



# Instrumentelle Bioanalytik

Trennverfahren

Prof. Dr. Mircea Tric

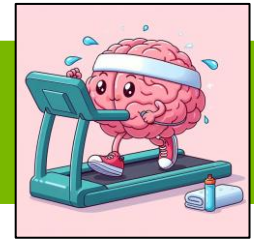
SS 2026

# Gaschromatographie (GC)



# Gaschromatographie (GC)

Was macht eine  
Substanz volatil?



## Gaschromatographie (GC)

Gaschromatographie ist nach DC das älteste chromatographische Trennverfahren

GC und HPLC ergänzen sich in ihrem Leistungsspektrum



## Voraussetzung für eine Analyse mittels GC:

**Analyt** muss **thermisch stabil** und leicht flüchtig (**volatil**), bzw. **verdampfbar** sein

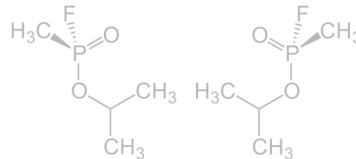
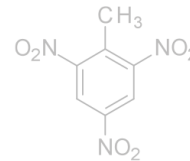
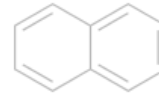
20 % aller bekannten organischen Substanzen mittels GC analysierbar (80 % mit HPLC)

Bestimmte **Aminosäuren** nach **Derivatisierung** mittels GC messbar

# Gaschromatographie (GC)

## Beispiele für den Einsatz (volatile, organische Analyten):

- Aromastoffe: Vanillin, aromaaktive Komponenten im Wein
- Charakterisierung ätherischer Öle (Pharma, Lebensmittel)
- Verunreinigung von Lebensmitteln mit Aromaten
- Analytik von **PAKs** in Gewässerproben
- Rückstandsanalytik (Organohalogene, Organophosphate)
- Detektion von Sprengstoff-Spuren (z.B. TNT mittels GC-IMS)
- Nachweis chemischer Kampfstoffe (VX, Tabun, Sarin)



# Gaschromatographie (GC)

## Gaschromatographie (GC):

- **Mobile Phase** ist **gasförmig**
- **Trennleistung** gegenüber der HPLC **überlegen**

GC → **N = 4.000 pro Meter** (meist **30 m Kapillarsäulenlänge**)

## Trennprinzip:

Trennung aufgrund von **Flüchtigkeit** (Dampfdruck) und **Wechselwirkung** mit stationärer Phase

- **Adsorptionschromatographie:** stationäre Phase ist ein **Feststoff (gepackte Säulen)**
- **Verteilungschromatographie:** stationäre Phase ist ein **Flüssigkeitsfilm (Kapillar-GC)**

# Gaschromatographie (GC)

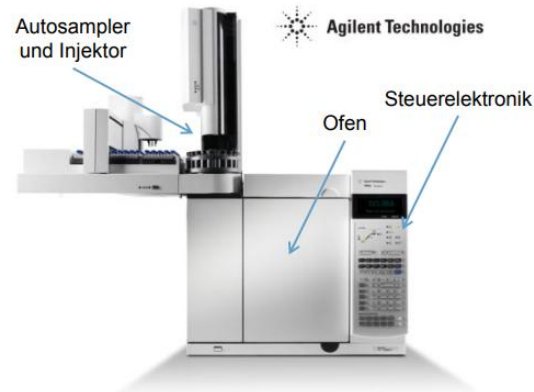
Die Gaschromatographie ist gekennzeichnet durch folgende Charakteristika:

**Stationäre Phase:** fest oder flüssig („kautschukartig“, nicht flüchtig)

**Mobile Phase:** gasförmig → H<sub>2</sub>, He, N<sub>2</sub>, ("Trägergas")

Die Trennung erfolgt in der Gasphase, d.h. bei erhöhter Temperatur:

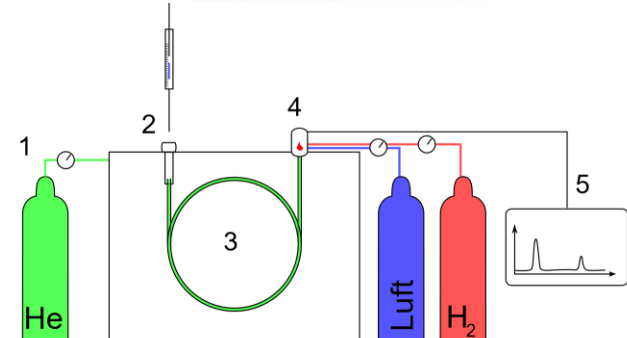
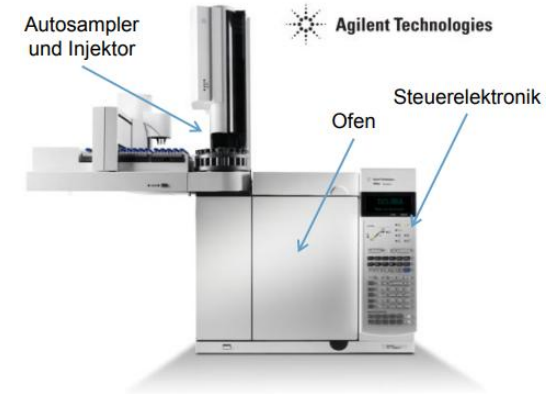
$$T_{\text{Ofen}} = 60 - 450^{\circ}\text{C}$$



# Aufbau

## Aufbau:

- 1) Gasversorgung: hochreine Gase (z.B. Helium)
- 2) Probenaufgabe: Gasförmig oder flüssig
- 3) Trennsäule in Säulenofen
- 4) Detektor:  
universell oder spezifisch  
Betriebsgase je nach Detektortyp ( $H_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$ ...)
- 5) Chromatogramm



# Säulen

## Gepackte Säulen

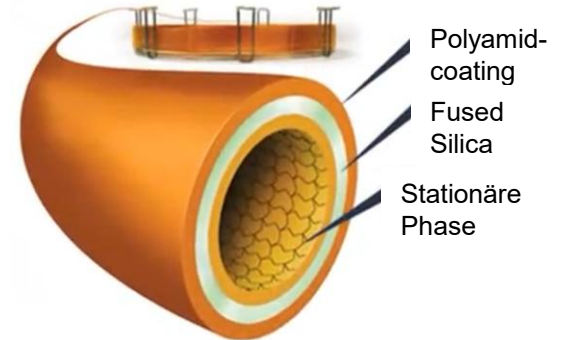
- 2-4 mm Innendurchmesser
- Säule ist **vollständig** mit **Partikel** gefüllt
  - GSC: **Stationäre Phase** ist ein poröser **Feststoff**
  - GLC: **Stat. Phase**  $\text{SiO}_2$  bedeckt mit immobilisierter „**Flüssigkeit**“
- Säulenmaterial: Stahl, Kupfer oder Quarzglas ( $\text{SiO}_2$ )
- Säulenlänge: 1-6 m (niedrige Trennleistung, hoher Strömungswiderstand)
- Verträgt größere Probenmengen (0,1 – 10  $\mu\text{L}$ )
- **Einsatz für präparative Trennung**



# Säulen

## Kapillarsäulen

- 0,1 – 0,53 mm Innendurchmesser (davon **99 % Hohlraum**)
- Säulenlänge: 15 - 100 m (hohe Trennleistung) aufgerollt als Spirale
- **Stationäre Phase:** Silikon-Kautschuk (0,1 – 5  $\mu\text{m}$  an der Innenwand der Säule)
- **Säulenmaterial:** Fused silica (hochreines **Quarzglas** ( $\text{SiO}_2$ )), äußere Schutzschicht aus **Polyimid** ( $\rightarrow$  verleiht Flexibilität)
- **Höhere Auflösung** (längere Säule  $\rightarrow$  höhere Trennstufenzahl  $N \rightarrow$  **größere Empfindlichkeit**)
- **Kürzere Analysenzeiten** (Beitrag der **axialen Diffusion** wichtiger als bei der HPLC, da die **Diffusionsgeschwindigkeit** von Gasen  $10^4 - 10^5$  mal größer ist!)
- **Aber geringere Probenkapazität**
- Kapillarsäulen werden für die **analytische GC** eingesetzt

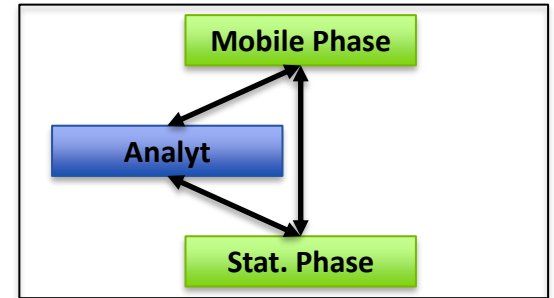


# Unterschiede zur HPLC

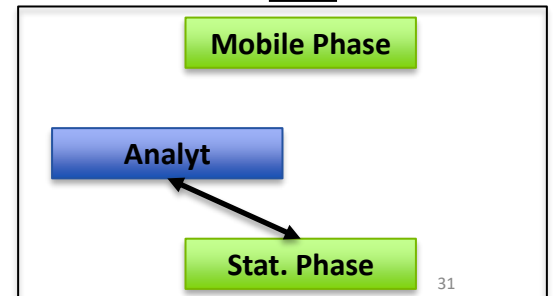
## Hauptunterschiede von GC zur HPLC:

- **Mobile Phase** dient nur dem **Transport** des Analyten durch die Säule
- **Arbeitsdrücke** deutlich **geringer** (0,7 – 3,5 bar)
- **Polarität** der **stationären Phase** sollte der des **Analyten** entsprechen  
→ stärkere und spezifischere Wechselwirkungen
- **Keine Gradientenelution**, da **unbedeutende Wechselwirkungen** zwischen **Trägergas** und **Probe**
- **Trennung** mit **Temperaturgradient** möglich  
→ **schnellere Analysenzeiten** (→ geringere Längsdiffusion!)  
→ **schmalere Peaks**

## HPLC:

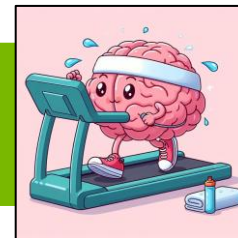


## GC:



# Temperaturgradient

Wie beeinflusst die Temperatur die Retentionszeit?

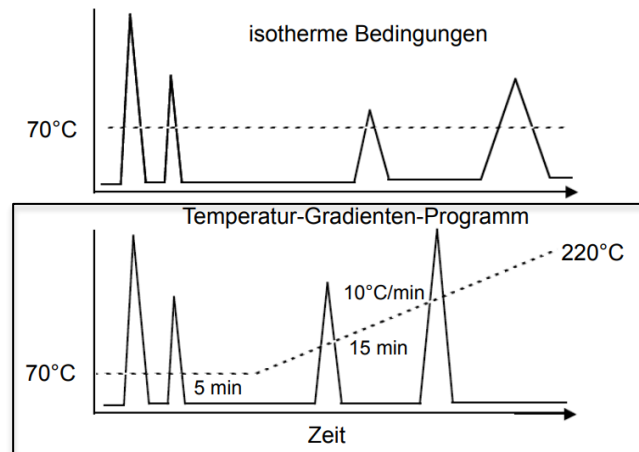
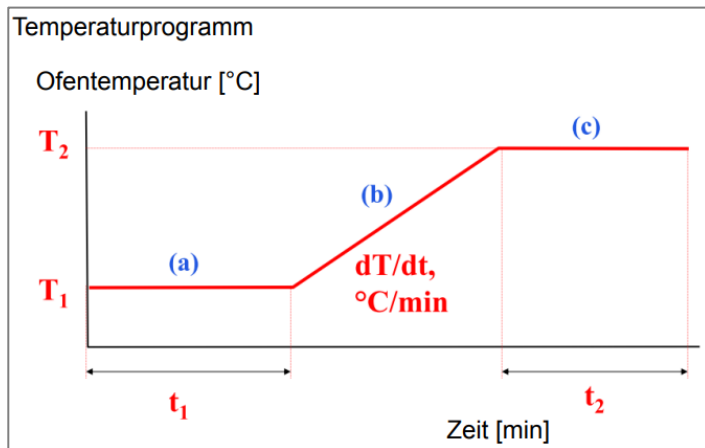


## Temperaturgradient

Die **Temperatur** in der Säule **beeinflusst** die **Flüchtigkeit** des **Analyten**

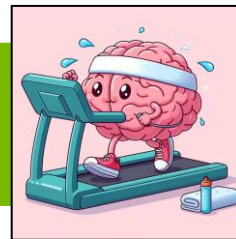
→ Je **wärmer**, desto **schneller** laufen die Analyten über die stationäre Phase

→ kürzere **Analysenzeit** für hochsiedende Komponenten → geringere **Peakverbreiterung** → bessere **Nachweisgrenze**



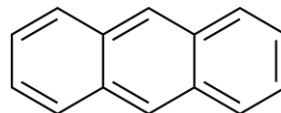
# Säulentemperatur

Warum verdampft eine Flüssigkeit bereits unterhalb ihres Siedepunkts?



Die **Säulentemperatur** muss **nicht** oberhalb des Siedepunkts des Analyten liegen!

- Beispiel Anthracen: Siedepunkt  $340^{\circ}\text{C}$  (1013 mbar)  
→ eluiert auf unpolaren Kapillarsäulen bereits bei ca.  $175^{\circ}\text{C}$
- Der **Dampfdruck** einer Substanz **steigt** stark mit der **Temperatur** an



Anthracen

Säulentemperatur wird gewählt in Abhängigkeit:

- der Dampfdrücke **aller** Analyten  
→ frühe Komponenten nicht zu schnell eluieren  
→ späte Komponenten nicht zu lange zurückhalten
- der maximal akzeptablen **Analysendauer**
- der Menge an stationärer Phase (Filmdicke)  
→ dickere stationäre Phase → längere Verweilzeit → breitere Peaks

# Trägergase (carrier gas)

## Helium:

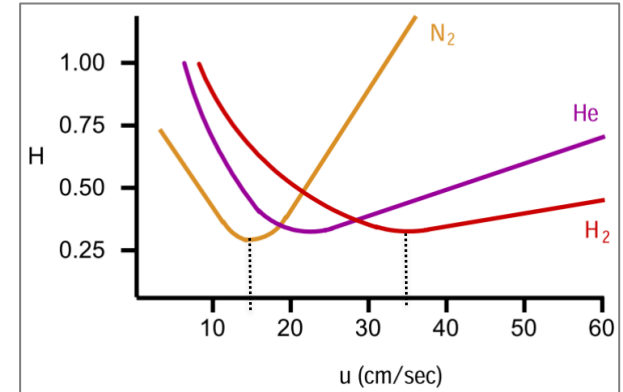
Chemisch **inert** und für die meisten Detektoren geeignet – aber teuer!

## Wasserstoff:

**Schnellste** Trennung, **Brenngas** für **FID**, Explosionsgefahr, **chemisch reaktiv** (nicht MS geeignet)

## Stickstoff:

Chemisch **inert**, aber **langsamste** Trennung (längere Analysenzeit → schlechtere Trennleistung)



Wichtig: hohe Reinheit der Gase (→ steigert Kosten)

- Trocken mittels Molekularsieben (z.B. Zeolith A) → sonst **Hydrolyse** der **stationären Phase / Analyten**
- Sauerstofffrei (< 0,01 ppm) → **Oxidation** der **stationären Phase und Analyten**

# Injektion

## Injektion:

Septum (Butylkautschuk)

Liner (silanisiertes Glasrohr)

Injektortemperatur: 300-350°C (→ **schnelle Verdampfung**)

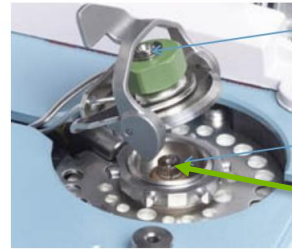
Probe wird in **flüssiger** Form injiziert und **verdampft**

**Trärgasstrom** (Carrier Gas) spült die Probe in die Säule

Beste Auflösung, wenn **geringe Probenmenge** (kurze Injektionszeit)

→ geringe Bandenverbreiterung/Überladung

→ Einsatz von **Probensplitter**



Führung mit Septum

Liner

Geöffneter Injektor

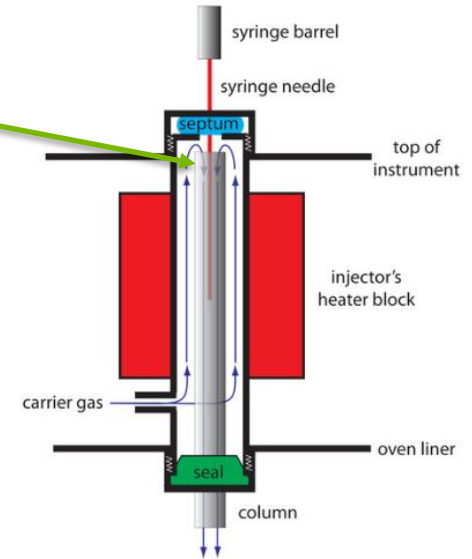


Abbildung: Einspritzblock  
Injektion einer flüssigen Probe in den beheizten Probenraum am Kopf der Säule

# Injektor für Kapillarsäulen

## Split-Injektion:

- **Kapillarsäulen** haben eine **geringe Probenkapazität**

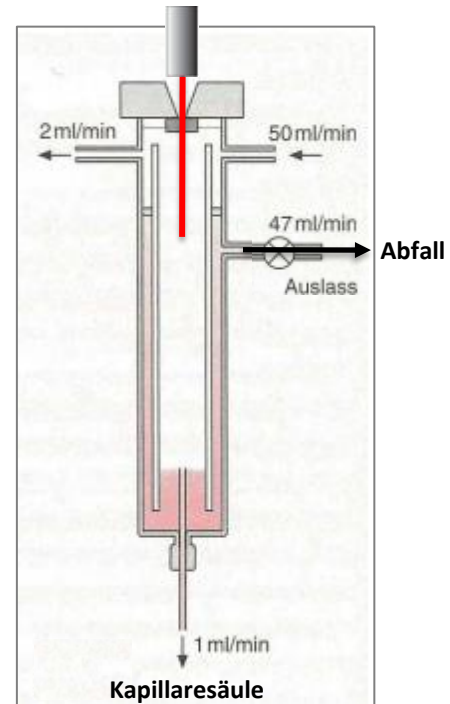
→ **Überladung** der Säule führt zu **unsymmetrischen Peaks** (Fronting) und **schlechter Auflösung**

**Split: Aufteilung** des **Gasstroms** (50:1 bis 600:1)

→ **Injektion von kleinen Analytmengen**

## Nachteile:

- Diskriminierungseffekt: **Schwertsieder** verdampfen langsamer und gelangen in geringerem Maße auf die Säule.
- Nicht optimal für Spurenanalytik



# Injektor für Kapillarsäulen

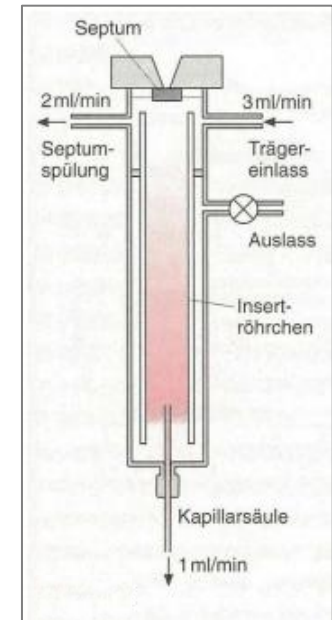
## Splitless-Injektion:

- Splitventil ist zu → für **Spurenanalytik** geeignet
- Temperatur des Injektors/Säule entspricht dem Siedepunkt des Lösungsmittels

Problem: Injektion dauert **lange** (1 min) → breite Peaks!

## Fokussierung am Säulenkopf:

- **Kondensation** der **Analyten** am kühlen Anfang der Säule
- Das Lösungsmittel bleibt gasförmig und wandert durch die Kapillare
- Für die Elution der Analyten wird die Temperatur der Kapillare erhöht

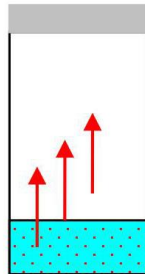


# Headspace-Analytik

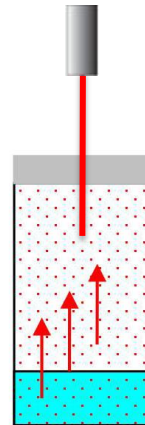
## Headspace-Analytik (Dampfraumanalyse)

Probe in einem Headspace-Vial dicht verschlossen und zeitgesteuert **temperiert** (40-120°C)

- ⇒ Der **Analyt verdampft** aus der Probe in den **Gasraum**
- ⇒ **Gleichgewicht** zwischen **Gasphase** und **Probe**
- ⇒ **Injektion** aus dem **Gasraum**



15 min.  
thermostatisieren



$$K = \frac{n_{fl.}}{n_{gas}}$$

K (Verteilungskoeffizient)

# Headspace-Analytik

## Headspace-Technik (HS):

Für **flüchtige Komponenten** aus **flüssiger** und **fester Matrix**  
z.B. Alkohol im Blut, PAKs in Klärschlamm

## Vorteile Headspace:

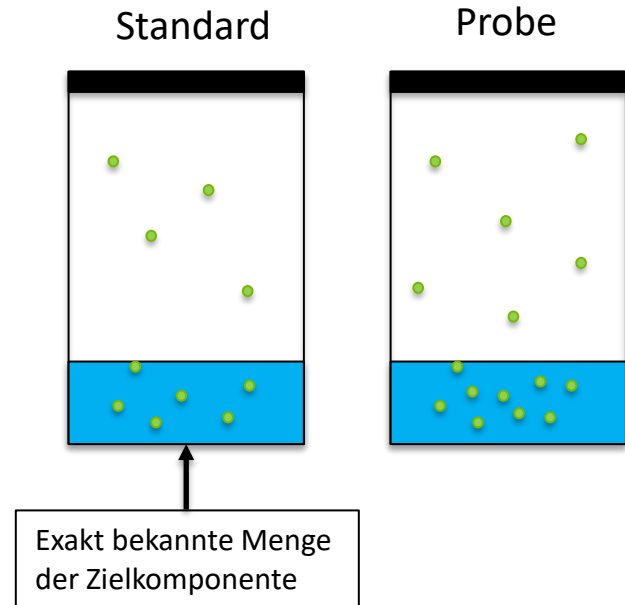
- keine Vorbereitungsschritte
  - keine Kontamination
  - keine Verluste an Analyten
  - Zeitersparnis
- Sehr gute **Automatisierbarkeit**
- Keine Verunreinigung durch **nichtflüchtige** Komponenten
- Sehr gute **Reproduzierbarkeit** der Ergebnisse



# Quantifizierung mittels Headspace

## Quantifizierung mittels Headspace:

- Gleiche Volumina
- Gleiche Thermostatisierungszeit
- Gleiche Thermostatisierungstemperatur
- Gleiche Druckaufbauzeit (Geräteparameter)
- Gleiche Injektionszeit
- Gleiche GC-Messbedingungen
- Gleiche Lösemittelzusammensetzung!!!
- Gleiche Beimengungen (Matrix) bei Probe und Standard

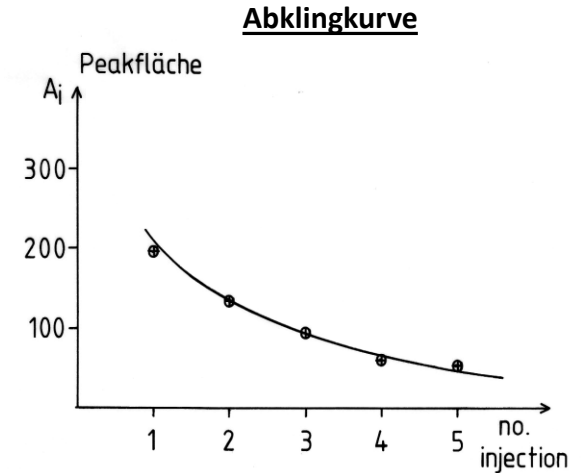


# Multiple Headspace Extraction (MHE)

## Multiple Headspace Extraction (MHE)

- Für  **feste Proben**, die nicht in Lösung gehen (z.B. Polymere)
- Für feste Proben mit  **unbekannter Matrix** (z.B. Bodenproben)

**Mehrfachinjektion (4-10x)** → 1. Temperieren dann 2. Injizieren  
→ Chromatogramme mit sukzessiv  **abnehmender Peakfläche  $A_i$**



# Multiple Headspace Extraction (MHE)

## Quantifizierung mit Hilfe eines Standards:

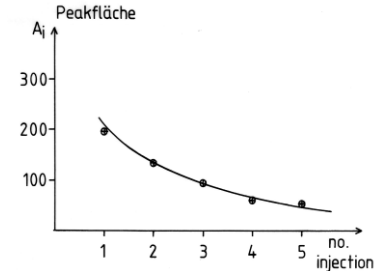
- **Summe der Peakflächen** für die **Probe** bestimmen
- **Summe der Peakflächen** für einen **Standard** bestimmen

Es gilt: 
$$\frac{\sum A_{i,Probe}}{\sum A_{i,Standard}} = \frac{m_{Pr}}{m_{Std}}$$

Gesamtfläche ist aus den **ersten beiden Peakflächen** berechenbar (falls der Verteilungskoeffizient konstant ist → lineare Abnahme):

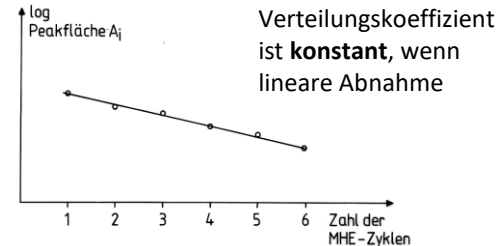
$$\sum A_n = \frac{A_1^2}{A_1 - A_2}$$

## Abklingkurve



Linearisierung

## Abklinggerade



# Detektoren

## Wichtige Detektoren in der GC:

- **Flammenionisations-Detektor (FID)**
- **Massenselektive Detektoren (MS, MS/MS)**
- Wärmeleitfähigkeits-Detektor (WLD, TCD)
- Elektroneneinfang-Detektor (ECD)
- Atomemissions-Detektor (AED)
- Thermoionisations-Detektor (TID, NPD)
- Flammenphotometrischer Detektor (FPD)
- Photoionisations-Detektor (PID)
- FT-IR-Detektor

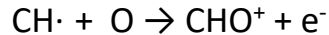
} Am häufigsten eingesetzt

# Flammenionisationsdetektor (FID)

## Flammenionisationsdetektor (FID):

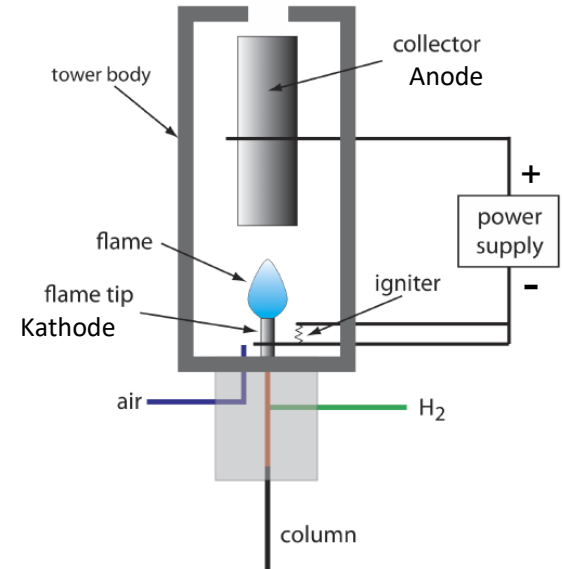
Signal: **Ionisierung** von Substanzen mit **C–C** und **C–H-Bindungen**

- Eluat in einem **H<sub>2</sub>/Luft-Gemisch verbrannt** (2000°C)
  - Org. Analyten erzeugen CH-Radikale
  - CH-Radikale werden in der Flamme zu **CHO<sup>+</sup>-Ionen + Elektronen**



- **Angelegte Spannung** (+200-300 V) zwischen der Sammelelektrode und der Flammendüse
- Der resultierende **Ionisationsstrom** (pA-Bereich) ist proportional zur Menge des eluierenden Analyten

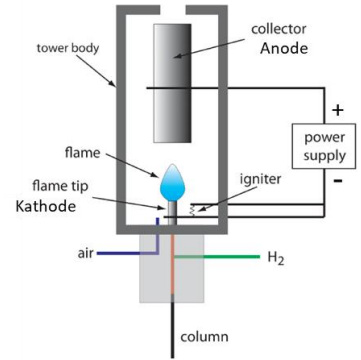
Massenflussabhängiger (= stoffstromabhängiger) Detektor  
→ Signal ist proportional zum Massenstrom (**Masse pro Zeit**)



# Flammenionisationsdetektor (FID)

## Eigenschaften des FID:

- Geringes **Hintergrundrauschen**
- **Hohe Linearität:  $10^7$**
- FID-Signal ist **direkt proportional** zur **Anzahl oxidierbarer C-Atome** im Molekül
- **Hohe Empfindlichkeit** für reduzierte organische Verbindungen ( $10^{-13}$  g/s)
- Mäßige Empfindlichkeit für C-O, C-N, C-S
- FID-Empfindlichkeit: Kohlenwasserstoffe > Alkohole, Ether > Aldehyde, Ketone > Ester > Carbonsäuren
- **Kaum detektierbar:**  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $CO$ ,  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $H_2$ ,  $H_2S$ ,  $NO_x$ ,  $CS_2$ , He
- Hohe **Robustheit**
- Selbstreinigend durch Verbrennungsvorgang
- **Destruktive Messung**



# Wichtiger Hinweis

Dieses Skript ist als unterstützende Lernhilfe nur zum persönlichen Gebrauch von Studierenden des Studienganges Biotechnologie (Bachelor) an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf freigegeben.

Jede unbefugte Vervielfältigung und **Verbreitung**, sei es in Papierform oder in elektronischer Form, ist urheberrechtlich **verboten**.

