Reaktionsmischung e wird durch Antipumpen der Kapillare zu deren Ende bewegt und mit der Spritze entnommen.

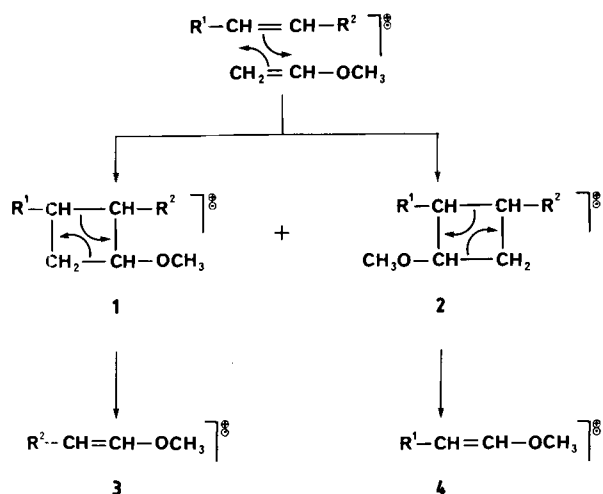
sofern der Nadeldurchmesser kleiner als der der Kapillare ist. Durch Neigen der Kapillare kann man das kondensierte Material mit dem Lösungsmittel vermischen. Dann wird die Nadel wieder eingeführt und die Lösung entnommen. Weil die Nadel so dünn ist, muß das Material durch einen septumlosen Injektor rechromatographiert werden. Bei unseren Arbeiten konnten wir 80–90% wiedergewinnen^[34].

4. Bestimmung von Doppelbindungspositionen

Die Bestimmung von Doppelbindungspositionen ist für die Strukturaufklärung eines Naturstoffes oft von großer Bedeutung. Die Elektronenstoß(EI)-Massenspektrometrie ist dabei meist wenig hilfreich, solange nicht die Spektren der authentischen Verbindung und aller ihrer Doppelbin-

dungsisomere vorhanden sind. Oft muß erst eine indirekte Methode für biologisch wichtige und nur in ng-Mengen verfügbare Substanzen gefunden werden^[35].

Selbst die Massenspektrometrie mit chemischer Ionisation (CI) führt mit den üblichen Reaktantgasen, z. B. Methan, nicht immer zum Ziel. Methylvinylether und einige andere gasförmige, ungesättigte Verbindungen wurden jedoch mit Erfolg als CI-Reaktantgas bei der Lokalisierung von Doppelbindungen in einfach ungesättigten Verbindungen eingesetzt^[36]. Das Alken bildet mit Methylvinylether ein Paar Vierzentren-Additionskomplexe **1**, **2**, die wiederum zu zwei charakteristischen Ionen **3** bzw. **4** zerfallen (Schema 1). Durch die m/z -Werte der Ionen **3** und **4**



Schema 1.

ist die Position der Doppelbindung festgelegt. Eine Mischung des Methylvinylethers mit Stickstoff und Schwefeldisulfid als Reaktantgas soll einfachere Spektren mit erkennbaren Molekülionen und charakteristischen Fragmenten zur Lokalisierung der Doppelbindung ergeben^[36b]. Die Methode ist jedoch nicht spezifisch für Alkenfunktionen, da auch gesättigte Verbindungen Addukt-Ionen bilden^[37]. Ähnliche Schwierigkeiten mit Methylvinylether-CI-MS-Spektren hatten auch *Budzikiewicz* und *Busker*^[38]. Sie fanden jedoch, daß die Doppelbindung in den meisten Fällen auch mit Isobutan als CI-Gas lokalisiert werden konnte; für schwierige Fälle empfehlen sie Stickoxid NO oder Methylamin als Reaktantgas. Isobutan-CI-MS-Spektren dienten zur Lokalisierung von Doppelbindungen konjugierter Diene in einer Serie von Verbindungen, die Aldehyde, Alkohole, Formiate, Acetate und Kohlenwasserstoffe umfaßte^[39].

Obwohl die Molekülionen leicht isomerisieren, ist es auch möglich, die Position der Doppelbindung einfach ungesättigter Acetate und Alkohole aus den relativen Intensitäten einiger Ionen des EI-Massenspektrums zu bestimmen. *Horiike et al.*^[40] beschrieben als erste diese empirische Näherung zur Lokalisierung der Doppelbindung in Tetradeceacylaceten. Zwei andere Arbeitsgruppen verifizierten und verbesserten die Methode für lineare, einfach ungesättigte C_{12} -, C_{14} - und C_{16} -Acetate^[41,42]. EI-Massenspektren bestimmter Alkatriene zeigen ebenfalls signifikante Fragmentationen, die für die Positionen der Doppel-

bindungen charakteristisch sind^[43]. Es sind jedoch die Spektren sämtlicher reiner Doppelbindungsisomere notwendig, um sie mit dem MS-Spektrum der unbekannten Substanz zu vergleichen. Schon die Synthese der reinen Isomere kann aufwendig sein, und falls sie zur Verfügung stünden, so genügte bereits der Vergleich der Retentionszeiten dieser Standards mit der der unbekannten Probe.

Sofern eine entsprechend moderne MS-Ausrüstung vorhanden ist, sind damit die massenspektrometrischen Methoden noch nicht erschöpft. Die Kombination Negativionen-MS/MS wurde verwendet, um die Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren zu bestimmen. Die Carbonsäuren wurden durch Fast-Atom-Bombardment (FAB) ionisiert; anschließend wurden die Stoßaktivierungsspektren (CAD) der $[M-H]^-$ -Ionen untersucht^[44].

Im allgemeinen muß der Chemiker zur Bestimmung der Doppelbindungsposition auf Derivatisierungsmethoden zurückgreifen, wie sie in Schema 2 zusammengestellt sind. Durch alle diese Methoden wird die Verbindung in ein Derivat überführt, welches bei der GC-Massenspektrometrie am Bindungsort der Derivatisierungsgruppe charakteristische Ionen ergibt^[45-57]. Als Alternative kann die Verbindung an der Doppelbindung chemisch in Fragmente gespalten werden, die sich anschließend durch GC-Retentionszeit und wenn möglich durch Massenspektren identifizieren lassen^[58a-d].

Alle diese Methoden verlangen dem Chemiker ein Höchstmaß an Geschicklichkeit und Einfallsreichtum ab, wenn ng-Proben im Spiel sind.

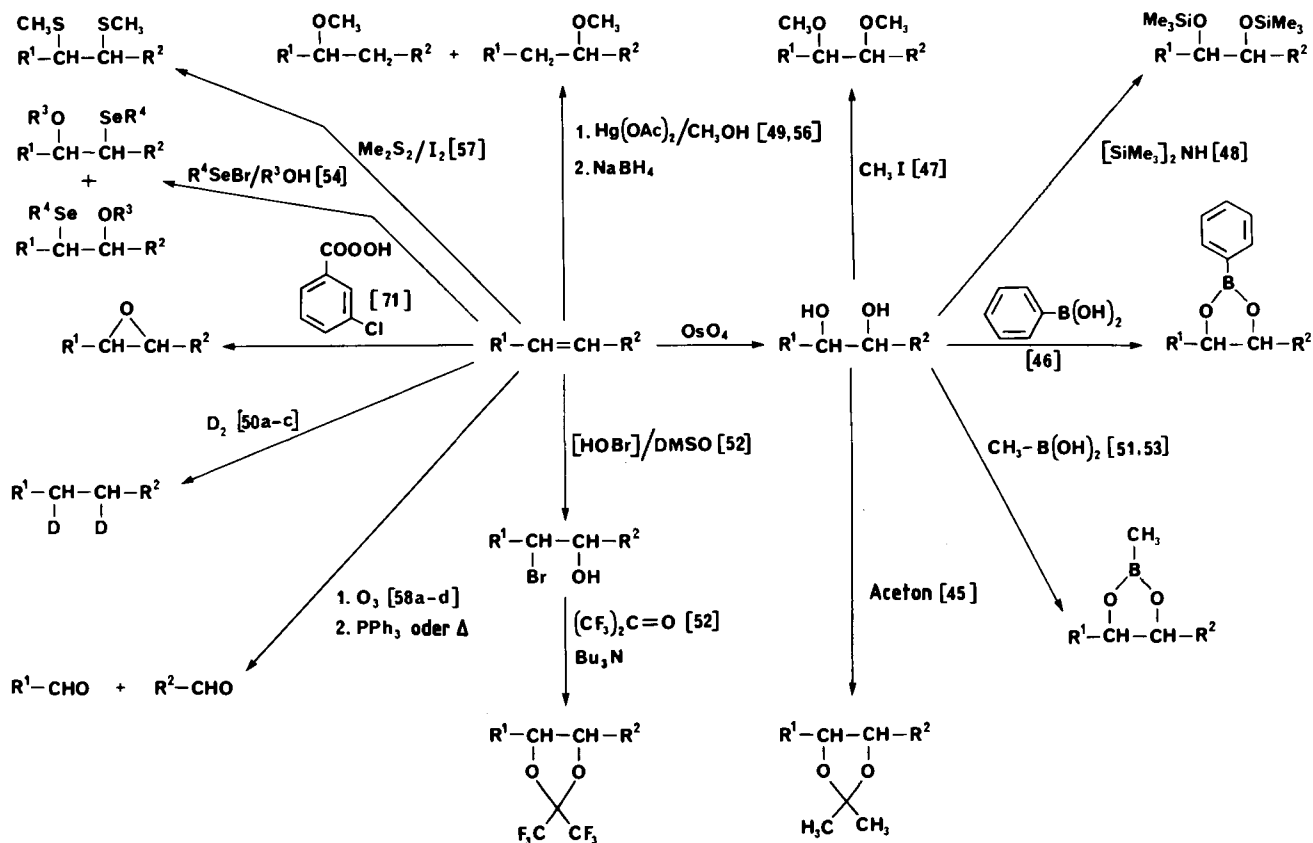
5. Nanogramm-Reaktionen mit kondensierten Verbindungen

Derivatisierungs- und Abbaureaktionen vor, während oder nach der gaschromatographischen Trennung können wertvolle Informationen zum Kohlenstoffskelett und zu funktionellen Gruppen der analysierten Verbindung liefern. Die Kombination von chemischer Reaktion und Gaschromatographie unter Verwendung eines Vor- oder Nachsäulenreaktors wird Reaktionsgaschromatographie genannt^[59,60]. Diese Technik ist vor allem dann besonders nützlich, wenn nur ng-Mengen Probenmaterial zur Verfügung stehen; jedoch gewinnt die Methodik, auch wenn die Probenmenge größer ist, wegen ihrer Einfachheit und bequemen Durchführung immer mehr an Beliebtheit. Einige Substanzen müssen derivatisiert werden, um die gaschromatographischen Eigenschaften zu verbessern. Manchmal kann das Rohgemisch der Substanzen direkt in den Gaschromatographen injiziert werden, in anderen Fällen muß das Produkt erst mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden.

5.1. Reaktionen ohne Lösungsmittelextraktion

5.1.1. Ozonisierung

Die Ozonisierung ist eine besonders einfache und nützliche Methode zur Lokalisierung von CC-Doppelbindungen und bereits lange Zeit bekannt^[58a,b]. Ihre Entwicklung zu einer mikrochemischen Technik verdankt man jedoch in erster Linie den Arbeiten von *Beroza et al.*^[58c,d]. Ein relativ



Schema 2.

billiger Mikro-Ozongenerator, ähnlich dem von *Beroza* und *Bierl* beschrieben^[61] (Abb. 9), kann aus handelsüblichen Teilen gebaut werden. Die Probe wird in 5 µL eines geeigneten Lösungsmittels aufgenommen und ist nach dem Durchleiten des Ozons fertig zur Gaschromatographie mit Splitlos-Injektion. Die herkömmliche Zugabe von Triphenylphosphan zur Reduktion der Ozonide ist nicht notwendig^[30,32,62], da diese thermisch bereits im GC-Einspritzblock in Carbonylverbindungen zerfallen. Darüber hinaus würde überschüssiges Ph₃P nur langsam aus der Säule eluiert werden und damit die Folgeanalysen beeinträchtigen.

Der Hauptnachteil der Ozonspaltung in einem Lösungsmittel besteht darin, daß die GC-Signale kleiner Molekülfragmente bei der Analyse durch den Lösungsmittelpeak überdeckt werden können. *Beroza* und *Bierl*^[58c,d] empfehlen daher CS₂ als das geeignetste Lösungsmittel für größere Moleküle als Pentanal. Pentylacetat und in jüngerer Zeit Hexadecan^[58e] wurden für kleinere Moleküle als Pentanal vorgeschlagen. Die Schwierigkeit der Interferenz des Lösungsmittelpeaks bei der Detektion kleiner Moleküle wird jedoch am besten durch „trockene“ Ozonisierung – ohne Lösungsmittel – umgangen^[16d,30–32].

Dabei wird das Alken in einer Glaskapillare kondensiert und ozonhaltiger Sauerstoff durch eine Fused-Silica-Kapillare über das Alken geleitet (Abb. 9). Die Glaskapillare kann dann in eine größere eingeschmolzen und drei Minuten im Einspritzblock des Gaschromatographen erhitzt werden. Anschließend wird das Röhrchen zerbrochen, so daß die durch pyrolytische Spaltung der Ozonide gebildeten Carbonylverbindungen auf die Trennsäule gelangen. Abbildung 10 zeigt die Anwendung bei der Ozonisierung eines Gemisches von Heptadecan und (Z)-8-Heptadecen.

Der Heptadecenpeak ist nach der Ozonspaltung vollständig aus dem Chromatogramm verschwunden, während Si-

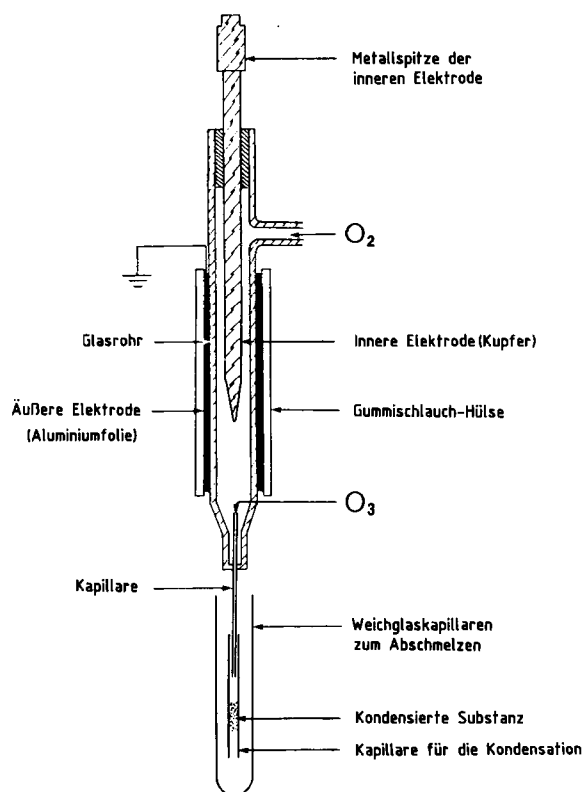


Abb. 9. Mikro-Ozongenerator. Der Ozon-Sauerstoff-Strom wird mit einer kurzen Fused-Silica-Kapillare direkt auf das kondensierte Material geblasen.

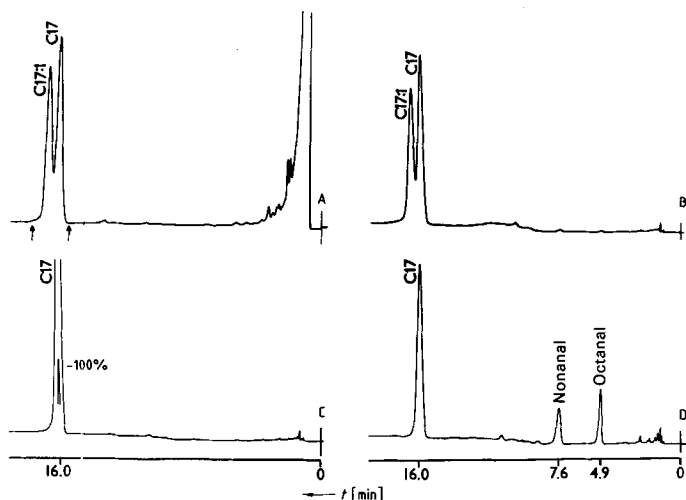
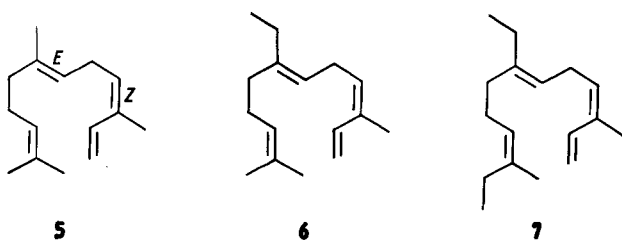


Abb. 10. Kondensation, Reaktion und Reinjektion. A) Heptadecan und 8-Heptadecan (je 350 ng) in 0.5 μ L Hexan, chromatographiert auf 10% PEGA. B) Der Teil zwischen den Pfeilen in A) wurde kondensiert und reinjiziert. C) Der kondensierte Anteil wurde reinjiziert und auf der Säule hydriert. D) Das kondensierte Material wurde mit Ozon gespalten und reinjiziert. C 17:1, (Z)-8-Heptadecan.

gnale für Octanal und Nonanal neu auftreten. Das Heptadecansignal bleibt dabei unverändert.

Diese Methode wurde bei der Strukturaufklärung von Pentadecen aus den Dufour-Drüsen der Ameise *Tetramorium caespitum*^[63] angewendet. Die Mischung von Pentadecen und Pentadecan (insgesamt 30 ng) aus drei Drüsen wurde nach der GC-Trennung kondensiert und ozonisiert. Aus der Bildung von Hexanal, Heptanal, Octanal und Nonanal geht hervor, daß der Pentadecenpeak von einem 6-Pentadecen/7-Pentadecen-Gemisch herrührt.

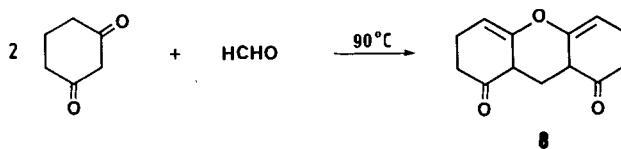
Diese „trockene“ Ozonisierung ist vor allem für die Bestimmung des Kohlenstoffskeletts zwischen dem Kettenende und der ersten Doppelbindung nützlich. Sie wurde bei der Strukturaufklärung von Farnesen **5** und seinen Homologen **6** und **7** aus den Dufour-Drüsen von *Myrmica*-Ameisen^[64] angewendet. Mikro-Ozonisierung und die Ent-



stehung von Aceton zeigten die Anwesenheit einer Isopropylidengruppe in Farnesen **5** und Homofarnesen **6** an. Die Bildung von Butanon sicherte eine 1-Methylpropylidengruppe als Struktureinheit im Bishomofarnesen **7**. Ungefähr 50 ng eines Alkens reichen im allgemeinen für Analysen dieser Art aus. Die Reaktionsprodukte werden besser in Form der Ozonide als der leichter flüchtigen Carbonylverbindungen in den Gaschromatographen eingebracht; der Materialverlust ist minimal. Die Anwendung der Ozonspaltung von Alkenen und Alkinsäureester wurde erst kürzlich beschrieben^[65].

Die Detektion von Formaldehyd, der durch Ozonspaltung einer terminalen Doppelbindung entsteht, oder

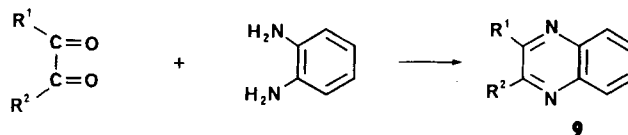
kleinen Dialdehyden, die sich aus Struktureinheiten zwischen zwei Doppelbindungen bilden, bereitet im allgemeinen Schwierigkeiten. Diese Verbindungen lassen sich durch FID nicht nachweisen. Zur Detektion von Formaldehyd werden mehrere Methoden empfohlen. So wird Formaldehyd mit 1,3-Cyclohexandion zum Pyranderivat **8**



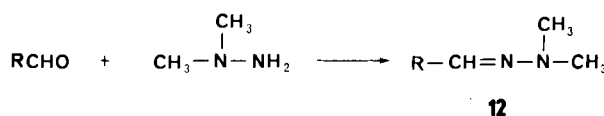
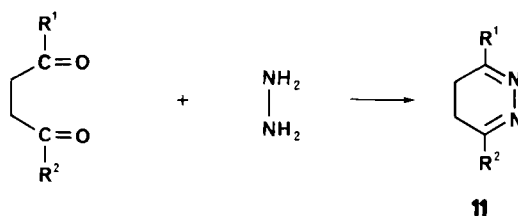
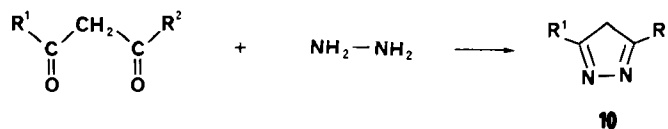
umgesetzt, das für die GC-Detektion durch FID geeignet ist^[66]. Andere Autoren raten zur Herstellung von Pentafluorphenylhydrazonen^[67a], *O*-Benzyloximen^[67b], *O*-(*p*-Nitrobenzyl)oximen^[67b] und *O*-Pentafluorbenzyloximen^[67c], die alle durch Gaschromatographie nachweisbar sind.

Wir fanden zwei nützliche Wege zur Bestimmung von ng-Mengen von Formaldehyd und anderen niedermolekularen Carbonylverbindungen. Zum einen erhält man durch Reaktion mit *O*-Benzyldihydroxylamin in einem Keele-Mikroreaktor (vgl. Abschnitt 5.2) in quantitativen Ausbeuten Benzyloxime, die sich zur Gaschromatographie eignen^[68]. Zum anderen lassen sich die Carbonylverbindungen mit NaBH_4 reduzieren und die korrespondierenden Alkohole auf einer Porapak-Säule analysieren^[69].

Polyfunktionelle Carbonylverbindungen reagieren ebenfalls zu GC-geeigneten Derivaten. 1,2-Dicarbonylverbindungen, wie sie z.B. bei der Ozonspaltung konjugierter Doppelbindungen entstehen, können mit *o*-Phenylendiamin in Chinoxaline **9** umgewandelt werden^[66]. Mit dieser Methode wurden selbst noch 50-ng-Proben bearbeitet^[30].



Hydrazinhydrat reagiert mit 1,3- und 1,4-Dicarbonylverbindungen zu Pyrazolen **10** bzw. Dihydropyridazinen **11**^[66].



Alle obengenannten Derivate sind auch für GC-MS-Analysen geeignet. Sowohl Chinoxaline als auch Pyrazole geben im allgemeinen das Molekülion als Basispeak im Spektrum, während Dihydropyridazine aufgrund ihrer Aromatisierungstendenz zu einem starken $[M-2]$ -Peak führen. Gesättigte und ungesättigte Aldehyde als Ozonolyseprodukte vieler Lepidopterenpheromone tendieren eher zur Bildung uncharakteristischer Massenspektren. Aldehyde und Ketone können jedoch in *N,N*-Dimethylhydrazone 12 umgewandelt werden, die wiederum geeignete Spektren mit intensiven Molekülionen (ca. 20–30% relative Intensität) ergeben^[70].

5.1.2. Epoxidierung

Epoxide aus Alkenen oder anderen ungesättigten Verbindungen werden durch Reaktion mit *m*-Chlorperbenzoesäure (MCPBA) erhalten (Schema 2)^[71]. Im Falle einfacher Epoxide kann durch Elektronenstoß(EI)-Massenspektrometrie, bei den komplexeren Epoxiden meist durch Massenspektrometrie mit chemischer Ionisation (CI), die Position des Oxiranrings lokalisiert^[72] und damit die Position der Doppelbindung in der ursprünglichen Verbindung festgelegt werden. Auch bei mehr als einer Doppelbindung im Molekül läßt sich die Epoxidierung erfolgreich anwenden^[1, 72d]. Die Reaktion kann auf der Monoepoxystufe gestoppt, und anhand der CI-Massenspektren der beiden Monoepoxide können die Positionen der Doppelbindungen in der Ausgangsverbindung angegeben werden.

Diese Reaktion ist besonders bei der Bestimmung der (*E*)/(*Z*)-Verhältnisse von Mischungen geometrischer Isomere wichtig. Bei vielen olefinischen Insektenpheromonen gibt nur ein bestimmtes (*E*)/(*Z*)-Verhältnis die maximale biologische Aktivität. Eine Grundlinientrennung der (*E*)- und (*Z*)-Isomere von underivatisierten Monoenen gelingt mit Kapillarsäulen, die mit polaren Phasen wie SP-2340 belegt sind^[73]. Das gleiche Resultat erreicht man jedoch auch auf unpolaren Kapillarsäulen und sogar auf gepackten Säulen, wenn die Alkene in die Epoxide umgewandelt werden.

ng-Mengen von Alkenen, die in Glaskapillaren kondensiert sind, können in einem Gesamtreaktionsvolumen von 1 μ L epoxidiert werden. So wurde z. B. eine Mischung aus Heptadecan und (*Z*)- und (*E*)-8-Heptadecen kondensiert und durch Zugabe von MCPBA in Hexan epoxidiert (vgl. Abschnitt 3.4) (Abb. 11)^[34]. Nach der Reaktion traten im Chromatogramm statt des 8-Heptadecenpeaks die entsprechenden Epoxidsignale auf, während der Heptadecanpeak unverändert blieb. Das 8-Heptadecen aus der Dufour-Drüse der Ameise *Myrmica rubra* coeluierte nach Umsetzung zum Epoxid mit dem synthetischen (*Z*)-8,9-Epoxyheptadecan (Abb. 11C).

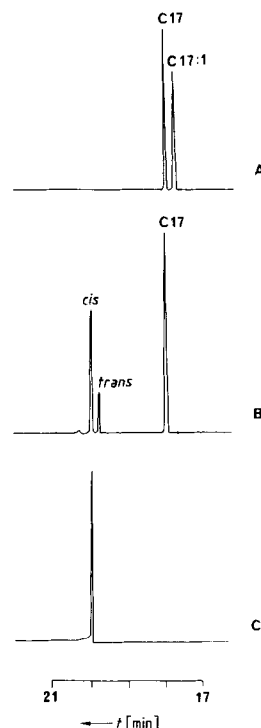
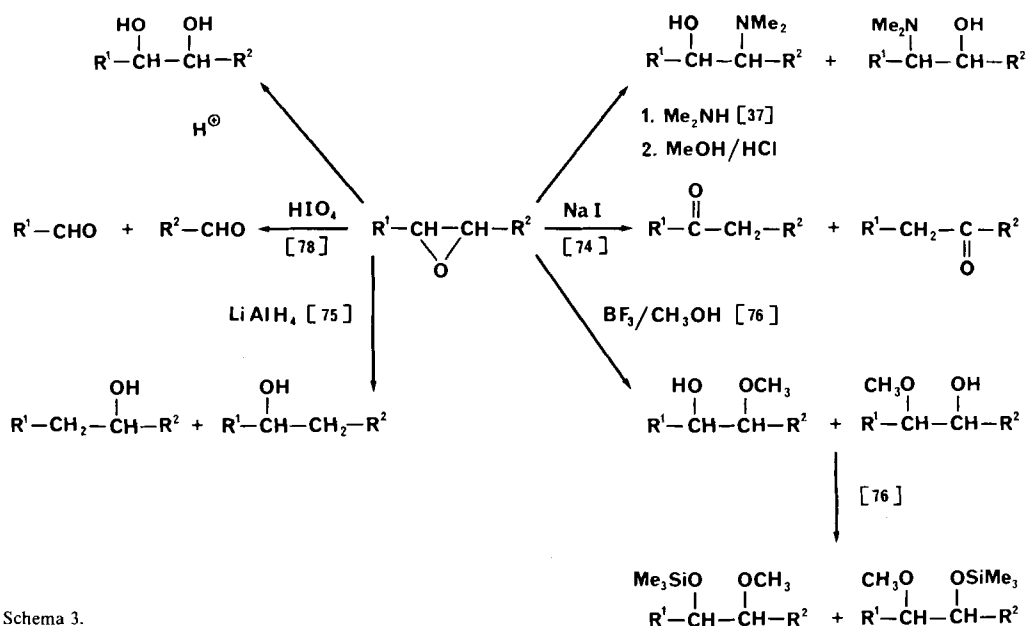


Abb. 11. Trennung von (*E*)- und (*Z*)-8-Heptadecen durch Epoxidierung. A) Chromatogramm einer Mischung von Heptadecan und Heptadecen von einer OV-1-Kapillarsäule. B) Beide Peaks von A) wurden zusammen kondensiert. Die Mischung wurde dann mit *m*-Chlorperbenzoesäure epoxidiert und reinjiziert. C) (*Z*)-8-Heptadecen aus der Dufour-Drüse einer *Myrmica-rubra*-Ameise, auf gleiche Art kondensiert, epoxidiert und reinjiziert.

Epoxide lassen sich außerdem in sekundäre Derivate mit besserer GC-MS-Charakteristik umwandeln (Schema 3). *Minnikin*^[77] hat diese Methoden kritisch zusammenge-

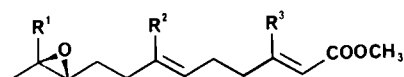


Schema 3.

faßt. *N,N*-Dimethylaminoalkohol-Derivate^[37] sind insbesondere für CI-MS-Arbeitsweisen nützlich.

5.1.3. Epoxidspaltung

Da Epoxygruppen in vielen Naturstoffen, z. B. den Juvenilhormonen **13** und einigen Insektenpheromonen, vorkommen, sind Mikrotechniken zur Lokalisierung der Epoxidfunktion sehr wichtig. Die direkte MS-Analyse zeigt



- 13** a, $R^1 = R^2 = R^3 = \text{Et}$ JHO
 b, $R^1 = R^2 = \text{Et}; R^3 = \text{Me}$ JHI
 c, $R^1 = \text{Et}; R^2 = R^3 = \text{Me}$ JH II
 d, $R^1 = R^2 = R^3 = \text{Me}$ JH III

üblicherweise die Gegenwart des Epoxids an. Zur Absicherung können die Epoxide in chemisch oder massenspektrometrisch leichter identifizierbare Einheiten umgewandelt werden (Schema 3).

Epoxide lassen sich mit Periodsäure zu den entsprechenden Carbonylverbindungen spalten^[78], die anschließend gaschromatographiert werden können. Die geometrische Konfiguration disubstituierter Epoxide kann durch Bestimmung der Reaktionszeit untersucht werden. *trans*-Epoxide werden viel langsamer gespalten als die *cis*-Isomere^[78]. Eine reaktionsgaschromatographische Epoxidspaltung erreicht man einfach durch Erhitzen des mit fester Periodsäure in einem Röhrchen eingeschmolzenen Epoxids im Injektorblock des Gaschromatographen^[32]. Es ist jedoch bequemer, diese Reaktion in einer Vorsäule durchzuführen^[79].

Abbildung 12 veranschaulicht die Spaltung des Epoxidpheromons Disparlure **14** mit einer Periodsäure-Vorsäule. Das Pheromon wurde vorher in einer Glaskapillare kon-

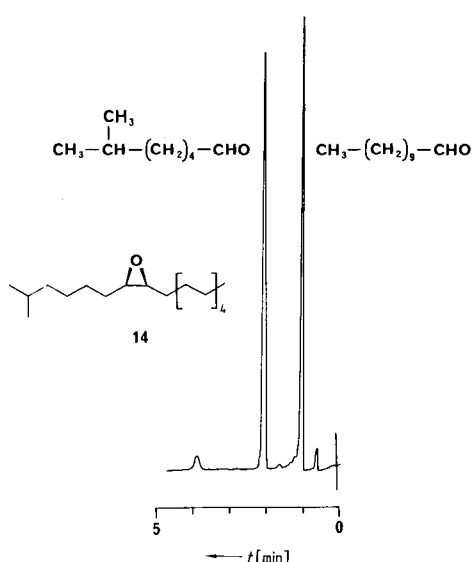


Abb. 12. Epoxidspaltung mit einer Periodsäure-Vorsäule. Das Pheromon Disparlure **14** (200 ng) wurde in einer Glaskapillare eingeschmolzen und mit dem Feststoffprobengeber bei 180°C in den Gaschromatographen eingeführt. Die Substanz passiert zuerst die Periodsäure-Vorsäule und dann eine 20% PEG-20M-Säule.

densiert, eingeschmolzen und anschließend mit einem Feststoffprobengeber injiziert. In der Vorsäule zerfällt das Pheromon in 6-Methylheptanal und Undecanal. Eine Periodsäure-Vorsäule, die einer Porapak-Q-Trennsäule vorgeschaltet ist, eignet sich vor allem zur Untersuchung niedermolekularer Epoxide. Beispielsweise geben 1,2-Epoxypropan und 2,3-Dimethyl-2,3-epoxybutan Acetaldehyd bzw. Aceton als Spaltprodukte, während 2,3-Epoxy-2-methylbutan sowohl zu Acetaldehyd als auch zu Aceton gespalten wird. Ähnlich führten Juvenilhormon I und II (**13b**, **13c**) zu Butanon; dieses Spaltprodukt zeigt an, daß der Oxiranring eine Methyl- und eine Ethylgruppe am gleichen Kohlenstoffatom enthält. Juvenilhormon III (**13d**) ergab bei der Spaltung hingegen Aceton. Demnach befinden sich zwei Methylgruppen am gleichen C-Atom des Epoxidrings^[79]. Die Spaltung von Epoxiden verläuft quantitativ, und es sind nur wenige ng für die Bestimmung notwendig.

5.1.4. Hydrierung

Die Charakterisierung eines Alkens kann durch Hydrierung zum gesättigten Analogon, dessen Massenspektrum oft leicht interpretierbar ist, vereinfacht werden. Das ist speziell zur Bestimmung des Kohlenstoffskeletts von ungesättigten Terpenoiden nützlich, und durch Kombination mehrerer Methoden kann man die Anzahl der Doppelbindungen und Ringe im Molekül bestimmen. Zur reaktionsgaschromatographischen Hydrierung von ungesättigten Verbindungen benötigt man einen Vorsäulen-^[32, 80a, b] oder Nachsäulen-Katalysator^[80c] und Wasserstoff als Trägergas. Die Reduktion findet nahezu augenblicklich statt. Verbindungen mit bis zu vier Doppelbindungen wurden bereits an Vorsäulen von nur wenigen cm Länge komplett reduziert^[64]. Verwendet man Wasserstoff als Trägergas zur GC-Massenspektrometrie, so können gleichzeitig die Massenspektren der hydrierten Verbindungen erhalten werden. Andernfalls sollte man die hydrierten Verbindungen nach der GC-Trennung kondensieren und sie mit der Feststoffprobenaufgabe-Technik erneut durch GC-MS-Analyse untersuchen. Die Methode ist sowohl für wenige ng einer ungesättigten Verbindung als auch im mikropräparativen Maßstab anwendbar. Die Reduktion von (*Z*)-8-Heptadecen (Abb. 10C) zeigt, daß die Reaktion quantitativ verlaufen kann.

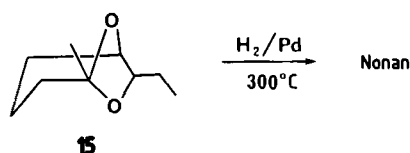
Ein System zur Hydrierung in Kapillarsäulen ist für die Doppellofen-Gaschromatographie beschrieben worden. Es wurde speziell geprüft, ob sich die Katalysatoren zur Reduktion aromatischer Kohlenwasserstoffe und Verbindungen mit polaren funktionellen Gruppen eignen^[81].

Als Alternative kann ein Alken in einem Glasrohr, das den Katalysator enthält, kondensiert werden^[30, 31]. Das Röhrchen wird dann mit Wasserstoff gefüllt, abgeschmolzen und im Einspritzblock für einige Minuten erhitzt, bevor es zerstoßen wird und die Produkte chromatographiert werden.

5.1.5. Hydrogenolyse

Das einfachste Derivat, das man zur Charakterisierung einer organischen Verbindung heranziehen kann, ist ihr

Stammkohlenwasserstoff. Die erschöpfende reaktionsgas-chromatographische Hydrogenolyse zu diesem Kohlenwasserstoff, häufig „Kohlenstoffskelett-Chromatographie“ genannt, sättigt Mehrfachbindungen ab und ersetzt funktionelle Gruppen, die Halogen, Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff enthalten, durch Wasserstoff. Das resultierende Produkt, üblicherweise der Stammkohlenwasserstoff oder das nächstniedrige Homologe oder eine Mischung der beiden, kann dann leicht identifiziert werden. Die Verbindung wird in einer Vorsäule mit Pd- oder Pt-Katalysatoren bei Temperaturen, die viel höher sind als bei üblichen Hydrierungen^[82], mit Wasserstoff umgesetzt. *Brownlee* und *Silverstein* haben diese Technik zum direkten Gebrauch für kondensiertes Material und ohne Lösungsmittelintervention modifiziert^[25]. Bei der Hydrogenolyse von *Brevicomine* **15**, einem Sexuallockstoff des Borkenkäfers *Dendroctonus brevicornis*, erhielten sie *n*-Nonan. Eine einfachere, alternative Methode wurde von *Bierl-Leonhardt* und *DeVilbiss*^[83a]



beschrieben. Sie erhitzen in einem Rohr eingeschmolzene reine oder kondensierte Substanzen mit Pt und LiAlH_4 . Die Produkte wurden dann je nach den erwarteten Molekülmassen in Hexan oder Hexadecan aufgenommen und durch GC oder GC-MS analysiert^[83]. LiAlH_4 dient dabei anscheinend als Wasserstoffquelle, da die gleiche Reaktion mit Pt allein nur zu ungesättigten Produkten führt.

Zur Strukturbestimmung cyclischer Schwefelverbindungen wurde die Hydrodesulfurierung im Mikroreaktor – zwischen Gaschromatograph und Massenspektrometer geschaltet – entwickelt^[84]. Verwendet man sowohl Wasserstoff- als auch Deuteriumgas, kann man Strukturinformationen und die Ringgröße ableiten.

5.1.6. Reduktion mit NaBH_4

Die Reduktion von Aldehyden und Ketonen mit NaBH_4 und die anschließende GC- oder GC-MS-Analyse der entsprechenden Alkohole erleichtert deren Identifizierung^[85]. Die Strukturzuordnung von Aldehyden ist wegen ihrer Tendenz zur Oxidation und wegen ihrer nur wenig charakteristischen Massenspektren schwierig. Reduktionsprodukte, die größer als Hexanol sind, haben sich durch Reaktion mit einer ethanolischen oder wässrigen NaBH_4 -Lösung im Zylinder einer Injektionspritze identifizieren lassen^[86]. Überraschenderweise kann die Reaktion auch mit festem NaBH_4 in einem abgeschmolzenen Glasrohr ohne Hydrolyse oder zusätzliche Feuchtigkeit durchgeführt werden, zumindest bei einer Anzahl von Carbonylverbindungen^[14,32,87]. Eine Anwendung dieser Prozedur wird in Abbildung 13 gezeigt. Die Mandibeldrüse einer *Myrmica*-Ameise enthält eine Mischung von 3-Alkanolen und 3-Alkanonen (Abb. 2 und 13A). 3-Octanon und der Nebenbestandteil 3-Heptanol, der als Schulter im Octanonpeak eluiert, wurden in einem Glasrohr kondensiert und mit gepulvertem, festem NaBH_4 rechromatographiert. 3-Octanon wurde dabei quantitativ zu 3-Octanol reduziert; das unveränderte 3-Heptanol trat deutlich hervor (Abb. 13C). Wahrscheinlich findet die Reduktion zwischen den Carbonyldämpfen und dem festen NaBH_4 im GC-Einspritzblock statt.

Als Alternative kann die NaBH_4 -Reduktion auch in einem Lösungsmittel, das für On-Column-Injektionen geeignet ist (keinesfalls Wasser oder Ethanol), durchgeführt werden. Das sind z. B. Dimethoxyethan oder Tetrahydrofuran (THF), obwohl sich NaBH_4 in THF nur schlecht löst. Bei einem Anwendungsbeispiel wurde eine gesättigte NaBH_4 -Lösung in THF zu 3-Octanon injiziert, das in einer Glaskapillare kondensiert war. Die Reduktion verlief in 10 Minuten mit über 90% Ausbeute^[60] (siehe Abschnitt 3.4).

Eine andere Methode bedient sich der „Rückreaktion“ dieser Carbonylreduktion. In einer mit aktivem Cu-Staub gefüllten Vorsäule können primäre und sekundäre Alkohole bei 300 bis 325°C zu den Aldehyden und Ketonen

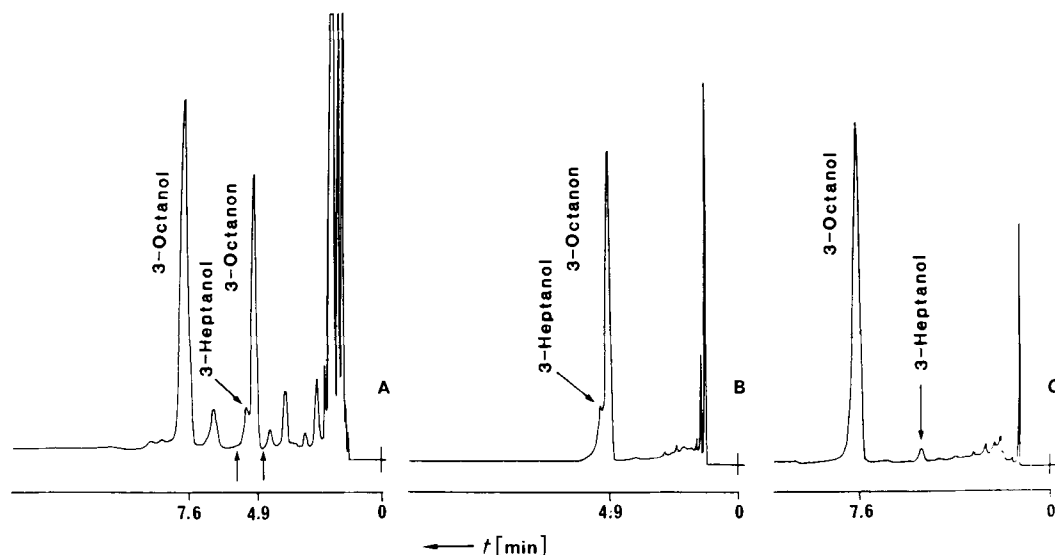


Abb. 13. Reduktion von Carbonylverbindungen. A) Der gesamte Inhalt der Mandibeldrüse einer *Myrmica-ruginodis*-Arbeiterin, chromatographiert auf 10% PEGA bei 125°C. B) Das Effluent zwischen den Pfeilen in A) wurde kondensiert und reinjiziert. C) Das Effluent wurde kondensiert, mit NaBH_4 versetzt und injiziert.

dehydriert werden, die sich durch Massenspektrometrie untersuchen lassen^[88]. Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen primären, sekundären und tertiären Alkoholen sowie Dialkylethern.

5.1.7. Bromierung

Die Unterscheidung zwischen Peaks gesättigter und ungesättigter Substanzen in einem GC-Profil ist für Mikrochemiker wichtig. Eine Bromierung verschiebt alle Peaks der ungesättigten Verbindungen und läßt die der gesättigten unverändert. Die Reaktion ist sofort vollendet; die bromierten Produkte eluieren sehr viel langsamer als die ursprünglichen Alkene, so daß die Bromaddukte mit mehr als zehn Kohlenstoffatomen kaum im Chromatogramm beobachtet werden. Da die Bromierung eine stereospezifisch verlaufende *trans*-Addition ist, kann man durch diese Reaktion auch die Konfiguration von niedermolekularen Alkenen festlegen^[89]. Normalerweise eluieren die Bromaddukte von *trans*-Alkenen vor denen der entsprechenden *cis*-Isomere. Die Verwendung einer stark verdünnten Lösung von Brom in Lösungsmitteln wie Hexan oder Schwefelkohlenstoff wird empfohlen. ng-Mengen von Material, das in Glaskapillaren kondensiert ist, kann nach der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Methode bromiert werden. Abbildung 14 zeigt als Beispiel die Anwendung auf eine Mi-

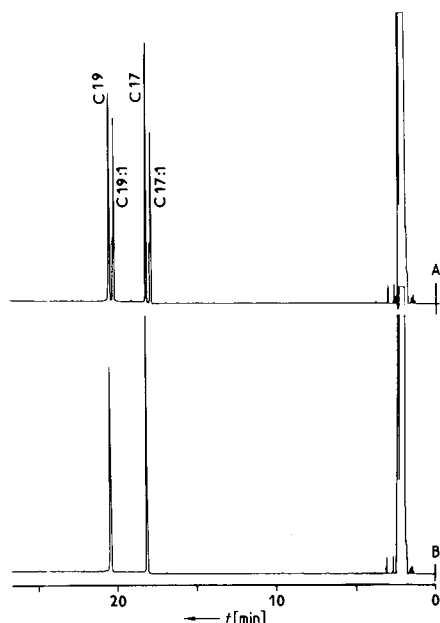


Abb. 14. Bromierung von Alkenen. A) Eine Mischung von Heptadecan, (Z)- und (E)-8-Heptadecen, Nonadecan sowie (Z)- und (E)-9-Nonadecen (je 100 ng) wurde in einer Glaskapillare kondensiert und reinjiziert. B) Die gleiche Mischung wurde vor der Injektion mit Brom behandelt. Chromatographiert auf einer OV-1-Kapillarsäule; Temperaturprogramm: 40 bis 300°C, 10°C/min.

schung von Heptadecan, 8-Heptadecen, Nonadecan und 9-Nonadecen^[34]. Die Bromierung von Drüsenbestandteilen im Mikromaßstab kann durch Zugabe von 1 µL einer Bromlösung zu einer präparierten Drüse erreicht werden, die dann mit der Feststoffprobenaufgabe-Technik chromatographiert wird.

5.1.8. Veresterung mit Diazomethan

Kurzkettige aliphatische Monocarbonsäuren sind flüchtig genug, um direkt durch GC aufgetrennt zu werden. Jedoch führt die Adsorption von Carbonsäuren auf dem Trägermaterial oft zu „Peaktailing“. Häufig werden deshalb polare und relativ wenig flüchtige Carbonsäuren in die weniger polaren Methylester mit besserer GC-Charakteristik umgewandelt. Die Vielfalt der Techniken zur Veresterung von Fettsäuren ist zusammenfassend beschrieben worden^[90]. Carbonsäuren können aus dem GC-Effluent in Glaskapillaren kondensiert und bequem mit Diazomethan (CH_2N_2) in THF verestert werden^[34]. Die Reaktionsmischung kann dann wie in Abschnitt 3.4 beschrieben rechromatographiert werden. Huwyler et al. verwendeten eine vergleichbare Methode zur Veresterung niedermolekularer Fettsäuren und identifizierten damit die Fettsäurekomponenten des Spurpheromons der Ameise *Lasius fuliginosus*^[91]. Octansäure kann auch dadurch verestert werden, daß sie kurz vor Injektion einer etherischen CH_2N_2 -Lösung in den Gaschromatographen injiziert wird^[92]. Andere reaktionsgaschromatographische Methoden für die Veresterung von Fettsäuren hat Harris^[93] zusammenfassend referiert.

5.1.9. Acetylierung von Alkoholen

Die Acetylierung ist eine nützliche Reaktion zur Absicherung der Identität von Alkoholen und ermöglicht außerdem die Unterscheidung von primären und sekundären Alkoholen. Ist eine Substanz biologisch aktiv, so kann außerdem der Verlust der Aktivität nach Acetylierung und deren Wiedergewinn nach Verseifung das Vorliegen eines Alkohols anzeigen.

Primäre und sekundäre Alkohole lassen sich im Mikromaßstab ähnlich der Methode von Huwyler^[94] acetylieren. Dazu werden in Glaskapillaren kondensierte primäre Alkohole mit einer THF-Lösung von Acetanhydrid und Pyridin versetzt; diese Mischung wird dann durch On-Column-Injektion gaschromatographisch untersucht. Obwohl die Reaktion bei sekundären Alkoholen langsam verläuft, ist sie quantitativ. Die gleiche Prozedur kann auch zur Acetylierung von Phenolen herangezogen werden; aus der Verschiebung der Retentionszeiten läßt sich dabei die Anzahl der phenolischen OH-Gruppen abschätzen. Diese Methode ist für Proben von wenigen Nanogramm anwendbar.

5.1.10. Dehydratisierung

Die Dehydratisierung von Alkoholen zu Alkenen durch Reaktionsgaschromatographie ist schon längere Zeit bekannt. Unter vorzugsweise milden Bedingungen können Alkohole so dehydratisiert werden, daß die neue Doppelbindung an der Verknüpfungsstelle der ursprünglichen Hydroxygruppe entsteht. Zur Dehydratisierung wurden z.B. Aluminiumoxid^[87], KHSO_4 ^[87], H_3PO_4 ^[95] und Hexamethylphosphorsäuretriamid^[87] verwendet.

Drawert et al.^[59,95] benutzten einen Vorsäulenreaktor, der Phosphorsäure enthält. Stanley^[87] führte die Dehydratisierung von kondensierten Alkoholen in abgeschmolze-

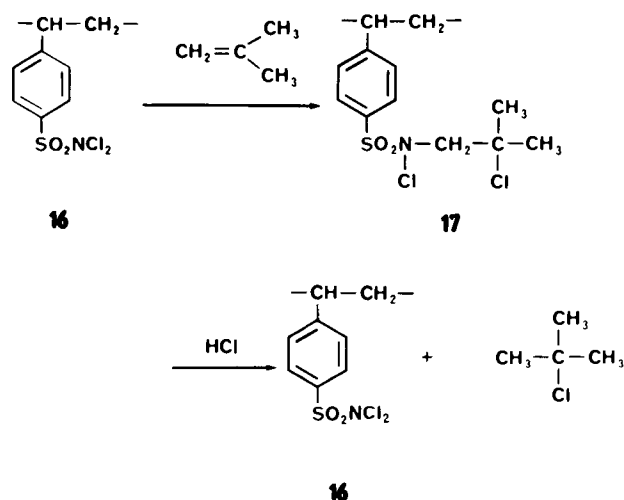
nen Glaskapillaren durch. Kürzlich erst verwendeten *Kobold et al.* und *Bestmann et al.*^[96] wenige mg von Al_2O_3 im Insertliner des Injektorblocks zur Dehydratisierung von Terpenalkoholen. *Stanley*^[87] fand, daß basisches Aluminiumoxid weniger Umlagerungsprodukte ergibt als saures; z. B. war 1-Hepten das Hauptprodukt der Dehydratisierung von 1-Heptanol, während saures Aluminiumoxid alle isomeren Heptene ergab.

5.1.11. Subtraktionstechniken

Informationen über funktionelle Gruppen einer Verbindung erhält man mit der Subtraktionstechnik. Ein geeignetes Reagens wird auf festes Trägermaterial aufgetragen und vor oder nach der GC-Trennsäule plaziert. Das Reagens bildet nichtflüchtige Verbindungen und „subtrahiert“ damit die umgesetzten Verbindungen aus dem Chromatogramm^[82d].

Subtraktionstechniken für gepackte Säulen sind seit mehreren Jahren bekannt, und es sind viele Übersichten zu der Thematik erschienen^[97]; hier sollen nur Fortschritte aus neuerer Zeit erwähnt werden. Benzidin, das zur Subtraktion von Carbonylverbindungen verwendet wurde, ist ein potentes Carcinogen. Es kann durch das nichtmutagene 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin ersetzt werden.

Alieshoev et al.^[98] führten das Reagens **16** für die Subtraktion ungesättigter aliphatischer Kohlenwasserstoffe ein. Dieses Styrol-Divinylbenzol-Copolymer mit *N,N*-Di-



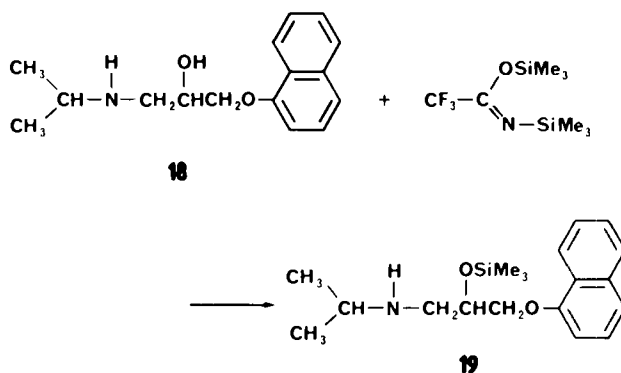
chlorsulfonamidgruppen entfernt Alkene und Alkine quantitativ, während Alkane und Arene nicht angegriffen werden. Außerdem kann das umgesetzte Polymer **17** durch Einleiten eines HCl-Stroms wieder in die aktive Form **16** umgewandelt werden. *Kalo*^[99] hat die Subtraktionsmethode in der Kapillarsäulentechnik angewendet, wobei die Wand einer Glaskapillarsäule mit dem subtrahierenden Agens belegt war.

5.1.12. Andere Methoden

Es gibt noch viele andere Reaktionen, die das Arsenal der Nanogramm-Chemie vergrößern könnten. Alkohole wurden in abgeschmolzenen Glaskapillaren durch $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Kristalle zu Carbonylverbindungen oxidiert^[87].

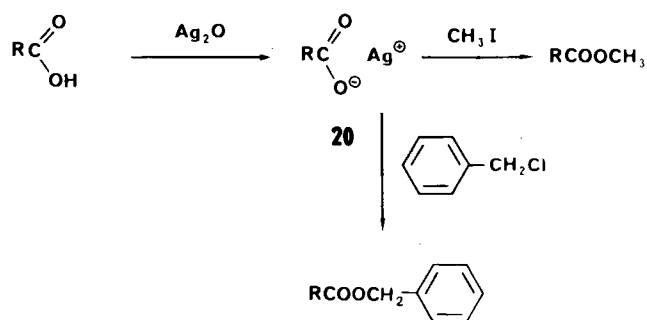
Auch eine Periodsäure-Vorsäule kann Alkohole in Carbonylverbindungen umwandeln, wenn auch mit schlechten Ausbeuten^[32]. Eine Anzahl von Mikroreaktionen kann man direkt in der GC-Injektionsspritze durchführen^[85, 86], indem man die Reaktanten vor der Chromatographie einige Minuten im Zylinder zurückhält.

Oft zeigen Substanzen, die aktiven Wasserstoff enthalten (z. B. **18**), ein besseres gaschromatographisches Verhalten, wenn sie silyliert werden (**19**). Außerdem liefern die Mas-



senspektren von Silylethern mehr Strukturinformationen als die der entsprechenden Stammverbindungen; z. B. läßt sich die Hydroxygruppe eines sekundären Alkohols oft anhand des Spektrums lokalisieren^[58e]. Viele der üblichen Silylierungstechniken^[100] können im Mikromaßstab durchgeführt werden.

Unveresterte, kurzkettige Fettsäuren wurden in Röhrchen, die Ag_2O enthielten, kondensiert und damit in die Silbersalze **20** überführt. Nach Zugabe von Methyljodid oder Benzylchlorid^[101] kann das Material mit der Feststoffprobenaufgabe-Technik in Form der Ester rechromatographiert werden.



Einige andere mikrochemische Derivatisierungsmethoden^[102] lassen sich ebenfalls im ng-Maßstab ausführen. Aus den Beispielen ist ersichtlich, daß eine große Zahl chemischer Reaktionen, die lange im Makromaßstab erprobt sind, mit etwas Erfindungsgabe an sehr kleine Quantitäten angepaßt werden können.

5.2. Reaktionen mit Lösungsmittel-extraktion

Viele bekannte Reaktionen aus der Organischen Chemie erfordern im Makromaßstab einen erheblichen Arbeitsaufwand zur Produktisolierung. Eine Verbindung muß manchmal aus einem Salz freigesetzt, ein Überschuß an Reagens vielleicht zerstört oder das Produkt aus einer

wäßrigen Mischung von verbrauchten Reagentien abgetrennt werden. Nicht immer wird es möglich sein, solche Reaktionen im Mikromaßstab durchzuführen und das Reaktionsgemisch direkt in einen Gaschromatographen zu injizieren. Reagentien und/oder Produkte mögen korrosiv sein oder die stationäre Phase zerstören oder die Analyse selbst beeinträchtigen. In einer Übersicht beschreiben *Poole und Schuette*^[103] die Möglichkeiten der Probenaufbereitung zur Kapillargaschromatographie einschließlich der Extraktions- und Konzentrierungsschritte, und fassen die damit verbundenen Probleme zusammen.

Während für die Chromatographie wenige μL Solvens ausreichen, erfordern Scheidetrichter-Trennungen Lösungsmittelvolumina im mL-Bereich. Entweder liegt dann die winzige, wertvolle Probe in hoher Verdünnung vor, oder das Solvens muß entfernt werden, was wiederum zur Anreicherung von Verunreinigungen im Rückstand führt und möglicherweise den Verlust flüchtiger Verbindungen zur Folge hat.

Eine Methode von *Cais und Shimoni*^[104] ergibt mehr als 80% Rückgewinnungsausbeuten aus Extraktionen, erfordert aber zumindest 2 mL Extraktionsmittel. Viel kleinere Lösungsmittelvolumina wurden von *Grob et al.*^[105] zur Extraktion organischer Substanzen aus Wasserproben verwendet. *Murray*^[106] hat diese Methode zur Erhöhung der Ausbeuten noch verbessert. Eine einfache und doch sehr effektive Extraktionstechnik unter Verwendung einer Glas-Injektionspritze beschrieben *van Rensburg und Hassel*^[107]. Dabei wird die Probe im Spritzenzylinder extrahiert, die Spritze dann umgedreht und das Lösungsmittel durch leichten Kolbenvorschub an der Nadelspitze abgetrennt.

Keine der oben vorgestellten Methoden und Vorrichtungen ist für eine Derivatisierung vor der Extraktion anwendbar, speziell wenn die Reaktion Erhitzen erfordert. Wir haben daher eine Technik entwickelt, die die Derivatisierung und Extraktion im gleichen Behältnis und mit einem Minimum an Manipulationen und Transferschritten ermöglicht. Die Vorrichtung, Keele-Mikroreaktor genannt^[108] (Abb. 15 und 16), ist heute im Handel erhältlich.

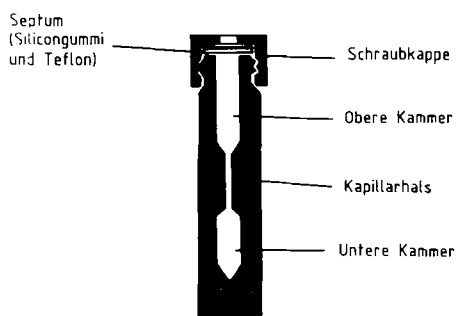


Abb. 15. Schnitt durch den Keele-Mikroreaktor. Der Mikroreaktor ist zu beziehen von Wheaton Scientific, Millville, NJ 08332 (USA), und deren weltweiten Vertretungen.

Der Keele-Mikroreaktor besteht aus drei Segmenten: Einer unteren Kammer, einem engen Kapillarhals und einer oberen Kammer. Bei Verwendung des Mikroreaktors für Reaktionen oder Extraktionen wird die benötigte flüssige Phase in den engen Kapillarhals getrieben und von dort fast ohne Substanzverlust für die Analyse entnommen. Ei-

ner der Hauptvorteile dieser Prozedur liegt darin, daß Lösungsmittel verwendet werden können, die leichter oder schwerer als Wasser sind. Der Mikroreaktor kann mit Teflonseptum und Schraubkappe verschlossen und bis zu 200°C im Ofen erhitzt werden, ohne daß ein nennenswerter Verlust an Probenmaterial auftritt.

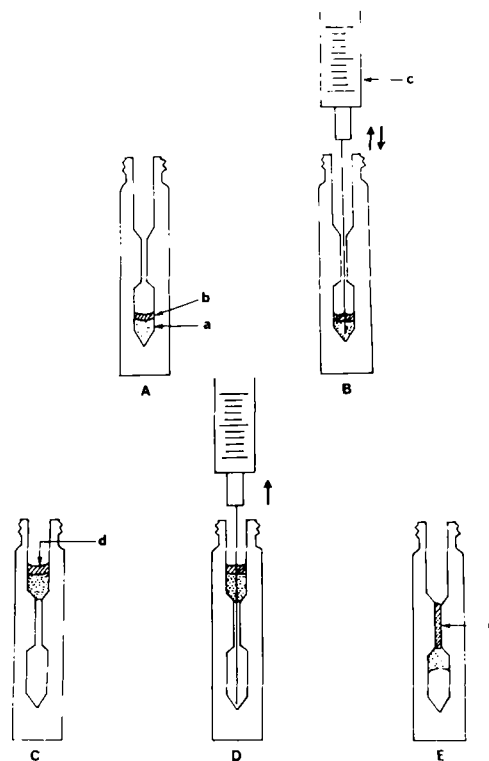


Abb. 16. Verwendung des Keele-Mikroreaktors. A) Nach der Reaktion wird zum Reaktionsgemisch a in der unteren Kammer ein Extraktionsmittel b gegeben. B) Die beiden Phasen werden durch Pumpen mit einer $100\text{ }\mu\text{L}$ -Spritze c gemischt. C) Die Mischung wird zur Abtrennung der Extraktlösung d in die obere Kammer gebracht. D) Die verbrauchten Reagentien werden durch Abziehen der Luft mit einer Spritze in die untere Kammer gebracht. E) Die Extraktlösung d verbleibt im Kapillarhals des Reaktors, von wo sie effektiv mit einer Mikroliterspritze entnommen werden kann.

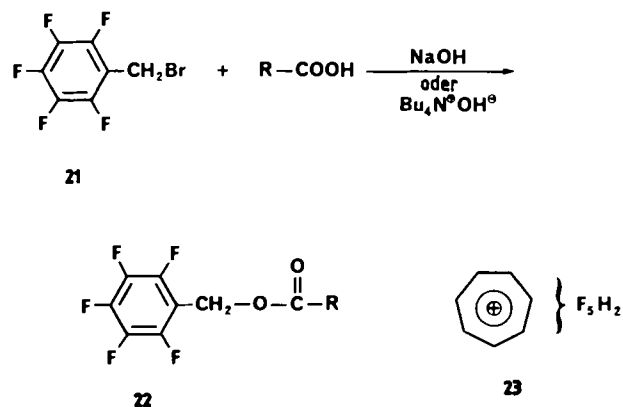
Bei einem typischen Extraktionsvorgang wird die wäßrige Lösung (etwa $50\text{ }\mu\text{L}$) mit einem Lösungsmittel wie z. B. Hexan ($10\text{ }\mu\text{L}$) durch mehrmaliges Aufziehen und Pumpen mit einer Glasspritze (Abb. 16B) gemischt. Dieser Arbeitsschritt garantiert die Verteilung des flüssigen Materials in kleine Tropfen und ruft somit eine innige Mischung der beiden Phasen hervor. Die flüssige Mischung läßt man nun in der oberen Kammer absetzen. Die Oberflächenspannung der Flüssigkeit im engen Kapillarhals und die Luft in der unteren Kammer verhindern das Herabrinnen der Lösung in die untere Kammer. Mit einer feinen Injektionsnadel (0.17 mm äußerer Durchmesser) wird nun aus der unteren Kammer solange Luft entnommen, bis die gewünschte organische Phase in die Halsregion des Reaktors eintritt (Abb. 16D). Von dort kann nun die organische Phase effektiv für GC- und HPLC-Analysen entnommen werden. Typische Rückgewinnungsausbeuten lagen für einen Extraktionsschritt zwischen 40 und 65% und bei nahezu 90% für drei aufeinanderfolgende Extraktionsschritte^[108].

Einige Derivatisierungsreaktionen, die einen Extraktionsschritt erfordern, belegen die Nützlichkeit des Reak-

tors. Auch andere Probleme auf dem GC-Gebiet dürften sich mit diesem Gerät lösen lassen.

5.2.1. Pentafluorbenzylisierung von Carbonsäuren

Pentafluorbenzylbromid ist ein gebräuchliches Reagens zur Derivatisierung von Phenolen, Thiolen, Sulfonamiden und Carbonsäuren^[109] für eine anschließende GC-Analyse. In einer typischen Anwendung werden Carbonsäure und Pentafluorbenzylbromid **21** in der unteren Kammer des



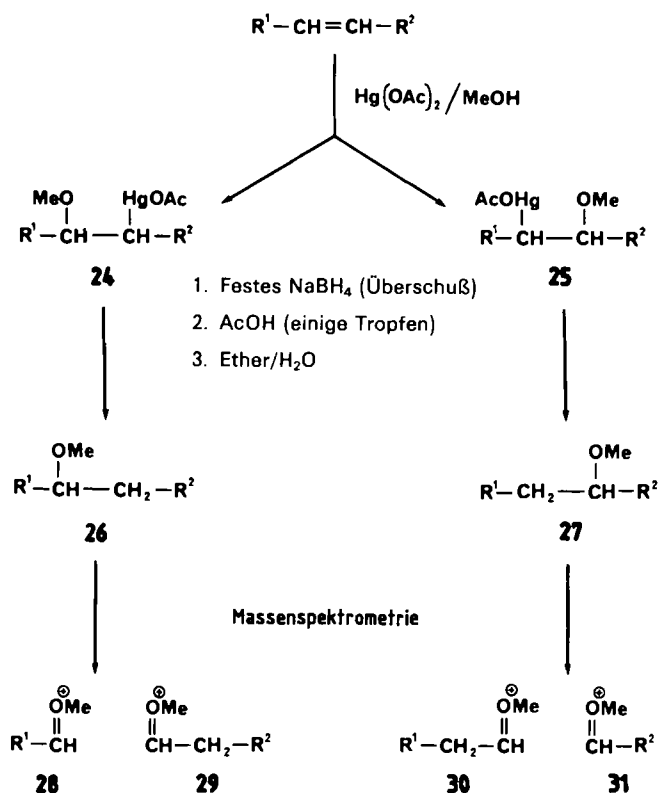
Mikroreaktors vorgelegt. Anschließend wird eine starke Base, z. B. Tetrabutylammoniumhydroxid in Wasser, zum Abfangen von Bromwasserstoff zugegeben. Die Reaktanten werden einige Male mit einer Spritze aufgezogen, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Dann wird die Reaktionsmischung wieder in die untere Kammer gegeben, das Gefäß verschlossen und geschüttelt. Nach der Reaktion gibt man 20 µL Wasser und 10 µL Hexan zu und trennt die organische Phase für die GC-Analyse ab^[108]. Die Reaktion verläuft schnell und quantitativ. Die Derivate **22** lassen sich durch das Auftreten des Pentafluortropylium-Ions **23** im MS-Spektrum leicht durch GC-MS-Analyse identifizieren. Für den FID-Detektor sind nur wenige ng erforderlich, und bei Verwendung eines Elektroneneinfang-Detektors (ECD) erreicht man Empfindlichkeiten im pg-Bereich.

5.2.2. Methoxymercurierung-Desmercurierung von Alkenen

Die Addition von CH₃OH an Alkene durch Methoxymercurierung-Desmercurierung hat als Methode zur Lokalisierung von Doppelbindungen in Alkenylketten Beliebtheit erlangt. Abley et al.^[49] beschrieben als erste die GC-MS-Analyse dieser Methoxyderivate (Schema 4). Im Falle einfach ungesättigter Verbindungen entstehen zunächst zwei Addukte **24** und **25**. Die daraus gebildeten Methoxyderivate **26** bzw. **27** werden üblicherweise bei der Gaschromatographie gemeinsam eluiert. Im Massenspektrometer fragmentieren **26** und **27** bevorzugt auf beiden Seiten der Methoxygruppen; daher entstehen die vier intensiven und charakteristischen Fragmentationen **28–31**. Aus den Massen dieser vier Ionen kann die Position der ursprünglichen Doppelbindung abgeleitet werden.

Diese Technik wird häufig angewendet^[56, 110]. Die Methoxyderivate **26** und **27** müssen zwischen Wasser und Ether oder Hexan verteilt werden, bevor die nichtwäßrige

Schicht durch GC untersucht wird. Solche Extraktionen erfordern im allgemeinen 50 µL oder mehr des nichtwäßrigen Extraktionsmittels, damit die obere Phase bequem entnommen werden kann. Mit dem Keele-Mikroreaktor ließen sich jedoch 200 ng einer Alkenprobe einfach derivatisieren und die Methoxyderivate mit 5 µL Hexan extrahieren^[108].



Schema 4.

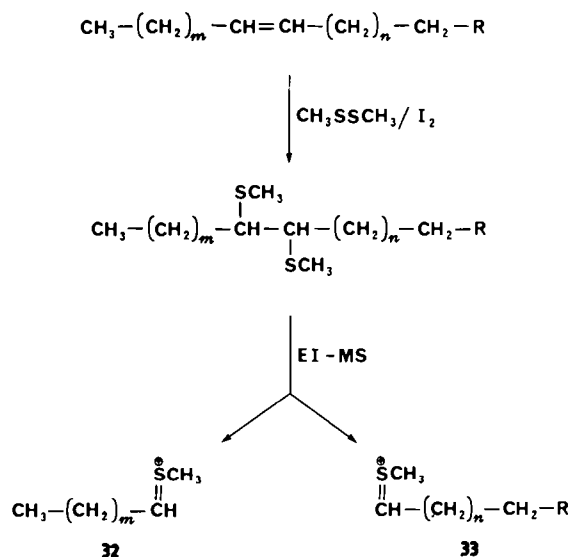
5.2.3. Einführung von Methylthiogruppen in Alkene (Methylthiolierung)

Die Addition von Dimethyldisulfid (DMDS) an einfach ungesättigte Alkene^[57], Acetate^[111a], Fettsäureester, Aldehyde und Alkohole^[111b, c] ist eine neuere Methode zur Lokalisierung von Doppelbindungen. Die Addition ist stereospezifisch und gibt sowohl mit (*Z*)- als auch mit (*E*)-Isomeren jeweils nur ein einziges Produkt. Diese Addukte zerfallen im Massenspektrometer bevorzugt an der C–C-Bindung zwischen den beiden CH₃S-Substituenten zu zwei Hauptfragmentationen **32** und **33** (Schema 5), von denen eines üblicherweise der Basispeak im Spektrum ist, und können somit zur Lokalisierung der Doppelbindung im ursprünglichen Molekül herangezogen werden.

In den Arbeitsvorschriften von Buser et al.^[111a] und Dunkelblum et al.^[111b] werden die Produkte zum Schluß mit 200 µL Hexan extrahiert. Vor der chromatographischen Untersuchung wird die Lösung eingeeengt. Durch Anwendung des Keele-Mikroreaktors kann die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode noch erheblich verbessert werden^[108].

Die „Methylthiolierung“ bietet gegenüber der häufiger verwendeten Methoxymercurierung-Desmercurierung mehrere Vorteile^[63]. Bei letzterer ist die Reaktionsmi-

schung nach der Abspaltung des Quecksilbers heterogen und schwierig zu handhaben, außerdem verläuft die Reaktion nicht quantitativ; typische Ausbeuten liegen zwischen 55 und 70%. Im Gegensatz dazu ist die Methylthiolierung eine homogene Reaktion, alle Komponenten sind mischbar, es können viel kleinere Mengen der ungesättigten Verbindung eingesetzt werden, und die Reaktion ist nahezu quantitativ. Und während die Methoxymercurierung nur ein Misch-Massenspektrum von zwei Derivaten liefert (Schema 4) und damit jede einfach ungesättigte Verbindung zu vier charakteristischen Peaks im Spektrum führt, gibt die Methylthiolierung nur ein Produkt, das im Massenspektrum in die beiden signifikanten Ionen **32** und **33** zerfällt (Schema 5). Diese Ionen sind im allgemeinen auch intensiver als die der Methoxyderivate. Außerdem enthält das Massenspektrum der Methoxyderivate kaum Molekülionen, so daß die Identifizierung weniger sicher ist. Während underivatisierte Alkenylacetate, Alkohole und Aldehyde nur selten ein Molekülion ergeben, zeigten die untersuchten DMDS-Addukte immer ein intensives Molekülion. Die Massenspektren der DMDS-Addukte von Alkenylacetaten und Fettsäuremethylestern enthalten außerdem Fragmentionen, die durch Verlust von Essigsäure bzw. Methanol aus dem Ion **33** entstehen^[11a,b]. Ähnlich zeigen die Spektren von Alkoholen und Aldehyden eine schwache Abspaltung von Wasser aus dem Ion **33**^[11c]. Diese Ionen helfen, die Funktionalität der Verbindung festzulegen, wenn ein Gemisch untersucht wird.



$\text{R} = \text{H}, \text{OH}, \text{CHO}, \text{OCOCH}_3, \text{COOCH}_3$

Schema 5.

Abschließend sei erwähnt, daß die Methoxylierung keine Unterscheidung zwischen (*Z*)- und (*E*)-Isomeren erlaubt, während die Methylthiolierung unter stereospezifischer *trans*-Addition verläuft. Die (*E*)- und (*Z*)-Isomere führen damit zu *erythro*- bzw. *threo*-Verbindungen, die fast gleiche MS-Spektren haben, aber durch Kapillar-GC trennbar sind, wobei das *threo*-Isomer üblicherweise zuerst eluiert wird. Daher kann auch die Konfiguration einer Verbindung durch Vergleich der Retentionszeit mit der eines Standard-(*E/Z*)-Gemisches bestimmt werden.

Obwohl die Methylthiolierung häufig nur mit Monoenen durchgeführt wurde, kann sie nach neueren Resultaten^[112] auch auf Diene angewendet werden. Allerdings sind die Massenspektren von Dien- nicht so einfach wie die von Monoenderivaten. Der Methylthiolierungsmethode ist zur Lokalisierung einer einzigen CC-Doppelbindung im Molekül sicherlich der Vorzug einzuräumen.

5.2.4. Veresterung von Carbonsäuren mit Bortrifluorid-Methanol

Die Veresterung mit $\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ ist eine bequeme Methode zur Herstellung von Methylestern aus Carbonsäuren^[113]. Man kann jedoch die rohe Reaktionsmischung nicht direkt in den Gaschromatographen injizieren, da BF_3 viele stationäre Phasen zerstört. Die Ester müssen daher vor der Injektion mit Lösungsmitteln extrahiert werden. Durch Verwendung des Keele-Mikroreaktors läßt sich die Nachweisgrenze der Methode wesentlich senken^[108].

McDaniel und Howard^[70] berichteten kürzlich, daß Fettsäuren auch mit 1,1-Dimethylhydrazin verestert werden können. Die Reaktion ist nahezu quantitativ, wenn man Säure und Dimethylhydrazin im verschlossenen Mikroreaktor erhitzt. Der Mechanismus dieser Reaktion ist unbekannt. Die Produkte sind zwischen Hexan und verdünnter Schwefelsäure verteilt.

6. Flüssigchromatographie-Gaschromatographie (LC-GC)

Bei der Analyse von Probengemischen wird oft eine flüssigchromatographische Trennung (LC) vor der GC-Analyse durchgeführt. Die Methode ist jedoch zeitraubend und verlustreich, wenn nur eine kleine Menge an Probe zur Verfügung steht. Sandra^[114] beschrieb eine elegante, einfache und effektive Methode zur LC-Fraktionierung vor der Gaschromatographie. Er funktionierte eine Spritze, wie sie zum direkten Einspritzen in die Säule verwendet wird, zur LC-Säule um. Dazu wurde die Spritze mit einer Polyimidpatrone gefüllt, die mg-Mengen von Kieselgel oder ähnlichen Materialien enthält.

Eine „Mikrosäule“ aus feinem Kieselgel kann man im Zylinder einer 100- μL -Spritze aufbauen^[115]; ähnliche Vorrichtungen sind heute im Handel erhältlich. Eine Anwendung dieser Technik zur Analyse einer Dufour-Drüse der Ameise *Lasius niger* wird in Abbildung 17 veranschaulicht. Die Drüse enthält über 50 Verbindungen mit mehreren Funktionalitäten (Abb. 17A)^[15a]. Auf die Mikrosäule wurde nun eine einzelne Drüse gelegt und zuerst mit Hexan über einen splitlosen Injektor direkt in den Gaschromatographen eluiert. In den Chromatogrammen der ersten beiden Hexanfraktionen traten nur die Signale der Kohlenwasserstoffe auf (Abb. 17B). Die dritte Hexanfraktion enthielt nur noch die hauptsächlichsten Kohlenwasserstoffe, die vierte Fraktion war leer. Anschließend wurde die Mikrosäule mit Hexan/Ether-Gemischen eluiert. In der zweiten Hexan/Ether-Fraktion waren nur Ester-Peaks vorhanden (Abb. 17C). Eine darauffolgende Elution der Säule mit reinem Ether ergab die Alkohole.

Die LC-GC-Technik hat ein großes Potential zur Mikroanalyse organischer Funktionalitäten. Beispielsweise ha-

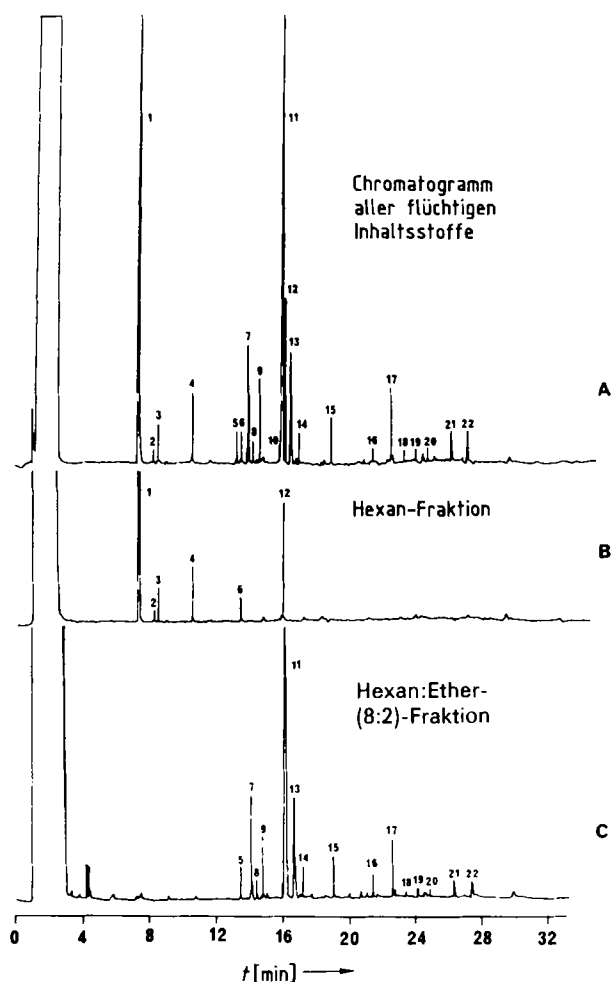


Abb. 17. LC-GC-Kombination unter Verwendung einer Mikro-LC-Säule zur Trennung von Substanzklassen. A) Extrakt der Dufour-Drüsen der Ameise *Lasius niger* in Hexan, chromatographiert auf OV-17-Kapillarsäule. Temperaturprogramm: 2 min 60°C, dann 60 bis 270°C mit 10°C/min; Splitlos-Injektion, Splitventil 30 s geschlossen. B) Chromatogramm der Hexanfraktion, die aus der Mikrosäule direkt in den Gaschromatographen eluiert wurde. Alle Peaks entsprechen Kohlenwasserstoffen. C) Chromatogramm der Hexan/Ether(8:2)-Fraktion, direkt in den Gaschromatographen eluiert. Die Peaks (außer 9) entsprechen Estern. 1, Undecan; 2, 5-Methylundecan; 3, 3-Methylundecan; 4, Tridecan; 5, Decylacetat; 6, Pentadecan; 7, 5-Methyldecylacetat; 8, 3-Methyldecylacetat; 9, Undecylacetat + Dodecanol; 10, Dodecylacetat; 11, Dodecylacetat; 12, Heptadecan; 13, verzweigtes Tridecylacetat; 14, Dodecylpropionat; 15, Farnesylacetat; 16, Heptadecylpropionat; 17, Octadecylacetat; 18, Octadecylpropionat; 19, Dodecyldecanoat; 20, Decyltridecanoat; 21, Dodecyldecanoat; 22, Dodecyltridecanoat.

ben Bestmann et al.^[115] diese Methode zur Identifizierung des Sexualpheromons des Schmetterlings *Cnephasia longana* angewendet. Ferner können verdünnte Proben vor der Elution in den Gaschromatographen konzentriert werden. In Verbindung mit der Subtraktionstechnik kann man weitere Informationen über funktionelle Gruppen erhalten. Außerdem lassen sich damit Rohgemische aus Reaktionen vorreinigen, bevor die gewünschten Produkte in den Gaschromatographen eluiert werden.

7. Resümee und Ausblick

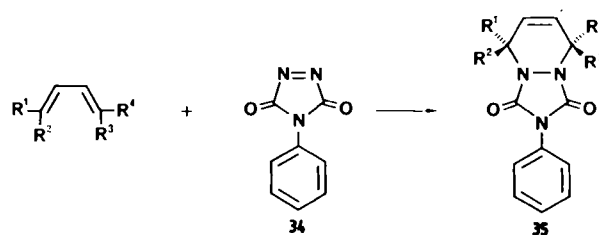
Der forschende Chemiker und Analytiker mag erstaunt sein, was mit Nanogramm-Mengen reinen oder verunreinigten organischen Materials zu bewerkstelligen ist. Sofern die Proben nicht durch große Mengen Lösungsmittel kon-

taminiert werden, lassen sie sich in vielen aufeinanderfolgenden Schritten untersuchen. Es ist nicht immer notwendig, sich auf vorhandene Massenspektren-Bibliotheken zu stützen, um die Struktur einer neuen Substanz aufzuklären, die nur in winzigen Quantitäten zur Verfügung steht. Vielmehr kann konventionelles chemisches Training in Verbindung mit Einfallsreichtum und Geschicklichkeit ausreichen, um die Substanz umzusetzen, abzubauen oder zu derivatisieren, selbst wenn sie noch von vielen anderen begleitet wird, und so etwas über ihr Kohlenstoffskelett oder ihre funktionellen Gruppen zu erfahren. Winzige Substanzmengen können aus Gemischen abgetrennt und für weitere Untersuchungen verwendet werden. Und wenn auch die Erfahrungen der Autoren dieses Beitrags zum großen Teil aus der Insektenchemie stammen, ist die Anwendungsbreite dieser Mikromethoden viel größer. Beispiele lassen sich in der Gerichtsmedizin, der Archäologie, der Umweltkontrolle, der Pharmakologie und in der Untersuchung des Drogenmetabolismus finden.

8. Addendum^[*]

Nach Fertigstellung des Manuskripts dieses Beitrags erschienen zwei Übersichten über Derivatisierungstechniken, die sich im Mikromaßstab ausführen lassen^[116]. Zur Wiedergewinnung von Material nach einer kapillargaschromatographischen Trennung wurden Fallen verwendet, die mit einem sehr dicken Film einer stationären Phase belegt waren^[117]. Eine reaktionsgaschromatographische Methode zur Bestimmung von Wasser als Acetylen^[118] könnte sich für die quantitative Analyse von Wasser in biologischen Proben eignen. Die GC-FTIR-Kopplung scheint eine vielversprechende Möglichkeit zur Konfigurationsbestimmung von Doppelbindungen in Pheromonen zu sein^[119]. Durch Verwendung von Wasserdampf als Trägergas gelang die gaschromatographische Trennung geometrischer Isomere an Silbernitrat-impregniertem Trägermaterial^[120].

Zwei umfassende Übersichten über die Lokalisierung von Doppelbindungen in Kohlenstoffketten sind in der Zwischenzeit publiziert worden^[119a, 121]. Die Massenspektren der Cycloaddukte **35**, die bei der Addition von 4-Phenyl-1,2,4-triazol-3,5-dion **34** an konjugierte Diene entstehen,



hen, weisen charakteristische Fragmentationen auf, die diagnostisch für die Zuordnung der Dienposition in der Kette sind^[122]. Ähnlich kann die Addition von Tetracyanethylen angewendet werden^[123]. Die Methode der Methylthiolierung zur Festlegung der Position von Doppelbindungen

[*] Eingegangen am 13. Januar 1988.

(vgl. Abschnitt 5.3.2) ist auf viele Diene übertragen worden^[124]. Neue Entwicklungen in der CI-Massenspektrometrie, die auf der Verwendung von Fe^[125] oder NO^[126] als Reaktanten beruhen, eröffnen ebenfalls Möglichkeiten zur Lokalisierung von Doppelbindungen, auch wenn die zugrundeliegenden Prinzipien noch unbekannt sind^[127]. Für den Einsatz der Tandem-Massenspektrometrie zum gleichen Zweck wurden weitere Beispiele veröffentlicht^[128].

Zur Bestimmung von Dialdehyden, wie sie bei der Ozonolyse von Polyenen entstehen, wurde eine bequeme Technik beschrieben^[129]. Dabei wird die Reduktion der Ozonide zu Aldehyden in Gegenwart von 1,3-Propandithiol durchgeführt, das die Aldehyde zu 1,3-Dioxanen umsetzt.

A. B. A. dankt dem British Council und der Nuffield Foundation für finanzielle Unterstützung, der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Stipendium, und Prof. Dr. H. J. Bestmann für die Gastfreundschaft in seinem Institut während der Vorbereitung dieses Manuskriptes. E. D. M. dankt der Royal Society für eine Förderung durch Sachmittel und den Herren K. T. Alston und T. Bolam für Hilfe bei der Entwicklung von Geräten bzw. für viele der Illustrationen. Herrn Dr. O. Vostrowsky danken wir für eine kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Eingegangen am 23. Juni 1987 [A 663]
Übersetzt von Dr. Otto Vostrowsky, Erlangen

- [1] J. H. Tumlinson, R. R. Heath, *J. Chem. Ecol.* 2 (1976) 87.
- [2] R. R. Heath, J. H. Tumlinson in H. E. Hummel, T. A. Miller (Hrsg.): *Techniques in Pheromone Research*. Springer, Berlin 1984, S. 288.
- [3] D. J. David: *Gas Chromatographic Detectors*. Wiley, New York 1974.
- [4] R. L. Bowman, A. Karmen, *Nature (London)* 182 (1958) 1233.
- [5] a) J. R. Bridges, F. H. Guinn, *Z. Angew. Entomol.* 89 (1980) 54; b) K. Dettner, G. Schwinger, P. Wunderle, *J. Chem. Ecol.* 11 (1985) 859; c) B. V. Burger, Z. Munro, M. Röth, H. S. C. Spies, V. Truter, H. Geertsma, A. Habich, *ibid.* 11 (1985) 1093; d) U. M. Senanayake, R. A. Edwards, T. H. Lee, *J. Chromatogr.* 116 (1976) 468; e) D. R. Roberts, *J. Gas Chromatogr.* 6 (1968) 126; f) J. Weatherston, W. MacLean, *Can. Entomol.* 106 (1974) 281.
- [6] a) C. Descoins, M. Gallois, *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 11 (1979) 521; b) B. Frerot, E. Priesner, M. Gallois, *Z. Naturforsch. C34* (1979) 1248; c) B. Frerot, M. Gallois, M. Lettère, J. Einhorn, D. Michelot, C. Descoins, *J. Chem. Ecol.* 8 (1982) 663.
- [7] H. V. Buser, H. M. Widmer, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 2 (1979) 177.
- [8] a) S. Stållberg-Stenhagen, *Chem. Scr.* 2 (1972) 97; b) G. Bergström, J. Löfqvist, *J. Insect Physiol.* 19 (1973) 877; c) G. Bergström, M. Appelgren, A.-K. Borg-Karlson, I. Groth, S. Strömberg, S. Strömberg, *Chem. Scr.* 16 (1980) 173.
- [9] E. D. Morgan, L. J. Wadhams, *J. Chromatogr. Sci.* 10 (1972) 528.
- [10] N. W. Davies, J. L. Madden, *J. Chem. Ecol.* 11 (1985) 1115.
- [11] a) A. B. Attygalle, R. P. Evershed, E. D. Morgan, M. C. Cammaerts, *Insect Biochem.* 13 (1983) 507; b) A. B. Attygalle, E. D. Morgan, *J. Chem. Ecol.* 10 (1984) 1453.
- [12] E. D. Morgan, R. C. Tyler, *J. Chromatogr.* 134 (1977) 174.
- [13] a) A. B. Attygalle, M. C. Cammaerts, E. D. Morgan, *J. Insect Physiol.* 29 (1983) 27; b) R. P. Evershed, E. D. Morgan, M. C. Cammaerts, *Naturwissenschaften* 67 (1981) 374; c) E. D. Morgan, L. J. Wadhams, *J. Insect Physiol.* 18 (1972) 1125.
- [14] E. D. Morgan, R. P. Evershed, R. C. Tyler, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 605.
- [15] a) A. B. Attygalle, O. Vostrowsky, H. J. Bestmann, E. D. Morgan, *Insect Biochem.* 17 (1987) 219; b) G. Bergström, J. Löfqvist, *J. Insect Physiol.* 16 (1970) 2353.
- [16] a) A. B. Attygalle, M. Herrig, O. Vostrowsky, H. J. Bestmann, *J. Chem. Ecol.* 13 (1987) 1299; b) A. B. Attygalle, W. Cai-Hong, J. Schwarz, O. Vostrowsky, I. Hasenfuss, H. J. Bestmann, *ibid.* 14 (1988) 481; c) A. B. Attygalle, J. Schwarz, O. Vostrowsky, H. J. Bestmann, *Z. Naturforsch. C41* (1986) 1077; d) H. J. Bestmann, A. B. Attygalle, T. Brosche, J. Erler, H. Platz, J. Schwarz, O. Vostrowsky, W. Cai-Hong, K. E. Kaissling, C. Te-Ming, *ibid.* C42 (1987) 631.
- [17] H. J. Bestmann, M. Herrig, A. B. Attygalle, *Experientia* 43 (1987) 1033.
- [18] D. R. Deans, *Chromatographia* 1 (1968) 18.
- [19] a) T. H. Maugh II, *Science* 227 (1985) 1570; b) W. Bertsch, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 1 (1978) 85; c) R. J. Miller, S. D. Stearns, R. R. Freeman, *ibid.* 2 (1979) 55.
- [20] W. Blass, K. Riegner, H. Hulpke, *J. Chromatogr.* 172 (1979) 67.
- [21] G. Schomburg, H. Husmann, F. Weeke, *J. Chromatogr.* 112 (1975) 205.
- [22] a) V. Schurig, U. Leyrer, U. Kohule, *Naturwissenschaften* 72 (1985) 211; b) V. Schurig, R. Weber, G. J. Nicholson, A. C. Oehlschlager, H. Pierce, A. M. Pierce, J. H. Borden, L. C. Ryker, *ibid.* 70 (1983) 92; c) V. Schurig, R. Weber, D. Klimetzek, U. Kohule, K. Mori, *ibid.* 69 (1982) 602; d) H. J. Bestmann, A. B. Attygalle, J. Glasbrenner, R. Riemer, O. Vostrowsky, *Angew. Chem.* 99 (1987) 784; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 784.
- [23] G. Schomburg, H. Husmann, E. Hubinger, W. A. König, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 7 (1984) 404.
- [24] R. K. Odland, E. Glock, N. L. Bodenhamer, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 187.
- [25] R. G. Brownlee, R. M. Silverstein, *Anal. Chem.* 40 (1968) 2077.
- [26] R. Baker, J. W. S. Bradshaw, D. A. Evans, M. D. Higgs, L. J. Wadhams, *J. Chromatogr. Sci.* 14 (1976) 425.
- [27] J. Roeraade, C. R. Enzell, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 2 (1979) 123.
- [28] H. J. Williams, S. B. Vinson, *J. Chem. Ecol.* 6 (1980) 973.
- [29] C. F. Poole, S. A. Schuette: *Contemporary Practice of Chromatography*. Elsevier, Amsterdam 1984, S. 403.
- [30] D. A. Cronin, J. Gilbert, *J. Chromatogr.* 87 (1973) 387.
- [31] G. Stanley, B. H. Kennet, *J. Chromatogr.* 75 (1973) 304.
- [32] A. B. Attygalle, E. D. Morgan, *Anal. Chem.* 55 (1983) 1379.
- [33] I. Klimes, W. Stünzi, D. Lamparsky, *J. Chromatogr.* 136 (1977) 23.
- [34] A. B. Attygalle, E. D. Morgan, *J. Chromatogr.* 290 (1984) 321.
- [35] Y. Tamaki in E. D. Morgan, N. B. Mandava (Hrsg.): *Handbook of Natural Pesticides: Insects, Vol. 3: Pheromones*. CRC Press, Boca Raton, FL (USA), im Druck.
- [36] a) A. J. Ferrer-Correia, K. R. Jennings, D. K. Sen Sharma, *Adv. Mass Spectrom.* 7 (1978) 287; b) R. Chai, A. G. Harrison, *Anal. Chem.* 53 (1981) 34.
- [37] M. Cervilla, G. Puzo, *Anal. Chem.* 55 (1983) 2100.
- [38] H. Budzikiewicz, E. Busker, *Tetrahedron* 36 (1980) 255.
- [39] a) R. E. Doolittle, J. H. Tumlinson, A. Proveaux, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1625; b) J. Einhorn, H. Virelizier, A. L. Gemal, J. C. Tabet, *Tetrahedron Lett.* 26 (1985) 1445.
- [40] a) M. Horiike, N. Miyata, C. Hirano, *Biomed. Mass Spectrom.* 8 (1981) 41; b) M. Horiike, C. Hirano, *Agric. Biol. Chem.* 46 (1982) 2667; c) *Biomed. Mass Spectrom.* 11 (1984) 145.
- [41] B. A. Leonhardt, E. D. DeVilbiss, J. A. Klun, *Org. Mass Spectrom.* 18 (1983) 9.
- [42] B. S. Lanne, M. Appelgren, G. Bergström, C. Löfstedt, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1621.
- [43] O. Vostrowsky, K. Michaelis, H. J. Bestmann, *Liebigs Ann. Chem.* 1982, 1001.
- [44] a) K. B. Tomer, C. W. Crow, M. L. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 5487; b) N. J. Jensen, K. B. Tomer, M. L. Gross, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2018.
- [45] J. A. McCloskey, M. J. McClelland, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 5090.
- [46] C. J. W. Brooks, J. Watson, *Chem. Commun.* 1967, 952.
- [47] W. G. Niehaus, R. Ryhage, *Tetrahedron Lett.* 1967, 5021.
- [48] P. Capella, C. M. Zorzut, *Anal. Chem.* 40 (1968) 1458.
- [49] P. Abley, F. J. McQuillan, D. E. Minnikin, K. Kusamran, K. Maskens, N. Polgar, *Chem. Commun.* 1970, 348.
- [50] a) K. K. Sun, H. W. Hayes, R. T. Holman, *Org. Mass Spectrom.* 3 (1970) 1035; b) E. Selke, C. R. Schofield, C. D. Evans, H. J. Dutton, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 38 (1981) 614; c) V. G. Zaikin, A. I. Mikaya, *J. Chromatogr.* 301 (1984) 77.
- [51] C. J. W. Brooks, I. Maclean, *J. Chromatogr. Sci.* 9 (1971) 18.
- [52] B. M. Johnson, J. W. Tylor, *Anal. Chem.* 44 (1972) 1438.
- [53] V. Dommès, F. Wirtz-Peitz, W. H. Kunau, *J. Chromatogr. Sci.* 14 (1976) 360.
- [54] G. W. Francis, T. Tande, *J. Chromatogr.* 150 (1978) 139.
- [55] G. Janssen, G. Parmentier, *Biomed. Mass Spectrom.* 5 (1978) 439.
- [56] G. J. Blomquist, R. W. Howard, C. A. McDavid, S. Remaley, L. A. Dwyer, D. R. Nelson, *J. Chem. Ecol.* 6 (1980) 257.
- [57] G. W. Francis, K. Veland, *J. Chromatogr.* 219 (1981) 379.
- [58] a) V. L. Davison, H. J. Dutton, *Anal. Chem.* 38 (1966) 1302; b) E. C. Nickell, O. S. Privett, *Lipids* 1 (1966) 166; c) M. Beroza, B. A. Bierl, *Anal. Chem.* 38 (1966) 1976; d) *ibid.* 39 (1967) 1131; e) B. A. Bierl-Leonhardt, D. S. Moreno, M. Schwarz, H. S. Forster, J. R. Plimmer, E. D. DeVilbiss, *Life Sci.* 27 (1980) 399.
- [59] F. Drawert, R. Felgenhauer, G. Kupfer, *Angew. Chem.* 72 (1960) 555.
- [60] B. Leonhardt, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1240 A.
- [61] M. Beroza, B. A. Bierl, *Mikrochim. Acta* 1969, 720.
- [62] E. R. White, B. M. Sutton, J. E. Blank, E. Moeckel, J. E. Zarembo, *Anal. Chem.* 44 (1972) 1582.
- [63] J. P. J. Billen, R. P. Evershed, A. B. Attygalle, E. D. Morgan, D. G. Ollett, *J. Chem. Ecol.* 12 (1986) 669.

- [64] A. B. Attygalle, E. D. Morgan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1982, 949.
- [65] L. S. Silbert, T. A. Foglia, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1404.
- [66] B. P. Moore, W. V. Brown, *J. Chromatogr.* 60 (1971) 157.
- [67] a) K. Kobayashi, M. Tanaka, S. Kawai, T. Ohno, *J. Chromatogr.* 176 (1979) 118; b) D. F. Margin, *ibid.* 202 (1980) 255; c) K. Kobayashi, M. Tanaka, S. Kawai, *ibid.* 187 (1980) 413.
- [68] D. G. Ollett, A. B. Attygalle, E. D. Morgan, *J. Chromatogr.* 367 (1986) 207.
- [69] D. G. Ollett, E. D. Morgan, *Microchem. J.* 35 (1987) 296.
- [70] C. A. McDaniel, R. W. Howard, *J. Chem. Ecol.* 11 (1985) 303.
- [71] N. N. Schwartz, J. H. Blumbers, *J. Org. Chem.* 29 (1964) 1976.
- [72] a) R. T. Aplin, L. Coles, *Chem. Commun.* 1967, 858; b) F. D. Gunstone, F. R. Jacobsberg, *Chem. Phys. Lipids* 9 (1972) 26; c) B. A. Bierl-Leonhardt, E. D. DeVilbiss, J. R. Plimmer, *J. Chromatogr. Sci.* 18 (1980) 364; d) L. R. Hogge, E. W. Underhill, J. W. Wong, *ibid.* 23 (1985) 171; e) J. H. Tumlinson, R. R. Heath, R. E. Doolittle, *Anal. Chem.* 46 (1974) 1309.
- [73] a) R. R. Heath, G. E. Burnsed, J. H. Tumlinson, R. E. Doolittle, *J. Chromatogr.* 189 (1980) 199; b) L. R. Hogge, D. J. H. Olson, *J. Chromatogr. Sci.* 21 (1983) 524.
- [74] G. W. Kenner, E. Stenhagen, *Acta Chem. Scand.* 18 (1964) 1551.
- [75] T. J. Walton, P. E. Kolattukudy, *Biochemistry* 11 (1972) 1885.
- [76] R. Kleiman, G. F. Spencer, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 50 (1973) 31.
- [77] D. E. Minnikin, *Chem. Phys. Lipids* 21 (1978) 313.
- [78] B. A. Bierl, M. Beroza, M. A. Aldridge, *Anal. Chem.* 43 (1971) 636.
- [79] A. B. Attygalle, E. D. Morgan, *Anal. Chem.* 65 (1984) 1530.
- [80] a) T. L. Mounts, H. J. Dutton, *Anal. Chem.* 37 (1965) 641; b) M. Beroza, R. Sarmiento, *ibid.* 38 (1966) 1042; c) A. L. Chaffee, I. Liepa, *ibid.* 57 (1985) 2429.
- [81] G. Schomburg, E. Hübinger, H. Husmann, F. Weeke, *Chromatographia* 16 (1982) 228.
- [82] a) M. Beroza, R. Sarmiento, *Anal. Chem.* 35 (1963) 1353; b) *ibid.* 36 (1964) 1744; c) R. E. Kepner, H. Maarse, *J. Chromatogr.* 66 (1972) 229; d) B. A. Bierl, M. Beroza, W. T. Ashton, *Mikrochim. Acta* 1969, 637.
- [83] a) B. A. Bierl-Leonhardt, E. D. DeVilbiss, *Anal. Chem.* 53 (1981) 936; b) B. A. Bierl-Leonhardt, D. S. Moreno, M. Schwarz, J. Fargerlund, J. R. Plimmer, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 389; c) B. A. Leonhardt, J. N. Neal, J. A. Klun, M. Schwarz, J. R. Plimmer, *Science* 219 (1983) 314.
- [84] A. I. Mikaya, E. A. Trusova, V. G. Zaikin, N. P. Volinsky, E. N. Karaulova, G. D. Gal'pern, *Org. Mass Spectrom.* 19 (1984) 428.
- [85] J. E. Hoff, E. F. Feit, *Anal. Chem.* 36 (1964) 1002.
- [86] K. M. Fredricks, R. Taylor, *Anal. Chem.* 38 (1966) 1961.
- [87] G. Stanley, *J. Chromatogr.* 178 (1979) 487.
- [88] A. J. Mikaya, V. I. Smetanin, V. G. Zaikin, A. V. Antonova, N. S. Prostavkov, *Org. Mass Spectrom.* 18 (1983) 99.
- [89] M. J. Burk, R. H. Crabtree, D. V. McGrath, *Anal. Chem.* 58 (1986) 977.
- [90] a) A. Darbre in K. Blau, G. S. King (Hrsg.): *Handbook for Derivatives for Chromatography*, Heyden, London 1977, S. 39; b) T. S. Ma, A. S. Ladas: *Organic Functional Group Analysis by Gas Chromatography*, Academic Press, London 1976.
- [91] S. Huwyler, K. Grob, M. Viscontini, *J. Insect Physiol.* 21 (1975) 299.
- [92] D. B. de Oliveira, W. E. Harris, *Anal. Lett.* 6 (1973) 1107.
- [93] W. E. Harris, *J. Chromatogr. Sci.* 13 (1975) 514.
- [94] S. Huwyler, *Experientia* 28 (1972) 718.
- [95] F. Drawert, K.-H. Reuther, *Chem. Ber.* 93 (1960) 3066.
- [96] a) U. Kobold, O. Vostrowsky, H. J. Bestmann in E. J. Brunke (Hrsg.): *Progress in Essential Oil Research*, de Gruyter, Berlin 1986, S. 565; b) H. J. Bestmann, U. Kobold, O. Vostrowsky, *Liebigs Ann. Chem.* 1986, 234.
- [97] R. Ikan: *Chromatography in Organic Microanalysis*, Academic Press, New York 1982.
- [98] V. R. Alieshoev, V. G. Berezkin, E. N. Viktorova, J. Hradil, J. Stamberg, *J. Chromatogr.* 246 (1982) 141.
- [99] P. Kalo, *J. Chromatogr.* 205 (1981) 39.
- [100] C. F. Poole, A. Zlatkis, *J. Chromatogr. Sci.* 17 (1979) 114.
- [101] a) C. B. Johnson, E. Wong, *J. Chromatogr.* 109 (1975) 403; b) C. B. Johnson, *Anal. Biochem.* 71 (1976) 594.
- [102] K. Blau, G. S. King: *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Heyden, London 1977.
- [103] C. F. Poole, S. A. Schuette, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 6 (1983) 526.
- [104] M. Cais, M. Shimoni, *Ann. Clin. Biochem.* 18 (1981) 317.
- [105] K. Grob, K. Grob Jr., G. Grob, *J. Chromatogr.* 106 (1975) 299.
- [106] D. A. J. Murray, *J. Chromatogr.* 177 (1979) 135.
- [107] J. F. J. van Rensburg, A. J. Hassett, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 5 (1982) 574.
- [108] A. B. Attygalle, E. D. Morgan, *Anal. Chem.* 58 (1986) 3054.
- [109] M. Ma, H. E. Hummel, W. E. Burkholder, *J. Chem. Ecol.* 6 (1980) 597.
- [110] a) O. Vostrowsky, K. Michaelis, Z. Naturforsch. B36 (1981) 402; b) O. Vostrowsky, K. Michaelis, H. J. Bestmann, *Liebigs Ann. Chem.* 1981, 1721; c) R. Baker, J. W. S. Bradshaw, W. Speed, *Experientia* 38 (1982) 233.
- [111] a) H. Buser, H. Arn, P. Guerin, S. Rauscher, *Anal. Chem.* 55 (1983) 818; b) E. Dunkelblum, S. H. Tan, P. J. Silk, *J. Chem. Ecol.* 11 (1985) 265; c) B. A. Leonhardt, E. D. DeVilbiss, *J. Chromatogr.* 322 (1985) 484.
- [112] C. Tonini, G. Cassani, P. Massardo, G. Guglielmetti, P. L. Castellari, *J. Chem. Ecol.* 12 (1986) 1545.
- [113] L. D. Metcalfe, A. A. Schmitz, *Anal. Chem.* 33 (1961) 363.
- [114] P. Sandra, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 6 (1983) 690.
- [115] H. J. Bestmann, A. B. Attygalle, H. Platz, O. Vostrowsky, Z. Naturforsch. C40 (1985) 667.
- [116] a) C. F. Poole, S. K. Poole, *J. Chromatogr. Sci.* 25 (1987) 434; b) K. Imai, *Adv. Chromatogr.* 27 (1987) 215.
- [117] S. Blomberg, J. Roeraade, *J. Chromatogr.* 394 (1987) 443.
- [118] R. Boos, T. Prey, A. Bergert, *J. Chromatogr.* 328 (1985) 233.
- [119] a) L. R. Hogge, J. G. Millar, *Adv. Chromatogr.* 27 (1987) 299; b) R. Yamaoka, M. Tokoro, K. Hayashiya, *J. Chromatogr.* 399 (1987) 259.
- [120] E. N. Viktorova, V. G. Berezkin, V. S. Gavrichiev, *J. Chromatogr.* 398 (1987) 317.
- [121] B. Schmitz, R. A. Klein, *Chem. Phys. Lipids* 39 (1986) 285, 299.
- [122] D. C. Young, P. Vouros, B. Decosta, M. F. Holick, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1954.
- [123] A. B. Attygalle, H. J. Bestmann, unveröffentlicht.
- [124] M. Vincenti, G. Guglielmetti, G. Cassani, C. Tonini, *Anal. Chem.* 59 (1987) 694.
- [125] D. A. Peake, S.-K. Huang, M. L. Gross, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1557.
- [126] C. Malosse, J. Einhorn, *Adv. Mass Spectrom.* 1986, 1369.
- [127] H. Budzikiewicz, B. Schneider, E. Busker, W. Boland, W. Francke, *Org. Mass Spectrom.* 22 (1987) 458.
- [128] a) G. Takeuchi, M. Weiss, A. G. Harrison, *Anal. Chem.* 59 (1987) 918; b) J. Adams, M. L. Gross, *ibid.* 59 (1987) 1576.
- [129] G. Lakshminarayana, D. G. Cornwell, *Lipids* 21 (1986) 175.