

# Analyse von Fettsäuremethylestern (FAMES) auf einem Agilent 8890 GC-System und ihre Anwendung auf reale Proben

## Autor

Jie Zhang  
Agilent Technologies, Inc.  
Shanghai, China

## Zusammenfassung

Diese Application Note behandelt die Anwendung der Methoden GB5009.168-2016<sup>1</sup> und 5009.257-2016<sup>2</sup> auf die FAME-Analyse unter Verwendung einer langen polaren Säule in einem Agilent 8890 GC-System. Die GC-Methode wurde für die Trennung von 37 repräsentativen FAMES und 21 repräsentativen *trans*-FAMES in 80 Minuten optimiert. Die Retentionszeit (RT), Flächenreproduzierbarkeit und Linearität des Systems wurden evaluiert, und es wurde eine aus realen Ölproben zubereitete FAME-Mischung analysiert.

## Einführung

Fette sind in erster Linie die Triester von Fettsäuren und Glycerol und werden im Allgemeinen als Triglyceride bezeichnet. Zum Zwecke der Lebensmittel-Kennzeichnung wird Fett unabhängig von der Quelle als die Gesamtheit der Fettsäuren in dem jeweiligen Lebensmittel definiert, ausgedrückt in Triglycerid-Äquivalenten. Es gibt verschiedene Arten von Fettsäuren, die entsprechend ihrem Grad der Ungesättigtheit als gesättigt, einfach ungesättigt und mehrfach ungesättigt klassifiziert werden. *Trans*-Fettsäuren sind ungesättigte Fettsäuren, die mindestens eine nicht-konjugierte *trans*-Doppelbindung enthalten.

Der Fettgehalt in Lebensmitteln war schon immer ein viel diskutierter und untersuchter Bestandteil der Ernährung. Viele Käufer interessieren sich aus verschiedenen Gründen für den Fettgehalt von Lebensmitteln – etwa, weil sie auf eine gesunde Ernährung achten oder an Gewicht verlieren möchten.

Es wurde eine Reihe von Methoden, wie z. B. GB 5009.168-2016<sup>1</sup> und GB 5009.257-2016<sup>2</sup>, für die Fettanalyse in Lebensmitteln entwickelt. Diese beiden Methoden beschreiben Ansätze für die Extraktion von Fetten aus verschiedenen Lebensmittelmatrixen, die Umesterung der Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern (FAMES) und empfohlene GC-Methoden für die Trennung und Datenanalyse. Die Methode 168 konzentriert sich in erster Linie auf die Analyse von 37 repräsentativen Fettsäuren und die Methode 257 auf die Analyse von *trans*-Fettsäuren.

## Materialien

### Geräte

- Agilent 8890 GC mit Split/Splitless-Einlass und FID-Detektor
- Agilent 7693A automatischer Flüssigprobengeber (ALS) (Best.-Nr. G4567A)

### Chemikalien

- FAME-Mischung mit 37 Komponenten (CDAA-252795-MIX-1 ml), bezogen von ANPEL Laboratory Technologies (Shanghai) Inc., mit C4–C24 FAMES im Konzentrationsbereich von 200–400 ng/µl.

- *trans*-FAME-Mischung mit 13 Komponenten (CDAA-2527,15–100 mg) und *cis/trans*-Octadecatriensäure-Methylester (CDAB-CRM47792) mit acht Komponenten, bezogen von ANPEL Laboratory Technologies (Shanghai) Inc. Die Gewichtsprozent der einzelnen Komponenten in den beiden Mischungen lagen im Bereich von 3–30 %.

### Proben

Sojaöl-, Erdnussöl- und Sesamöl-Proben wurden vom Shanghai Institut für Qualitätsinspektion und technische Forschung gemäß GB 5009.168-2016 vorbereitet und zur Verfügung gestellt.

## Geräte

Tabelle 1: Gerätebedingungen.

GC-System	8890A GC
S/SL-Einlass	250 °C, Splitverhältnis 100:1,
Liner	Split, Ultra inert, Glaswolle, geringer Druckabfall (Best.-Nr. 5190-2295)
Ofentemperatur-Anstiegsprogramm	100 °C (13 Minuten), 10 °C/min bis 180 °C (6 Minuten), 1 °C/min bis 200 °C (20 Minuten), 4 °C/min bis 230 °C (7 Minuten)
Trärgas	Stickstoff, 40 psi, konstanter Druck
Säule	Agilent HP-88, 100 m × 0,25 mm, 0,20 µm (Best.-Nr. 112-88A7)
Detektor	280 °C, H <sub>2</sub> : 40 ml/min Luft: 400 ml/min Makeup-Gas: 25 ml/min

## Ergebnisse und Diskussion

Es wurde das in GB 5009.168-2016 empfohlene Ofentemperaturprogramm verwendet. Es wurden der Modus für konstanten Druck verwendet und der Säulenvordruck bei 40 psi optimiert, um eine ausreichende Trennung mit einer Mindestauflösung von 1,3 für entscheidende Paare, d. h. C20:0/C20:3n6, zu erreichen. Damit wurde die in der Methode angegebene Anforderung an die Auflösung von 1,25 übertroffen.

Ein Mischungsstandard von 37 FAMES wurde für jede Komponente auf 50–100 ng/µl verdünnt und verwendet, um die Reproduzierbarkeit des Systems zu testen. Dieser Standard wurde gemäß der GB-Methode ausgewählt und weil er die Fettsäurezusammensetzung vieler Lebensmittelproben imitiert. Das Ofentemperatur-Anstiegsprogramm war relativ lang; wie in Abbildung 1 ersichtlich, wurden die 37 FAMES innerhalb von 81 Minuten getrennt. Alle Komponenten wurden gut aufgelöst. Die überlagernde Darstellung der Chromatogramme von sechs Injektionen zeigte eine hervorragende Flächen- und RT-Reproduzierbarkeit (Abbildung 1). Tabelle 2 führt für jeden Peak die RT, Fläche und Präzision auf. Die Flächenreproduzierbarkeit liegt im

Bereich von 1,1–3,4 % (Abbildung 2), wobei die relative Standardabweichung einer Komponente 4,0 % betrug. Da das Lösemittel für die Proben Hexan war und die Analysendauer bei über 80 Minuten pro Injektion lag, resultierte die Verdampfung der Proben (insbesondere des Lösemittels) während der Trennung in einer leichten Variation der Probenkonzentration.

Die Probenmenge, die für jede Komponente auf die Säule geladen wurde, lag im Bereich von 0,5–1 ng. Aufgrund dieser geringen Probenmengen, noch erschwert durch die Verdampfung des Lösemittels, resultierten relative Standardabweichungen (%) für die Fläche von knapp über 2 %, die jedoch noch immer in Einklang mit den Anforderungen für die Quantifizierung standen.

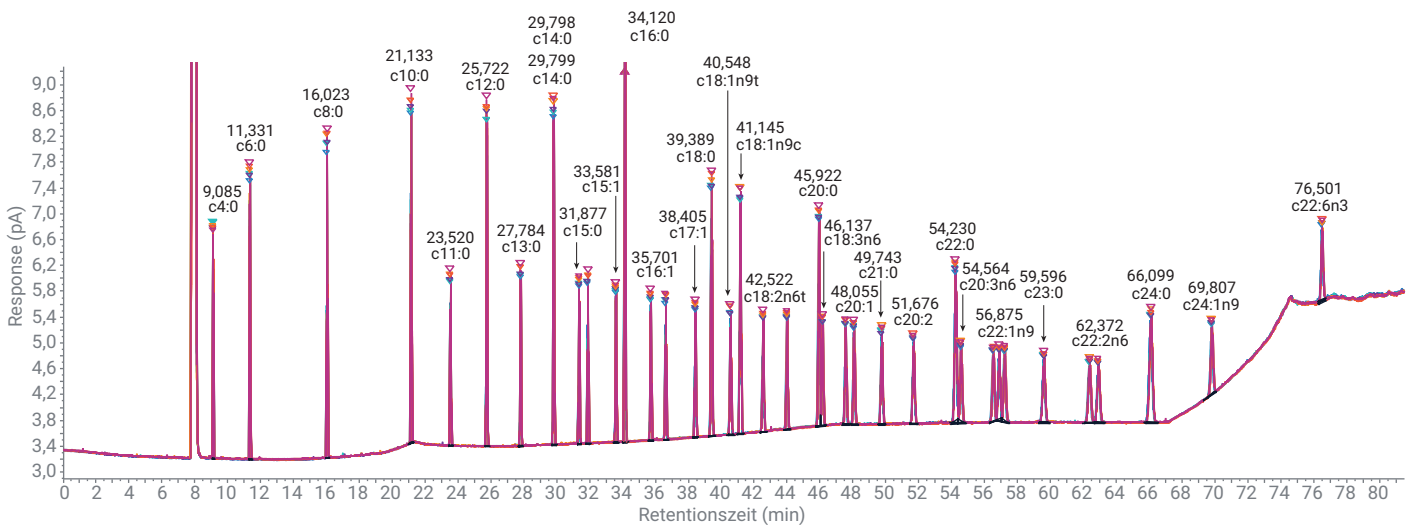


Abbildung 1: Überlagerte Darstellung der Chromatogramme von sechs Injektionen von 37 FAMES auf einem 8890 GC-System.

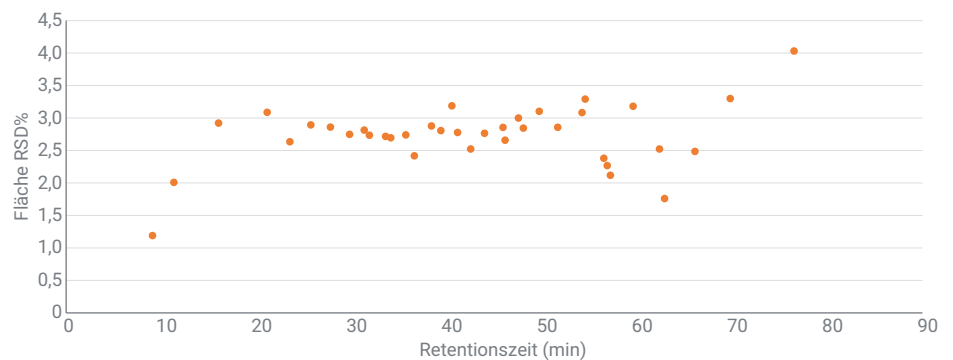


Abbildung 2: Flächengenauigkeit von 37 FAMES in sechs Injektionen.

Die Retentionszeit-Reproduzierbarkeit lag im Bereich von 0,01–0,03 % (Abbildung 3). Obwohl eine hervorragende Reproduzierbarkeit des Systems aufgrund der langen Analysendauer schwerer zu erreichen war, lieferte das 8890A GC-System eine genaue, präzise und stabile Regelung der Ofentemperatur, des Einlassdruckes und der Detektor-Flussraten, wodurch hochgradig reproduzierbare Chromatogramme erzeugt und zuverlässige Identifizierungsergebnisse erzielt werden konnten.

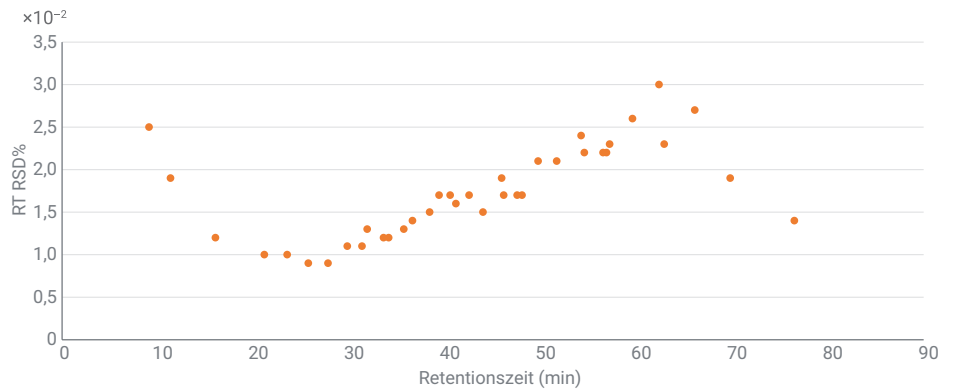


Abbildung 3: RT-Genauigkeit von 37 FAMEs in sechs Injektionen.

Tabelle 2: RT, Fläche und ihre Genauigkeit für 37 Verbindungen in sechs Injektionen.

Verbindung	Mittlere RT (min)	RT RSD (%)	Fläche (Durchschn.)	Fläche RSD (%)
C4:0	9,086	0,025	6,903	1,189
C6:0	11,331	0,019	12,795	2,008
C8:0	16,022	0,012	16,599	2,921
C10:0	21,131	0,01	17,995	3,086
C11:0	23,518	0,01	9,365	2,633
C12:0	25,721	0,009	18,702	2,893
C13:0	27,783	0,009	9,655	2,859
C14:0	29,796	0,011	19,362	2,747
C14:1	31,333	0,011	9,57	2,813
C15:0	31,874	0,013	9,9	2,733
C15:1	33,58	0,012	9,818	2,716
C16:0	34,119	0,012	29,97	2,694
C16:1	35,699	0,013	9,999	2,739
C17:0	36,602	0,014	10,125	2,417
C17:1	38,4	0,015	10,053	2,876
C18:0	39,385	0,017	20,432	2,805
C18:1n9t	40,544	0,017	10,294	3,186
C18:1n9c	41,142	0,016	20,389	2,776
C18:2n6t	42,519	0,017	10,188	2,522
C18:2n6c	43,972	0,015	10,363	2,763
C20:0	45,919	0,019	20,719	2,854
C18:3n6	46,135	0,017	10,003	2,657

Verbindung	Mittlere RT (min)	RT RSD (%)	Fläche (Durchschn.)	Fläche RSD (%)
C18:3n3	47,54	0,017	10,167	2,998
C20:1	48,052	0,017	10,354	2,843
C21:0	49,731	0,021	10,554	3,102
C20:2	51,671	0,021	10,302	2,855
C22:0	54,225	0,024	21,046	3,082
C20:3n6	54,554	0,022	10,28	3,29
C20:3n3	56,514	0,022	10,244	2,379
C22:1n9	56,871	0,022	10,273	2,266
C20:4n6	57,204	0,023	10,633	2,117
C23:0	59,588	0,026	10,693	3,179
C22:2n6	62,36	0,03	10,415	2,521
C20:5n3	62,903	0,023	10,177	1,758
C24:0	66,093	0,027	21,326	2,484
C24:1n9	69,797	0,019	10,863	3,298
C22:6n3	76,499	0,014	9,456	4,03

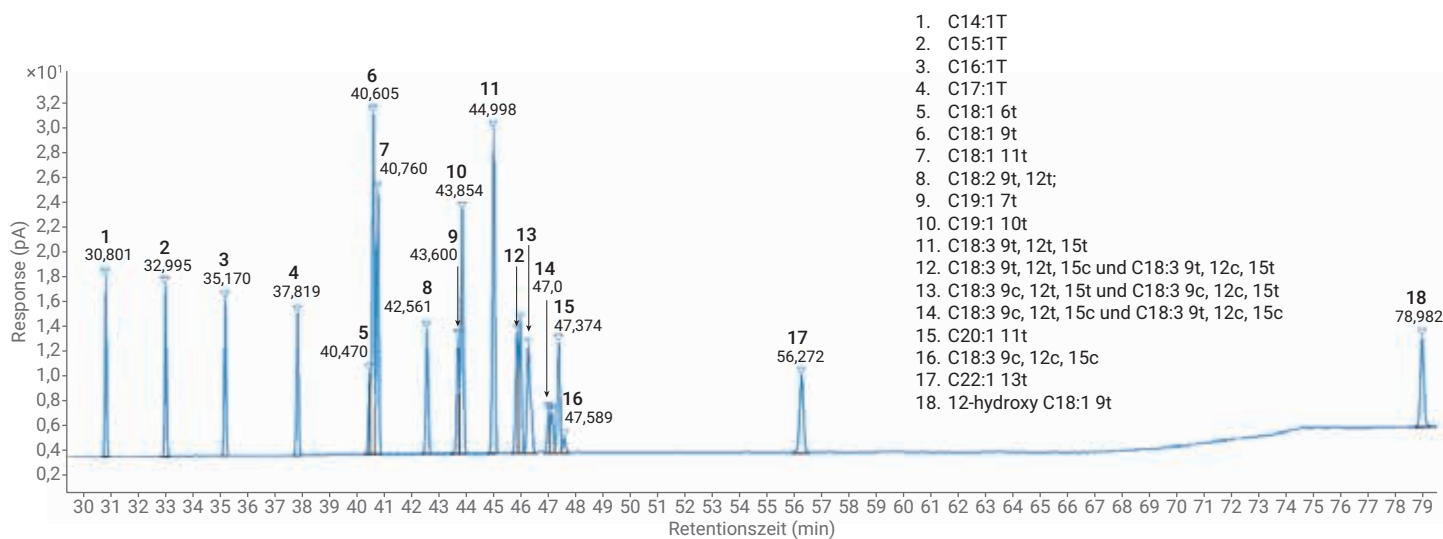
Die Linearität des Systems wurde mittels Berechnung der relativen Standardabweichung (RSD%) des Response-Faktors (RF) von C18:1c FAME und C18:2c FAME bei fünf Konzentrationsniveaus bewertet. Tabelle 3 zeigt eine relative Standardabweichung des RF (RF RSD%) für die zwei Sonden-Verbindungen von nur 4 %, was eine hervorragende Linearität hinsichtlich der Peak-Response belegt. Einige Labore verwenden für die Quantifizierung die ESTD-Methode; eine gute Detektorlinearität über einen großen Konzentrationsbereich hinweg kann sogar bei Verwendung einer Ein-Punkt-ESTD-Methode eine genaue Quantifizierung gewährleisten.

Abbildung 4 zeigt die Trennung einer *trans*-FAME-Mischung mit 13 Komponenten und einer Octadecatriensäure-Methylesterisomeren-Mischung mit 8 Komponenten. Die Ergebnisse wurden gemäß GB 5009.257-2016 erzielt. Es wurde dasselbe Ofentemperaturprogramm wie für die Analyse der FAME-Mischung mit 37 Komponenten verwendet. Die acht Isomere von C18:3 *trans*-FAME-Isomeren sind besonders schwierig aufzulösen, insbesondere in Anbetracht dessen, dass andere FAMEs, die neben den C18:3 FAMEs bestehen, im selben Lauf aufgelöst werden müssen. Allerdings erzeugte die 100-m-HP-88-

Säule acht Peaks für die acht Isomere im vergrößerten Elutionsbereich für Octadecatriensäure-Methylester (Abbildung 5). Obwohl die Auflösung weit von einer Basislinientrennung entfernt war, zeigt der Vergleich mit dem Referenzchromatogramm in GB 5009.257-2016, dass sich die erzielte Trennung innerhalb zulässiger Grenzen befand. Darüber hinaus war der *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15-Octadecatriensäure-Methylester von den anderen sieben *trans*-Isomeren gut getrennt. Dies ist eine wichtige praktische Erwägung angesichts der Art der Kennzeichnung der *trans*-Fettsäuren in der Lebensmittelindustrie.

**Tabelle 3:** Flächen-Response-Linearität für C18:1-*cis* und C18:2-*cis*.

Komponente	Konzentration	Fläche (PA*S)	RF (Response pro Menge)	RSD% von RF
C18:1- <i>cis</i>	1,7 ppm	0,330	0,194	4,7 %
	17 ppm	3,002	0,177	
	170 ppm	29,152	0,171	
	1700 ppm	301,107	0,177	
	17 000 ppm	3.065,390	0,180	
C18:2- <i>cis</i>	0,86 ppm	0,155	0,180	3,0 %
	8,6 ppm	1,628	0,189	
	86 ppm	14,833	0,172	
	860 ppm	152,562	0,177	
	8600 ppm	1.550,921	0,180	



**Abbildung 4:** Chromatogramm von 21 *trans*-FAMEs auf einer HP-88 Säule.

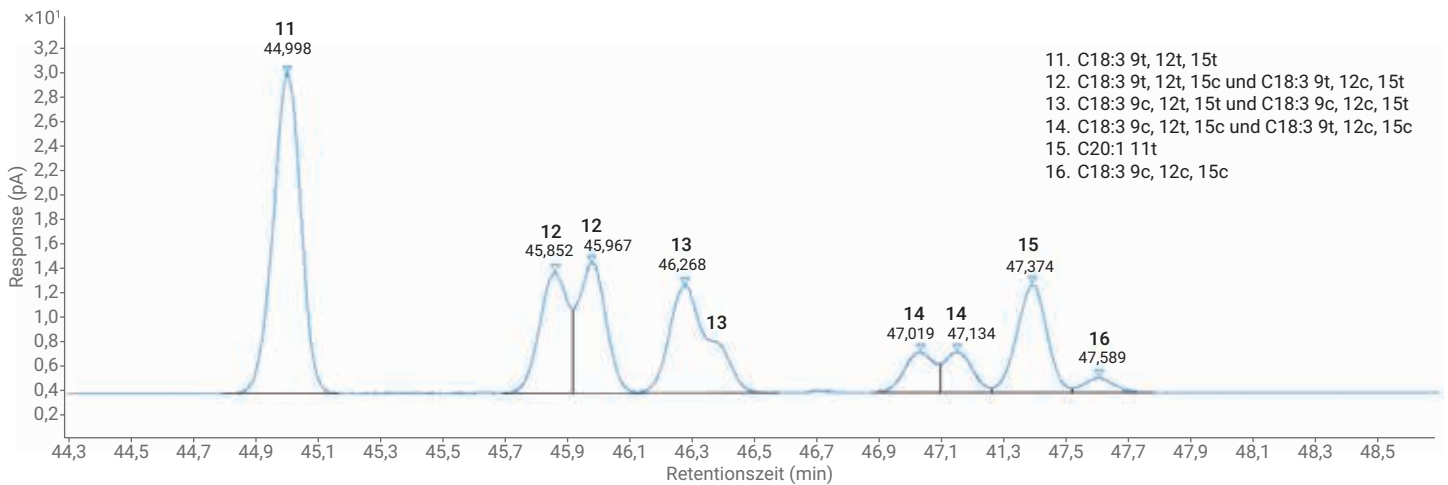


Abbildung 5: Vergrößerter Chromatogramm-Ausschnitt für Octadecatriensäure-Methylesterisomere.

Reale Ölproben, von Sojaöl, Erdnussöl und Sesamöl, wurden gemäß GB 5009.168-2016 auf einer 8890 GC-Plattform extrahiert, derivatisiert und analysiert. Abbildungen 6A, 6B und 6C zeigen die resultierenden Chromatogramme. C16:0, C18:0, C18:1n9c, C18:2n6c, C18:3n3 und C20:1 waren in den drei Ölprobenarten die hauptsächlich identifizierten Fettsäuren (in den Abbildungen 6A, 6B und 6C sind in rot die Verbindungen angegeben, die

in der Methoden-Kalibrierungstabelle aufgeführt sind, aber nicht in der realen Probe identifiziert wurden).

Es gibt eine Lösung, die eine schnelle FAME-Analyse ermöglicht, mit der die 37 repräsentativen FAMES auf einer kurzen Polycyanopropyl-Siloxansäule innerhalb von 10 Minuten aufgelöst werden können<sup>3</sup>. Die schnelle Analyse hat allerdings gewisse Einschränkungen für die Trennung von *cis*- und *trans*-FAMES. Die 60- bis 80-minütige

FAME-Analyse unter Verwendung einer langen polaren Säule wurde für Proben entwickelt, die die Trennung komplexer *cis/trans*-Fettsäuren oder anderer schwieriger Isomere erfordern. Bei bestimmten Applikationen, wie z. B. der Qualitätsprüfung von nativem Olivenöl extra, ist die effektive Trennung von *cis/trans*-FAMES wichtiger als die Analysendauer.

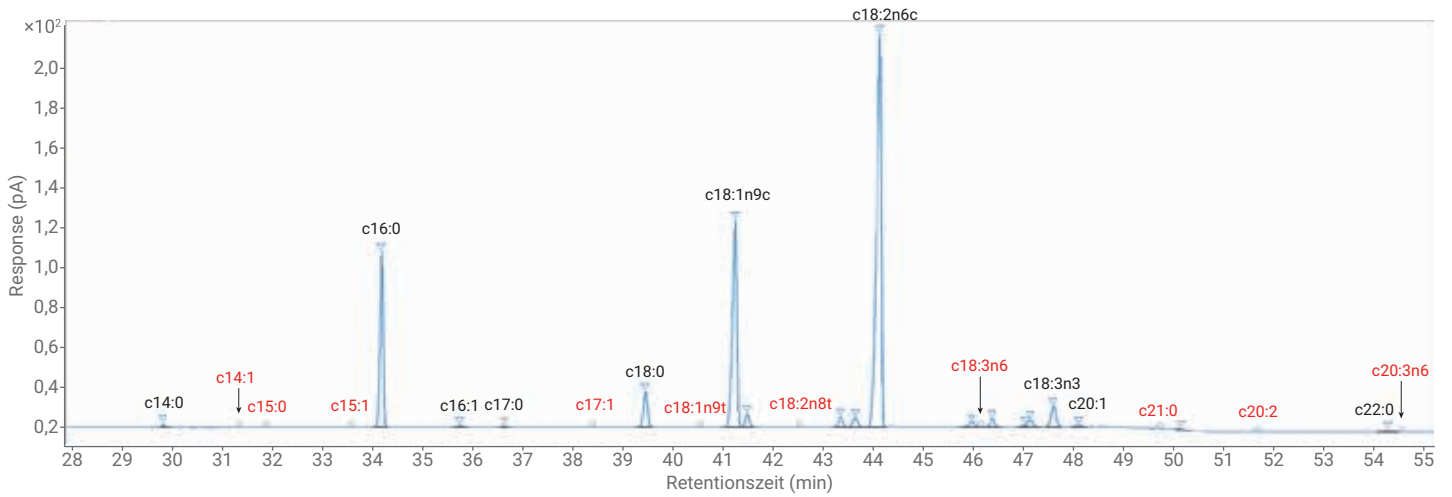


Abbildung 6A: Chromatogramm der Analyse von Sesamöl.

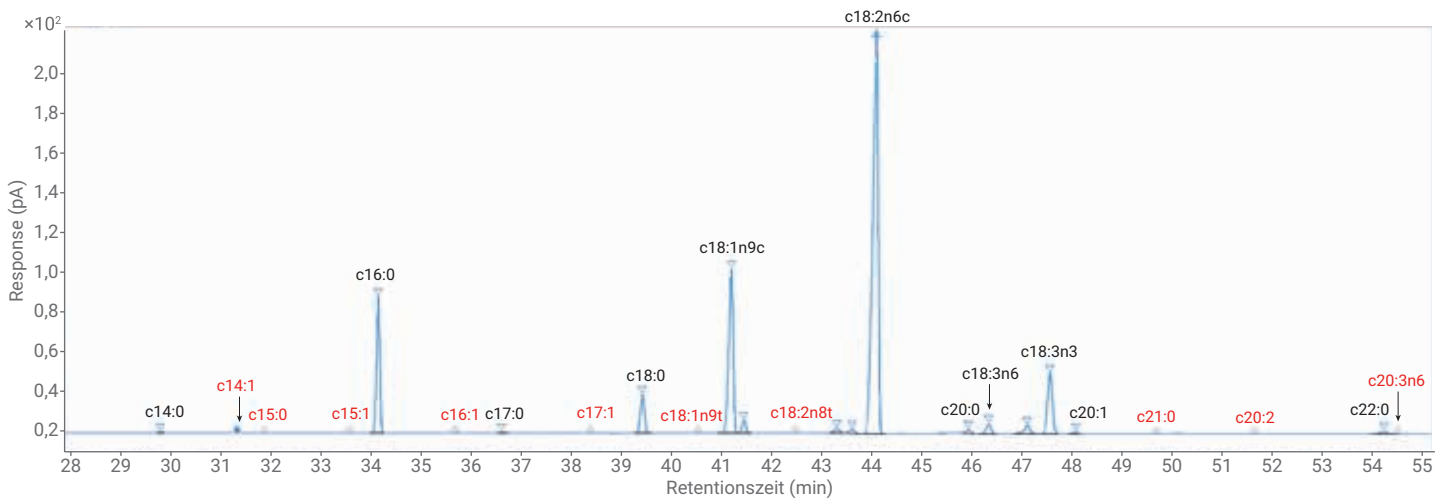


Abbildung 6B: Chromatogramm der Analyse von Sojaöl.

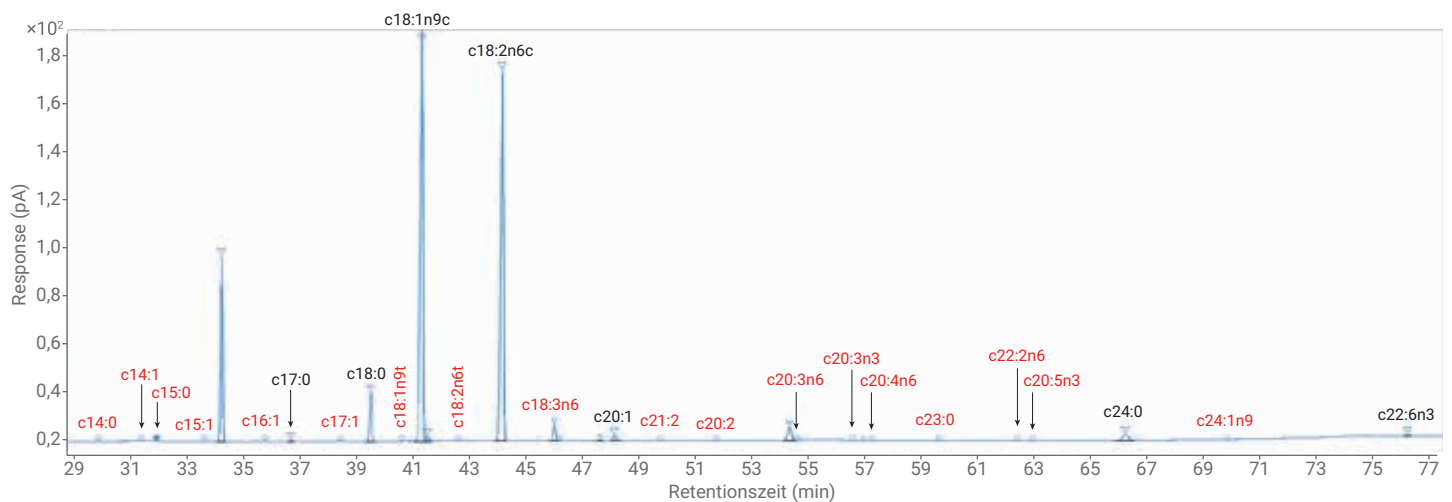


Abbildung 6C: Chromatogramm der Analyse von Erdnussöl.

## Schlussfolgerungen

Die Verwendung eines 8890A GC-Systems in Kopplung mit einer HP-88 Säule für die Analyse von 37 repräsentativen FAMES und 21 *trans*-FAMES ergab für beide Probenarten eine gute Auflösung. Die Auflösung der kritischen Verbindungen erfüllte und übertraf die Anforderungen der Methoden GB 5009.168-2016 und GB 5009.257-2016.

Eine ausgezeichnete Retentionszeit und Flächenreproduzierbarkeit sowie der große lineare Detektionsbereich des FID-Detektors belegten, dass das 8890A GC-System eine ideale Plattform für die zuverlässige Analyse von FAMES ist.

## Literatur

1. Bestimmung von Fettsäuren in Lebensmitteln, Methode GB5009.168-2016.
2. Bestimmung von *trans*-Fettsäuren in Lebensmitteln, Methode GB5009.257-2016 Methode.
3. A fast analysis of FAME by Intuvo 9000 GC, *Agilent Technologies Application Note*, Publikationsnummer 5991-9482EN.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Gedruckt in den USA, 2. Januar 2019  
5994-0549DEE