

Schnelle Analyse von 37 Fettsäuremethylestern (FAMEs) mit dem Agilent 8860 Gaschromatographen

Autor

Youjuan Zhang
Agilent Technologies Co. Ltd.,
Shanghai 200131 P. R. China

Zusammenfassung

Ein mit einem Split/Splitless-Einlass und Flammenionisationsdetektor (FID) ausgerüstetes Agilent 8860 GC-System wurde verwendet, um eine Standardmischung mit 37 Fettsäuremethylestern (FAMEs) und reale Proben von proteolytischer Säuglingsanfangsnahrung zu analysieren. Diese Application Note beschreibt die Analyse einer Mischung mit 37 FAMEs, die schneller als Methode GB 5009.168-2016 ist und zugleich eine ausgezeichnete Trennung aufweist.

Einführung

Fettsäuren sind die Hauptkomponenten von neutralen Fetten, Phospholipiden und Glykolipiden. Fettsäuren können in drei Kategorien eingeteilt werden: gesättigt, einfach ungesättigt und mehrfach ungesättigt. Einige Fettsäuren, wie z. B. Linolsäure, sind essentielle Fettsäuren; sie können nicht vom Körper synthetisiert werden und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren, wie z. B. Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA), sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die eine Schlüsselrolle bei der menschlichen Ernährung spielen. Es wird davon ausgegangen, dass Omega-3-Fettsäuren an der Vorbeugung von Erkrankungen wie Herzkrankheiten und Bluthochdruck beteiligt sind. Fette spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Ernährung und in der Lebensmittelchemie.

Hydrolyse und Methylierung sind die am häufigsten eingesetzten Methoden für die Bestimmung von Fettsäuren; die Veresterung von Fettsäuren reduziert die Polarität und erleichtert die Trennung von ungesättigten Isomeren. Die Analyse von Fettsäuremethylestern (FAMEs) ist eine der wichtigsten Applikationen in der Lebensmittelanalytik.

GB 5009.168-2016 reguliert die Bestimmung von 37 Fettsäuren in Lebensmitteln. Die Vorbehandlung von Proben und die Gaschromatographie(GC)-Parameter sind in dieser Methode im Detail beschrieben; sie empfiehlt eine hochpolare Cyano-Polysiloxan-Säule (100 m x 0,25 mm, 0,2 µm). Diese Methode ermöglicht die Trennung von 37 FAMEs innerhalb von 82 Minuten. Eine frühere Agilent Application Note zeigt, dass das Agilent Intuvo 9000 GC-System mit einer Agilent J&W DB-FastFAME Intuvo GC-Säule und Helium als Trägergas 37 FAMEs innerhalb von acht Minuten auflösen kann². Diese schnelle Analyse profitiert von der Intuvo-Technologie mit direkter Heizung, die eine Erhitzung der Säule mit 250 °C/min ermöglicht.

Diese Application Note beschreibt relativ schnelle Methoden mit DB-FastFAME-Säulen in zwei verschiedenen Längen mit dem 8860 GC-System und Stickstoff als Trägergas. Die relativen Standardabweichungen (RSDs) für die Fläche wurden bestimmt und wesentliche neutrale Fette wie ARA, EPA und DHA quantitativ analysiert. Darüber hinaus wurden Proben von Säuglingsanfangsnahrung analysiert, um die Anwendbarkeit der Methode zu zeigen.

Experimentelles

Chemikalien und Standards

Eine FAME-Standardmischung mit 37 Komponenten (Best.-Nr. CDAA-252795-MIX-1 ml) und einzelne Standards mit C20:4n6 (Best.-Nr. CDAA-253207M-10 mg), C20:5n3 (Best.-Nr. CDAA-253209M-10 mg) und C22:6n3 (Best.-Nr. CDAA-253228M-10 mg) wurden von ANPEL Scientific Instrument Co. Ltd. (Shanghai, China) bezogen. Die Konzentration jeder Komponente in der Mischung betrug 200 bis 400 mg/ml.

Proben von Säuglingsanfangsnahrung wurden vor Ort erworben.

Die Vorbehandlung der Proben wurde gemäß GB 5009.168-2016 durchgeführt.

Geräte

Die FAME-Analysen wurden auf einem 8860 GC-System mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) durchgeführt. Die Probenzuführung erfolgte mit einem Agilent 7693A automatischen Flüssigprobengeber mit einer 5-µl-Spritze und einem Einspritzblock für Split/Splitless-Injektion. Tabellen 1 und 2 führen die Geräte und Bedingungen auf.

Tabelle 1: Agilent DB-FastFAME 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Methodenparameter.

Parameter	Wert
GC-System	8860 GC/FID
Einlass	Split/Splitless, 250 °C, Splitverhältnis 100:1; Liner (Best.-Nr. 5190-2295)
Säule	DB-FastFAME, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm (Best.-Nr. G3903-63011)
Trägergas	Stickstoff, 12 psi, konstanter Druck
Ofen	80 °C (0,5 Minuten), dann 40 °C/min bis 165 °C (1 Minute), dann 4 °C/min bis 230 °C (4 Minuten)
FID	260 °C; Wasserstoff: 40 ml/min; Luft: 400 ml/min; Makeup-Gas (N ₂): 25 ml/min
Injektion	1 µl

Tabelle 2: Agilent DB-FastFAME 20 m x 0,18 mm, 0,2 µm Methodenparameter.

Parameter	Wert
GC-System	8860/FID
Einlass	Split/Splitless, 250 °C, Splitverhältnis 100:1; Liner (Best.-Nr. 5190-2295)
Säule	DB-FastFAME, 20 m x 0,18 mm, 0,2 µm (Best.-Nr. G3903-63010)
Trägergas	Stickstoff, 20 psi, konstanter Druck
Ofen	80 °C, dann 35 °C/min bis 194 °C (1 Minute), dann 5 °C/min bis 245 °C
FID	260 °C; Wasserstoff: 40 ml/min; Luft: 400 ml/min; Makeup-Gas (N ₂): 25 ml/min
Injektion	1 µl

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 1 zeigt ein typisches Chromatogramm für die Analyse der FAME-Standardmischung mit 37 Komponenten auf der 30-m DB-FastFAME-Säule. Bei einigen Applikationen können *cis*- und *trans*-C18:1, *cis*- und *trans*-C18:2, C22:0 und C20:3 sowie C22:6 und C24:1 koeluiieren und zu Problemen bei der Peakerkennung führen. Wie Abbildung 1 zeigt, wurden unter diesen Bedingungen alle 37 Verbindungen durch das 8860 GC-System gut getrennt, mit scharfen, symmetrischen Peaks und einer Verringerung der Analysendauer auf unter 24 Minuten. Besonders hervorzuheben ist die Fähigkeit zur Trennung der *cis-trans*-Isomere und der EPA- und DHA-Komponenten. Diese Methode ist für die quantitative Fettsäureanalytik in komplexen Mischungen sehr hilfreich, insbesondere für die Bestimmung von EPA und DHA in Matrices wie z. B. Fischöl. Im Vergleich mit einer Säule mit einem Innendurchmesser von 0,18 mm bieten der größere Innendurchmesser und dickere Film dieser 30 m × 0,25 mm, 0,25-µm-Säule eine größere Säulenkapazität und eine längere Lebensdauer der Säule.

Proteolytische Säuglingsanfangsnahrung ist eine gute Wahl für Säuglinge mit Milchallergie und kann gemäß dem Grad der Hydrolyse in drei Arten unterschieden werden: Säuglingsanfangsnahrung mit partieller Hydrolyse, mit extensiver Hydrolyse und als Aminosäuren-Formulanahrung. Abbildungen 2 bis 4 zeigen die Analyse drei verschiedener Arten von proteolytischer Säuglingsanfangsnahrung. Wesentliche FAMEs, einschließlich C18:2n6, C18:3n3, ARA und DHA, wurden problemlos nachgewiesen und quantifiziert.

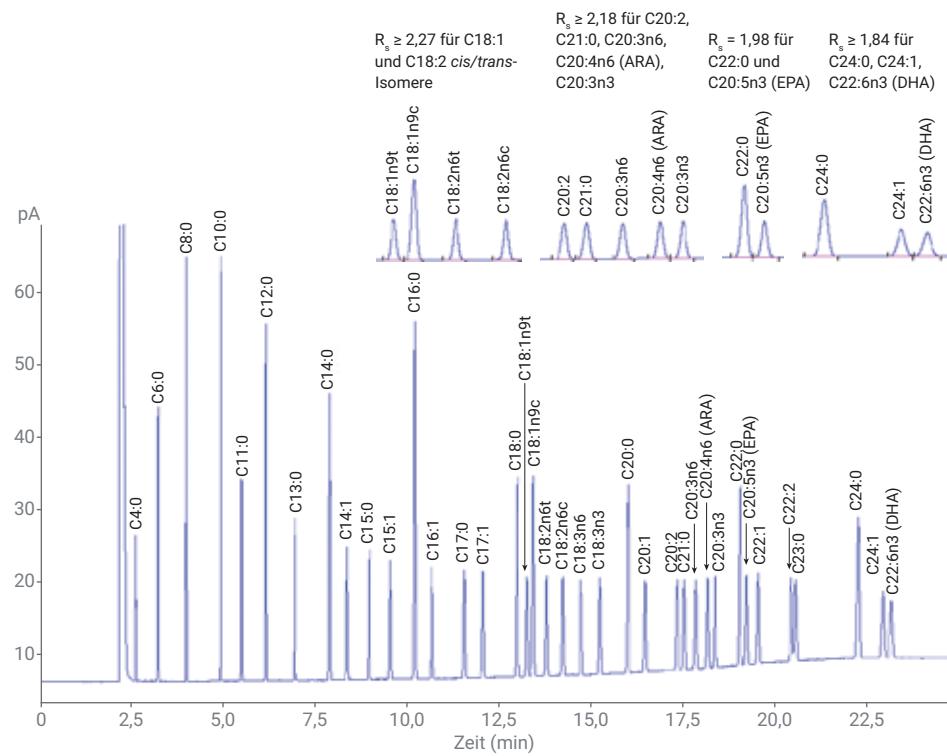


Abbildung 1: GC/FID-Chromatogramm der FAME-Standardmischung mit 37 Komponenten auf einer 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm DB-FastFAME Ultra Inert-Säule (Best.-Nr. G3903-63011).

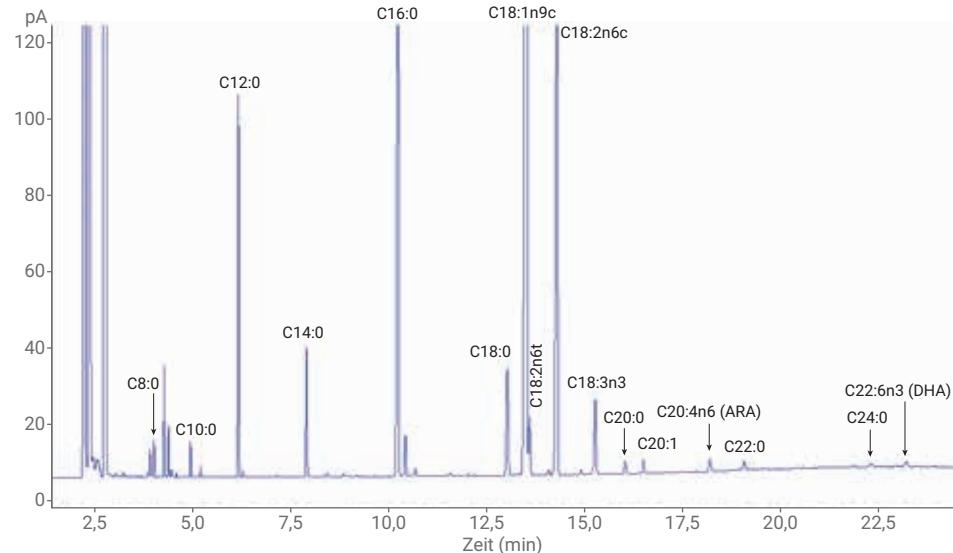


Abbildung 2: GC/FID-Chromatogramm der FAMEs in Aminosäuren-Formula-Säuglingsanfangsnahrung auf einer 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm DB-FastFAME Ultra Inert-Säule.

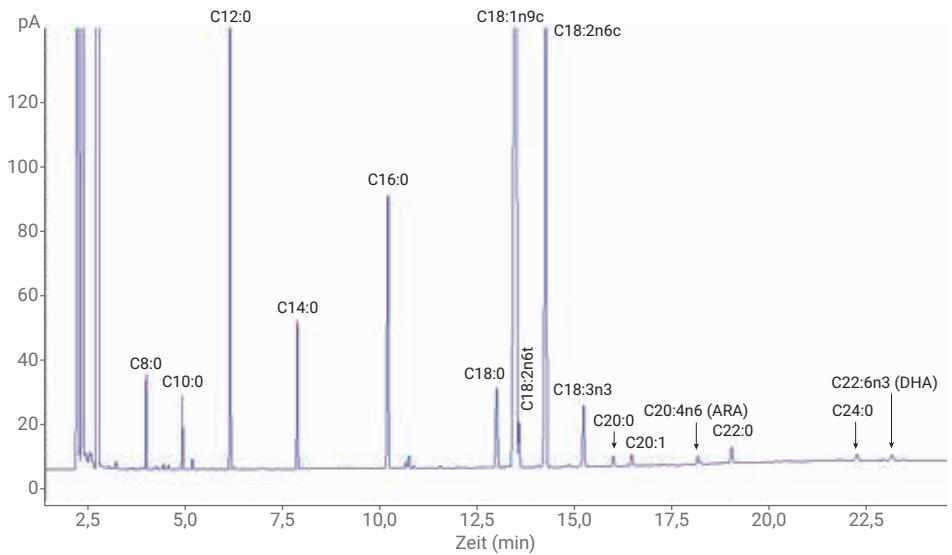


Abbildung 3: GC/FID-Chromatogramm der FAMEs in Säuglingsanfangsnahrung mit extensiver Hydrolyse auf einer $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm}, 0,25\text{ }\mu\text{m}$ DB-FastFAME Ultra Inert-Säule.

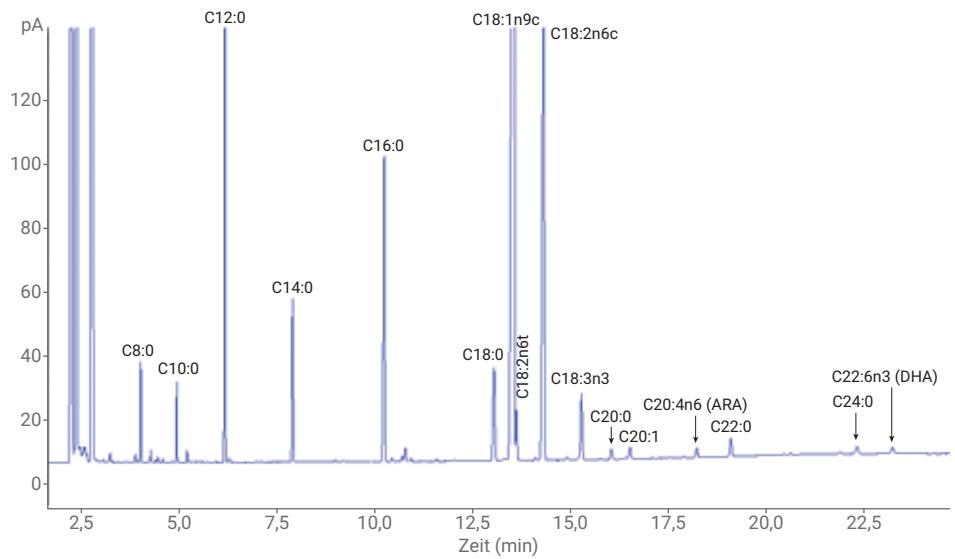


Abbildung 4: GC/FID-Chromatogramm der FAMEs in Säuglingsanfangsnahrung mit partieller Hydrolyse auf einer $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm}, 0,25\text{ }\mu\text{m}$ DB-FastFAME Ultra Inert-Säule.

Kalibrierungsstandards von ARA, EPA und DHA wurden bei Konzentrationen von 5, 10, 50, 100, 250 und 1000 mg/l vorbereitet. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) für diese drei Komponenten lag bei $\geq 0,9997$. Abbildungen 5, 6 und 7 zeigen die Kalibrierungskurven.

Die Methodenreproduzierbarkeit wurde unter Verwendung von sechs Injektionen der Standardmischung getestet. Abbildung 8 illustriert, dass für alle Verbindungen mit Ausnahme von C4:0 die relative Standardabweichung (%RSD) für die Fläche deutlich unter 1 % lag. Dies belegt, dass das 8860 GC-System ein zuverlässiges System für die Analyse von Fettsäuren ist.

Eine hocheffiziente Säule mit einem Innendurchmesser von 0,18 mm kann ohne Verluste bei der Analyseleistung die Produktivität verbessern und die Analysendauer verringern. Wie in Abbildung 9 gezeigt, ermöglicht die Verwendung dieser kurzen Säule eine schnellere Analyse – unter 14 Minuten – mit nahezu vergleichbarer Auflösung. Die Auflösungswerte für wesentliche Verbindungen sind in Abbildungen 1 und 9 gezeigt.

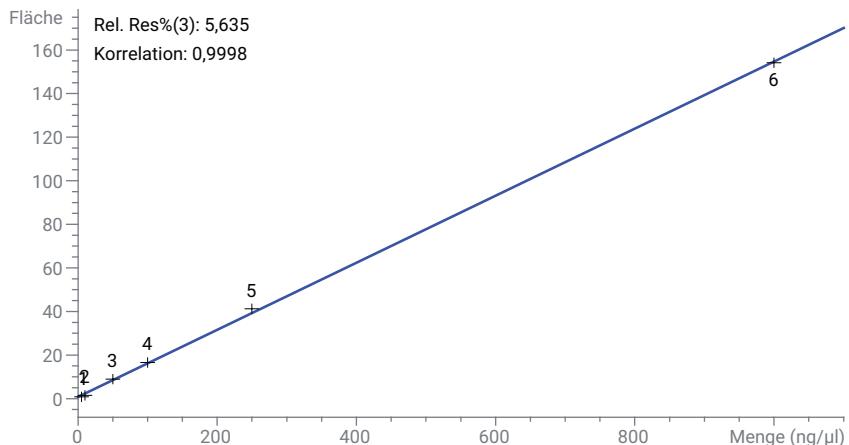


Abbildung 5: Kalibrierung von C20:4n6 (ARA) von 5 bis 1000 µg/ml auf einer 30 m \times 0,25 mm, 0,25 µm DB-FastFAME Ultra Inert-Säule.

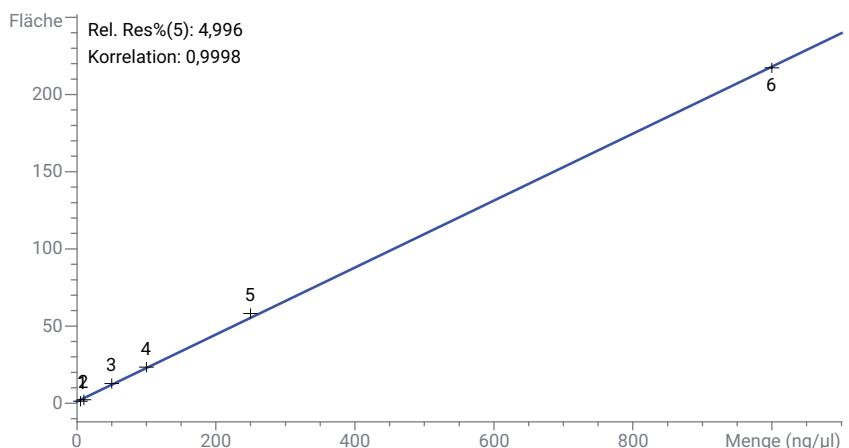


Abbildung 6: Kalibrierung von C20:5n3 (EPA) von 5 bis 1000 µg/ml auf einer 30 m \times 0,25 mm, 0,25 µm DB-FastFAME Ultra Inert-Säule.

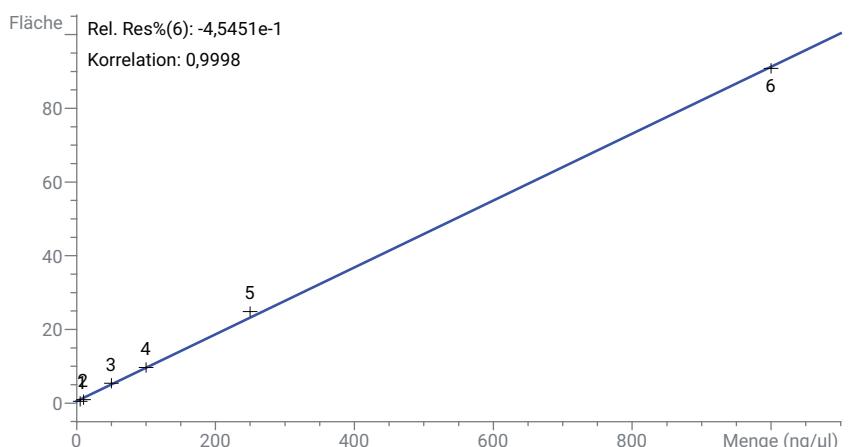


Abbildung 7: Kalibrierung von C22:6n3 (DHA) von 5 bis 1000 µg/ml auf einer 30 m \times 0,25 mm, 0,25 µm DB-FastFAME Ultra Inert-Säule.

Abschließende Bemerkungen

Diese Application Note zeigt, dass das 8860 GC-System in Konfiguration mit einer automatischen Injektion und einem FID-Detektor eine schnellere und zuverlässige Lösung für die Analyse von 37 FAMEs bieten kann. Es wurden zwei Arten von Kapillarsäulen, die für die FAME-Analyse vorgesehen sind, eingesetzt; beide zeigen eine ausgezeichnete Effizienz ohne Beeinträchtigungen bei der Auflösung. Die 30-m-DB-FastFAME-Säule bietet eine größere Säulenkapazität und bessere Langlebigkeit, während die 20-m-DB-FastFAME-Säule eine kürzere Analysezeit ermöglicht. Der 7693A automatische Probengeber mit einer Kapazität von 16 Probenflaschen und die 8860 GC EPC-Steuerung gewährleisten eine gute Reproduzierbarkeit und Benutzerfreundlichkeit sowohl für die Fast-Food-Industrie als auch für Routineanalysen.

Literatur

1. Zhou, Y.; Wu, H. Improving the analysis of 37 fatty acid methyl esters, *Agilent Technologies Application Note*, Publikationsnummer 5991-8706EN, **2018**.
2. Zhou, Y. Rapid separation of fatty acid methyl esters, *Agilent Technologies Application Note*, Publikationsnummer 5994-0116EN, **2018**.

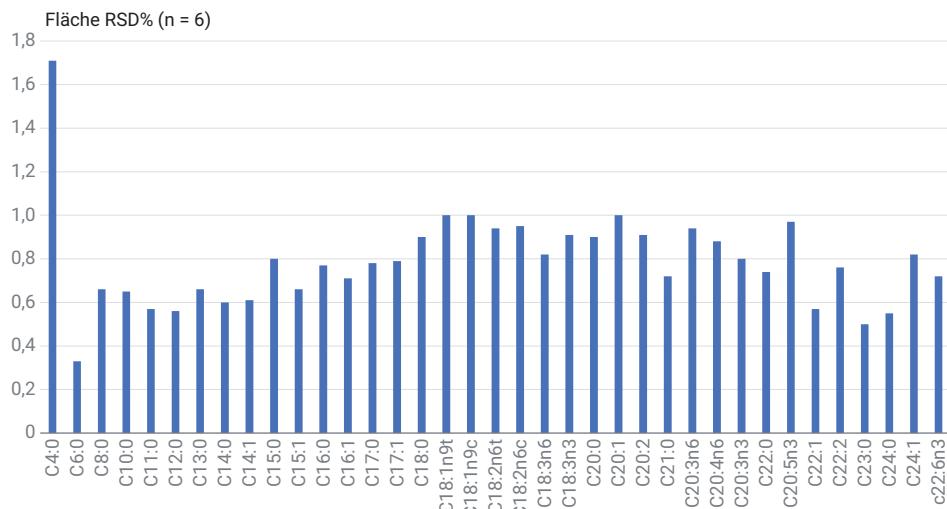


Abbildung 8: Relative Standardabweichung (RSD%) von sechs wiederholten Injektionen einer FAME-Standardmischung mit 37 Komponenten auf einer 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm DB-FastFAME Ultra Inert-Säule.

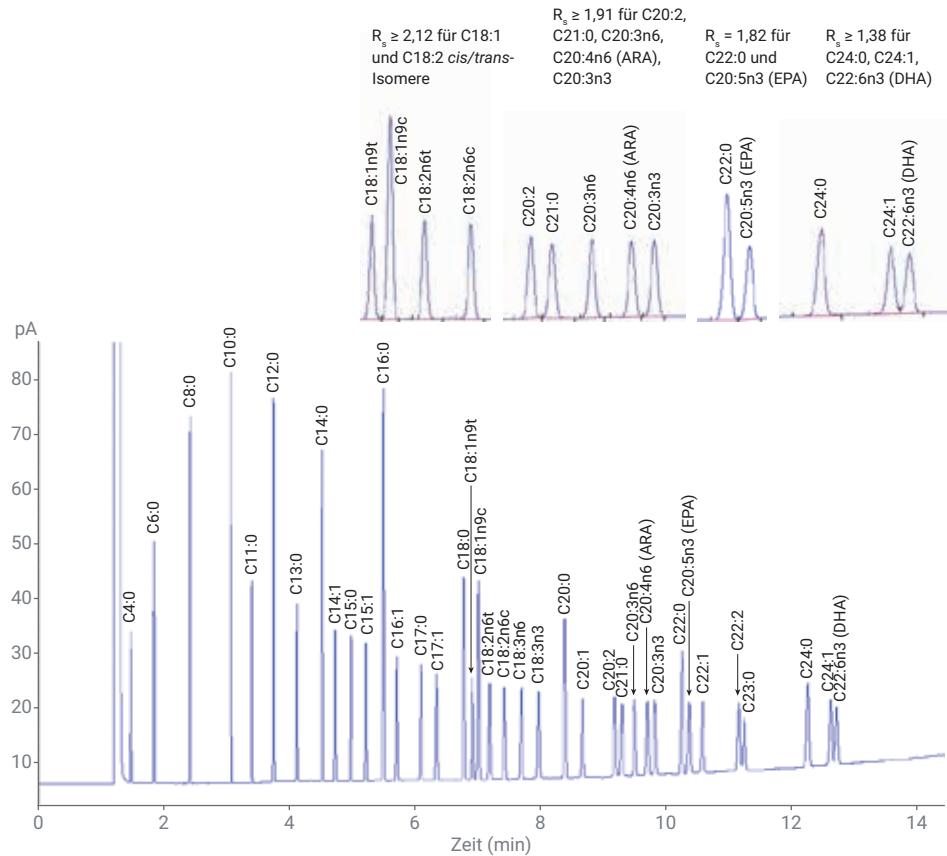


Abbildung 9: GC/FID-Chromatogramm der FAME-Standardmischung mit 37 Komponenten auf einer 20 m x 0,18 mm, 0,2 µm DB-FastFAME Ultra Inert-Säule (Best.-Nr. G3903-63010).