



FAME-Verteilung

Hochdurchsatz mit Intuvo 9000

Application Note

Lebensmittel & Umwelt



KURZFASSUNG

In dieser Application Note wird die Hochdurchsatz-Analytik der Fettsäureverteilung in Lebensmitteln anhand eines FAME-Standards mit 37 Komponenten mit dem Intuvo 9000 GC-System von Agilent Technologies demonstriert. Die Detektion erfolgte mit FID und MSD. Da die Laufzeit dieser Messung nur ca. 20 Minuten beträgt, bietet der Intuvo gegenüber Laufzeiten von Standard-GCs mit bis zu 80 Minuten eine signifikante Zeitersparnis.



EINFÜHRUNG

Die Bestimmung der Verteilung von freien und gebundenen Fettsäuren, vorrangig im Lebensmittelbereich, ist eine weitverbreitete Analytik. So muss z.B. bei der Nährwertkennzeichnung von verpackten Lebensmitteln der Anteil der gesättigten Fettsäuren angegeben werden und für Olivenöl sowie Säuglingsnahrung gibt es Grenzwerte für trans-Fettsäuren [1,2].

Denn für die Verbraucher sind längst nicht mehr nur die unmittelbar aus dem Gesamtfettgehalt resultierenden Nährwerte der Lebensmittel von Interesse. Bereits seit längerem ist bekannt, dass ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren im Kontrast zu ihren gesättigten Gegenstücken deutlich positive Effekte auf die Gesundheit der Verbraucher haben können [3,4]. In jüngerer Vergangenheit gesellte sich zu diesem Wissen noch die Tatsache hinzu, dass auch ungesättigte Fettsäuren in trans-Konfiguration erhebliche gesundheitliche Risiken bergen können. Letztere entstehen insbesondere während der industriellen Härtung von Fetten, die z.B. bei der Herstellung von Margarine üblich ist. Der Verzehr dieser sogenannten trans-Fettsäuren, bzw. ihrer Glycerin-Ester wird heutzutage als wesentlicher Mitverursacher koronarer Herzkrankheiten angesehen, welche ihrerseits wiederum als häufigste Todesursache in den Industrienationen gelten [5-7]. Zur gaschromatografischen (GC) Analytik werden die Fettsäuren mittels Veresterung in Fettsäuremethylester (FAME) überführt, um ihnen die notwendige Flüchtigkeit zu verleihen. Eine möglichst vollständige, basislinienseparierte Trennung der Komponenten ist dabei auch mit moderner Säulentechnologie noch eine Herausforderung. Während die Fettsäuremethylester der gesättigten Fettsäuren eine homologe Reihe ähnlich der n-Alkane bilden, beinhalten ihre ungesättigten Gegenstücke C=C Doppelbindungen, welche in unterschiedlicher Anzahl sowie jeweils in cis- und trans-Konfiguration vorliegen können. Dies resultiert in einer Vielzahl sehr ähnlicher Komponenten mit fast identischem Trennverhalten. Gegenwärtige GC Methoden zur Trennung von FAME stützen sich daher häufig auf verhältnismäßig lange Kapillarsäulen (60 - 100 m) mit Laufzeiten bis zu 60 oder 80 min. Durch die Verwendung des Intuvo 9000 von Agilent können höhere Aufheizraten die Laufzeit verkürzen. Die vorgestellte Methode zur FAME-Analytik demonstriert anhand eines 37 Komponenten-Mix zwischen C₄ und C₂₄ eine Trennung in unter 20 Minuten. Zusammen mit der folgenden Abkühl- und Äquilibrierphase liegt die Run-to-Run-Time bei ca. 27 Minuten.

Beim **Intuvo 9000 GC** handelt es sich um eine komplett neue Generation an GC-Systemen, die durch innovative und intuitive Technologien die Gaschromatographie komplett neu definiert. Hierzu zählen:

- direkte Heizung, kürzere Zykluszeiten planares Säulendesign
- schnelle, zuverlässige Säulenwechsel Click-and-Run-Verbindungen
- kein Abschneiden von Säulen mehr Intuvo Guard Chip-Technologie
- Systeminformationen sofort verfügbar intuitiver Touchscreen
- mehr Platz im Labor halbe Standfläche im Vergleich zu normalen Benchtop GCs
- einfachste Bedienbarkeit interaktive, vorrausschauende Wartungsfunktionen



EXPERIMENTELLER TEIL

Chemikalien und Lösungen

• Supelco 37 Komponenten FAME Mix

Instrument

- Intuvo 9000 FID
- Agilent 5977A MSD
- ALS (7693)

Software

• OpenLab CDS 2.1

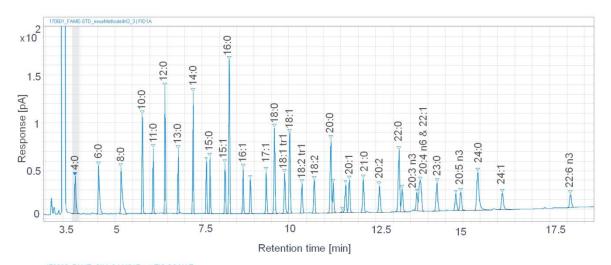
Methodenparameter

Parameter			
Agilent Intuvo 9000			
Säule	HP-88		
Säulenfluss (const.)	1,5 ml/min		
Trägergas	Helium (MSD) / Wasserstoff (FID)		
Injektor	Split, 250 °C		
Detektor FID	260 °C		
Intuvo Guard Chip	folgt Ofen		
Intuvo Bus Temp.	250 °C		
ALS			
Spritze	10 μΙ		
Inj. Vol.	1 μΙ		
MSD 5977A			
Modus	SIM (Scan)		
Massenbereich	50 – 400 amu		
Ionisierung	EI, 70eV		
Quellen-Temp.	230 °C		
Quad-Temp.	150 °C		



ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Trennung für den Standard aus 37 FAME-Komponenten von C4:0 bis C22:6 n3 wurde mit einem INTUVO 9000-FID System optimiert (siehe Abb. 1, oben). Um die Reihenfolge der Komponenten eindeutig zu identifizieren, wurde im Anschluss die Messung mit einer Kopplung INTUVO 9000/MSD wiederholt (siehe Abb. 1, unten). Die durchgeführten Messungen unter optimierten Methodenparametern zeigen eine fast vollständige Trennung der 37 Komponenten, insbesondere der cis- und trans-Fettsäuren, lediglich die Komponenten C20:4n6 und C22:1 sind nur angetrennt.



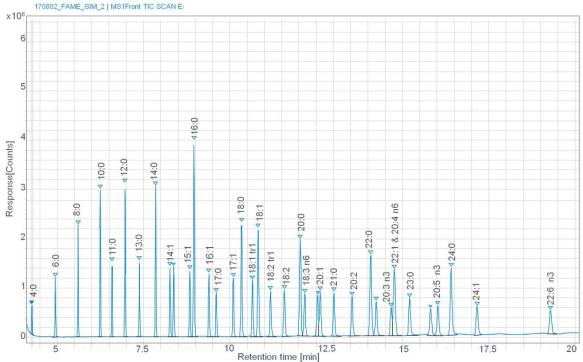


Abb. 1 Gesamtchromatogramm FAME-Mix (37 Komponenten), Messung mit INTUVO-FID und Trägergas Wasserstoff (oben), mit INTUVO/MS und Trägergas Helium (unten) (vollständige Elutionsreihenfolge vgl. Tab. 1)



Im Folgenden wurde die Praxistauglichkeit dieser zeitsparenden Methode anhand von Realproben getestet. Dabei wurden die derivatisierten Extrakte von 11 unterschiedlichen Lebensmitteln vermessen und anhand ihres Fettsäureprofils verglichen. Da diese Profile in der Regel weniger komplex ausfallen als der in Abb. 1 dargestellte Multikomponentenstandard, war die erwähnte Koelution für die praxisnahen Proben nicht von Relevanz. So konnten die Gehalte und Verhältnisse von gesättigten, ungesättigten sowie cis- und trans-Fettsäuren gut bestimmt werden.

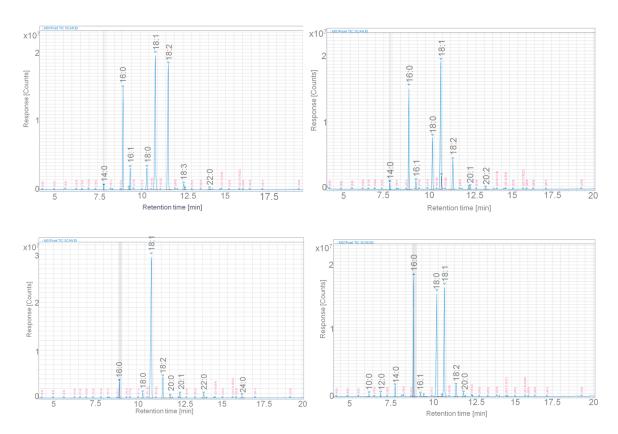


Abb. 2 Exemplarische Chromatogramme von vier Realproben: Fleischwurst und Schweinenacken (obere Reihe von links nach rechts) sowie Erdnussflips und Schokolade (untere Reihe von links nach rechts) (Messung mit INTUVO/MS, Komponenten unterhalb der Bestimmungsgrenze sind rot markiert)

Da FAMEs üblicherweise mittels GC-FID bestimmt werden, wurde diese Instrumentierung verwendet, um die Wiederholbarkeit der gezeigten Resultate sicher zu stellen. Dabei zeigte sich eine insgesamt hohe Wiederholgenauigkeit mit einer relativen Standardabweichung (RSD) von < 0,2% bezüglich der Retentionszeiten und von < 2,5% hinsichtlich der Peakflächen.



Tab. 1 Chromatografische Größen für FAME-Mix Injektion mit INTUVO/MS

#	Fettsäure	RT (min)	Area	Area%
		4.260	4040000 040	0.050
1	4:0	4,269	1018932,342	0,858
2	6:0	4,946	1991640,645	1,676
3	8:0	5,609	2996141,128	2,522
4	10:0	6,249	3799042,074	3,197
5	11:0	6,591	2066131,47	1,739
6	12:0	6,966	4487632,695	3,777
7	13:0	7,383	2392423,52	2,014
8	14:0	7,853	5042313,914	4,244
9	14:1	8,266	2565526,169	2,159
10	15:0	8,373	2558619,274	2,153
11	15:1	8,842	2634688,511	2,217
12	16:0	8,961	7948652,64	6,69
13	16:1	9,396	2757892,316	2,321
14	17:0	9,607	1920274,724	1,616
15	17:1	10,102	2787678,599	2,346
16	18:0	10,34	5578736,514	4,695
17	18:1 tr1	10,655	2877548,956	2,422
18	18:1	10,82	5666175,407	4,769
19	18:2 tr1	11,182	2480284,544	2,088
20	18:2	11,58	2719853,342	2,289
21	20:0	12,041	5671172,731	4,773
22	18:3n6	12,169	2592013,115	2,182
23	18:3n3	12,539	2592697,639	2,182
24	20:1	12,619	2856161,775	2,404
25	21:0	13,014	2866595,746	2,413
26	20:2	13,541	2747904,47	2,313
27	22:0	14,081	5700842,558	4,798
28	20:3 n6	14,238	2617588,308	2,203
29	20:3 n3	14,67	1954098,989	1,645
30	20:4 n6 und 22:1	14,763	5478060,116	4,611
31	23:0	15,205	2788398,639	2,347
32	22:2	15,813	2222840,338	1,871
33	20:5 n3	16,026	2327034,571	1,959
34	24:0	16,409	5480406,629	4,613
35	24:1	17,16	2444573,142	2,057
36	22:6 n3	19,287	2185209,058	1,839



ZUSAMMENFASSUNG

Die durchgeführten Messungen zeigen eine gute Trennung der 37 FAME-Mix Komponenten mittels Intuvo 9000. Die Laufzeit kann somit bei annähernd gleicher Trennleistung von bis zu 80 Minuten auf unter 20 Minuten verkürzt werden. Wiederholbarkeitsstudien via GC-FID zeigten, dass eine RSD(RT) < 0,2% und RSD(Area) < 2,5% erreicht werden. Je nach praktischen Anforderungen bietet diese Methode also erhebliche Einsparungen an Messzeit. Die in der Praxis üblicherweise erforderliche Probenvorbereitung (Extraktion, Trocknung, Derivatisierung), lässt sich durch die Verwendung eines CTC PAL-Autosamplers in direkter Kopplung zur GC-Detektion automatisieren. Je nach Probenmatrix stehen in diesem Kontext bereits diverse Lösungen unterschiedlichen Umfangs zur Verfügung. Durch eine sinnvoll angepasste Kombination der nun verfügbaren präparativen und chromatografischen Optionen lassen sich erhebliche Zugewinne an Effizienz und Genauigkeit für die FAME-Analytik realisieren.

LITERATUR

- (1) Durchführungsverordnung (EU) 2015/1833 der Kommission vom 12. Oktober 2015 zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 über die Merkmale von Olivenölen und Oliventresterölen sowie die Verfahren zu ihrer Bestimmung ABI. L 266/29 vom 13.10.2015; http://eurlex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=celex:32015R1833 (Stand 08.09.2017)
- (2) Richtlinie 2006/141/EG der Kommission vom 22.Dezember 20006 über Säuglingsnahrung und Folgenahrung und zur Änderung der Richtlinie 199/21/EG, Amtsblatt der Europäischen Union (2006a) 1-33
- (3) H. Daniel, H. Hecht Ernährung und Arteriosklerose Deutsche Apotheker Zeitung. 1990, S. 1307–1318
- (4) Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V (DGE) Mehrfach ungesättigte Fettsäuren senken das Risiko für koronare Herzkrankheiten – Presseinformation 7/2010 https://www.dge.de/uploads/media/DGE-Pressemeldung-aktuell-07-2010-SFA-PUFA.pdf (Stand 08.09.2017)
- (5) Bundesinstitut für Risikobewertung Trans-Fettsäuren sind in der Ernährung unerwünscht zu viel Fett auch Stellungnahme Nr. 015/2006 des BfR vom 30. Januar 2006, http://www.bfr.bund.de/cm/343/trans_fettsaeuren_sind_in_der_ernaehrung_unerwuenscht_zu_viel _fett_auch.pdf (Stand 08.09.2017)
- (6) European Food Safety Authority (EFSA) Opinion of the Scientific Panel on Dietetic products, nutrition and allergies [NDA] related to the presence of trans fatty acids in foods and the effect on human health of the consumption of trans fatty acids - the EFSA Journal - 30. August 2004 http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2004.81/epdf (Stand 08.09.2017)
- (7) Gesundheitsberichterstattung des Bundes Häufige Todesursachen Kapitel 1.4.2 [Gesundheit in Deutschland, 2006]
 - http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GesInDtld/GiD 2006/gesundheitsbericht.pdf? blob=publicationFile (Stand 08.09.2017)

Informationen in diesem Dokument können sich ohne Vorankündigung ändern.
©SIM GmbH, 2017
Deutschland, September 2017