

Die gaschromatographische Analyse unbekannter Fettsäuren in Speiseölen

- Dennis ■ -

Index

1. Die Gaschromatographie

- 1.1 Einführung in die Chromatographie
 - 1.1.1. Prinzip der Gas-Chromatographie
 - 1.1.2. Wozu dient die Gas-Chromatographie
 - 1.1.3. Voraussetzung für eine Gas-Chromatographische Analyse
- 1.2. Die Säule
 - 1.2.1. Kapillarsäulen
- 1.3. Trägergas
 - 1.3.1. Stickstoff
- 1.4. Detektoren
 - 1.4.1. Flammen-Ionisations-Detektor
 - 1.4.2. Verstärker und Schreiber
- 1.5. Das Chromatogramm
- 1.6. Auswertung
 - 1.6.1. Identifizierung mittels Testsubstanzen (= qualitative Analyse)

2. Bestimmung der Fettsäuren in Speiseölen mit Hilfe der GC

- 2.1. Was sind Fettsäuren
 - 2.1.1. Essentielle Fettsäuren
- 2.2. Triglyceride
- 2.3. Methylierung der Fettsäuren
- 2.4. Material zur Gaschromatographie der Fettsäuren in Speiseölen
 - 2.4.1. Biologisches Untersuchungsmaterial
 - 2.4.2. Chemikalien
 - 2.4.3. Geräte
 - 2.4.4. sonstiges Material
- 2.5. Versuchsvorbereitung
 - 2.5.1. Erwartungen
 - 2.5.2. Vorbereiten des Chromatographen
- 2.6. Versuchsdurchführung
 - 2.6.1. Erstellen eines Chromatogramms von BME
 - 2.6.2. Erstellen eines Chromatogramms von bekannten Fettsäuren
 - 2.6.3. Beurteilung & Erläuterung des Chromatogramms bekannter Fettsäuren
 - 2.6.4. Gaschromatographische Analyse der fertigen TMSH-Lösungen
 - 2.6.5. Beurteilung der Chromatogramme der TMSH-Lösungen
 - 2.6.6. Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren in Speiseölen
 - 2.6.7. Auswertung der Chromatogramme der drei Speiseöle

3. Fazit

4. Quellenverzeichnis

1. Die Gaschromatographie

1.1. Einführung in die Chromatographie

Unter Chromatographie versteht man Trennverfahren, bei denen die unterschiedliche Verteilung der Komponenten eines Gemisches auf zwei Hilfsphasen ausgenutzt wird, von denen die eine ruht, die andere sich bewegt. Der Aggregatzustand der ruhenden (stationären) Phase kann fest oder flüssig, die der strömenden (mobilen) Phase flüssig oder gasförmig sein. Demzufolge gibt es vier verschiedene Kombinationsmöglichkeiten:

Mobile Phase	Stationäre Phase	Trennwirkung durch	Ausführungsform
flüssig	fest	Adsorption	DC
flüssig	flüssig	Verteilung	HPLC
gasförmig	fest	Adsorption	GC
gasförmig	Verteilung	flüssig	GC

1.1.1. Prinzip der Gas-Chromatographie

Bei der Gas-Chromatographie (GC) ist die bewegliche (mobile) Phase gasförmig, die stationäre Phase meist flüssig, in Sonderfällen auch fest. Die Gas-Chromatographie zählt, wie z.B. die Destillation, zu den thermischen Trennmethoden.

Als bildliches Beispiel stelle man sich folgendes vor: Auf einem Fluß (Trennsäule) werden durch die Strömung (Trägergas) gleichzeitig eine Reihe von Fahrzeugen (zu trennende Substanzen) mitgeführt. An den Ufern befinden sich Landungsstellen. Je öfter ein Fahrzeug an einer Landungsstelle anlegt, um so mehr wird sich seine Reise verzögern. Gegenüber den Booten, die überhaupt nicht oder weniger oft anlegen, vergrößert sich der Abstand. Dies entspricht einer Auftrennung.

Die Hauptanwendung der GC ist die Analyse von Vielkomponentengemischen. Die weite Verbreitung der Gas-Chromatographie ist auf den geringen Substanzeinsatz und die niedrigen Nachweisgrenzen zurückzuführen.

Bei der Gas-Flüssigkeits-Chromatographie ist die stationäre Phase eine Flüssigkeit (bzw. in unserem Fall ein Flüssigkeitsfilm), die sich auf einem indifferenten "Träger" befindet. "Träger" ist entweder ein

saugfähiges Füllkörpermaterial oder (wie in unserem Fall) die Wand einer Kapillare. Diese Arbeitsweise entspricht im Prinzip der klassischen Verteilungschromatographie, bei der jedoch als

mobile Phase eine Flüssigkeit verwendet wird.

Bei der Adsorptions-Gas-Chromatographie wird als "stationäre Phase" ein Festkörper-Granulat mit adsorptiv wirksamer Oberfläche benutzt, z.B. Aktivkohle oder Silicagel.

Bei der GC strömt das Trägergas (mobile Phase) aus einer Vorratsflasche über ein Reduzierventil durch die Trennsäule zum Detektor. Das vom Detektor gelieferte Signal wird elektronisch verstärkt und vom Schreiber registriert.

Zu der raschen Entwicklung der Methode in den letzten Jahren hat wesentlich beigetragen, daß relativ einfache und äußerst empfindliche Meßmethoden zur Verfügung stehen, die es gestatten, im Anschluß an die Trennsäule eine kontinuierlich arbeitende Detektorstufe zu

verwenden. Trennung, Nachweis und quantitative Bestimmung können somit praktisch in einem Arbeitsgang vorgenommen werden.

1.1.2. Wozu dient die Gas-Chromatographie

Die Gas-Chromatographie kann zum quantitativen und qualitativen Trennen von gasförmigen, flüssigen, gelösten oder festen Substanzen angewendet werden. Diese Substanzen müssen sich unzerstört rückstandsfrei verdampfen oder zu stabilen Endprodukten reproduzierbar zersetzen lassen.

Eine gaschromatographische Trennung von unverdampfenden Substanzen wird möglich, wenn diese sich vorher in verdampfbare Derivate reproduzierbar umwandeln lassen.

1.1.3. Voraussetzung für eine Gas-Chromatographische Analyse

Wichtig für eine GC-Analyse ist die Art des Substanzgemisches, das getrennt werden soll. Einige Substanzen könnten unter thermischer Zersetzung aggressive Gase freisetzen, die dann die Geräte beschädigen. Nach der Art des Gemisches richtet sich dann auch die Wahl der Säule und des Detektors.

Wichtig ist auch, daß die Substanz bis zu einer Temperatur von 400°C unzerstört verdampft oder wenigstens in detektierbare Spaltprodukte zerfällt, die bis 400°C verdampfbar sind.

Anwendungsbeispiele für auftrennbare Stoffgemische sind Fettsäuremethylester, Alkanoide und verschiedenste Drogen.

1.2. Die Säule

Gaschromatographische Trennungen werden normalerweise bei erhöhten Temperaturen ausgeführt, so daß eine **thermostatisierte Heizung** der Säule erforderlich ist.

Säulenrohre werden aus verschiedenen Materialien hergestellt: Glas, Kunststoff und Metalle wie Kupfer, Kupfer-Nickel und Edelstahl. Metall-Säulen werden in der Regel vorgezogen, weil sie inert (= reaktionsträge) und robust sind und gute thermische Eigenschaften besitzen.

1.2.1. Kapillarsäulen

Kapillarsäulen (so wie unser Chromatograph sie besitzt) , oder auch Golay-Säulen, sind Trennsäulen höchsten Auflösungsvermögens. Sie unterscheiden sich im Aufbau von einer gepackten Säule

dadurch, daß sie keine „Packung“ enthalten, sondern einen „offenen Längskanal“ besitzen.

Diese Säulen haben im allgemeinen eine Länge von 20 - 100 m und einen Durchmesser von 0,1 - 1 mm.

Man unterscheidet heute zwei Typen von Kapillarsäulen:

1. „Dünnschichtkapillarsäulen“

Sie haben die flüssige Phase in einem dünnen Film (ca. 1-3 μ) direkt auf der inneren Rohroberfläche (siehe die von uns verwendete Säule)

2. „Dünnschichtkapillarsäule“

Diese Säule eignet sich für qualitative Auswertungen, da sie, durch ihre hohe Anzahl „theoretischer Böden“, eine sehr gute Trennung von komplexen Stoffgemischen gewährleistet, d.h. bei dieser Säule wird zunächst eine dünne Schicht feines Trägermaterial auf die innere Rohroberfläche gebracht und dann erst die Belegung mit flüssiger Phase vorgenommen. Eine quantitative Auswertung wäre auf Grund ihres geringen Fassungsvermögens nicht oder nur schlecht möglich. Der Begriff „theoretischer Boden“ rührt von der Anzahl der Schichten, die auf die Säule aufgetragen werden, her.

1.3. Trägergas

1.3.1. Stickstoff

Stickstoff ist einfach zu beziehen, billig, ungefährlich und läßt sich leicht reinigen. Es ist reaktionsträge und reagiert nicht mit dem Stoffgemisch.

1.4. Detektoren

Aus der Säule kommende Verbindungen können auf verschiedene Weise angezeigt werden. Wenn Wasserstoff als Trägergas benutzt wird, kann er am Säulenende abgebrannt werden. Einige Verbindungen können dann an der Farbe erkannt werden, die sie in der Flamme erteilen. Durch Messen der Flammenhelligkeit mit einem photoelektrischen Gerät in gleichen Zeitabständen kann eine Kurve gezeichnet werden, die eine quantitative Bestimmung der einzelnen Komponenten einer Mischung ermöglicht.

Detektoren sind äußerst wichtig für gaschromatographische Trennungen. Einer der einfachsten Detektoren ist der **Janak-Detektor**. Hierbei wird reines Kohlendioxid als Trägergas benutzt, das nach dem Verlassen der Säule durch eine konzentrierte Kaliumhydroxid-Lösung geleitet wird, von der es leicht aufgenommen wird. Gasförmige Substanzen, die sich nicht in der Kalilauge lösen, werden in einer kalibrierten Gasbürette gesammelt. Das Volumen (und damit die Menge) jeder Komponente wird unter Atmosphärendruck gemessen.

Der Janak-Detektor ist ein **Integral-Detektor**.

Die meisten käuflichen Detektoren sind im Gegensatz dazu **Differential-Detektoren**. Sie sind so konstruiert, daß sie keinen Ausschlag geben, wenn reines Trägergas durch sie strömt. Sobald aber eine Komponente von der Säule her sie erreicht, geben sie einen Ausschlag, der direkt proportional entweder der Menge oder der Konzentration der betreffenden Komponente ist. Wenn die Komponente den Detektor verlassen hat, geht der Ausschlag wieder auf Null zurück, bis eine weitere Komponente ankommt.

1.4.1. Flammen-Ionisations-Detektor

Bei diesem Detektor wird Stickstoff als Trägergas benutzt, Wasserstoff und Sauerstoff werden am Säulenausgang zugefügt und zur Herstellung einer kleinen Flamme (Knallgasreaktion) verwendet.

Diese Knallgasflamme (einziges Nebenprodukt ist Wasser) brennt in einem elektrischen Feld mit einigen 100 Volt. Zwischen Kathode und Anode fließt solange kein Strom, bis ein Probemolekül (= Edukt-Molekül) in der Flamme verbrennt. Die entstehenden Kationen führen dann zu einem messbaren Stromfluss. Dieser wird gemessen und das Signal mittels Verstärker amplifiziert.

Der FID reagiert sehr empfindlich auf organische Verbindungen, aber er ist unempfindlich gegenüber Wasser sowie Druckschwankungen und Schwankungen in der Strömungsgeschwindigkeit des Trägergases. Der Detektor ist ideal für eine allgemeine Anwendung, und er dürfte der zur Zeit am meisten verwendete Detektor überhaupt sein.

1.4.2. Verstärker und Schreiber

Nahezu alle Detektor-Arten bewirken ein elektrisches Signal, wenn eine Komponente im Anschluß an die Kolonne den Detektor passiert. Diese Signale sind sehr schwach, sie werden zunächst zu einem Verstärker geleitet, bevor sie zum Schreiber gelangen. Schreiber bestehen aus zwei Hauptteilen: Ein Papierstreifen, der sich von einer Rolle aus mit einer vorgewählten Geschwindigkeit weiterbewegt; eine bewegliche Schreibfeder, deren Bewegung durch das vom Verstärker kommende Signal gesteuert wird.

Die Trennung eines Substanzgemisches macht sich dann dadurch bemerkbar, daß auf dem Papier eine Reihe von **Peaks** entsteht.

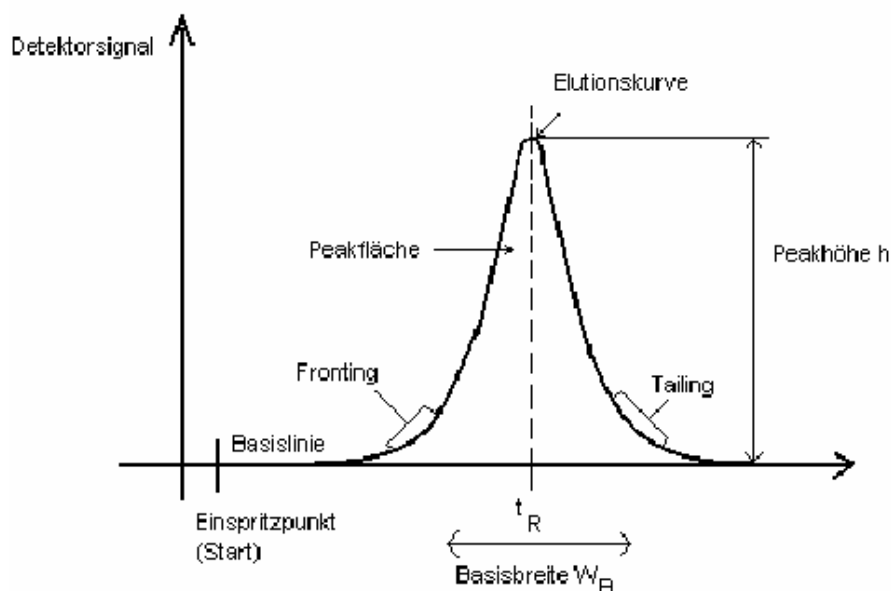
Dieses Ergebnis wird **Chromatogramm** genannt. Indem man statt des Schreibers einen sogenannten **Integrator** benutzt, können nicht nur die Peaks in der oben beschriebenen Weise dargestellt, sondern gleichzeitig auch die Zeit der Peaks und die Fläche unter diesen (für spätere Berechnungen) ausgegeben werden.

1.5. Das Chromatogramm

Als Ergebnis der Gaschromatographie erhält man ein Gaschromatogramm, das qualitativ und quantitativ auszuwerten ist. Voraussetzung dazu ist, daß die Analysen bei gleichbleibenden äußeren Bedingungen durchgeführt werden. Jedes Chromatogramm muß daher mit einer Reihe von zusätzlichen Angaben versehen werden, um die Ergebnisse reproduzieren zu können.

Es gehören dazu: Trennsäule, Trägermaterial, Trennflüssigkeit, Temperatur, Trägergas, Strömungsgeschwindigkeit und Detektor.

Ein typisches Chromatogramm wird wie folgt dargestellt:



(Quelle: Internet)

1.6. Auswertung

Die Analyse beginnt mit der Probenahme. Danach folgt die Auswahl der Arbeitsweise und der einzelnen Baugruppen, wie Säule, Detektor usw.

Mit dem Eingeben der Probe beginnt der gaschromatographische Teil der Analyse. Es folgt das Trennen in der Säule, schließlich das Messen im Detektor und das Registrieren mit Hilfe elektrischer Zwischenglieder auf dem Schreiber (bzw. Integrator).

1.6.1. Identifizierung mittels Testsubstanzen (= qualitative Analyse)

Bei Standardbedingungen ist die Zeit, die eine Verbindung zur Durchwanderung der Säule benötigt konstant und wird **Retentionszeit** genannt. Diese Zeit dient zur qualitativen Auswertung der zu trennenden Stoffe im Gemisch.

Zur Identifizierung muß man die Analyse mit einem bekannten Testgemisch durchführen. Hierbei werden der unbekannt Probe Testsubstanzen zugesetzt oder die Testsubstanzen unter identischen Analysenbedingungen untersucht. Das Auftreten eines neuen Peaks bzw. eine veränderte Retentionszeit zeigen an, daß die unbekannte Verbindung und die Testsubstanz nicht identisch sind. Andernfalls besteht die Möglichkeit der Gleichheit beider Verbindungen.

Gute Trennleistungen, d.h. schmale Peaks, erhöhen die Aussagekraft derartiger Befunde. Die Identifizierung mittels Testsubstanzen ist eine einfache und wirksame Methode.

Vorkenntnisse über die Probe sind allerdings erforderlich.

Da wir uns im Praktikum auf die qualitative Analyse von Stoffgemischen beschränken, werde ich auf die Durchführung einer quantitativen Messung nicht weiter eingehen.

2. Bestimmung der Fettsäuren in Speiseölen mit Hilfe der GC

2.1. Was sind Fettsäuren

Fettsäuren sind Ketten aus Kohlenstoffatomen, die nach ihrer Länge und dem Sättigungsgrad unterschieden werden. Beide Parameter beeinflussen die physikalischen und physiologischen Eigenschaften eines Fettes. Die Kettenlänge beeinflusst die Verdaulichkeit eines Fettes. Langkettige Fettsäuren sind schwerer verdaulich, ihr Schmelzbereich liegt höher als bei kurzkettigen Fettsäuren. Der Sättigungsgrad ist ein Maß für die Bereitschaft, mit anderen Substanzen eine Verbindung einzugehen, und er bestimmt die Konsistenz eines Fettes. Gesättigte Fettsäuren haben nur einfache Verbindungen zwischen den einzelnen Kohlenstoffatomen, ungesättigte Fettsäuren haben auch Doppelbindungen (einfach ungesättigt bedeutet eine Doppelbindung, mehrfach ungesättigt zwei oder mehr Doppelbindungen). Fettsäuren können an ihre Doppelbindung eine weitere Substanz anbinden, sie sind reaktionsfreudiger als gesättigte Fettsäuren und auch leichter verderblich.

Flüssige Fette haben einen hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, da durch die Doppelbindungen der C-Atome in den apolaren Schwänzen und die dadurch verursachten Verzweigungen die van-der-Waals-Kräfte nur schwach wirken. Feste Fette beinhalten mehr gesättigte Fettsäuren (hier können die van-der-Waals-Kräfte stärker wirken, da die Schwänze nicht auf Grund von Doppelbindungen der C-Atome abknicken).

2.1.1. Essentielle Fettsäuren

Ungesättigte Fettsäuren werden an Hand der Stelle, wo sich die Doppelbindung in der Kette befindet, in essentielle und nicht essentielle Fettsäuren unterschieden. Essentielle Fettsäuren

müssen wir mit der Nahrung aufnehmen, da sie vom Menschen nicht selbst gebildet werden können, aber lebensnotwendig sind. Essentielle Fettsäuren sind Linolsäure

(Aufnahmeempfehlung:

10g/Tag) und Linolensäure (Aufnahmeempfehlung: 1g/Tag).

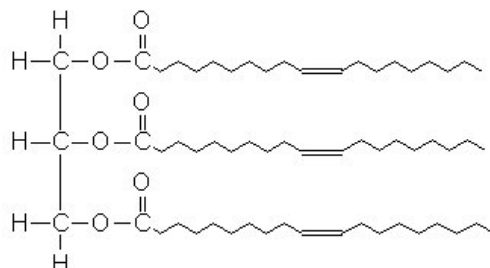
Essentielle Fettsäuren sind in nennenswerten Mengen in Seefischen, pflanzlichen Ölen und Getreidekeimölen (z. B. Distelöl, Sesamöl, Leinöl, Maiskeimöl, Weizenkeimöl,

Sonnenblumenöl

etc.) enthalten.

2.2. Triglyceride

Triglyceride sind Ester aus Glycerin mit jeweils drei Fettsäuren (Carbonsäuren)



Typisches Triglycerid des Sonnenblumenöls (Quelle Internet)

2.3. Methylierung der Fettsäuren

Bei der Bestimmung der Fettsäuren mittels Gaschromatographie ergibt sich zunächst folgendes Problem: Fettsäuretriglyceride (welche die natürliche Speicherform des Körpers sind und als solche auch in den zu untersuchenden Speiseölen vorkommen) sind schwer flüchtig, die Gaschromatographie erfordert aber leichtflüchtige Substanzen. Ein Ausweg ist die Umesterung der Triglyceride zu Methylestern mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH). Dabei werden die Esterbindungen zwischen dem Glycerin und den drei Fettsäuren gelöst (Esterhydrolyse) und eine Methylgruppe an das freie Ende der Fettsäuren angehängt.

2.4. Material zur Gaschromatographie der Fettsäuren in Speiseölen

2.4.1. Biologisches Untersuchungsmaterial

- Olivenöl der Firma „la Capannina“ aus Laborbestand
100g enthalten: 91,3 Fett,
g davon
13,7 gesättigte Fettsäuren
g
68,3 einfach ungesättigt
g
mehrfach ungesättigt
9,3g

- Distelöl der Firma „Färber“ aus Laborbestand
100g enthalten: 91 Fett, davon
g
gesättigte Fettsäuren
9g
14 einfach ungesättigt
g
68 mehrfach ungesättigt
g

- Keimöl der Firma „Mazola“ aus Laborbestand
100g enthalten: 99 Fett, davon
g
12 gesättigte Fettsäuren
g
28 einfach ungesättigt
g
59 mehrfach ungesättigt, davon
g Linolsäure
57
g

2.4.2. Chemikalien

- Methylester **gesättigter** Fettsäuren:

Myristinsäuremethylester für GC: $C_{15}H_{30}O_2$ / M=242,40 g/mol / Reinheit >99%

von ROTH aus Laborbestand

Palmitinsäuremethylester für GC: $C_{17}H_{34}O_2$ / M= 270,46g/mol / Reinheit >95%

von ROTH aus Laborbestand

Stearinsäuremethylester für GC: $C_{19}H_{38}O_2$ / M= 298,51g/mol / Reinheit >99%
von ROTH aus Laborbestand

➤ Methylester **ungesättigter** Fettsäuren:

Ölsäuremethylester für GC: $C_{19}H_{36}O_2$ / $C_{19:1(9)}$ M=296,50 g/mol / Reinheit >96%
von ROTH aus Laborbestand

Linolsäuremethylester für GC: $C_{19}H_{34}O_2$ / $C_{19:2(9;12)}$ M= 294,50g/mol / Reinheit unbekannt
von ROTH aus Laborbestand

Stearinsäuremethylester für GC: $C_{19}H_{32}O_2$ / $C_{19:3(9;12;15)}$ M= 292,51g/mol / Reinheit >99%
von ROTH aus Laborbestand

- Seite 6 -

Laurinsäure (zum Testen der TMSH-Lsg.): $C_{12}H_{24}O_2$ / M= 200,32g/mol von MERCK

- Gaskartuschen der Firma Linde aus Köln (teilweise Leihgut): Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff (Qualität 5.0 99,9% rein)
- tert-Butylmethylether (BME) für Flüssigkeitschromatographie der Firma Merck aus Laborbestand.
 $(CH_3)_3CoCH_3$ / $\delta = 0,74$ kg/l / M = 88,15 g/mol
- Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) aus Laborbestand (von Gruppe A eine Woche zuvor mehrmals hergestellt) 0,2 mol/l in MeOH

2.4.3 Geräte

Chromatograph HP 5890 Series II Gaschromatograph mit Flammenionisations-
:
detektor

Schreiber: HP 3394 Integrator

Säule: Kapillarsäule von CS GmbH mit 0,33 μ m dickem Flüssigkeitsfilm
(quervernetztes, 5% Phenylmethylsilicon)
Typ: FS-FFAP-CB-0,25
Länge: 25m
ID: 0,25mm / AD:0,38mm
max. Temp: 220°C



Gaschromatograph HP 5890 und Integrator HP 3394 (Quelle: Internet)

- Analysenwaage (Firma Sartorius, Typ A 200S, genau bis 0,0001g, max. 200g)

2.4.4. sonstiges Material

- Mikroliterspritze (5µl) der Firma Hamilton Bondaduz AG (#7005)
- Septumkappen HP Septa BTO 11mm (high temperatur, low bleed)
- Schnappdeckelgläser + passende Deckel
- Mikroliterpipetten + passende Spitzen
- Schutzbrille und –handschuhe

2.5 Versuchsvorbereitung

2.5.1. Erwartungen

Wir haben uns dazu entschlossen, im Rahmen unseres zweitägigen Praktikums eine qualitative Analyse der Fettsäuren in drei verschiedenen Speiseölen durchzuführen. Die dazu verwendete stationäre Phase in der Säule (s.o.) hat apolare Eigenschaften (und ist bis 325°C hoch zähflüssig) wodurch die Fettsäuremethylester im zu trennenden Stoffgemisch länger verweilen.

Wir werden dann mit dem Integrator zunächst die Retentionszeiten verschiedenster bekannter Fettsäuren (bzw. deren Methylester) bestimmen, in der Hoffnung nach der chromatographischen Analyse der Speiseöle Übereinstimmungen in den Peaks (und damit die entsprechende Fettsäure) nachzuweisen. Als Lösungsmittel verwenden wir tert-Butylmethylether, welcher auf Grund seiner apolaren Eigenschaften hierzu bestens geeignet ist.

Gleichzeitig werden wir die Sauberkeit der verschiedenen TMSH-Lösungen, welche von Gruppe A hergestellt wurden, mit Hilfe des Gaschromatographen überprüfen.

2.5.2. Vorbereiten des Chromatographen

Von der Firma HP wurden folgende Schritte zur Vorbereitung des Chromatographen vorgeschlagen (Quelle: Internet):

How to Operate a HP-5890 series II Gas Chromatography

1.- Before starting the first run, the whole system must be checked including the following components:

- a.- Helium, hydrogen, nitrogen, and compressed air cylinder must have enough pressure.
- b.- Hp-5890 must display System ready, and the integrator must have green light on indicating it is ready.

2.-Set the oven at desired temperature by following this sequence.

- a.-Press key OVEN TEMPERATURE to see in the HP5890 screen the current temperature and the maximum temperature already set.
- b.-Press INIT TEMP to set the initial temperature at which the oven will be at the injection time.
- c.-Press INIT TIME to set the time in which the oven must remain at the initial temperature.
- d.-Press RATE to set the temperature increase rate.
- e.-Press FINAL TEMP to set the maximum temperature oven will reach.

f.- Press FINAL TIME to set the time you want the oven remains in the maximum temperature.

g.-Press EQUIB TIME to set the time you want the oven takes to stabilize in the initial temperature.

NOTE:The valid set point for a flame ionization detector is 0 to 450 centigrades degree.

Vorgenommene Einstellungen:

Gasflusseinstellungen am GC: Sauerstoff: 280kPa
Septum page: 13ml/min
Vordruck: 8kPa
Split:
1ml/min
Wasserstoff: 110 kPa
Stickstoff: 400kPa

Programmierung des GC: Oven temp: 200°C
Int Value: 200°C
Int time: 0 (da kein Temperaturgradient gefahren wird*)
Rate: 0
(s.o.)
Final temp: 200°C
Inj A temp: 220°C (damit alle Stoffe gleichzeitig verdampfen)
Det a temp: 220°C (entspricht der Temperatur am
Einspritzblock,
damit nichts kondensiert)
Equip time 25min (es wird manuel gestoppt, sobald alle Stoffe den
Detektor passiert haben)

Programmierung des Integrators Zero: 0,049 (Erfahrungswert)
Attenuation: 4 (am GC auf 0)
Chartspeed: 0,5
Peak width: 0,16
Trash hold:
4
Area reject: 0 (keine Mindestfläche zur Berechnung der
Fläche unter den Peaks)

* Die Nutzung der Temperaturunterschiede, bei welcher die zu testenden Verbindungen in die Gasphase übergehen (= Vortrennung durch Destilationsverhältnisse) würde nur bei Gemischen mit niedrigen Fettsäuren (z.B. Butter) Sinn machen.

2.6. Versuchsdurchführung

- 1. Versuchstag -

2.6.1. Erstellen eines Chromatogramms von BME

1. Gaschromatograph und Integrator werden, nachdem die Zufuhr der Gase überprüft wurde, eingeschaltet.
2. Einspritzblock, Detektor und Ofen werden vorgeheizt (Programmierung siehe oben).
3. Die Wasserstoff- und Sauerstoffzufuhr für den FID aufdrehen und die Flamme zünden
4. Den Integrator programmieren (s.o.).

5. In ein Schnappdeckelglas wird unter dem Abzug (Schutzbrille und –handschuhe) mit Hilfe einer Pipette etwas BME gegeben.
6. Wenn der Ofen des Chromatographen die gewünschte Temperatur erreicht hat, wird das Signal (für die Nulllinie) auf den derzeitigen Stand eingestellt.
7. Die Mikroliterspritze wird einige Male mit BME-Lsg. aus dem Schnappdeckelglas durchgespült, bevor 1µl (reproduzierbare Menge) aufgezogen und über das Septum mit dem Trägergas (= Stickstoff) gemischt werden. Der Chromatograph verwendet die sogenannte "split injection", d.h. dass der Gasstrom sich aufsplittet und nur ein ganz geringer Teil (~10%) der Probe wirklich auf den Detektor treffen (im Gegensatz zu der sogenannten "gepackten Säule").
8. Sobald die gesamte Probenmenge im Gerät ist, wird die Analyse am Chromatographen (und am Integrator) gestartet.
9. Die Spritze wird nach ~10sec aus dem Septum gezogen und wiederum gut durchgespült
10. Sobald ein Peak für BME erkannt wird, kann der Vorgang durch betätigen der STOPP-Taste am Integrator beendet werden

Das Gaschromatogramm (gestoppt nach ~ 6 min) von BME sieht folgendermaßen aus:

[Graph fehlt]

Man erkennt deutlich einen Peak nach 4.35 Minuten, was bedeutet, dass der tert-Butylmethylether nach dieser Zeit die Säule durchlaufen und im Flammenionisationsdetektor erfasst wurde.

Damit auf den weiteren Chromatogrammen der Peak des Lösungsmittels (BME) nicht beachtet wird, sprich Retentionszeit, Fläche unter dem Peak usw. nicht mit in die prozentuale Berechnung der einzelnen Stoffanteile mit einbezogen werden, gibt man am Integrator den sogenannten **Integrationsbefehl**, wobei die ersten 5min nicht mit in die Berechnung der entsprechenden Parameter der Peaks mit einfließen sollen.

2.6.2. Erstellen eines Chromatogramms von bekannten Fettsäuren

Für die Erstellung eines Chromatogramms bekannter Fettsäuren verwenden wir die entsprechenden Methylester (siehe *Chemikalien* S.6).

11. Auf der Analysenwaage werden 10mg jedes festen Fettsäuremethylesters in ein Schnappdeckelglas quantitativ eingewogen, bzw. 10µl (bei flüssigen Fettsäuremethylestern) mit Hilfe einer Mikropipette in das Schnappdeckelglas überführt.
12. Unter dem Abzug werden pro Fettsäuremethylester 1ml BME mit Hilfe einer Pipette in das Schnappdeckelglas überführt (entspricht bei sechs Verbindungen 6ml).
13. Nachdem die Mikroliterspritze 5x durchgespült wurde, wird 1µl des Gemisches über das Septum eingespritzt
14. Ist das gesamte Material eingespritzt, wird die Messung am Integrator gestartet.
15. Nach ~10sec die Spritze entfernen und gut durchspülen
16. Sobald alle Peaks für BME und die entsprechenden Fettsäuren erschienen sind (= 7), kann die Messung beendet werden.

Das Chromatogramm der gesättigten und ungesättigten Fettsäuremethylester (gestoppt nach 30 min) sieht folgendermaßen aus:

[Graph fehlt]

- 2. Versuchstag -

2.6.3. Beurteilung & Erläuterung des Chromatogramms bekannter Fettsäuren

Die Fettsäuren hatten folgende Retentionszeiten:

Fettsäure	Retentionszeit (in min)
Myristinsäure C ₁₄	7,53
Palmitinsäure C ₁₆	10,53
Stearinsäure C ₁₈	16,24
Ölsäure C _{18:1}	17,07
Linolsäure C _{18:2}	19,08
Linolensäure C _{18:3}	22,40

Insgesamt ist festzuhalten, dass die Retentionszeit (also die Verweilzeit in der apolaren stationären Phase) mit der Anzahl der C-Atome und der Doppelbindungen zunimmt. Dies liegt daran, dass die Fettsäuren apolarer sind, je länger ihre Kette an C-Atomen ist. Dann wirken die van-der-Waals Kräfte zwischen Fettsäure und stationärer Phase immer stärker und halten das Molekül länger fest.

Obwohl von allen Fettsäuren die gleiche Menge in der Probelösung enthalten war (10µl = 10mg), sind die Peaks (und der daraus ableitbare Anteil des Stoffes) unterschiedlich hoch. Das liegt wahrscheinlich daran, dass sich die Dichten der verschiedenen Stoffe trotz gleicher Masse unterscheiden können und somit die prozentualen Anteile verfälscht werden. Es gab außerdem leichte Verunreinigungen (siehe Chromatogramm bei t = 8,16 und 23,18).

Es wäre nun möglich einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der C-Atome und der Retentionszeiten innerhalb dieser homologen Reihe der Methylester der Fettsäuren graphisch herzustellen, um damit den im weiteren Verlauf bestimmten Retentionszeiten von unbekanntem Fettsäuren (sofern diese nicht glücklicherweise mit der Retentionszeit einer bekannten Fettsäure übereinstimmen) eine Anzahl an C-Atomen zuzuordnen. Sollte dies nach der Auftrennung der unbekanntem Fette im späteren Verlauf notwendig werden, so werde ich diesen graphischen Zusammenhang herstellen.

2.6.4. Gaschromatographische Analyse der fertigen TMSH-Lösungen

Von Gruppe A wurden vor einer Woche zwei verschiedene Aliquots an TMSH-Lsg. mit Hilfe des Ionentauschers (Amberlyst) und Trimethylsulfoniumjodid (+ NaCl und MeOH) hergestellt. Diese sollen nun chromatographisch auf ihre Reinheit überprüft werden. Denn bei hoher Reinheit dürften möglichst nur Peaks vom Lösungsmittel (BME) und dem TMSH vorhanden sein. Für jede TMSH-Probe sollen 10µl Fett (wir verwenden Laurinsäure) mit 250µl BME

gelöst werden und anschließend nach Zusatz von 150µl TMSH-Lsg. dann 2µl des Gemisches in den Chromatographen gegeben werden. Für zwei Ansätze führen wir also folgende Schritte durch:

17. Den Integrationsbefehl am Integrator aufheben
18. 20 mg Laurinsäure auf der Analysenwaage quantitativ einwiegen und in ein Schnappdeckelglas geben.
19. Unter dem Abzug (mit Schutzbrille und –handschuhen) 500µl BME in dasselbe Schnappdeckelglas pipettieren und das Fett lösen (= Lösung¹)
20. In zwei neuen Schnappdeckelgläsern werden nun je 260µl von Lösung¹ mit 150µl TMSH mit Hilfe einer Mikropipette pipettiert und gemischt (= Testlösung 1+2).
21. Von Testlösung 1 werden 2µl mit Hilfe der Mikroliterspritze (nachdem diese gut durchgespült wurde) über das Septum in den Chromatographen gespritzt und die Messung am Integrator gestartet. Um Vergleichswerte zu ermitteln werden nun im Abstand von 1min dreimal je 2µl nachgespritzt.
22. Nachdem alle Peaks von BME und TMSH gezählt wurden (= 6) kann die Messung am Integrator beendet werden.

Chromatogramm der 1. Testlösung:

[Graph fehlt]

Chromatogramm der 2. Testlösung

[Graph fehlt]

2.6.5. Beurteilung der Chromatogramme der TMSH-Lösungen

Die Ergebnisse der Testlösungen sind zufriedenstellend. Alle Peaks lassen sich einem Paar von BME und TMSH-Lsg. zuordnen (siehe Chromatogramme) und die Beziehungen in der Fläche unter den Peaks im jeweiligen BME/TMSH-Paar sind ebenfalls stimmig (siehe neonmarkierte Flächenangaben).

Abgesehen von leichten Verunreinigungen, welche jedoch prozentual unter 0,039% liegen (Test-lösung 1), sind meiner Meinung nach beide Lösungen für die folgende Umesterung der Fettsäuren in Speiseölen verwendbar.

2.6.6. Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren in Speiseölen

23. Integrationsbefehl am Integrator eingeben (in den ersten 5 min sollen die Parameter eventuell auftretender Peaks nicht mit in die Endabrechnung mit einfließen)
24. In einem Schnappdeckelglas werden mit Hilfe einer Mikropipette 10µl Olivenöl, 250µl BME (unter dem Abzug) und 150µl TMSH gelöst (=Testansatz).

25. Die Mikroliterspritze wird einige Male durchgespült, bevor 2µl des Testansatzes aufgezogen und über das Septum in den Chromatographen gespritzt werden.
26. Die Messung am Integrator starten
27. Die Spritze nach ~ 10sec aus dem Gerät entfernen und wiederum durchspülen.
28. Nach ~30min kann die Messung gestoppt werden, da nach dieser Zeit keine Peaks von enthaltenen Fettsäuremethylestern erwartet werden.
29. Schritt 23-27 mit Distel- und Keimöl wiederholen.

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse der drei Speiseöle befinden sich auf den folgenden Seiten.

[mehrere Graphen fehlen]

2.6.7. Auswertung der Chromatogramme der drei Speiseöle

Zunächst vergleiche ich die Retentionszeiten der bekannten Fettsäuremethylester (S. 11f) mit den gemessenen Retentionszeiten von unbekanntem Fettsäuremethylestern in den drei Speiseölen, um bei Übereinstimmungen die jeweiligen Fettsäuren den Speiseölen zuzuordnen:

Olivenöl

Methylester	ermittelte Retentionszeit (min)	Retentionszeit einer Verbindung beim Olivenöl
Myristinsäure C ₁₄	7,53	6,79
Palmitinsäure C ₁₆	10,53	10,37
Stearinsäure C ₁₈	16,24	15,99
Ölsäure C _{18:1}	17,07	16,89
Linolsäure C _{18:2}	19,08	18,80
Linolensäure C _{18:3}	22,40	-

Bei den Fett – markierten Zeitpaaren der bekannten und unbekanntem Fettsäuremethylester bin ich mir relativ sicher, dass eine Übereinstimmung des Stoffes vorliegt, bzw. dieser im Olivenöl nachgewiesen wurde. Der Unterschied von über einer Minute zwischen der Retentionszeit des ersten deutlichen Peaks beim Olivenöl (siehe oben) und der ermittelten Zeit für Myristinsäure ist meiner Meinung nach zu hoch um für einen eindeutigen Nachweis herzuhalten.

Vergleicht man die zu erwartenden Werte für gesättigte, einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren im Olivenöl (siehe S. 6), so ergibt sich ein sehr ähnliches Bild zu dem uns vorliegenden Chromatogramm. Denn die einfach ungesättigten Fettsäuren (hier Ölsäure) sollten laut Hersteller 2/3 des Fettanteils ausmachen. Betrachten wir uns den prozentualen Flächeninhalt des Peaks, welcher Ölsäure nachweist (siehe Chromatogramm S. 16), so wird ein Anteil von 76,82% an der Gesamtfläche der Peaks angegeben. Die gesättigten und

mehrfach ungesättigten Fettsäuren sollen laut Hersteller einen geringeren Anteil am Gesamtfettgehalt einnehmen, was sich auch in den gemessenen Peaks widerspiegelt.

Keimöl

Methylester	ermittelte Retentionszeit (min)	Retentionszeit einer Verbindung beim Olivenöl
Myristinsäure C ₁₄	7,53	6,75
Palmitinsäure C ₁₆	10,53	10,38
Stearinsäure C ₁₈	16,24	16,01
Ölsäure C _{18:1}	17,07	16,91
Linolsäure C _{18:2}	19,08	18,98
Linolensäure C _{18:3}	22,40	22,12

Bei den Fett – markierten Zeitpaaren der bekannten und unbekanntenen Fettsäuremethylester ist die Situation ähnlich wie beim Olivenöl, da sich eigentlich alle Retentionszeiten bis die des ersten Stoffes relativ deutlich auf eine Fettsäure beziehen lassen.

Überprüfen wir die Angaben des Herstellers (siehe S. 6) so sollten gesättigte Fettsäuren prozentual am wenigsten vorkommen, was durchaus der Fall ist (siehe Fläche von Palmitin- und Stearinsäure im Chromatogramm S. 17). Einfach ungesättigte Fettsäuren (hier Ölsäure) sollten dann prozentual mehr als doppelt soviel Anteil am Gesamtfett einnehmen, was ebenfalls der Fall ist (29,9% im Gegensatz zu ~14% von Palmitin- und Stearinsäure). Nochmal die doppelte Menge sollten prozentual die mehrfach ungesättigten Fettsäuren aufweisen, was im Fall von Linol- und Linolensäure durchaus der Fall ist (~56%). Allein von diesem Anteil sollte der überwiegende Teil laut Hersteller Linolsäure sein (~96% der mehrfach ungesättigten Fettsäuren), was ebenfalls zutrifft (55% Linolsäure, 0,9% Linolensäure).

Distelöl

Methylester	ermittelte Retentionszeit (min)	Retentionszeit einer Verbindung beim Olivenöl
Myristinsäure C ₁₄	7,53	6,72
Palmitinsäure C ₁₆	10,53	10,31
Stearinsäure C ₁₈	16,24	15,91
Ölsäure C _{18:1}	17,07	16,76
Linolsäure C _{18:2}	19,08	18,85
Linolensäure C _{18:3}	22,40	-

Wie bei den vorangegangenen Chromatogrammen so findet sich auch hier ein nicht unerheblicher Peak ca. 1min vor dem repräsentativ ermittelten Peak von Myristinsäure. Ich bin mir dennoch nicht sicher, ob die Abweichung zwischen den Retentionszeiten nicht zu hoch ist.

Der Hersteller gibt für das Distelöl einen niedrigen Gehalt an gesättigten Fettsäuren an, was sich durchaus im Chromatogramm widerspiegelt (siehe Fläche des Peaks für Palmitinsäure mit 6,5% des Gesamtfettanteils). Die einfach ungesättigten Fettsäuren sollten einen etwas höheren Anteil haben, was sich ebenfalls durch den prozentualen Anteil der nachgewiesenen Ölsäure (13,8%) abzeichnet. Den größten Anteil sollen dann wieder die

mehrfach ungesättigten Fettsäuren einnehmen, was durchaus anhand des Prozentsatzes der Linolsäure im Distelöl nachgewiesen ist (73,7%).

3. *Fazit*

Als Resumé der Praktikumseinheit zur Gaschromatographie können wir sagen, dass alle angestrebten Teilversuche, sprich das Erstellen eines Chromatogramms von bekannten Fettsäuremethylestern, die Reinheitskontrolle von TMSH-Lösungen, sowie die Bestimmung unbekannter Fettsäuren in Speiseölen (mit anschließender Kontrolle der Herstellerangaben) durchaus von unserer Seite zufriedenstellend verlaufen ist.

4. *Quellenverzeichnis*

D.Abbott / R.S. Andrews
Chromatographische Methoden
Umschau Verlag Breidenstein KG, Frankfurt am Main
Erscheinungsjahr 1973

Gottwalt / Paff
Physikalisch-chemisches Praktikum
VCH Verlag GmbH

Deutsches Arzneibuch 1996
Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart
Dietrich Jentzsch

Gaschromatographie
Grundlagen/Anwendung/Methoden
Frankh'sche Verlagshandlung Stuttgart
Erscheinungsjahr 1968

Erwin Wiederholt / Rudolf Engler
Gas-Flüssig-Chromatographie im Chemieunterricht
Aulis Verlag Deubner & KG Köln
Erscheinungsjahr 1978

W. Rödel / G. Wölm
Grundlagen der Gaschromatographie
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften
Erscheinungsjahr 1982

Audiovisuelles Lehrprogramm
Dr. Klaus Fuisting
i.A. des VDBIOL