

Universität Regensburg
LS für Organische Chemie
Prof. B. König
Dr. R. Vasold



Abteilung
Instrumentelle
Analytik
CH 32.1.05

Bestimmung von Fettsäuren als Fettsäuremethylester (F.A.M.E.s) mittels Solid-Phase-Microextraction (SPME) und GC/MS



MCH-MSc-M 03 Grundmodul Bioanalytische Chemie

Blockpraktikum Chromatographische Methoden GC

Inhalt

I Theoretischer Teil

I.1	Einleitung.....	3
I.2	Fettsäuren.....	3
I.2.1	Medizinische Bedeutung der Fettsäuren	4
I.3	Zielsetzung	5
I.4	Die Methode der Festphasenmikroextraktion (SPME).....	6
I.4.1	Das Grundprinzip der SPME	6
I.4.2	Anwendungsgebiete der SPME	6
I.4.3	Vor- und Nachteile der SPME.....	7
I.4.4	Aufbau und Funktionsweise eines SPME-Systems	8
I.4.5	Typen von SPME-Fasern	9
I.4.6	Anwendungsbereich der SPME-Fasern	9
I.4.7	Die Verwendung der richtigen Faser.....	10
I.4.8	Die SPME-Arbeitstechnik	11
I.5	Aufgaben zum theoretischen Teil	12

II Experimenteller Teil

II.1	Durchführung der GC-Analysen mit Aufgaben	14
------	--	----

I Theoretischer Teil

I.1 Einleitung

Die GC (**G**as **C**hromatograph) ist eine höchst leistungsfähige Methode zur analytischen chromatographischen Trennung und quantitativen Bestimmung von Verbindungen fast aller Klassen. So stellt die GC auch in der Medizinischen Chemie eine unerlässliche analytische Methode dar.

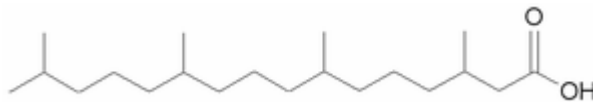
I.2 Fettsäuren

Fettsäuren gehören zur Gruppe der Lipide und sind Monocarbonsäuren, die aus einer -COOH Gruppe (Carboxylgruppe) und einer unterschiedlich langen Kohlenwasserstoffkette bestehen. Damit sind sie spezielle organische Säuren. Fettsäuren unterscheiden sich durch die Anzahl der C-Atome (Kettenlänge) sowie die Anzahl und Position ihrer Doppelbindungen. Die Kohlenstoffkette muss mindestens 4 C-Atome lang sein, somit ist die Buttersäure die einfachste Fettsäure.

Natürliche Fettsäuren bestehen in der Regel aus einer geraden Zahl von Kohlenstoffatomen und sind unverzweigt. Doppelbindungen sind cis-konfiguriert und durch mindestens eine CH₂-Gruppe voneinander getrennt.

Essentielle Fettsäuren sind solche, die der Organismus nicht aus anderer Nahrung synthetisieren kann. Für den Menschen sind all jene Fettsäuren essentiell, die mindestens eine Doppelbindung distal (von der Carboxylgruppe weg) von C₉ haben.

Gesättigte Fettsäuren

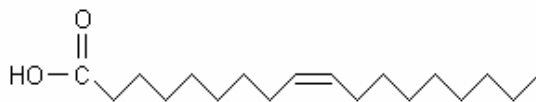


Phytansäure
Tetramethylhexadecansäure) (3,7,11,15-

Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure) ist eine verzweigt kettige Fettsäure, die als Abbauprodukt des Chlorophylls auftritt. Die Unfähigkeit zum Abbau dieser Fettsäure führt zu Morbus Refsum

Eine gesättigte Fettsäure ist eine Fettsäure, die keine Doppelbindungen aufweist. Die gesättigten Fettsäuren bilden eine so genannte homologe Reihe mit der Summenformel C_nH_{2n+1}COOH. Gesättigte Fettsäuren sind für den Menschen nicht essentiell (lebensnotwendig), da sie vom menschlichen Körper selbst synthetisiert werden können.

Ungesättigte Fettsäuren



Z-9-Octadecensäure (nach der IUPAC),
cis-9-Octadecensäure, Oleinsäure

Ölsäure (ungesättigte Fettsäure) kommt als Bestandteil der entsprechenden Triglyceride in fast allen natürlichen Ölen und Fetten vor. Einen besonders hohen Anteil an Ölsäure besitzen z. B. Palmöl, Olivenöl (55-80%), Traubenkernöl (15-20%) und Erdnussöl.

Ungesättigte Fettsäuren besitzen eine oder mehrere Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen der Kette. Da in natürlichen Fettsäuren die Doppelbindungen in der *cis*-Konfiguration vorliegen, entsteht ein Knick von etwa 30° in der Kohlenwasserstoffkette. Dadurch ist die Van-der-Waals-Wechselwirkung zu anderen Molekülen abgeschwächt und der Schmelzpunkt verringert.

I.2.1 Medizinische Bedeutung der Fettsäuren

Die Rolle der Fettsäuren bei Diabetes mellitus

Der entscheidende Unterschied: gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren

Die Empfehlungen der amerikanischen Herzgesellschaft (AHA), der amerikanischen Diabetes-Gesellschaft (ADA) und der Europäischen Diabetes-Gesellschaft (EASD) decken sich in Bezug auf die Empfehlungen zu den Fettsäuren in der Ernährungstherapie bei Diabetes mellitus dahingehend, dass der Gehalt an gesättigten Fettsäuren (SFA) und *trans*-ungesättigten Fettsäuren zusammen unter 10 % der Gesamtenergiezufuhr liegen bzw. die SFA möglichst, insbesondere auch bei erhöhten LDL-Cholesterinspiegeln im Serum, < 7-8 % von der täglichen Energiezufuhr betragen sollten. Hierzu sollte die Gesamtfettaufnahme nicht über 30 bis maximal 35% sein. Einfach ungesättigte Fettsäuren (MUFA) können 10-20% der Gesamtenergie ausmachen, die Menge der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) aber nur bis zu 10 %.

Die Bedeutung der der konjugierten Linolsäure (conjugated linoleic acid, CLA)

Konjugierte Fettsäuren, insbesondere Isomere der konjugierten Linolsäure (conjugated linoleic acid, CLA) haben innerhalb der letzten Jahre beachtliches wissenschaftliches Interesse gefunden. Neue Studien haben ergeben, dass einzelne CLA Isomere, wie C18:2 *cis9trans11* oder C18:2 *trans10cis12* unterschiedlich stark ausgeprägte physiologische Effekte im Organismus hervorrufen können.

Seit Entdeckung des antikarcinogenen Potentials von CLA in Tierversuchen sind zahlreiche Studien über die physiologischen Wirkungen von CLA zunächst *in vitro* und in Tiermodellen publiziert worden. Wenig später folgten erste Humanstudien. Mitte der Neunziger Jahre löste das beachtliche antikanzerogene Potential von CLA in verschiedenen Krebsstadien und Tiermodellen, aber auch die positive Wirkung von CLA auf das Immunsystem, die Körperfettzusammensetzung und die Atheroskleroseentwicklung in verschiedenen Tiermodellen eine fast überschwängliche CLA-Euphorie aus.

Die Bedeutung kurzkettiger Fettsäuren in BAL (Bronchoalveolarlavage)

Kurzkettige Fettsäuren sind Endprodukte der anaeroben bakteriellen Fermentation. Ihr Nachweis in Blutkulturen und Exsudaten legt die Vermutung nahe, dass bei einer bakteriellen Pneumonie auch Anaerobier für die Erkrankung verantwortlich sein können. Diese können mit Hilfe der konventionellen mikrobiologischen Untersuchungen nicht diagnostiziert werden. Als Alternative zur anaeroben Kultivierung wird ein Nachweis von kurzkettigen Fettsäuren in der Bronchoalveolarlavage (BAL) mit Hilfe der Festphasenmikroextraktion (SPME) vorgeschlagen.

I.3 Zielsetzung

Ziel dieses Praktikums ist es, eine spezielle Fragestellung aus dem Bereich der Medizinischen Chemie mit der Methode der **Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Micro Extraction)** gekoppelt mit GC/MS - Analysen zu lösen.

In diesem Praktikum sollen u. a.

- aufbauend auf das im Chromatographie Grundpraktikum (**siehe GC Versuchsanleitung / 5. Semester bzw. Skriptum Analytische Chemie II, Seite 1- 30**), gelernte, die einzelnen **Bestandteile** und **Komponenten** eines GC-Trennsystems sowie die **Funktionsweise** vertieft werden.
- das Arbeiten mit der **stationären Phase** des Gaschromatographen (in diesem Fall eine sog. HP-5 MS Phase mit 5% Polydimethylsiloxan / 30 Meter / 0.25mm ID/ 0.25 um Filmdicke) vertieft werden.
- das Arbeiten mit der **mobilen Phase** (hier Trägergas Helium) eines Gaschromatographen, mit der **Pneumatik**, mit dem Säulenofen und der **Injektionseinheit (hier: Split/splitless-Injektor)** vertieft werden,
- das Arbeiten mit dem **Detektor**, hier besonders dem **Massenselektive Detektor (MSD)** geübt und vertieft werden.
- die Bedienung der **Steuerungs-** und **Auswertesoftware** weiter eingeübt werden;
- das Grundprinzip und die Arbeitsweise der **SPME** kennen gelernt werden
- die Leistungsfähigkeit dieser modernen Extraktionstechnik (hier die Festphasenmikroextraktion [SPME], gekoppelt mit GC/MS) an einem Beispiel aus der **medizinischen Chemie** vorgestellt und eingeübt werden.
- die Typen der unterschiedlichen **Extraktionsfasern** vorgestellt werden.

Die Kenntnis wichtiger chromatographische Kenngrößen, wie **Retentionszeit**, **Durchbruchzeit**, **Retentionsvolumen**, **Durchbruchsvolumen**, **Wanderungsgeschwindigkeit** der mobilen Phase, **Kapazitätsfaktor** etc. und deren Berechnung, sowie die **quantitative Bestimmung mittels Internem Standard** wird in diesem Praktikum als bekannt vorausgesetzt. (**siehe Praktikumsskript 5. Semester / Skriptum Analytische Chemie II Seite 1-30**).

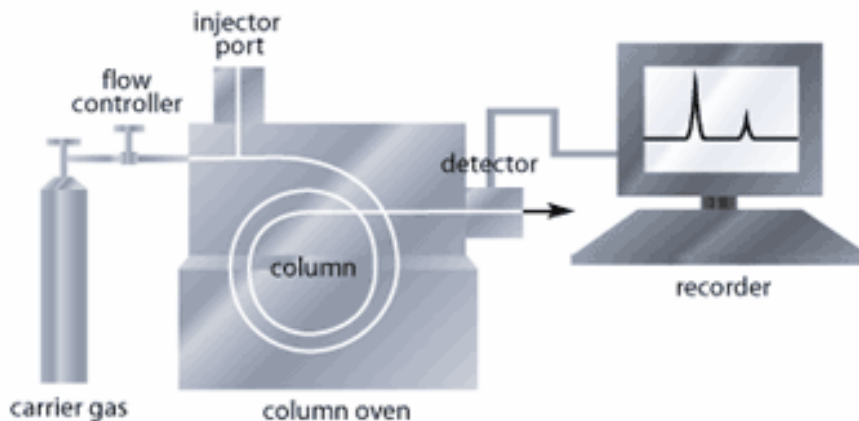


Abb. 1 Aufbau der verwendeten GC/MS-Apparatur

I.4 Die Methode der Festphasenmikroextraktion (SPME)

Die SPME ist ein lösungsmittelfreies Extraktionsverfahren, bei dem eine beschichtete Fused-Silica-Faser in einer gasförmigen oder flüssigen Probe oder im Dampfraum über einer flüssigen oder festen Probe (Headspace) exponiert wird. Die Beschichtung der Faser besteht normalerweise aus einem immobilisierten beschichteten Polymer, einem festen Adsorbens, oder einer Kombination aus beidem. Häufig wird die SPME bei der Probennahme aus komplexen Matrices verwendet.

I.4.1 Das Grundprinzip der SPME

Das Grundprinzip der SPME basiert auf der Absorption bzw. Adsorption von Substanzmolekülen in eine bzw. an einer beschichteten Fused-Silica-Faser.

I.4.2 Anwendungsgebiete der SPME

Verfolgt man die Entwicklung der Anzahl an Publikationen, so ist eine stetige Zunahme seit 1993 zu erkennen. Die SPME war ursprünglich für die Spurenanalytik in Umweltproben entwickelt worden (z.B. Benzin/Brandbeschleunigern in Brandschutt). Auf diesem Sektor sind demzufolge bis heute die meisten Arbeiten zu finden. Die Anwendungen reichen von der Analyse organischer Verbindungen aus wässrigen Proben bis hin zur Bestimmung von Luftqualitäten. Für die Bestimmung von Spuren in der forensischen und klinischen Analytik bietet sich die SPME als Anreicherungsmethode ebenfalls an. Die Verbreitung der SPME führte dazu, dass neben dem Einsatz im biologischen Bereich auch die Anwendung zur Untersuchung von Nahrungs- und Genussmitteln (z.B. die Untersuchung der Ranzigkeit von Lebensmittel, verursacht durch zersetztes Pflanzenöl), sowie von Aromen (z.B. Analyse von 2,4,6-Trichloranisol -> Korkgeschmack in Wein) immer mehr Bedeutung erlangte.

I.4.3 Vor- und Nachteile der SPME

Vorteile der SPME:

- **Geringer Zeitaufwand.**
Der Zeitaufwand für die Optimierung der Probenahmebedingungen wird durch die drastische Verkürzung des Zeitaufwandes für die Probenahme selbst mehr als aufgewogen.
- **Keine organischen Lösungsmittel**
Der komplette Verzicht auf organische Lösemittel bedeutet einen erheblichen ökologischen wie ökonomischen Vorteil da keine anschließende Entsorgung der Lösemittel nötig wird
- **Zu untersuchende Analyten werden nicht verändert**
Der Verzicht auf aufwendige Probevorbereitung bedeutet, dass Proben weniger verändert werden. Dies ist besonders bei empfindlichen Analyten von Bedeutung
- **Breite Anwendbarkeit auf viele unterschiedliche Analyten**
Die SPME kann sowohl für gasförmige, flüssige und sogar feste Analyten (Headspace) angewendet werden.
- **Kaum Einschränkung bei Matrices**
Die SPME kann für die unterschiedlichsten Matrices (Feststoff, Flüssigkeit, Gas) eingesetzt werden.
- **Sowohl für GC als auch für HPLC verwendbar**
Bei entsprechender Verwendung z.B. eines HPLC-Einlass-Kits

Nachteile der SPME:

- **Kein präparatives Verfahren**
Aufgrund der geringen Mengen die von der Faser ab/adsorbiert werden, eignet sich diese Methode, anders als z.B. die SPE (Solid Phase Extraction), nicht zur Isolierung der Analyten in größeren Mengen.
- **Exaktes Arbeiten erforderlich**
Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen speziell die Parameter bei der Probennahme (Zeit, Eintauchtiefe etc.) und bei der Desorption im Injektor (Desorptionszeit) sehr exakt eingehalten werden.
- **Reinigung / Konditionierung**
Vor jeder neuen Injektion muss die Faser konditioniert bzw. zwischen den Messserien u. U. längere Zeit (0.5 – 2h) ausgeheizt werden.
- **Bislang nur aus wässrigen Lösungen anwendbar**
Bei organischen Lösungen kann es zur Zerstörung der Faser bzw. der Faserbefestigung (Auflösung des Klebers) kommen.

I.4.4 Aufbau und Funktionsweise eines SPME-Systems

Der Aufbau einer Faser und deren Haltemechanismus für den manuellen Einsatz sind in Abb. 2 dargestellt.

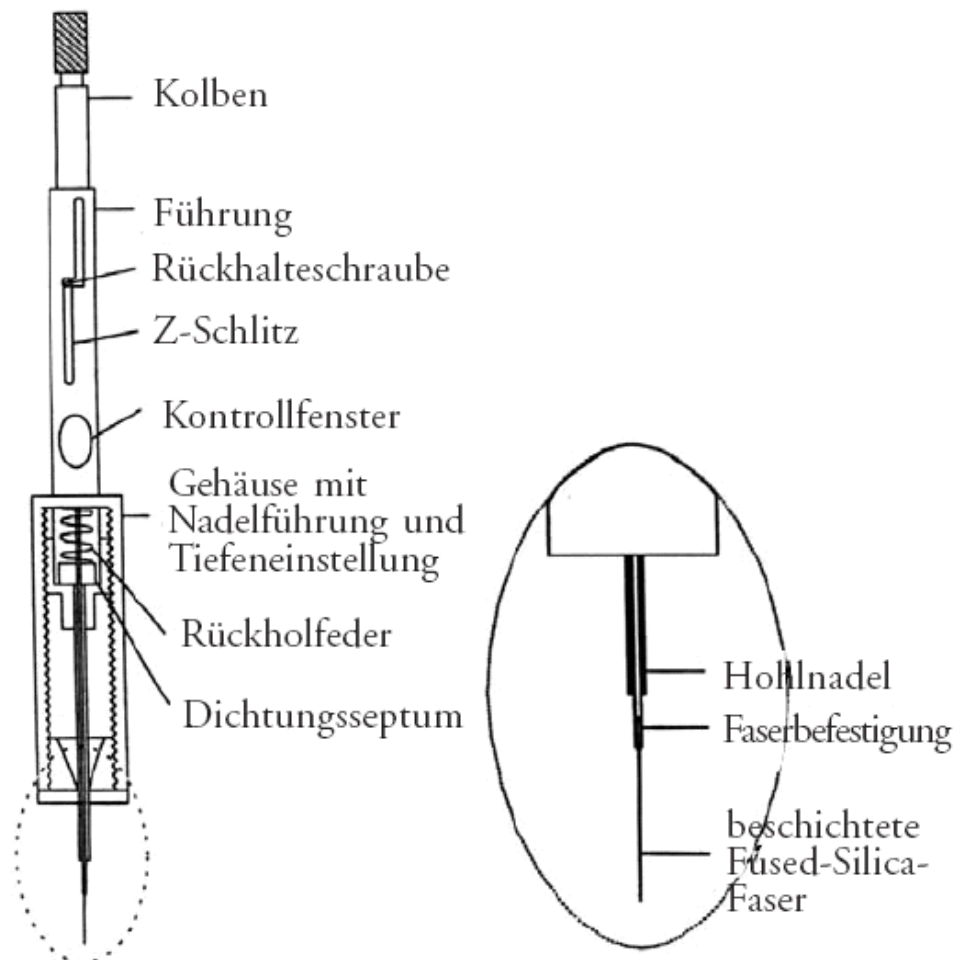


Abb. 2 Aufbau eines SPME-Systems ^[1]

Die etwa 1 cm lange beschichtete Faser ist an eine Metallnadel gebunden, die zum Schutz der Beschichtung in eine Hohl­nadel zurückgezogen werden kann. Die Faserbeschichtung wird der Probe ausgesetzt, indem mit der Nadel das Septum des Probenge­fäßes durch­sto­chen und die Faser aus der schützenden Nadel ausgefahren wird

^[1] Weber, Jörg, Entwicklungen zur Phestphasenmikroextraktion für flüchtige Verbindungen unter Einsatz der Gaschromatographie / Massenspektrometrie, Dissertation 2003

I.4.5 Typen von SPME-Fasern

Die Beschichtung der Fused-Silica-Faser besteht entweder aus reinen Polymeren wie z.B. **PDMS** (Polydimethylsiloxan) oder **PA** (Polyacrylat), oder aber aus **Hybridfasern**, d.h. aus Mischungen unterschiedlicher Fasertypen.

In Tabelle 1 sind die gängigsten Fasertypen aufgeführt:

Sationäre Phase*	Faserstärke [µm]	Maximal Temp [°C]	Arbeits-temp. [°C]	Konditionier-Temp. [°C]	Konditionier-Zeit [h]
PDMS	100	280	200-280	250	0.5
	30	280	200-280	250	0.5
	7	340	220-320	320	1.0
PDMS/DVB	65	270	200-270	250	0.5
Polyacrylat	85	320	220-310	300	2
CAR/PDMS	75	320	250-310	300	1-2
CW/DVB	65	260	200-250	220	0.5
DVB/CAR/PDMS	50/30	270	230-270	270	1

Tab. 1 Typen von SPME-Fasern

*PDMS = Polydimethylsiloxan / *CAR = Carboxen / *CW = Carbowax / *DVB = Divinylbenzol

I.4.6 Anwendungsbereich der SPME-Fasern

Sationäre Phase*	Faserstärke [µm]	Anwendungsbereich	Analysenmethode
PDMS	100	Flüchtige Analyten	GC / HPLC
	30	Unpolare, halbflüchtige Analyten	
	7	Unpolare Analyten mit hohem Molekulargewicht	
PDMS/DVB	65	Überwiegend flüchtige Analyten	
Polyacrylat	85	Polare, halbflüchtige Analyten	GC / HPLC
CX/PDMS	75	Gase / Analyten mit kleinem Molekulargewicht	GC
CW/DVB	65	Alkohole / polare Analyten	GC
DVB/CX/PDMS	50/30	Aromakomponenten	GC

Tab. 2 Anwendungsbereich der SPME-Fasern

Die einzelnen Beschichtungen unterscheiden sich hauptsächlich durch die Polarität und die Oberflächen- und Porenstruktur des verwendeten Materials.

I.4.7 Die Verwendung der richtigen Faser

Kommerziell sind im Wesentlichen fünf unterschiedliche SPME-Fasern (dies sind nach abnehmender Polarität geordnet: Polyacrylat (PA), Carbowax (CW), Polydivinylbenzol (DVB), Carboxen (CX) und Polydimethylsiloxan (PDMS) in mehreren Kombinationen und Schichtdicken für verschiedenste Einsatzgebiete erhältlich. Als Faustregel gilt dabei, dass polare Analyte mit polaren Fasern und apolare Analyte mit apolaren Fasern analysiert werden sollten. Für hochmolekulare Analyten werden geringere Schichtdicken empfohlen, als für niedermolekulare.

Abb. 3 Bei Absorptionsfasern basiert die Extraktion der Substanzen auf der **V**erteilung in dem entstehenden Mehrphasensystem, da die Faserbeschichtung einen Flüssigkeitsfilm darstellt. Solche Fasern sind z.B.: Polydimethylsiloxan (PDMS) oder Polyacrylat (PA).

Absorptionsfaser

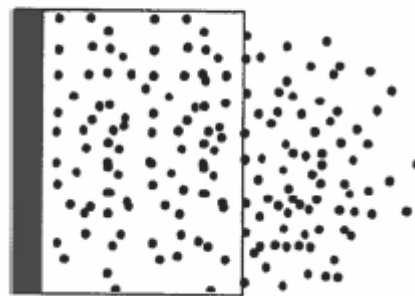
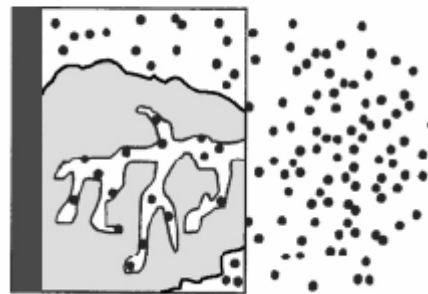


Abb 4: Bei der Beschreibung von Adsorptionsfasern (CW, CX) sind insbesondere Adsorptionsprozesse ausschlaggebend. Dabei weisen diese durch die zur Verfügung stehende Oberfläche eine begrenzte Kapazität auf. Hinzu kommen Konkurrenzeffekte der angereicherten Substanzen. Das Anreicherungsvermögen ist abhängig von der Molekülgröße im Verhältnis zu Porengröße des Adsorbens.

Adsorptionsfaser



Ein nichtlinearer Anreicherungsbereich und die o. g. Limitierungspunkte sind bei Absorptionsfasern im Vergleich zu Adsorptionsfasern hingegen in der Regel nicht zu finden. Für flüchtige Analyten erweisen sich in der Regel Fasern vom Adsorptionstyp als besser geeignet. Sie sind zudem besser geeignet für die Extraktion von Analyten, die in geringen Mengen vorliegen und erreichen so meist höhere Nachweisgrenzen. Für halbflüchtige Verbindungen aus dem Dampfraum verwendet man hingegen meist absorbierende Fasern.

Generell gilt, dass entweder Absorptionsfasern oder Adsorptionsfasern mit entsprechend weiten Poren (z.B. DVB) zur Extraktion und Desorption eher größerer Analyten (>150 amu) besser geeignet sind.

I.4.8 Die SPME-Arbeitstechnik

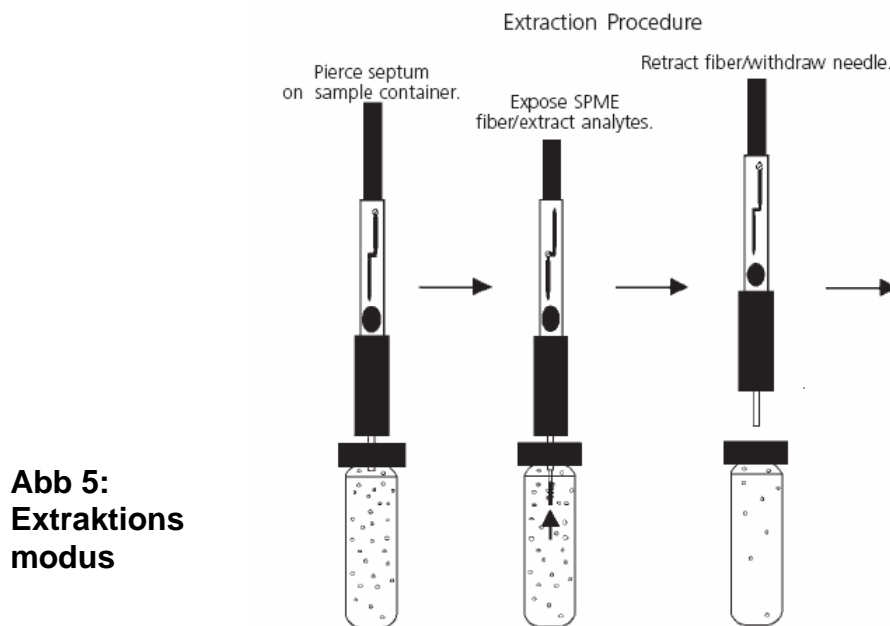


Abb 5:
Extraktionsmodus

Die Faser wird bei der Probenahme entweder über der Probe platziert (HS=Headspace-Technik) oder direkt in die flüssige Probe (DI-Technik) getaucht. Nach gewisser Zeit, wird die Faser zurück in die Metallnadel gezogen, die anschließend mit Hilfe des Halters wieder aus dem Probengefäß entfernt wird.

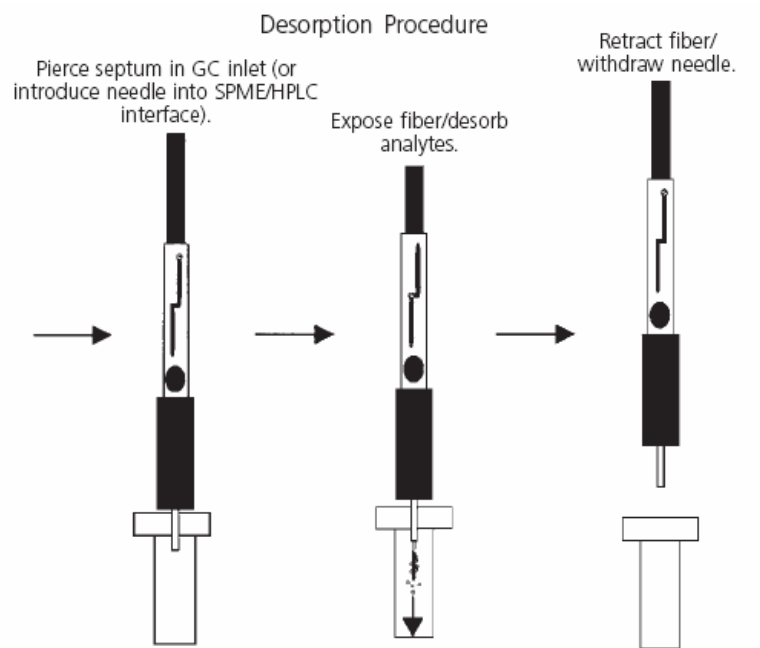


Abb 6:
Desorptionsmodus

Danach wird die Metallnadel direkt in den GC-Injektor eingeführt. Nach dem Durchstechen des Injektorseptums, wird die Faser erneut aus der Nadel geschoben und bei Injektortemperaturen zwischen 200 und 300°C (je nach Fasertyp) dem Trägergas ausgesetzt und so die Substanzen thermodesorbiert. Im Anschluß an die Thermodesorption (ca. 1- 5 min) wird die Faser wieder in die Nadel zurückgezogen, aus dem Injektor genommen und kann in der Regel für die nächste Extraktion verwendet werden.

1.5 Aufgaben zum theoretischen Teil:

Aufgabe 1)

Aus welchen Hauptbestandteilen besteht ein GC/MS?

Aufgabe 2)

Nennen Sie ein Reagenz zur Herstellung von F.A.M.E.s aus den entsprechenden Fettsäuren.

Aufgabe 3)

Nennen Sie 5 Anwendungsbereiche in denen die SPME überwiegend zum Einsatz kommt.

Aufgabe 4)

Welche beiden grundlegenden Methoden der Probennahme gibt es bei der SPME?

Aufgabe 5)

Nennen Sie sowohl Vor- als auch Nachteile der SPME (je vier Beispiele).

Aufgabe 6)

Auf welchen beiden Grundtypen von SPME-Fasern gibt es und worin unterscheiden sich diese?

Aufgabe 7)

Nennen Sie 6 verschiedene Typen von SPME-Fasern und für welche Analyten diese überwiegend eingesetzt werden.

Aufgabe 8)

Ordnen sie die folgenden Typen an SPME-Fasern nach steigender Polarität: Polyacrylat, Carbowax, Polydivinylbenzol, Carboxen und PDMS

Aufgabe 9)

Welche Faustregel gilt bezogen auf die Analyse polarer bzw. unpolare Verbindungen, im Hinblick auf die Verwendung einer entsprechend polaren bzw. unpolaren SPME-Faser?

Aufgabe 10)

Welche Faustregel gilt bezogen auf die Analyse hoch- bzw. niedermolekularer Verbindungen im Hinblick auf die Verwendung der Schichtdicke der verwendeten SPME-Faser?

II Experimenteller Teil

II.1 Durchführung der GC-Analysen mit Aufgaben:

Es steht ein bereits zu den entsprechenden Methylestern (F.A.M.E.) derivatisiertes Gemisch aus folgenden Fettsäuren zur Verfügung:

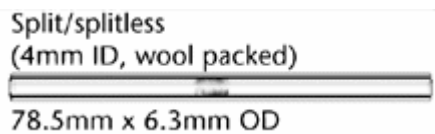
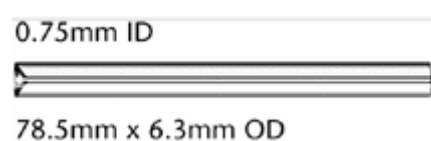
MW	Summenformel	Analyt	CAS-No.	Purity	Einwaage%
158	$C_9H_{18}O_2$	Octansäure-ME	111-11-5	99.9	7.986
186	$C_{11}H_{22}O_2$	Decansäure-ME	110-42-9	99.7	7.983
214	$C_{13}H_{26}O_2$	Dodecansäure-ME	111-82-0	99.7	7.989
242	$C_{15}H_{30}O_2$	Tetradecansäure-ME	124-10-7	99.9	7.988
268	$C_{17}H_{32}O_2$	9-Hexadecensäure (Z)-ME	1120-25-8	99.9	5.005
270	$C_{17}H_{34}O_2$	n-Hexadecansäure-ME	112-39-0	99.9	10.993
296	$C_{19}H_{36}O_2$	9-Octadecensäure (Z)-ME	112-62-9	97.9	5.100
298	$C_{19}H_{38}O_2$	Stearinsäure-ME	112-61-8	99.2	8.00
326	$C_{21}H_{42}O_2$	Arachidinsäure-ME	1120-28-1	99.7	7.986
352	$C_{23}H_{44}O_2$	13-Docosensäure (Z)-ME	1120-34-9	99.7	4.993
354	$C_{23}H_{46}O_2$	Docosansäure-ME	929-77-1	99.1	7.994
382	$C_{25}H_{50}O_2$	Tetracosansäure-ME	2442-49-1	99.9	7.988

Aufgabe 1)

Geben Sie zu 3 mg der obigen Mischung 1.5 ml Wasser (Millipore-Qualität). Die erhaltene Suspension (Lösung F.A.M.E.) wird 30 sec ultrabeschallt. Anschließend werden 100 ul der Suspension mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und in ein 2ml-Autosamplergläschen mit Konuseinsatz pipettiert. Danach wird das Gläschen mit einer Anbördelkappe verschlossen.

Aufgabe 2)

Um optimale Ergebnisse mittels SPME erzielen zu können, muss vor Beginn der Messungen der Standard Liner für Flüssiginjektion (z.B. SUPELCO-Split/less-Liner 4 mm, siehe Abb. 7) aus dem Split/splitless-Injektor ausgebaut und gegen einen speziellen SPME-Liner (z.B. SUPELCO-SPME-Injection Sleeve 0.75 mm ID Part Nr. 2-6375-01 / Abb. 8) mit geringerem Innendurchmesser ausgetauscht werden.

**Abb. 7 z.B. Standard-Liner****Abb. 8 z.B. SPME-Liner**

Hierzu stellen Sie den Front-Inlet-Pressure des Gaschromatographen auf „off“ und lassen den Injektor auf 50°C abkühlen. Anschließend schrauben Sie die Injektorkopf-Mutter ab und entfernen die Injektorabdeckung mit dem dafür vorgesehenen Spezialschlüssel. Danach entfernen Sie mit Hilfe des Assistenten das Septum (z.B. mit einem Septum-Puller) und nehmen den Liner mit einer Pinzette heraus. Der SPME-Liner wird nun mit einem neuen VITON[®]-o-Ring versehen und mit der Pinzette eingesetzt. Anschließend wird die Injektorabdeckung wieder aufgeschraubt und ein speziell vorgestanztes Inlet-Septum (z.B. Fa. Agilent 11mm / PartNr. 5183-4745) eingesetzt. Nach Aufschrauben der Injektorkopf-Mutter wird der Front-Inlet-Pressure wieder auf „on“ gesetzt. Man kontrolliere den Ist-Wert des Druckes mit dem Soll-Wert. Nach wenigen Sekunden sollten beide Druck-Werte wieder übereinstimmen und konstant sein. Anderenfalls ist das System undicht und die Injektorkopf-Mutter muss noch etwas nachgezogen werden.

Aufgabe 3)

Heizen Sie nun das komplette System für 30 min unter folgenden Bedingungen aus: Injektortemp. 300°C / Ofentemp. 300°C / Transferlinetemp. 310°C. Setzen Sie danach das System zurück auf Standby-Bedingungen (Inlet-Temp.: 250°C / Ofen-Temp.: 150°C / Transfeline-Temp.: 300 °C).

Aufgabe 4)

Das GC/MS-System, und speziell der massenselektive Detektor, müssen vor Beginn der Analysen auf ihre korrekte Funktion getestet werden. Führen Sie hierzu im Standby-Betrieb (Inlet-Temp.: 250°C / Ofen-Temp.: 150°C / Transfeline-Temp.: 300 °C) eine sog. Tune Evaluation durch. Dieser Test dient dazu, die korrekten Einstellungen des Massenspektrometers zu testen:



System Verification - Tune (Detector Optimization) Portion			
Instrument Name	: Instrument #1		
DC Polarity	: Positive		
Filament	: 1		
BasePeak should be 69 or 219			Ok
Position of mass 69	69.00	Ok	
Position of mass 219	219.00	Ok	
Position of mass 502	502.05	Ok	
Position of isotope mass 70	70.01	Ok	
Position of isotope mass 220	220.00	Ok	
Position of isotope mass 503	503.06	Ok	
Ratio of mass 70 to mass 69(0.5 - 1.6%)	1.11	Ok	
Ratio of mass 220 to mass 219(3.2 - 5.4%)	4.37	Ok	
Ratio of mass 503 to mass 502(7.9 - 12.3%)	10.07	Ok	
Ratio of 219 to 69 should be > 40% and is	61.74	Ok	
Ratio of 502 to 69 should be > 2.4% and is	5.21	Ok	
Mass 69 Precursor (<= 3%)	0.09	Ok	
Mass 219 Precursor (<= 6%)	0.14	Ok	
Mass 502 Precursor (<= 12%)	0.47	Ok	
Testing for a leak in the system			
Ratio of 18 to 69 (<20%)	2.18	Ok	
Ratio of 28 to 69 (<10%)	2.07	Ok	
Electron Multiplier Voltage	1247	Ok	
Tune portion of System Verification passed.			

Abb 9: Tune Evaluation Report

Achten Sie besonders auf die mit Pfeil gekennzeichneten Werte. Sie geben an, ob das System wasserfrei (H₂O = MW18) und entsprechend evakuiert (N₂ = MW 28) ist. Beide Werte dürfen den Grenzbereich von < 20% (Wasser) bzw. <10% (Stickstoff), bezogen auf die interne Referenzsubstanz PFTBA (Perfluortributylamin) nicht überschreiten.

Aufgabe 5)

Bauen Sie nun mit Hilfe des Assistenten zuerst das SPME Fiber Assembly der Carboxen™-PDMS-Faser (schwarze Codierung) in den Faserhalter ein.

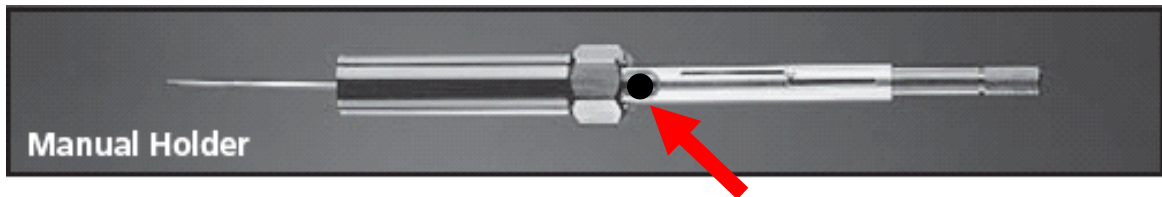


Abb. 10 SPME-Halter mit Carboxen™-PDMS-Fiber Assembly

Aufgabe 6)

Setzen Sie nun den SPME-Inlet Guide (siehe Abb XX) auf den Injektor auf. Er dient zur besseren Führung der Nadel während der Injektion.



Abb. 11: SPME-Inlet-Guide

Aufgabe 7)

Zur Konditionierung der Carboxen™-PDMS-Faser wird nun die Injektortemperatur auf 300° und ein Split von 40:1 eingestellt (Ofentemp. 300°C). Danach wird

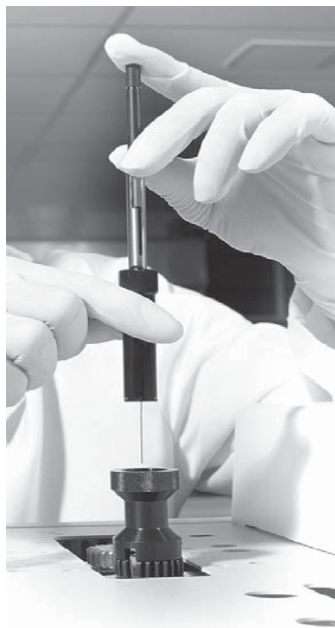


Abb. 12
Einführen der Metall-
nadel in den Injektor

die Metallnadel direkt in den GC-Injektor eingeführt (siehe Abb. 12). Nach dem Durchstechen des Injektorseptums wird die Faser aus der Nadel geschoben und für 30 min konditioniert.

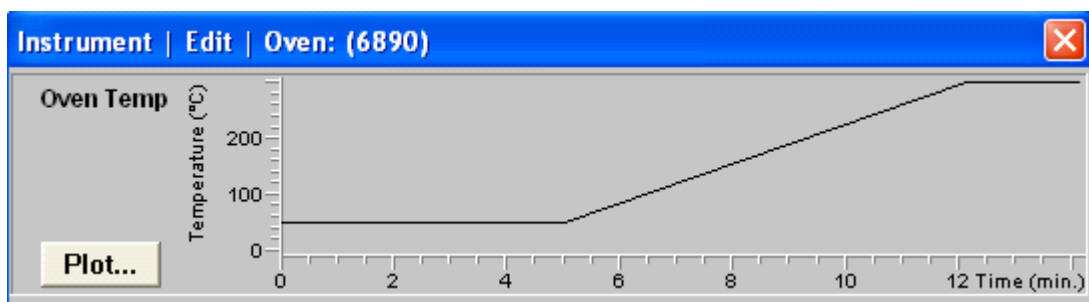
Aufgabe 8)

Ziehen Sie nach 30 Minuten die Faser wieder ein und entfernen Sie die Metallnadel mit dem SPME-Halter aus dem Injektor.

Aufgabe 9)

Programmieren Sie nun Ihre SPME-GC/MS Methode für die Analysen der Fettsäuremethylester wie folgt:

Parameter	Einstellung
Injektortemp.	250°C
Split	40:1
Column Flow	1ml/min (He)
Transferline	300 °C

Ofentemperatur-Programm für die FAME-Bestimmung:

°C/min	Next °C	Hold
	50	5.00
35	300	2.00

Abb. 13 Ofentemperaturprogramm

Aufgabe 10)

Beginnen Sie nun mit der Probennahme aus dem vorbereiteten Gläschen (Lösung F.A.M.E.), indem Sie die SPME-Nadel durch das Septum des Gläschens stechen und die auf Raumtemperatur abgekühlte CarboxenTM-PDMS-Faser vorsichtig ausfahren, so dass diese direkt in die Probenlösung eintaucht.

Nach exakt 5 Minuten (Kurzzeitmesser !) ziehen Sie die Faser wieder in die Hohl- nadel zurück, entfernen diese aus dem Septum des Gläschens und führen sie in den Injektor des GC ein. Nach dem Durchstechen des Injektorseptums schieben sie die CarboxenTM-PDMS-Faser erneut aus der Nadel und starten sofort danach den GC-Lauf. Belassen Sie die ausgefahrene Faser für erneute 5 Minuten (Desorptionszeit) im Injektor, bevor Sie diese wieder einziehen und die Metallnadel incl. SPME-Halter aus dem Injektor entnehmen.

Aufgabe 11)

Ordnen Sie nach Beendigung des Laufes (Chromatogramm_00) alle relevanten Peaks anhand Ihrer Massenspektren bzw. mit Hilfe der NIST-Datenbank, den entsprechenden Fettsäure-Methylestern zu.

Aufgabe 12)

Bauen Sie nun das SPME-Fiber-Assembly der PDMS/DVB-Faser (blaue Codierung) in den Faserhalter ein.

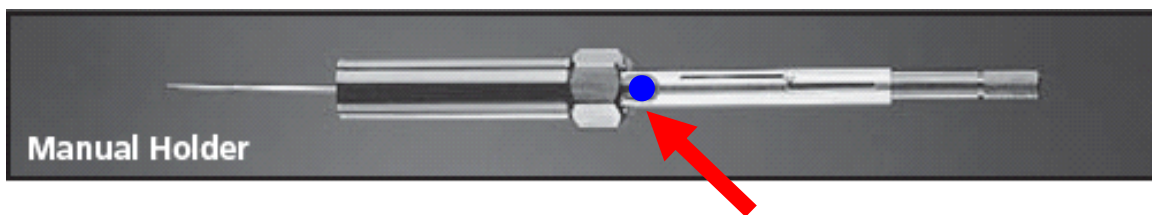


Abb. 14 SPME-Halter mit PDMS/DVB-Fiber Assembly

Konditionieren Sie die PDMS/DVB-Faser analog Aufgabe 7 für 30 Minuten, jedoch bei einer Injektortemperatur von 250°.

Aufgabe 13)

Wiederholen Sie nun die Probennahme aus der F.A.M.E-Lösung sowie die Desorption unter den exakt gleichen Bedingungen wie unter Aufgabe 10 mit der PDMS/DVB-Faser und Starten sie einen erneuten Lauf (Chromatogramm_01).

Aufgabe 14)

Analysieren Sie das Ergebnis analog Aufgabe 11. Was stellen Sie fest? Interpretieren Sie das Versuchsergebnis hinsichtlich der verwendeten SPME-Fasern. Für welchen Fasertyp zur Bestimmung der vorliegenden Fettsäuremethylester entscheiden Sie sich?