

Effiziente Derivatisierung von Fettsäuren

FAMEs *just-in-time* bestimmen

Kaum ein Labor, das nicht unter Zeit- und Kostendruck steht. Lösungen, ihn zu reduzieren, gleichzeitig Effizienz, Präzision und Sicherheit zu steigern, sind stets willkommen. „Ziel erreicht“, melden Applikateure der britischen Bespak Europe Ltd. und Anatune Ltd. für die GC/MS-Analyse von Fettsäuren. Ihr Lösungsansatz: Automatisierung der Probenvorbereitung, einschließlich Standardaddition, Zugabe eines internen Standards und Derivatisierung, bis hin zur diskriminierungsfreien Injektion in das Chromatographie-System.

Analysenbedingungen

Probeneingang:	Automatisierte Säulenkühlung im Ofeneinzug-Modus (Ofentemperatur: 3 °C)
Injektionsvolumen:	1 µL (10-µL-Spritze)
Trennsäule:	Phenomenex Zebron ZB1, 30 m x 240 µm (0,1 µm Film)
Vorsäule:	Approx 1 m x 0,53 µm Innendurchmesser, deaktiviert
Trägergas:	Helium (1mL/min), konstanter Fluss, Vakuum-kompensiert
T-Programm:	40 °C (1 min) – 10 °C/min – 300 °C (5 min)
Detektionsmodus:	Selected Ion Monitoring (SIM)
Interface-Temperatur:	280 °C (Detektorübergang)
MSD-Einstellung:	Standard Auto Tune (STUNE)
MSD-Lösemittelverzögerung:	5 min



Je komplexer die Analytik, desto höher die Anforderungen, die ein Laborroboter erfüllen muss. Maximale Flexibilität bietet jenes Gerät, das die Funktion von zwei Robotern für das Handling flüssiger Proben in sich vereint. So die MPS-PrepStation von GERSTEL, die von John Colwell, Bepak Europe Ltd., sowie Ray Perkins, Keith Summerhill und Jonathan Angove von der Anatune Ltd. in England zur Analyse von Fettsäuren eingesetzt wird – überaus erfolgreich, wie die vier GC/MS-Profis im Fachmagazin *Chromatography Today* (Vol. 1, Issue 4, Sept./Oct. 2008, p. 17-19) berichten.

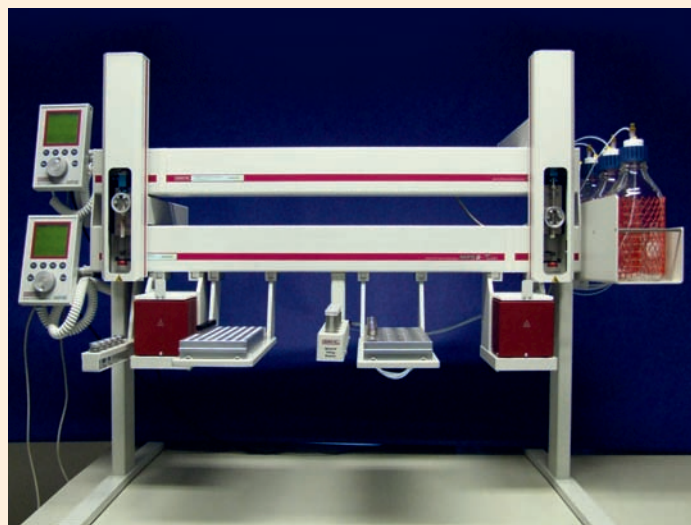
Triglyceride spalten und freie Fettsäuren derivatisieren

Tierische und pflanzliche Fette spielen als Bestandteil unserer Ernährung sowie als Schmier- und Gleitmittel eine wichtige Rolle. Analytik hat die Aufgabe, nicht nur den Reinheitsgrad von Fett und Öl zu untersuchen, sondern auch zu Deklarationszwecken Fettgehalt und -zusammensetzung von Lebensmitteln zu bestimmen.

Fette und fette Öle sind Ester des dreiwertigen Alkohols Glycerin (Propan-1,2,3-triol) mit drei meist verschiedenen, überwiegend geradzähligen und unverzweigten aliphatischen Monocarbonsäuren, den Fettsäuren, durch die Fette sich charakterisieren lassen. Verbindungen dieser Art werden Triglyceride beziehungsweise Triacylglycerine genannt.

Die Triglyceride der Fettsäuren lassen sich gaschromatographisch nicht analysieren. Dafür bedarf es der Spaltung und Derivatisierung: Die Esterbindungen werden aufgebrochen und die freien Fettsäuren in korrespondierende Fettsäuremethylester (FAMES; das Akronym leitet sich ab von Fatty Acid Methyl Esters) überführt. Im Gegensatz zu den jeweiligen Fettsäuren sind FAMES unpolar und moderat flüchtig und eignen sich für die GC-Analyse.

Der Schritt der Fettsäurederivatisierung ist für gewöhnlich arbeitsintensiv; eine Automatisierung der Probenvorbereitung, wie sie Colwell, Perkins, Summerhill und Angove unternommen haben, drängt sich geradezu auf. Die Wissenschaftler haben die vielfach beschriebene manuelle Derivatisierung mit Bortrifluorid und Methanol adaptiert (*Journal of Liquid Research*, 1965, 5: p. 600-608) und auf die MPS-PrepStation übertragen; die Vergleichbarkeit war gewährleistet, schreiben die Autoren.



MPS-PrepStation, wie sie von Colwell, Perkins, Summerhill und Angove zur Darstellung von Fettsäuremethylestern (Derivatisierung) eingesetzt wurde.

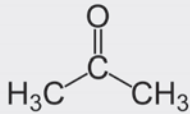
Zunächst wurden die Fettproben in 10-mL-Vials mittels Accelerated Solvent Extraction (ASE) extrahiert und mit deuterierten Fettsäuren versetzt. Die resultierenden Extrakte wurden bis zur Trockene eingedampft und schließlich alle weiteren Schritte automatisiert auf der MPS-PrepStation durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit 1-Bromtetradecan als internem Standard (IS).

Die technischen Details

Entscheidend für die effiziente Automatisierung der Fettsäurederivatisierung ist, dass

sich alle erforderlichen Arbeitsschritte auf dem Autosampler durchführen lassen. Die MPS-PrepStation verfügt über zwei übereinander gelagerte Achsen (Schienen), an denen sich jeweils ein Roboterarm entlangbewegt, der in alle drei Raumrichtungen agieren kann. „Während die obere Schiene der MPS-PrepStation etwa das gesamte Spektrum der Flüssigaufgabe abdeckt, inklusive Standardaddition, Zugabe eines internen Standards und Derivatisierung, kann die zweite Schiene eine abweichende Möglichkeit der Probenanreicherung und Probenaufgabe bieten – etwa Headspace (HS),

Aceton



Aceton ist in jedem Verhältnis mit Wasser und den meisten organischen Lösemitteln mischbar. Daher eignet sich Aceton zur Konditionierung von Spritzen, um beim Wechseln von wässrigen zu öligen Phasen und umgekehrt Benetzungsproblemen vorzubeugen, so wie es Colwell, Perkins, Summerhill und Angove im Zuge ihrer Probenvorbereitung gemacht haben.



SolidPhaseMicroExtraction (SPME) oder automatisiert SPE“, erklärt Ray Perkins. Die MPS-PrepStation ermöglicht es, selbst komplexe Analysen effizient, komfortabel, zeitlich verschachtelt und *just in time* durchzuführen, was insbesondere dann interessant ist, wenn es sich um sensible, leicht zerstörbare Proben handelt und ein Verlust an Substanz im derivatisierten Zustand zu befürchten ist.

Die MPS-PrepStation von Colwell, Perkins, Summerhill und Angove war mit einer 1-mL- sowie einer 10-µL-Spritze ausgestattet sowie mit zwei beheizbaren Agitatoren und einer Lösemittelstation, die Platz für vier Lösemittelbehälter bietet. Zwei enthielten Wasser der Qualitätsstufe HPLC-Grade, einer war mit Aceton gefüllt.

Der in Hexan gelöste interne Standard sowie das Derivatisierungsreagens (BF₃ in Methanol) wurden in je einem 100-mL-Vial bevorratet. Kontrolliert und gesteuert wurde die Probenvorbereitung mittels GERSTEL-MAESTRO-Software. Die anschließende Analyse erfolgte auf einer Kombination GC 6890 und MSD 5973 von Agi-

Tabelle 1

Durch GC/MS ermittelte Peakflächen ausgewählter Fettsäuremethylester einschließlich der deuterierten Standards nach manueller Derivatisierung.

Manuelle Derivatisierung	Zielkomponenten			Wiederfindung deuterierter Standards		
	Methyl-myristat	Methyl-palmitat	Methyl-stearat	Methyl-myristat	Methyl-palmitat	Methyl-stearat
Extrakt 1	5911552	560429	6651084	22453164	5917192	20516698
Extrakt 3	5214954	464150	5963759	19187919	5314788	17406052
Extrakt 5	6299444	526698	6967218	24595728	6292183	22172220
Extrakt 7	5947941	428824	6595360	22733879	5813124	20426225
Extrakt 9	5592389	509097	6143239	21871223	5455742	19616556
Extrakt 11	5377264	409680	5737022	19631692	5376005	17588047
Mittelwert	5723924	483146	6342947	21745601	5694839	19620966
SD	403271	58740	468868	2031093	380398	1843817
%RSD	7,0	12,2	7,4	9,3	6,7	9,4

Tabelle 2

Durch GC/MS ermittelte Peakflächen ausgewählter Fettsäuremethylester einschließlich deuterierter Standards nach automatisierter Derivatisierung mittels GERSTEL-MPS-PrepStation.

Automatisierte Derivatisierung	Zielkomponenten			Wiederfindung deuterierter Standards		
	Methyl-myristat	Methyl-palmitat	Methyl-myristat	Methyl-palmitat	Methyl-myristat	Methyl-palmitat
Extrakt 4	6344831	532349	6898268	22216496	6108466	21780161
Extrakt 6	6116601	502786	6809711	21822825	6002122	19655581
Extrakt 8	5738027	533162	6325660	23609555	5619961	21100648
Extrakt 10	5788570	499413	6257615	21053158	5814404	18986733
Extrakt 12	5711370	529985	5955155	20983184	5299360	18702875
Mittelwert	5939880	519539	6449282	21937044	5768863	20045200
SD	278869	16915	396131	1069993	321877	1341459
RSD (%)	4,7	3,3	6,1	4,9	5,6	6,7

Tabelle 3

Vergleich der Durchschnittswerte der mittels GC/MS ermittelten Peakflächen nach manueller und automatisierter Derivatisierung der Probenextrakte.

	Zielkomponenten			Wiederfindung deuterierter Standards		
	Myristat	Palmitat	Stearat	Myristat	Palmitat	Stearat
Mittelwert (manuell)	5723924	483146	6342947	21745601	5694839	19620966
Mittelwert (PrepStation)	5939880	519539	6449282	21937044	5768863	20045200
Unterschiede (%)	3,8	7,5	1,7	0,9	1,3	2,2

lent Technologies. „Unsere Gerätekonfiguration erlaubt es“, schreiben die Wissenschaftler, „Probenvorbereitung, Probenaufgabe und Analyse nahtlos ineinander übergehen zu lassen oder wahlweise jeden einzelnen Schritt unabhängig voneinander, das heißt die GC/MS-Analyse separat, durchzuführen.“

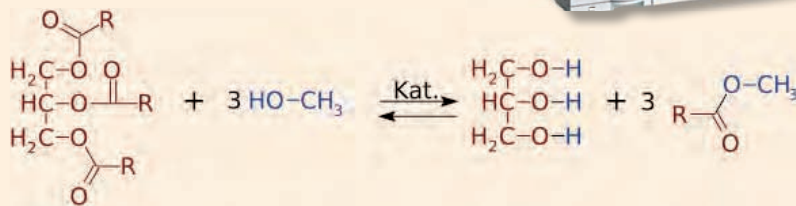
Colwell, Perkins, Summerhill und Angove überführten die 10-mL-Vials mit den eingedampften Extrakten von Hand auf die MPS-PrepStation. Alle weiteren Schritte verliefen voll automatisiert: 1 mL der BF₃/Methanol-Mischung wurde mit der 1-mL-Spritze dem Vorratsbehälter entnommen und zudosiert. Die Vials wurden zum ersten Agitator überführt und für die Dauer

von 5 min bei 70 °C geschüttelt, dann wieder im Proben tray positioniert. Die 1-mL-Spritze kam erneut zum Einsatz, um 1 mL des internen Standards (1-Bromtetradekan in Hexan) in die Probe zu dosieren.

Gestoppt wurde die Derivatisierungsreaktion durch Zugabe von 3 mL HPLC-Wasser. Die Extraktion der Fettsäuremethylester erfolgte für die Dauer von 35 min. bei Raumtemperatur durch Schütteln im zweiten Agitator. Nach einer Standzeit von 1 min im Proben tray hatte sich die organische Phase, in der sich die FAMES ange-reichert haben, von der wässrigen getrennt; mit der 10-µL-Spritze wurde je 1 µL der organischen Phase entnommen und direkt in das GC/MS-System injiziert.

Fettsäuremethylester (FAME)

Fettsäuremethylester (FAME) werden durch Umestern von Fetten oder Ölen (Triglyceriden) mit Methanol hergestellt. Diese Reaktion wird sauer oder basisch katalysiert. Dabei wird der dreiwertige Alkohol Glycerin gegen Methanol ausgetauscht. Es entstehen Glycerin und FAME als Reaktionsprodukte, wobei bei Einsatz von natürlichen Fetten stets ein Gemisch aus verschiedenen Fettsäuremethylestern erhalten wird, da natürliche Triglyceride mehrere verschiedene Fettsäurereste enthalten können. In der Technik wird das Gleichgewicht der Umesterungsreaktion, durch das Entfernen des Glycerins oder durch einen Überschuss des Alkohols (Methanol), auf die Seite der Produkte, also auf die Seite der Fettsäuremethylester, verschoben.



Biodiesel

Schon gewusst? Biodiesel ist ein dem Dieselloststoff vergleichbarer pflanzlicher Kraftstoff. Im Gegensatz zum konventionellen Dieselloststoff wird er nicht aus Rohöl, sondern aus Pflanzenölen oder tierischen Fetten gewonnen, meistens aus Raps (Rapsdiesel). Biodiesel wird deshalb als erneuerbarer Energieträger bezeichnet; chemisch handelt es sich um Fettsäuremethylester (FAME).

Hoher Probendurchsatz, präzise und sichere Ergebnisse

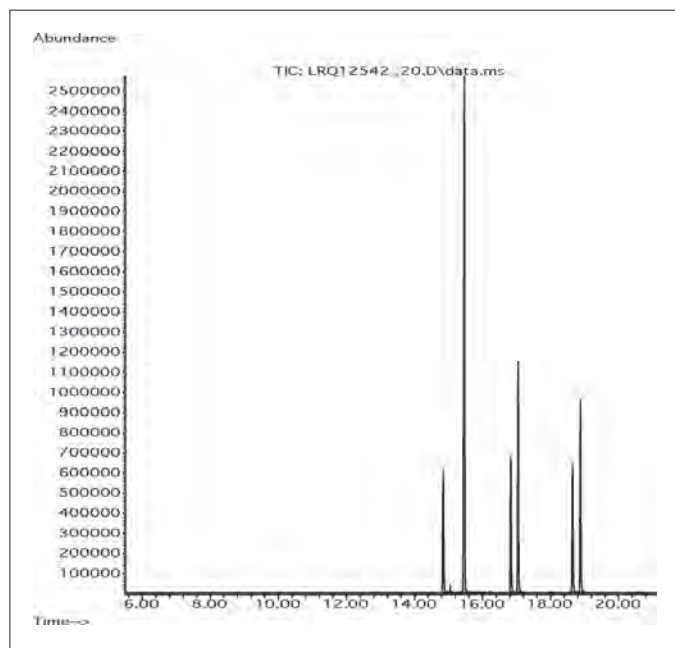
„Da die Probenvorbereitung deutlich mehr Zeit in Anspruch nimmt als der GC-Lauf“, erklärt Ray Perkins, „bedeutet der Einsatz der MPS-PrepStation puren Zeitgewinn, verbunden mit einer signifikanten Steigerung der Produktivität.“

Die Ursache ist in der intelligenten Softwaresteuerung zu finden, die über den Modus „PrepAhead“ verfügt und durch die der Anwender in der Lage ist, beide Schritte – Probenvorbereitung und Analyse – zeitlich zu verschachteln; die Vorbereitung der Proben kann so tief verschachtelt werden, dass sich unmittelbar ein GC-Lauf an den nächsten anschließt.

Die Software erlaube es sogar, die Schritte der Probenvorbereitung exakt zu planen. Nur so lasse sich die Kapazität des gesamten Analysensystems voll und ganz ausschöpfen. Dank des Schedulers, der in der Software integriert ist, hat der Anwender den Ablaufplan konkret vor Augen – auf dem Bildschirm seines Rechners. „Die Proben werden alle gleich behandelt und in der denkbar kürzesten Zeit abgearbeitet“, schreiben Colwell, Perkins, Summerhill und Angove.

Hohe Wiederfindung, präzise Ergebnisse, sichere Analyse

Ihre Arbeit habe gezeigt, schildern die Wissenschaftler, dass sich die bewährte manuelle Vorgehensweise bei der Derivatisierung von freien Fettsäuren in Fettsäuremethylester erfolgreich automatisieren lasse. Ein



GC/MS-Chromatogram (SIM-Mode) einer Probe, der deuterierte Fettsäuren zugesetzt wurden. Die Probenvorbereitung erfolgte automatisiert mit der MPS-PrepStation. Peaks in der Reihenfolge ihrer Elution von links: Methylmyristat (deuteriert), Methylmyristat, 1-Bromtetradecan (interner Standard), Methylpalmitat (deuteriert), Methylpalmitat, Methylstearat (deuteriert), Methylstearat.

Vergleich der manuellen, von erfahrener Hand durchgeführten Derivatisierung mit den Ergebnissen der auf der MPS-PrepStation realisierten automatisierten Prozedur bezeuge die Güte, die Sensitivität und Präzision der automatisierten Vorgehensweise: „Die Automatisierung brachte wie erwartet eine bessere Wiederfindung sowie eine ge-

ringere Standardabweichung in allen Fällen“, konstatieren die Wissenschaftler und merken an, dass ein Teil der ohnehin geringen Schwankungsbreite in den Daten der avisierten endogenen Methylester sowieso mit der individuellen ASE jeder einzelnen Probe, die im Vorfeld der Derivatisierung erfolgte, zusammenhinge.