

Fra fedtsyreprofil til fedtsyrekoncentration

Semikvantitativ bestemmelse af fedtsyrer i fødevarer med intern standard og GC-MS.

Af Daniel Halling Breiner, seniorspecialist, og Gudrun M. Jónsdóttir, konsulent, Teknologisk Institut

Sammensætningen af fedtsyrer i en given fødevarer har betydning for både smag og holdbarhed. Derfor er det vigtigt, at analyseresultaterne afspejler den reelle mængde af hver fedtsyre i fødevareren og ikke blot dens relative andel af det samlede fedtsyreindhold.

Fedtkvalitetsanalyser af fødevarer er traditionelt blevet gennemført ved bestemmelse af smeltepunkt, iodtal og ved analyse af fedtsyresammensætningen. Ved sidstnævnte bestemmes de enkelte fedtsyrers relative andel typisk ved gaskromatografi koblet til massespektrometri (GC-MS). Metoderne er sårbare over for variationer i prøveforberedelse og instrumentrespons. For at forbedre metodens robusthed og præcision benyttes deutereret intern standard i GC-MS metoden. Den interne standard muliggør korrektion for analyttab og variation i injektionsvolumen, så den relative profil ændres til en semikvantitativ bestemmelse, hvor resultaterne rapporteres i intern standardækvivalenter. Forbedringen giver et mere stabilt og sammenligneligt mål for fedtsyreindholdet og er et afgørende fundament for den videre udvikling mod en fuldt kvantitativ metode.

Fra relativ profil til absolut mængde

Fedtsyrerne omdannes først til fedtsyremethylestere (FAME), som efterfølgende separeres på en GC-kolonne baseret på forskelle i kogepunkt og polaritet. Detektion sker typisk med en flammeioniseringsdetektor (FID) og et massespektrometer (MS), se figur 1.

En traditionel GC-analyse giver et kromatogram (figur 2, side 10), hvor arealet under hver top er proportionalt med mængden af den pågældende FAME. De enkelte fedtsyrers andel beregnes som en procentdel af det samlede areal af alle identificerede fedtsyretoppe. Metoden giver en fremragende fedtsyreprofil, der viser, om fødevareren primært indeholder palmitinsyre eller oliesyre, men den angiver ikke den absolutte koncentration af fedtsyrerne i den oprindelige prøve.

Dette skyldes, at mængden af ekstraheret fedt kan variere, og at små variationer i det injicerede volumen på GC'en kan påvirke det samlede signal. En prøve med 5 procent totalfedt og en prøve med 10 procent totalfedt kan i princippet give en

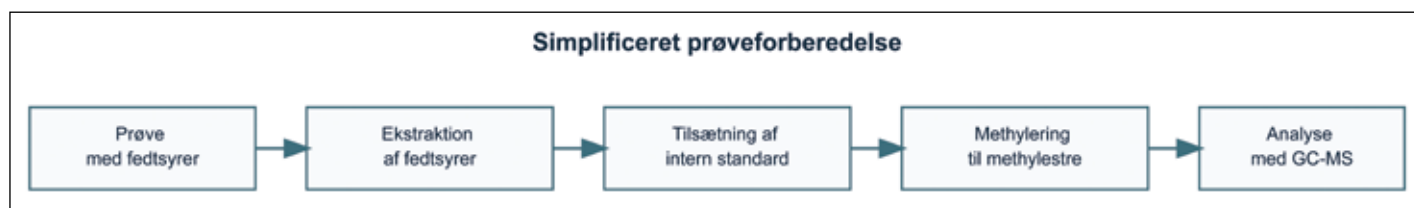


Illustration: www.magnific.com

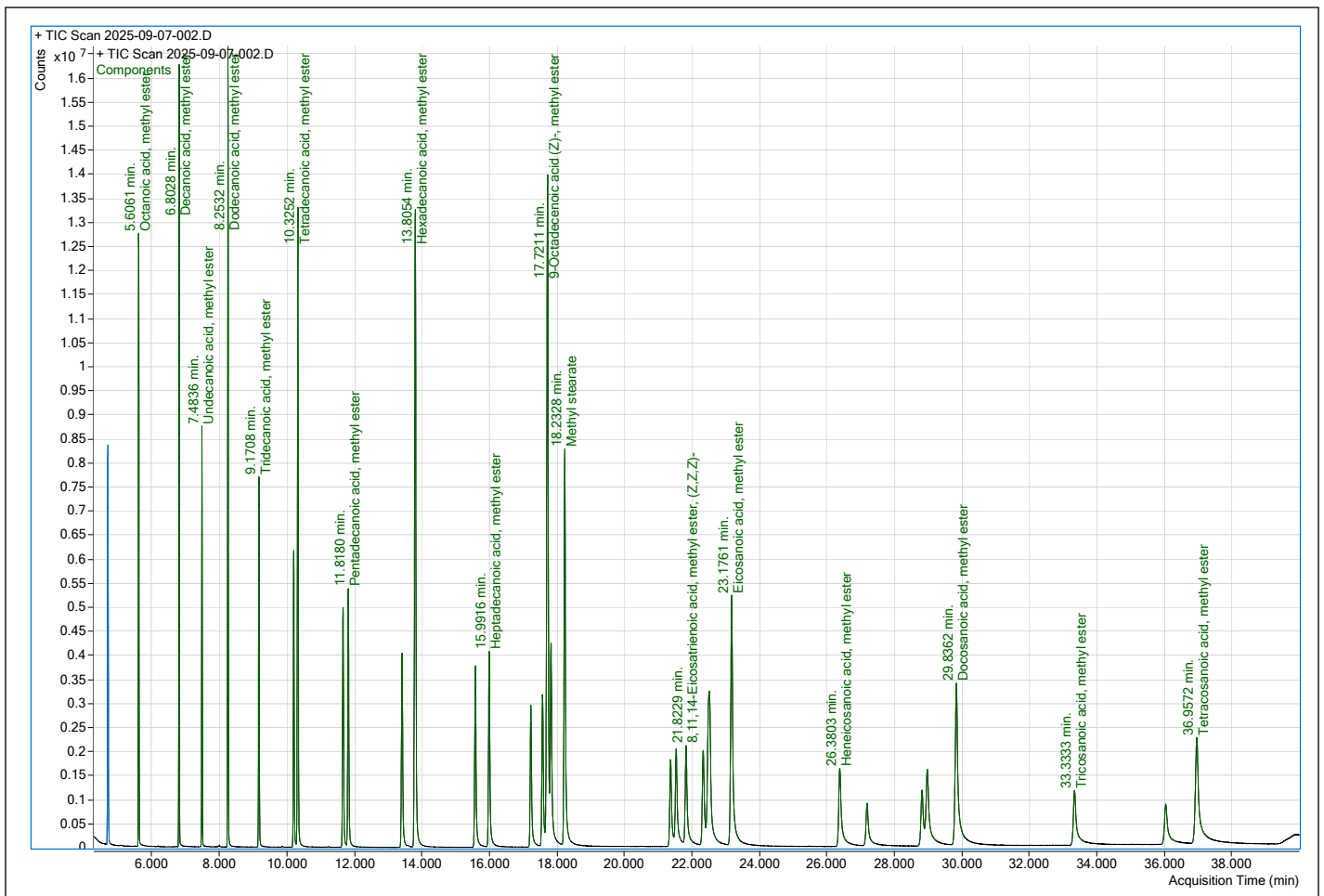
identisk relativ fedtsyreprofil, selvom den faktiske mængde af hver fedtsyre (for eksempel i mg/100 g) er dobbelt så høj i sidstnævnte.

Metodisk tilgang og analyse

Fedtsyrer bestemmes som FAME ved GC-MS efter modificeret lipidekstraktion og methylering [1]. Den kemiske omdannelse af fedtsyrer til FAME foregår i laboratoriet ved en syrekatalyseret transesterificering med bortrifluorid-methanol (BF_3 -MeOH). Metodens pålidelighed hviler på to grundpiller:



Figur 1. Simplificeret flowdiagram for prøveforberedelse ved analyse af fedtsyresammensætning med GC-MS.



Figur 2. Validering af den kromatografiske separation ved analyse af en FAME-standard.

en veldokumenteret kromatografisk separation og en korrekt anvendelse af den interne standard.

Det er afgørende, at GC-MS kan adskille de mange forskellige fedtsyrer, der forekommer i en kompleks prøve. Metodens separationsevne er dokumenteret ved analyse af en certificeret standardblanding, som vist i figur 2. Kromatogrammet bekræfter, at de enkelte FAME, fra de kortkædede mættede til de langkædede flerumættede, opnår en god separation.

I figur 2 ses GC-MS kromatogrammet for en FAME-standardblanding. Denne indgår som reference for retentionstider og massespektre. Referencekørslen er en forudsætning for korrekt identifikation af fedtsyrer i ukendte fødevarer.

Kvantificeringen opnås ved at integrere den interne standard i prøveforberedelsen. En deutereret standard tilsættes før selve transesterificeringen. Ved at lade standarden følge prøven gennem alle oprensningstrin, fungerer den som en intern målestok.

Efter GC-MS analysen bestemmes koncentrationen af hver enkelt fedtsyre ($C_{\text{analyt,semi-kvant}}$) ved at normalisere arealet for den pågældende fedtsyre (A_{analyt}) mod arealet for den interne standard (A_{IS}). Resultatet beregnes ved hjælp af formlen:

$$C_{\text{analyt,semi-kvant}} [\text{mg}/100\text{g}] = \frac{A_{\text{analyt}}}{A_{\text{IS}}} \times \frac{m_{\text{IS}}}{m_{\text{prøve}}} \times 100$$

hvor m_{IS} er den tilsatte masse af intern standard i mg, og $m_{\text{prøve}}$ er den afvejede prøvemasse i g.

Metoden udgør et markant fremskridt med hensyn til præcision og robusthed. I beregningerne ligger der dog en implicit

antagelse om, at alle fedtsyre-metylestre giver samme detektorrespons som den interne standard ved en given koncentration. Dette svarer til at sætte deres indbyrdes responsfaktor til 1.

I praksis er dette en velaccepteret forenkling, men ikke fuldstændig korrekt. Forskellige FAME opfører sig forskelligt, når de analyseres ved GC-MS. Både ioniseringseffektiviteten i ionkilden og fragmenteringsmønstret kan variere afhængigt af molekylets kædelængde og antallet af dobbeltbindinger. Den sande responsfaktor for en kort, mættet fedtsyre som C14:0 vil derfor typisk afvige fra responsfaktoren for en lang, flerumættet fedtsyre som C22:6.

Responsfaktorer er nøglen til nøjagtighed

Ved videreudvikling fra *semikvantitativ* til *fuldt kvantitativ* analyse skal de individuelle relative responsfaktorer (RRF) for hver enkelt fedtsyre bestemmes ved analyse af en standardblanding med kendte koncentrationer af både fedtsyrer (C_x) og den interne standard (C_{IS}).

RRF for hver fedtsyre beregnes som:

$$RRF_x = \frac{A_x/C_x}{A_{\text{IS}}/C_{\text{IS}}}$$

hvor A_x og A_{IS} er de målte peak-arealer.

Den relative responsfaktor bestemmes mest robust ved at fremstille en multipunkts-kalibreringskurve, hvor arealforholdet plottes som funktion af koncentrationsforholdet. Hældningen på linjen er per definition den relative responsfaktor.

Kalibreringen giver både den nødvendige korrektionsfaktor og dokumenterer metodens linearitet for hver enkelt fedtsyre.

RRF er ikke en teoretisk konstant, men et praktisk, relativt mål, der er direkte afhængigt af den valgte interne standard. RRF-værdien beskriver, hvor kraftigt en analyt responderer i massespektrometret i forhold til den interne standard. Ved skift af intern standard vil hele sættet af RRF-værdier for alle fedtsyrer ændre sig.

I udviklingen af metoden er myristinsyre-d27 (C14:0-d27) benyttet som intern standard. Undersøgelser viste, at de eksperimentelt bestemte RRF-værdier, selv for nært beslægtede fedtsyrer, afviger væsentligt fra den idealiserede værdi på 1,0. For eksempel blev RRF bestemt til 0,549 for palmitinsyre (C16:0) og 0,595 for stearinsyre (C18:0).

Dette illustrerer, hvorfor bestemmelsen af individuelle RRF-værdier er et absolut nødvendigt skridt i overgangen fra semi-kvantitative målinger til sande, nøjagtige koncentrationer. De specifikke RRF-værdier er naturligvis kun gyldige for netop denne kombination af analytter og standarden C14:0-d27.

Perspektiv.

Fra sammensætning til kemisk holdbarhed

Den kvantitative fedtsyreanalyse muliggør kobling til andre analytiske data, såsom analyse af flygtige organiske forbindelser (VOC). Aldehyder som hexanal og ketoner er nedbrydningsprodukter fra polyumættede fedtsyrer og bidrager væsentligt til udviklingen af harsk smag. Ved at integrere den kvantitative fedtsyreprofil kan et produkts fedtsyresammensætning kobles til den sensoriske holdbarhed.

Visionen er at kunne besvare følgende spørgsmål:

- Hvor hurtigt udvikler et produkt med en given koncentration af linolensyre uacceptable niveauer af off-flavour-forbindelser?
- Kan fedtsyreprofilen anvendes som prædikator for holdbarhed?

For mange fødevarerprodukter er det den kemiske og ikke den mikrobiologiske holdbarhed, der er den begrænsende faktor [2]. En kvantitativ, kemisk tilgang til holdbarhed vil kunne give et mere objektivt beslutningsgrundlag for kvalitetsstyring og reducere unødvendigt madspild.

Acknowledgements

Tak til Svineafgiftsfonden samt Uddannelses- og Forskningsstyrelsen for finansiel støtte til metodeudvikling og -test.

Tak til Annemette Aufeldt for en velgennemført praktikopgave.

E-mail:

Daniel Halling Breiner: DBRE@teknologisk.dk

Gudrun M. Jónsdóttir: GMJR@teknologisk.dk

Referencer

1. Font-I-Furnols, M., Čandek-Potokar, M., Maltin, C., & Povše, M.P. (2015). Fatty acid analysis in meat and meat products. In *A handbook of reference methods for meat quality assessment* (1st ed., pp. 55-65). COST Action FA1102. www.cost.eu.
2. Skibsted, L.H., Risbo, J., & Andersen, M.L. (2010). *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages* (1st ed.). Woodhead Publishing.

Præcis vakuum- teknologi til dine mest krævende opgaver

Oplev vores innovative HiCube Neo-serie

HiCube Neo-serien er udviklet til dig, der kræver pålideligt højvakuum – hver gang. Med en kombination af avancerede turbomolekylære pumper og effektive forpumper (tør eller oliesmurt) opnår du vakuumniveauer helt ned til 10^{-10} hPa (mbar). Den intuitive betjening, modulopbyggede konstruktion og det lave energiforbrug giver dig en fleksibel og brugervenlig løsning til fx restgasanalyse, vakuumovne og andre avancerede applikationer.

www.pfeiffervacuum.com



Part of the **BUSCH GROUP**

PFEIFFER 
VACUUM+FAB SOLUTIONS