

Sicherstellung der Systemeignung eines Agilent 8890 GC-Systems mit Retention Time Locking für die Analyse von *cis/trans*-Fettsäuremethylestern nach AOAC 2012.13

Autor

Rachael Ciotti
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Mit AOAC-Methode 2012.13 wird der Fettsäuregehalt in Milchprodukten und Säuglingsnahrung durch Kapillar-Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion bestimmt. Diese Methode wurde auf einem Agilent 8890 GC-System mit einer 100 m langen CP-Sil 88-Säule ausgeführt. Es wurde einerseits ein üblicher Array von 37 Fettsäuremethylestern getestet, andererseits wurde eine detailliertere Untersuchung der Trenneffizienz für Öl-, Linol- und Linolensäuren unter Verwendung von 19 einfach und mehrfach ungesättigten *cis-trans*-Isomeren der C18-Familie durchgeführt. Die Auflösung der wichtigsten kritischen Paare von *cis*- und *trans*-Fettsäuremethylestern wurde mithilfe eines qualitativen Standards beurteilt. Zum Schluss wurde Retention Time Locking (RTL) genutzt, um eine Neuanpassung nach einer Säulenwartung überflüssig zu machen.

Einführung

Milch- und Pflanzenfette enthalten Triglyceride – Ester von Glycerol, an das drei Fettsäurestränge gebunden sind. Fettsäuren bestehen aus terminalen Carboxylgruppen, die mit einer Kohlenwasserstoffkette verbunden sind, welche kurz oder lang, linear oder verzweigt und gesättigt oder einfach- oder mehrfach ungesättigt sein kann. Die Konfiguration und Position der Doppelbindung in ungesättigten Fettsäuren führt zu zahlreichen Positions- und *cis-trans*-Isomeren. Korrekte Identifizierung der Isomere ist eine entscheidende Voraussetzung für eine präzise Nährwertkennzeichnung.

Die Trennung und Identifizierung von Fettsäurehomologen und -isomeren in einer komplexen Matrix ist eine Herausforderung. Nach Veresterung können die entsprechenden Fettsäuremethylester (FAMES) durch Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion reproduzierbar analysiert werden. Die Elutionsreihenfolge der Isomere und die Trenneffizienz sind in hohem Maße abhängig vom Typ der stationären Phase und von der Länge der Säule. Zwar lässt sich eine vollständige Auflösung der Vielzahl unterschiedlicher *cis-trans*-Isomere der Fettsäuremethylester (FAMES) durch keine Säule erreichen, eine Kapillarsäule wie die CP-Sil 88, beschichtet mit einer hochpolaren stationären Cyanopropyl-Phase und einer Länge von 100 Metern, ermöglicht jedoch die zuverlässige, detaillierte Trennung der meisten *cis*- und *trans*-Isomere von FAMES. Anders als bei herkömmlichen WAX-Säulen eluieren bei der hochpolaren stationären Cyanopropyl-Phase die *trans*-Isomere vor den *cis*-Isomeren.

Experimentelles

Zur Erfassung der Daten wurde ein Agilent 8890 Gaschromatograph, konfiguriert mit einem Split/Splitless-Einlass (SSL), einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einem Agilent 7693A automatischen Flüssigprobengeber (ALS), eingesetzt.

Chemikalien

Zur Bewertung der FAME-Leistung wurden gekaufte Analysestandards verwendet:

- Eine FAME-Mischung aus 37 Komponenten (47885-U), die C4- bis C24-FAMES in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 600 µg/ml enthielt
- Eine Mischung aus vier *cis-trans*-Linolsäuremethylestern mit einer Gesamtkonzentration von 10 mg/ml (CRM47791)

- Eine Mischung aus acht Linolensäuremethylester-Isomeren (L6031), die jede Komponente in einer Konzentration von 3 bis 30 GEW.-% enthielt
- Eine Mischung zur Prüfung der Säulenleistung (40495-U), die verschiedene *cis-trans*-FAMES in einer Konzentration von 2,5 mg/ml enthielt

Alle oben genannten Mischungen wurden von Millipore Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen. Eine Mischung aus acht *cis-trans*-FAMES (35079) wurde von Restek (Belleronte, PA, USA) gekauft.

Tabelle 1: Gerätebedingungen.

Parameter für den Agilent 8890 GC – offizielle AOAC-Methode 2012.13	
Injektion	
Spritzengröße	10 µl, Best.-Nr. G4513-80204
Injektionsvolumen	1 µl
Einlass	SSL, Split-Modus
Temperatur	250 °C
Splitverhältnis	10:1
Septumspülungsfluss	3 ml/min
Säule	Agilent CP-Sil 88, Best.-Nr. CP7489
Abmessungen	100 m × 0,25 mm, 0,20 µm
Trägergas	He, 0,8 ml/min, konstanter Fluss
Ofen	
Anfangstemperatur	60 °C
Anfängliche Haltezeit	5 Minuten
Anstieg	15 °C/min auf 165 °C, Haltezeit 1 Minute 2 °C/min auf 225 °C, Haltezeit 20 Minuten
Detektor	
Typ	FID
Temperatur	250 °C
Luftfluss	400 ml/min
H ₂ Brenngasfluss	40 ml/min
N ₂ Makeup-Gasfluss	25 ml/min

Ergebnisse und Diskussion

Zur Beurteilung der Trennung über den gesamten Bereich hinweg (Abbildung 1) wurde eine Mischung von 37 FAMES von C4:0 bis C24:0 in Dichlormethan als Lösungsmittel injiziert. Ein Sollwert von 60 °C für die Anfangstemperatur des Ofens und die Haltezeit stellen sicher, dass C4:0, ein wichtiger Indikator für die Milchqualität, von der Lösemittelfront getrennt wird. Das Programm für den Ofentemperaturanstieg ermöglicht die effiziente Trennung der *cis-trans*-Isomere und der langkettigen mehrfach ungesättigten FAMES, abgesehen von den C23:0- und C20:4n6-Peaks, die bei etwa 48 Minuten koelulieren. C23:0 kommt jedoch in Milch üblicherweise nicht vor, sodass dies nur von geringer Bedeutung ist.

Die detaillierte Trennung von *cis-trans*-Isomeren wurde unter Verwendung von im Handel erhältlichen Referenzstandardmischungen untersucht. Eine Mischung von acht *cis/trans*-FAMES in Dichlormethan von Restek wurde 20fach in Dichlormethan verdünnt und in den GC injiziert. Die Methode ist zur Auflösung der sechs *cis-trans*-C18:1-FAME-Isomere gut geeignet (Abbildung 2).

Zwar tritt geringfügige Koelution der *trans*-Isomere auf, die Gruppe ist jedoch von den einfach ungesättigten *cis*-C18-Isomeren gut getrennt, was erforderlich ist, weil gemäß der offiziellen AOAC-Methode 2012.13 *trans*-Fettsäuren im Bericht als Gruppe aufgeführt werden.

Zur Charakterisierung der Trennung der C18:2-Isomere wurde eine Mischung von Linolsäuremethylester-FAMES in Dichlormethan (MilliporeSigma CRM47791) auf eine Endkonzentration von 500 mg/l verdünnt. Abbildung 3 zeigt, dass alle Linolsäure-FAME-Isomere gut aufgelöst sind.

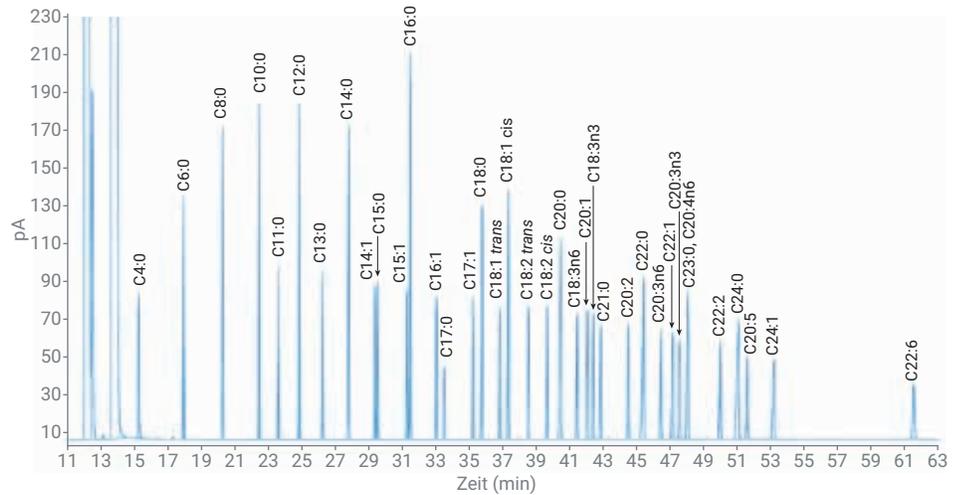


Abbildung 1: Chromatogramm von 37 Fettsäuremethylestern.

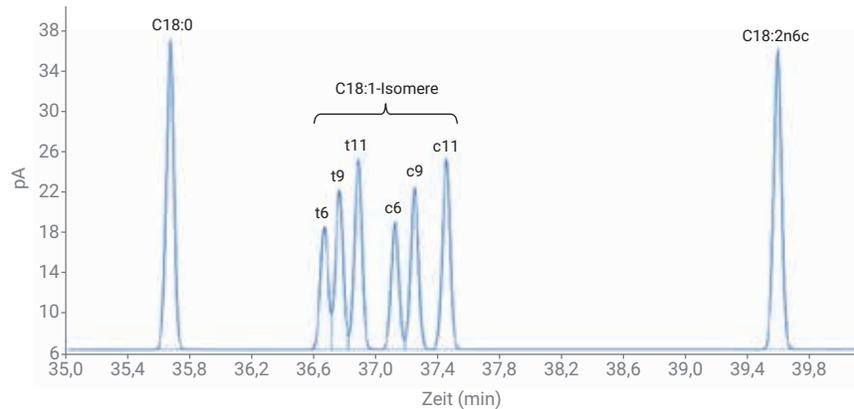


Abbildung 2: Vergrößertes Chromatogramm von C18:1-Isomeren, analysiert nach AOAC-Methode 2012.13.

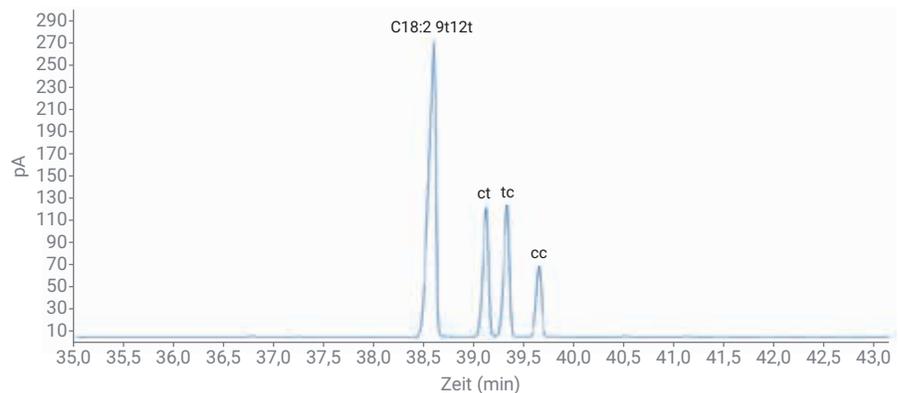


Abbildung 3: Vergrößertes Chromatogramm von C18:2-Isomeren, analysiert nach AOAC-Methode 2012.13.

Schließlich wurde die Leistung der Methode bei C18:3-Isomeren durch Injektion einer Linolensäuremethylester-Mischung (MilliporeSigma L6031), verdünnt auf 2,5 mg/ml in Dichlormethan untersucht (Abbildung 4). Die Linolensäuremethylester-Isomere können auf keiner Säule vollständig aufgelöst werden. Jedoch sind die *trans*-Bindungen enthaltenden Isomere ausreichend vom *alpha*-Linolensäuremethylester getrennt, wie es für die Zwecke der Deklaration der Nährwertdaten erforderlich ist.

Methode AOAC 2012.13 erfordert eine Leistungsbewertungsprüfung vor der Kalibrierung. Es wird die Auflösung zwischen dem Peak von *trans*-C18:1n13t/C18:1n14t und dem Peak von *cis*-C18:1n9c/C18:1n10c untersucht (Abbildung 5, Ausschnitt). Nach Gleichung 1 ist eine ausreichende Auflösung erzielt, wenn der berechnete R-Wert gleich oder größer als 1,00 ist. Zur Beurteilung der Auflösung sowie der Flächen/Retentionszeit-Reproduzierbarkeit wurden fünf Replikate einer aus verschiedenen *cis-trans*-FAMES bestehenden Mischung zur qualitativen Prüfung der Säulenleistung (MilliporeSigma 40495-U) injiziert.

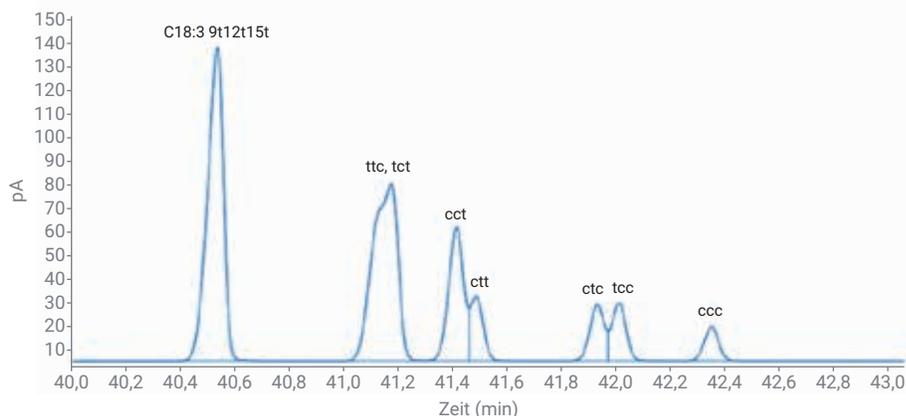


Abbildung 4: Vergrößertes Chromatogramm, das die Auflösung der C18:3-Isomere nach der AOAC-Methode 2012.13 zeigt.

$$R = 1,18 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0,5h1} + W_{0,5h2}} \right)$$

Gleichung 1. Peakauflösung in halber Höhe.

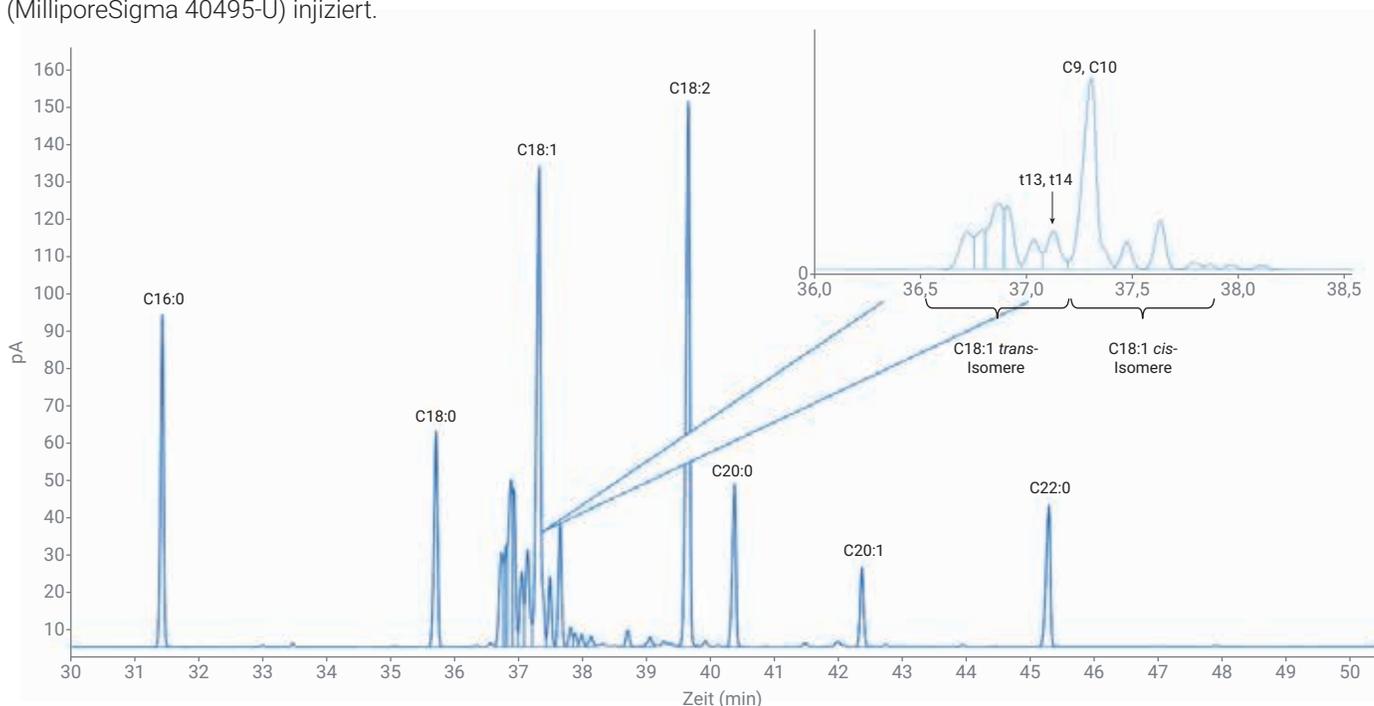


Abbildung 5: Vergrößertes Chromatogramm eines Standards zur qualitativen Prüfung der Säulenleistung.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse für das bei diesem Auflösungstest verwendete kritische Paar zusammengefasst: Die Retentionszeit-Reproduzierbarkeit ist mit einer relativen Standardabweichung (RSD) von 0,007 % für beide Isomere hervorragend. Die Peakflächengenauigkeit liegt für beide Isomere bei 2,5 % relativer Standardabweichung (RSD). Die mittlere Peakauflösung bei der halben Höhe von 1,494 übertrifft die Mindestanforderungen der Methode an die Auflösung.

Retention Time Locking

Die korrekte Identifizierung der mit der Methode AOAC 2012.13 bestimmten Palette an FAMEs setzt sowohl Temperatur- als auch Flussgenauigkeit voraus. Folglich ist die Methode ein hervorragender Kandidat für den Einsatz des Retention Time Locking. Die Agilent RTL-Funktion bietet langfristige Reproduzierbarkeit auf einem bestimmten Gerät und macht die Anpassung der Retentionszeiten nach einer Säulenwartung überflüssig. Nach Übertragung der Methode auf einen anderen GC gewährleistet sie die Beibehaltung derselben Retentionszeiten und vereinfacht damit den Methodentransfer sowie Ringversuche zwischen verschiedenen Laboren. Retention Time Locking (RTL) erfasst auf korrekte Weise die Beziehung zwischen Einlassparametern und der Retentionszeit während einer Reihe von Referenzläufen, ordnet anhand dieser Informationen Retentionszeiten einer bestimmten Verbindung zu und sperrt sie, dann wobei das System mithilfe der Ergebnisse kalibriert und der Zusammenhang in der Methodendatei gespeichert wird.

Agilent OpenLab CDS 2 Acquisition bietet einen RTL-Assistenten, der den Anwender durch den Prozess führt, indem er zusammen mit einer aus einer zuvor erstellten Datendatei ausgewählten Zielsubstanz ein Datenerfassungsverfahren für das Locking festlegt. Anschließend plant der RTL-Assistent eine Folge von Druckkalibrierungsläufen auf der Grundlage der vom festgelegten Erfassungsverfahren angegebenen Parameter. Ein Lauf wird mit dem ursprünglichen Drucksollwert durchgeführt und zwei Läufe mit einer

Druckabweichung vom Methodensollwert um 15 % nach oben bzw. nach unten. Die Abweichung vom Drucksollwert simuliert Änderungen der Säulenlänge, wie sie nach der Wartung häufig auftreten, z. B. nach dem Kürzen von Säulen. Bei gesperrten Methoden ist eine Neuanpassung der Retentionszeit nach der Wartung oder dem Austausch einer Säule nicht erforderlich. Vielmehr können die ursprünglichen

Geräte-Retentionszeiten auf dem Gerät anhand eines einfachen Relocking-Standards abgeglichen werden. Wird der Relocking-Standard auch als Standard für die Bewertung der Säulenleistung verwendet, kann der Anwender die in der AOAC-Methode 2012.13 festgelegten Anforderungen hinsichtlich der Leistungsbewertung in einem einzigen Schritt erfüllen.

Tabelle 2: Ergebnisse von fünf Wiederholungsinjektionen einer FAME-Standardmischung zur qualitativen Prüfung der Säulenleistung.

Wert	Beschreibung	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	RSD
t _{R1}	Retentionszeit 1 in min, t13/t14-Peak	37,124	37,125	37,128	37,128	37,13	0,007 %
t _{R2}	Retentionszeit 2 in min, c9/c10-Peak	37,304	37,305	37,308	37,308	37,31	0,007 %
	Fläche, t13/t14-Peak	115,605	113,463	117,747	115,944	120,812	2,356 %
	Fläche, c9/c10-Peak	599,259	588,91	610,828	602,276	628,644	2,458 %
W _{0,5H1}	Breite bei halber Höhe, t13/t14-Peak	0,073	0,072	0,073	0,073	0,074	0,969 %
W _{0,5H2}	Breite bei halber Höhe, c9/c10-Peak	0,069	0,069	0,069	0,069	0,07	0,646 %
R	Peakauflösung in halber Höhe	1,496	1,506	1,496	1,496	1,475	0,77 %

To complete the RTL calibration, the wizard will perform three runs. The first run is completed at a flow/pressure lower than the method setpoint, the second run is completed at the flow/pressure in the method, and the third run is completed at a higher flow/pressure than the method setpoint. Specify the pressure change for runs 1 and 3, and specify the sample vials for each of the runs. For liquid samples, this can be the same vial. For headspace samples, prepare three separate vials.

Run #	% Change in Pressure	Pressure	Vial Number
1	- 15%	21.673 psi	107
2		25.498 psi	107
3	+ 15%	29.323 psi	107

Injection Source: **GC Injector - Front**

From the chromatogram or table below, please select the retention time of your locking compound. If you wish to set that retention time to a specific value, please enter that in the "Targeted Retention Time" box.

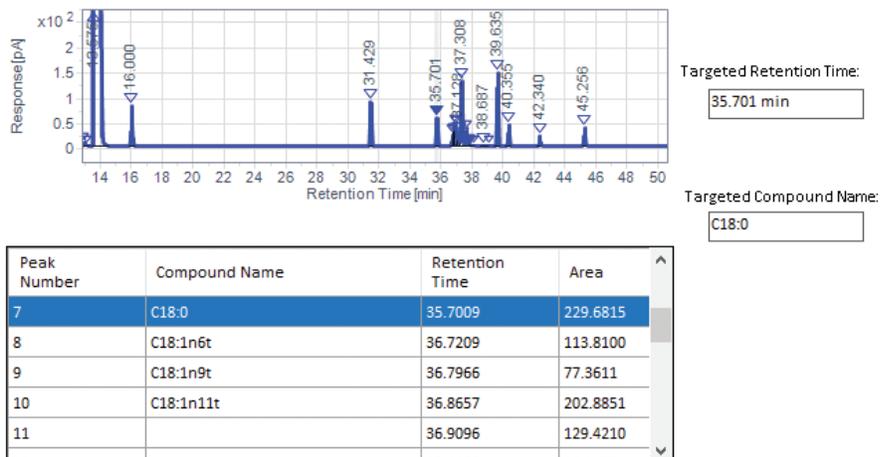


Abbildung 6: Konfigurationsbildschirm für den Retention Time Locking-Assistenten.

Der Mischungsstandard von *cis/trans*-FAMES zur Bewertung der Säulenleistung wurde eingesetzt, um ein Retention Locking der Methode durchzuführen. Ein Datenerfassungsverfahren, eine Auswertungsmethode und eine Datei mit verarbeiteten Resultaten einer zuvor erfassten Injektion des Mischungsstandards zur Leistungsbewertung wurden ausgewählt. Als Zielsubstanz für das RTL wurde C18:0 bestimmt. Wie in Abbildung 6 gezeigt, führte der RTL-Assistent den Anwender durch den Druckkalibrierungsprozess, bei dem der C18:0-Peak mit einer Zielretentionszeit von 35,701 Minuten verwendet wurde. Die kombinierte Druckkalibrierungskurve, die bei der vom RTL-Assistenten automatisch geplanten Folge von drei Läufen erhalten wurde, zeigte eine ausgezeichnete Korrelation (Abbildung 7). Die analytische Methode wurde anschließend beim angegebenen Druck von 25,498 psi gesperrt. Anschließend erfolgte eine Säulenwartung, bei der von der 100 m langen CP-Sil 88-Säule etwa 0,5 m am Säulenansatz abgeschnitten wurden.

Um den Verlust an Retention durch die veränderte Säulenlänge zu beurteilen, wurde

der Mischungsstandard von *cis/trans*-FAMES zur Bewertung der Säulenleistung nach der Wartung erneut analysiert. Die Retentionszeit des C18:0-Ziel-Peaks verschob sich um etwa 0,232 Minuten nach vorne. Ohne Retention Locking hätte der Anwender einen Standard mit der gesamten Palette gewünschter FAMES analysieren und die Analyt-Retentionszeiten manuell erneut in die Datenauswertungsmethode eingeben müssen.

Anstelle der manuellen Eingabe der neuen Analyt-Retentionszeiten erfolgte ein Relocking der analytischen Methode mithilfe des RTL-Assistenten, wobei ein neuer Drucksollwert von 25,253 psi festgelegt wurde. Der neue Drucksollwert gleicht die veränderte Säulenlänge aus und gewährleistet die erwarteten Retentionszeiten, sodass das System schneller wieder betriebsbereit ist.



Abbildung 7: Ergebnisse der Druckkalibrierung beim Retention Time Locking.

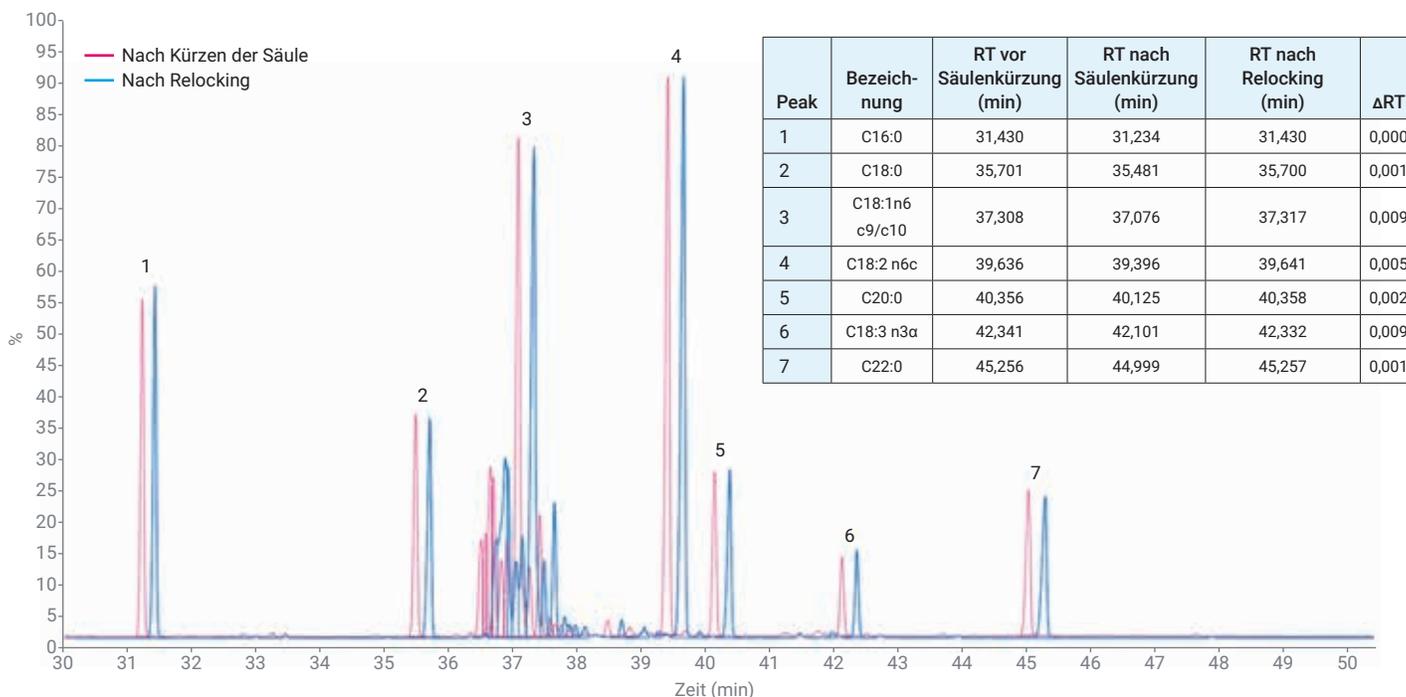


Abbildung 8: Ergebnisse und vergrößerte Überlagerung der Chromatogramme eines Säulenleistungsstandards vor und nach dem Relocking.

Schlussfolgerung

Die Trennung von FAME-Isomeren mithilfe einer 100 m langen Agilent CP-Sil 88-Säule auf einem Agilent 8890 GC-System ergibt eine zuverlässige Auflösung, die die in der AOAC-Methode 2012.13 festgelegten Mindestleistungsanforderungen übertrifft. Mit einem speziellen FAME-Standard zur Prüfung der Säulenleistung wurde eine hervorragende Reproduzierbarkeit der Injektionen erzielt, wobei die relative Standardabweichung der Retentionszeit von zwei wichtigen C18-Isomeren bei 0,007 % lag. Schließlich erlaubt die Anwendung eines Standards zur Prüfung der Säulenleistung zusammen mit Agilents einzigartiger RTL-Funktion die gleichbleibend korrekte Identifizierung von FAME-Isomeren, die schnellere Wiederherstellung der Betriebsbereitschaft nach der Gerätewartung und einfachere Ringversuche zwischen Laboren.

Literatur

1. Official Methods of Analysis AOAC International, Method 2012.13, **2012**.
2. David, F.; Sandra, P.; Vickers, A. K. Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. *Agilent Technologies Application Note*, Publikationsnummer 5989-3760EN **2005**.
3. Zou, Y.; Wu, H. Verbesserung der Analyse von 37 Fettsäuremethylestern. *Agilent Technologies Application Note*, Publikationsnummer 5991-8706DEE, **2018**.

www.agilent.com/chem

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Gedruckt in den USA, 15. November 2019
5994-1184DEE

