Automatisierung und Effizienzsteigerung in der Speiseölanalytik mittels LC-GC-Kopplung

Dr. Torben Küchler

15. November 2018

Eurofins

Mit einem jährlichen Umsatz von über 3 Milliarden Euro und mehr als 45.000 Mitarbeitern an über 650 Standorten in 45 Ländern, ist Eurofins Scientific eine international führende Labor-Gruppe, mit einem einzigartigen Angebot an Analyse- und Service-Leistungen für die Pharma-, Lebensmittel-, Umwelt-und Konsumgüterindustrie.

Campus Hamburg 2017

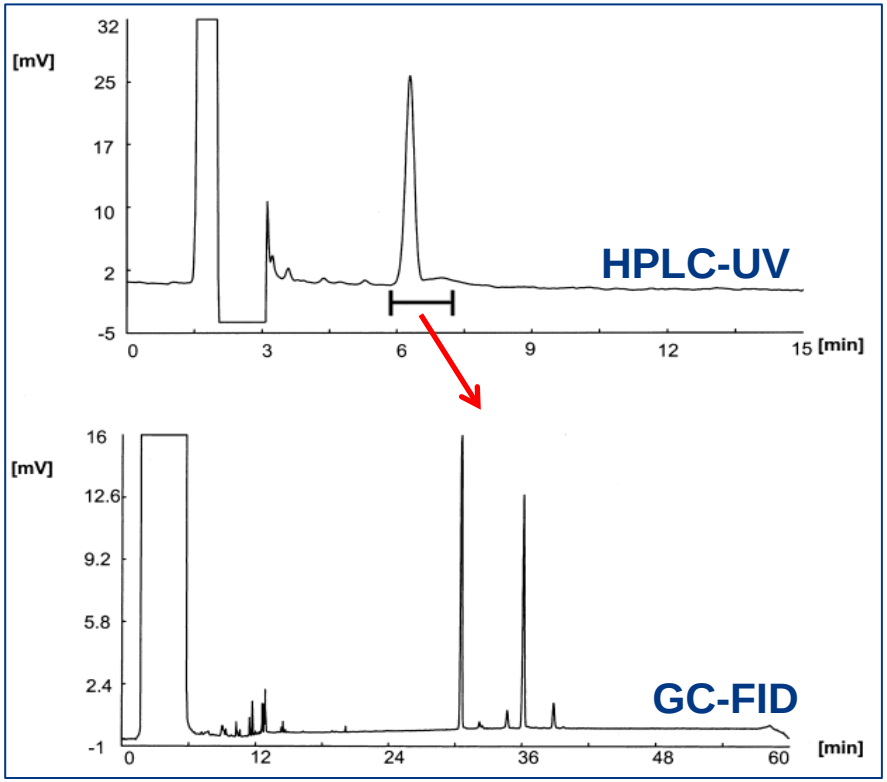
Allgemeines zur LC-GC

Allgemein

- **LC-GC ist die Kopplung von HPLC und GC, weniger um die Auflösung zu erhöhen, sondern mehr, um manuelle Probenvorbereitung zu ersetzen (“heart-cut”).**

- **Die HPLC hat die Funktion der Aufreinigung, Proben-vorbereitung und Vortrennung.**

- **Der Analyt wird aufkonzentriert und per large volume injection in die GC überführt.**



Allgemein

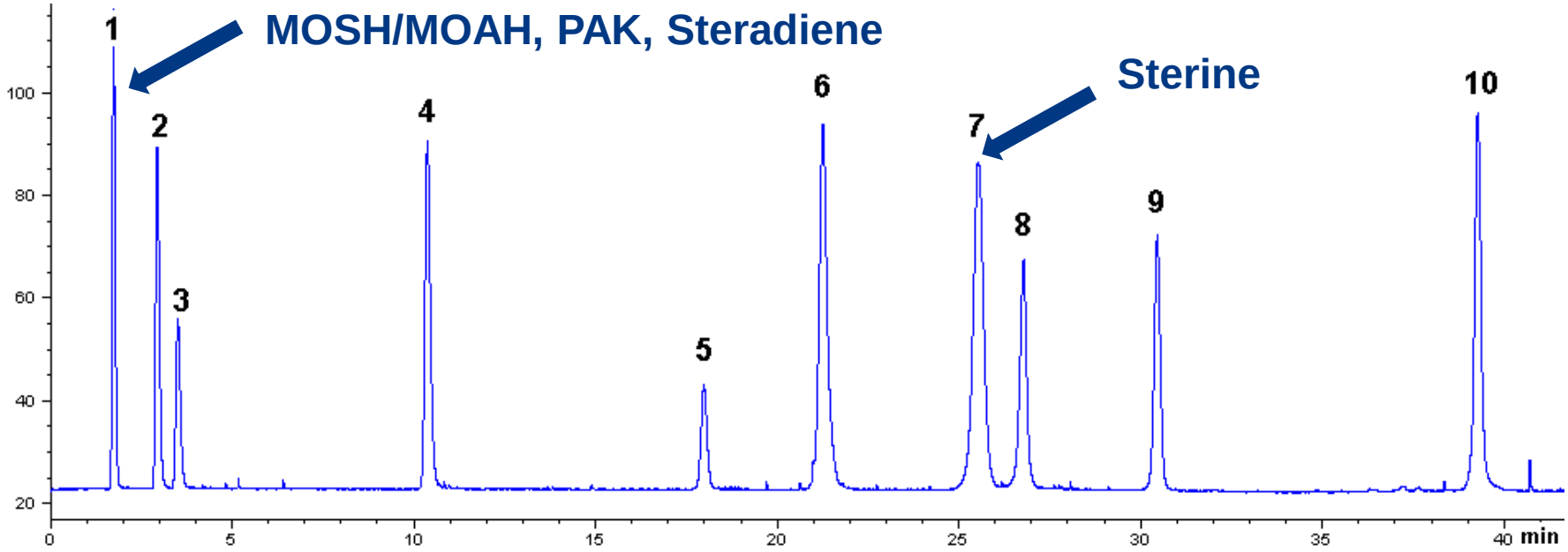
- **Erste Berichte / Forschungsaktivitäten in den frühen 1980er Jahren.** Majors, RE J. *Chromatogr. Sci.* 1980, 18(10), 571-579.

- **Konrad Grob aus Zürich veröffentlichte zwischen 1987 und heute unzählige Artikel in Fachzeitschriften über die LC-GC.**

- **1989 kam ein kommerzielles System auf den Markt.**

- **Seit 2010: Die Herausforderung der Untersuchung von Mineralöl als Kontaminante in Lebensmitteln hat dazu geführt, dass viele Routinelabore sich ein LC-GC-FID-System angeschafft haben.**

Typische chromatographische Elutionsreihenfolge von Lipiden auf Kieselgel:



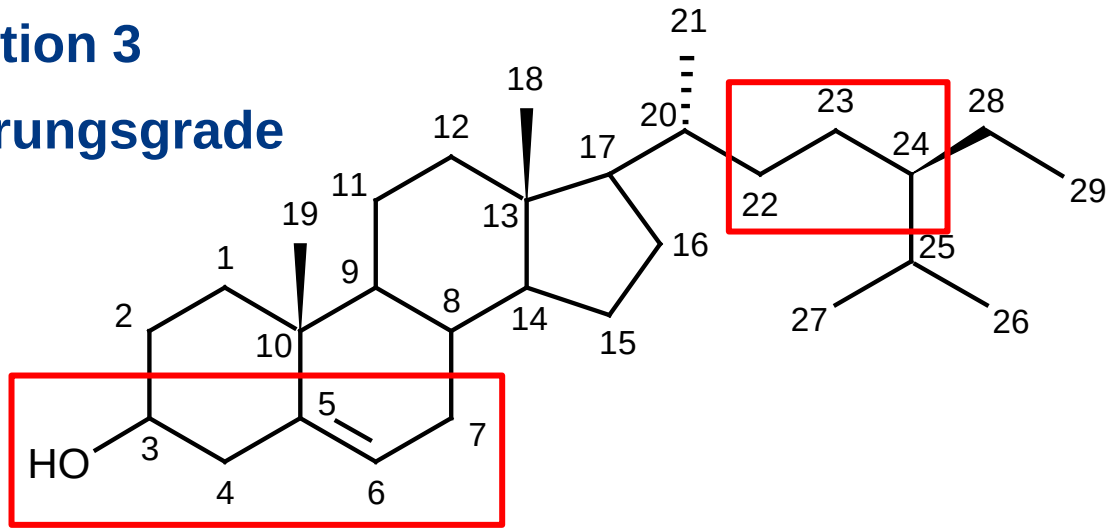
(1) Kohlenwasserstoffe, (2) Wachse, (3) Sterinester, (4) TAG, (5) Fettalkohole, (6) Fettsäuren, (7) Sterine, (8) 1,3-DAG, (9) 1,2-DAG, (10) MAG

Steringehalt und -profil

(LC-GC-FID)

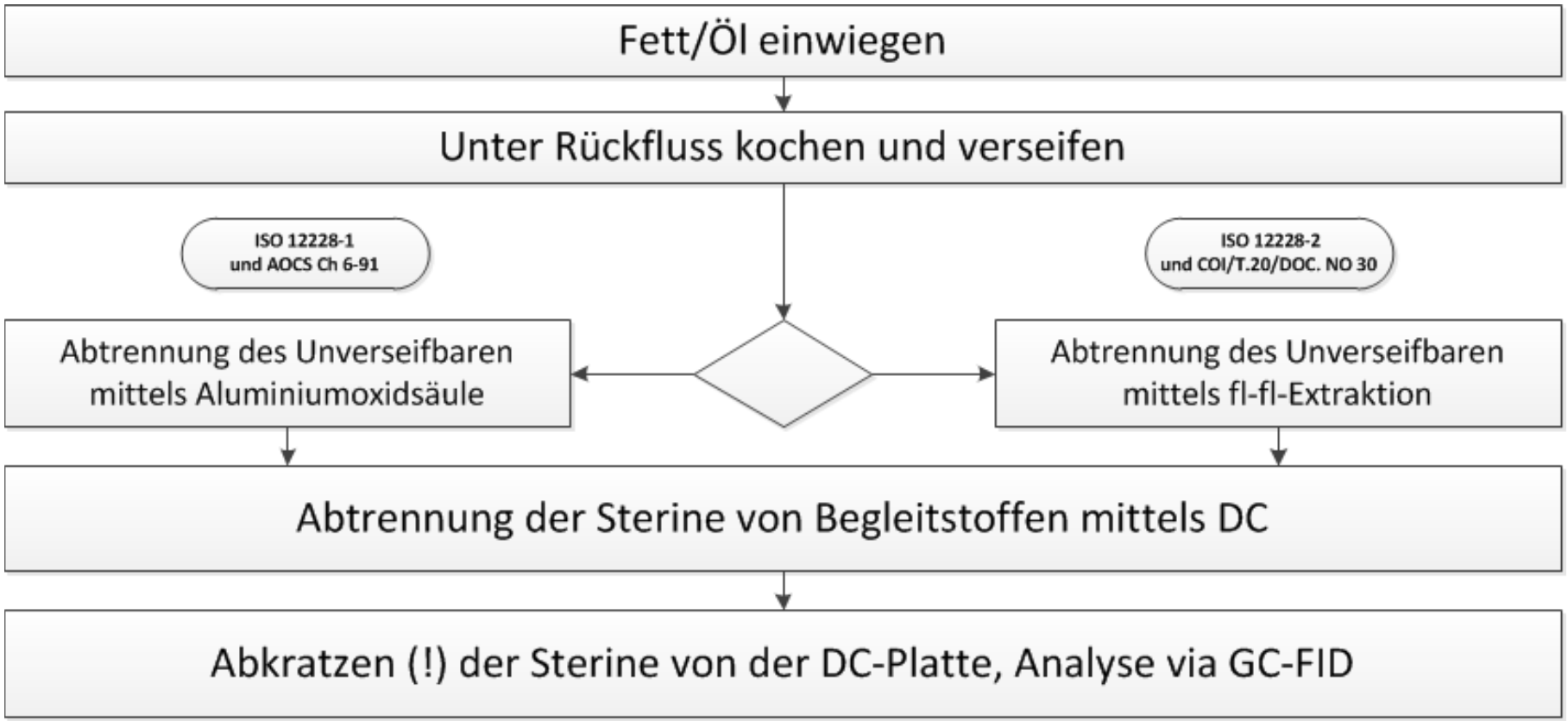
Sterine

- **Hydroxygruppe in Position 3**
- **Verschiedene Methylierungsgrade in Postion 4 möglich**

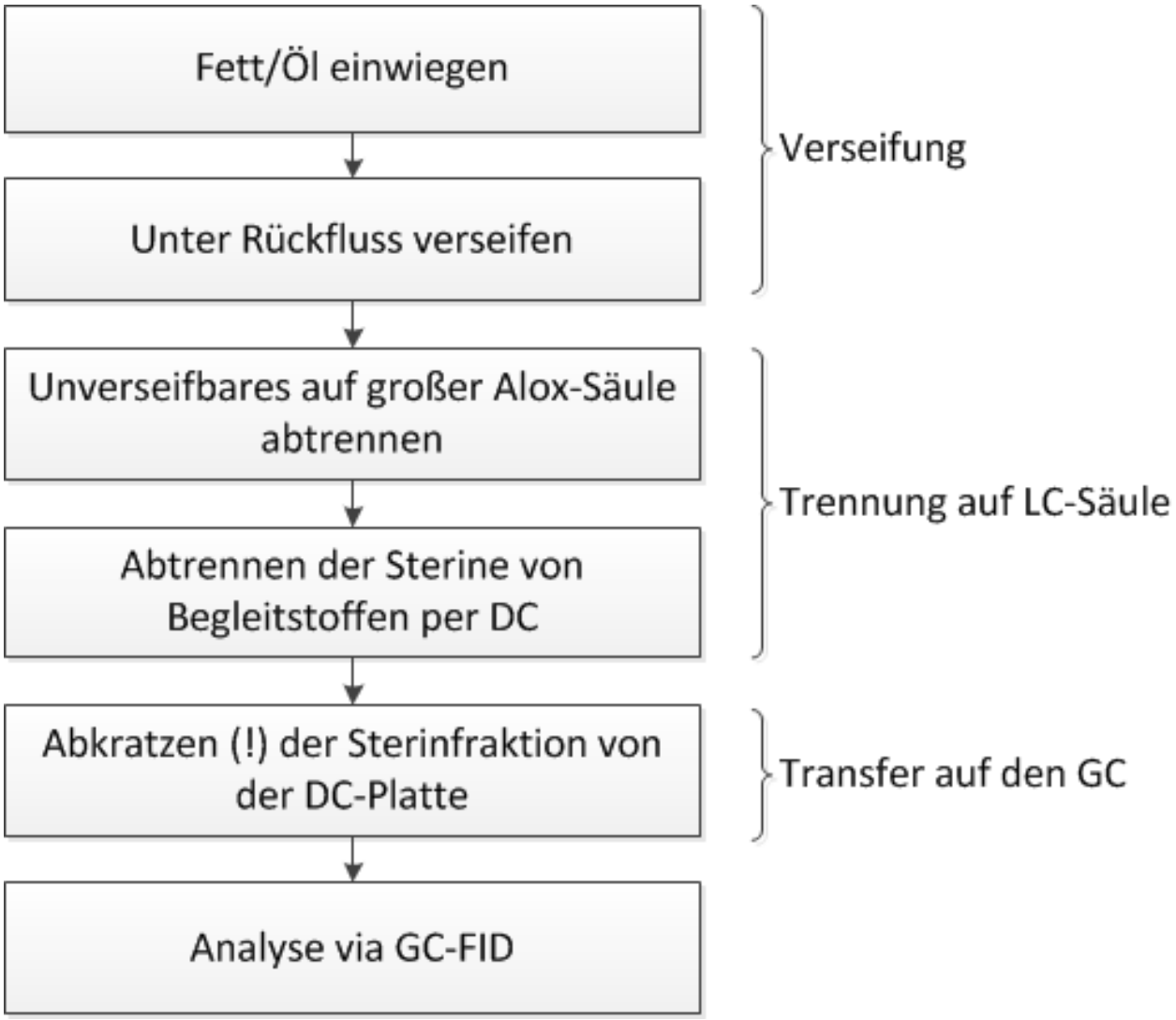


- **Doppelbindung in Position 5 oder 7 (→ Δ5- oder Δ7-Sterine bzw. bei Fehlen Stanole)**
- **Weitere Doppelbindungen an Position 22 und 24 möglich**
- **Für die Prüfung auf Identität und Authentizität werden die Desmethylsterine (keine Methylgruppe in Position 4) untersucht.**

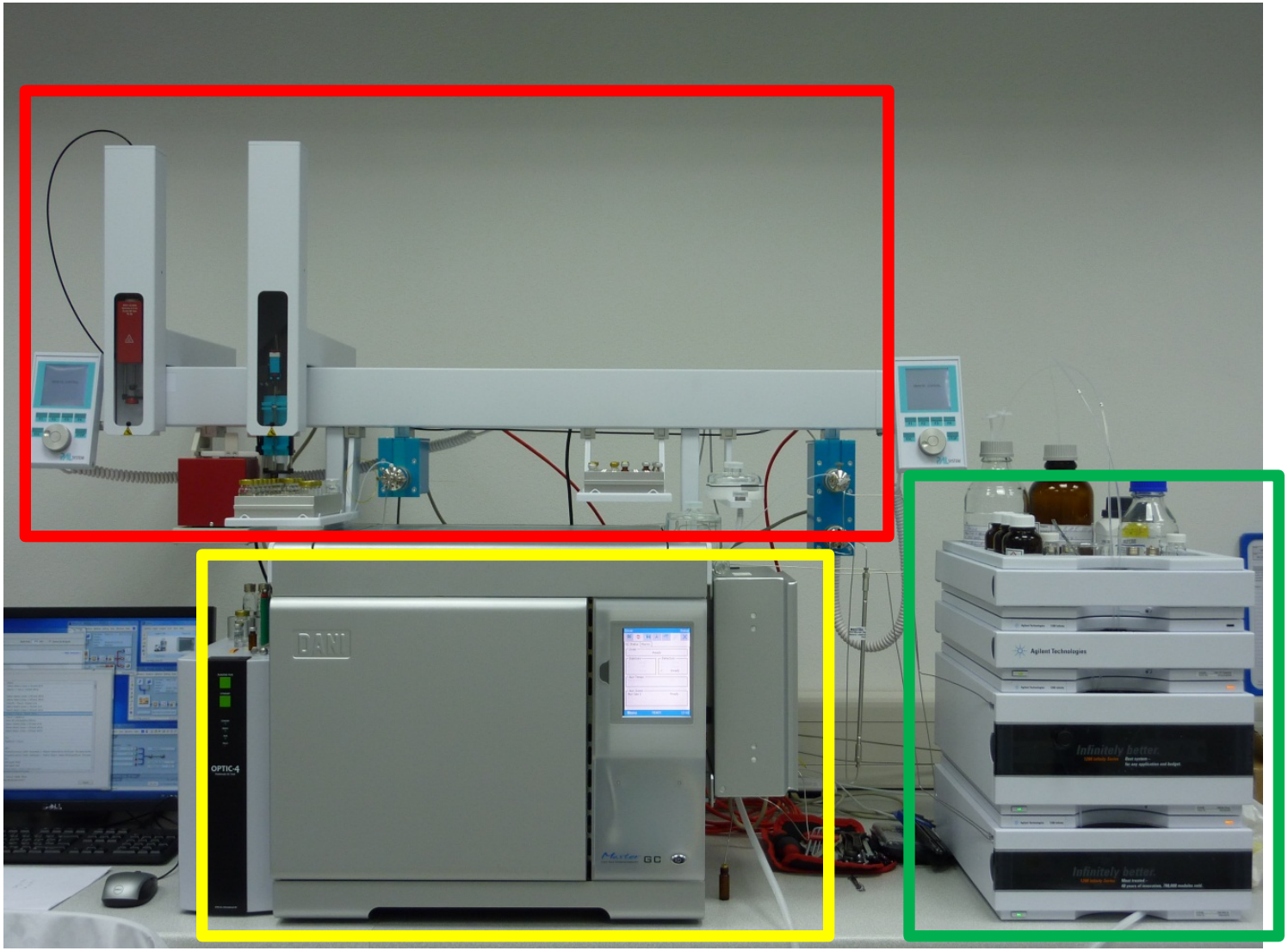
Sterine


Fett/Öl einwiegen
Unter Rückfluss kochen und verseifen
ISO 12228-1
und AOCS Ch 6-91
ISO 12228-2
und COI/T.20/DOC. NO 30
Abtrennung des Unverseifbaren
mittels Aluminiumoxidsäule
Abtrennung des Unverseifbaren
mittels fl-fl-Extraktion
Abtrennung der Sterine von Begleitstoffen mittels DC
Abkratzen (!) der Sterine von der DC-Platte, Analyse via GC-FID

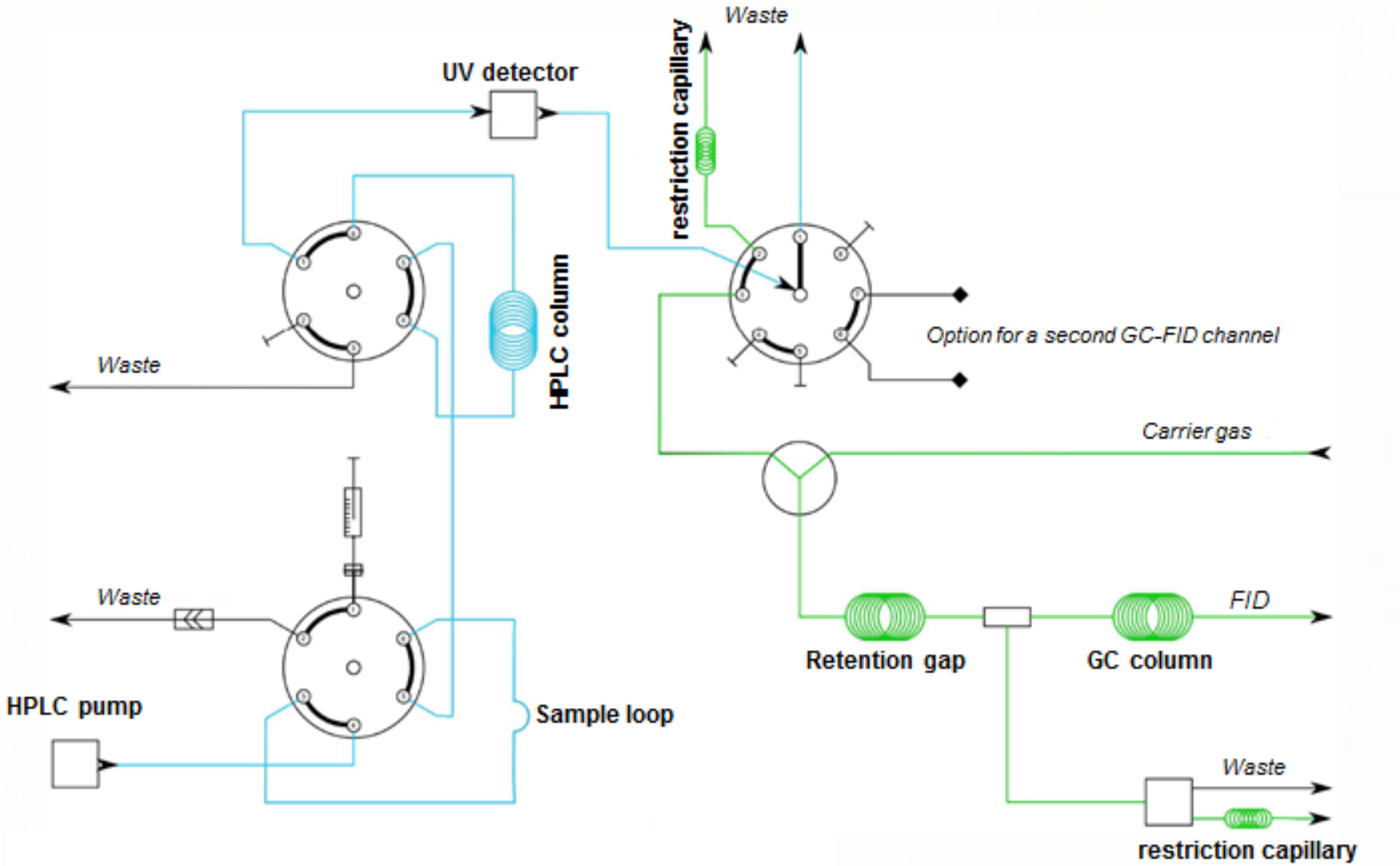
Sterine


Fett/Öl einwiegen
Unter Rückfluss verseifen
Unverseifbares auf großer Alox-Säule abtrennen
Abtrennen der Sterine von Begleitstoffen per DC
Abkratzen (!) der Sterinfraktion von der DC-Platte
Analyse via GC-FID
Verseifung
Trennung auf LC-Säule
Transfer auf den GC

LC-GC

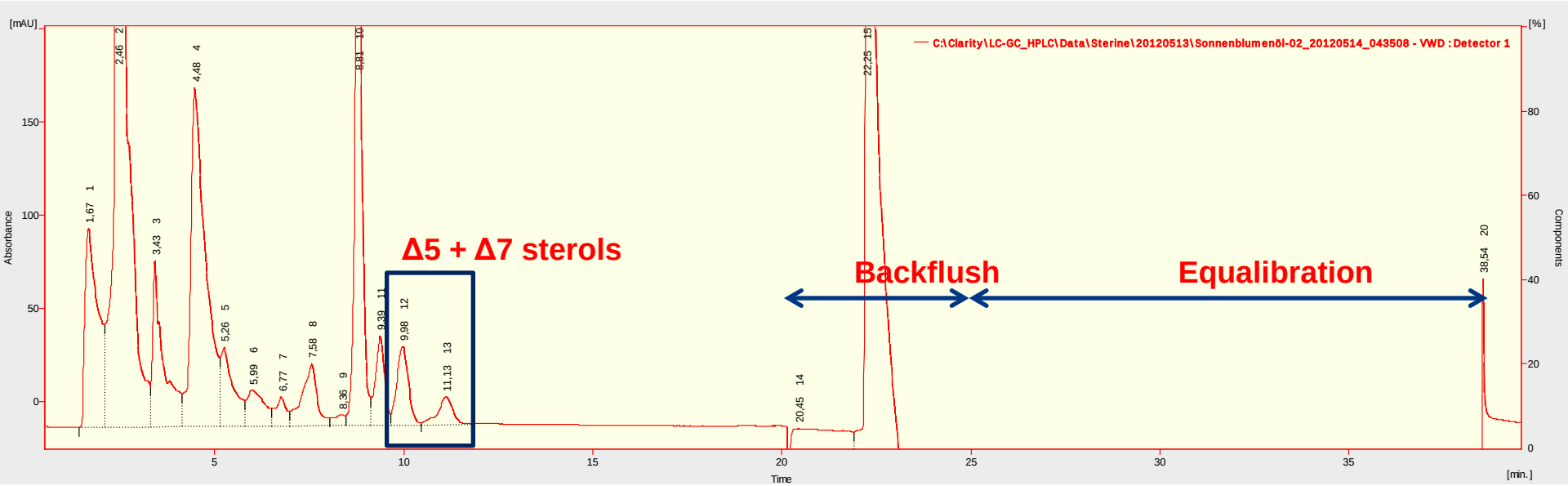

DANI
OPTIC-4
GC
Agilent Technologies
Infinitely better.
Infinitely better.

LC-GC


Waste
UV detector
restriction capillary
HPLC column
Waste
Option for a second GC-FID channel
Carrier gas
Waste
FID
Retention gap
GC column
HPLC pump
Sample loop
Waste
restriction capillary

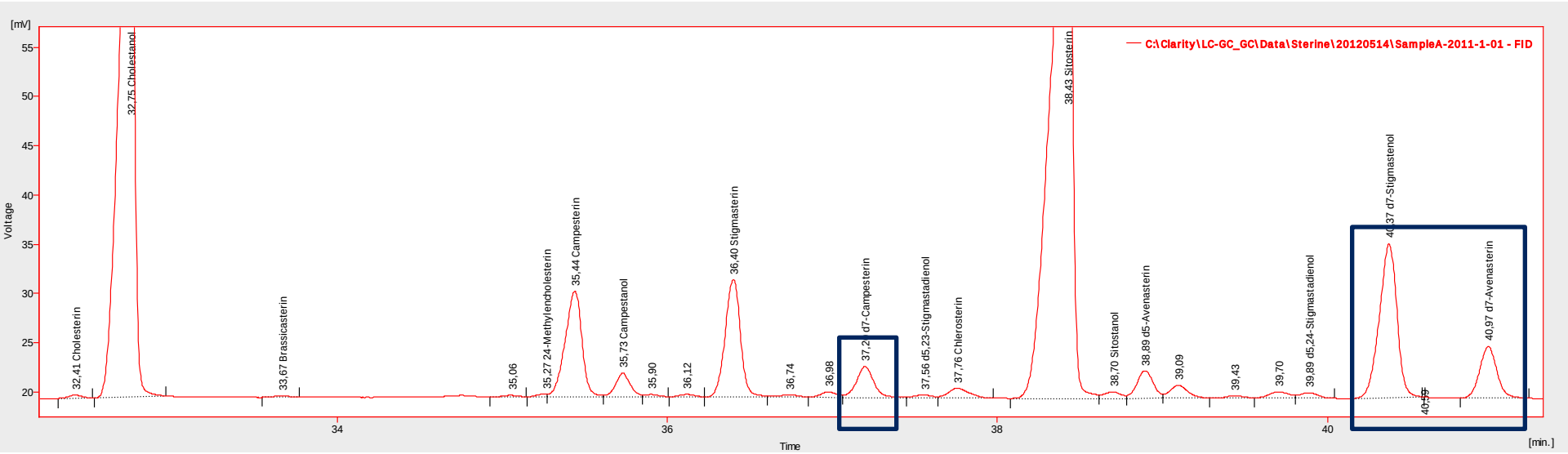
Sterine

Säule	**Kieselgel, 2.1x250 mm, 5 µm**
Eluent (Trennung)	**n-Hexan/2-Propanol (98/2)**
Eluent (Backflush)	**MTBE**



Trennung von Δ5- and Δ7-Sterinen theoretisch möglich

Sterine



Typisch für Sonnenblumenöl: Δ7-Sterine

Sterolic composition of main seed oils according to Codex Alimentarius.

	Rapeseed oil (low erucic acid)	Safflowerseed oil	Safflowerseed oil (high oleic acid)	Soyabean oil	Sunflowerseed oil	Sunflowerseed oil (high oleic acid)	Peanut oil	Maize oil	Grapeseed oil
Cholesterol	ND-1.3	ND-0.7	ND-0.5	0.2-1.4	ND-0.7	ND-0.5	ND-3.8	0.2-0.6	ND-0.5
Brassicasterol	5.0-13.0	ND-0.4	ND-2.2	ND-0.3	ND-0.2	ND-0.3	ND-0.2	ND-0.2	ND-0.2
Campesterol	24.7-38.6	9.2-13.3	8.9-19.9	15.8-24.2	6.5-13.0	5.0-13.0	12.0-19.8	16.0-24.1	7.5-14.0
Stigmasterol	0.2-1.0	4.5-9.6	2.9-8.9	14.9-19.1	6.0-13.0	4.5-13.0	5.4-13.2	4.3-8.0	7.5-12.0
beta-sitosterol	45.1-57.9	40.2-50.6	40.1-66.9	47.0-60.0	50.0-70.0	42.0-70.0	47.4-69.0	54.8-66.6	64.0-70.0
delta-5-avenasterol	2.5-6.6	0.8-4.8	0.2-8.9	1.5-3.7	ND-6.9	1.5-6.9	5.0-18.8	1.5-8.2	1.0-3.5
delta-7-stigmastenol	ND-1.3	13.7-24.6	3.4-16.4	1.4-5.2	6.5-24.0	6.5-24.0	ND-5.1	0.2-4.2	0.5-3.5
delta-7-avenasterol	ND-0.8	2.2-6.3	ND-8.3	1.0-4.6	3.0-7.5	ND-9.0	ND-5.5	0.3-2.7	0.5-1.5
Others	ND-4.2	0.5-6.4	4.4-11.9	ND-1.8	ND-5.3	3.5-9.5	ND-1.4	ND-2.4	ND-5.1
Total sterols (mg/kg)	4500-11300	2100-4600	2000-4100	1800-4500	2400-5000	1700-5200	900-2900	7000-22100	2000-7000

ND not detectable

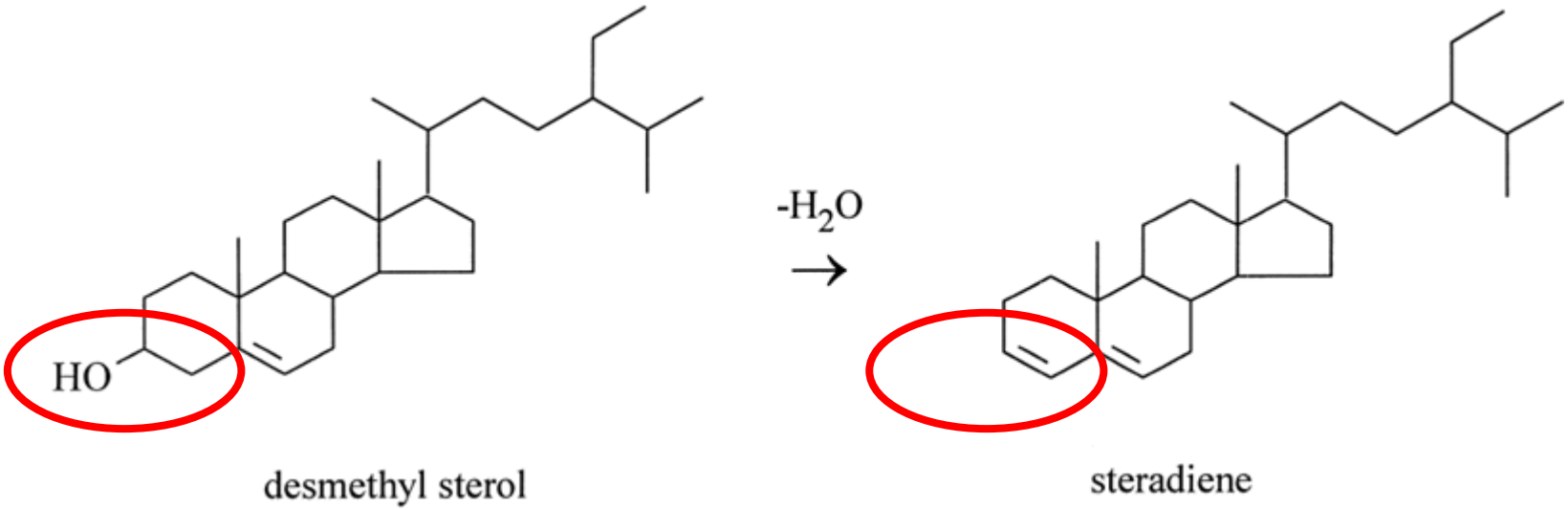
Steradiene

(LC-GC-FID)

Steradiene

- **Während der Raffination von Fetten und Ölen (ab 200 °C; ab 120 °C in Anwesenheit von Bleicherde).**
- **Kommen natürlich nicht in Fetten und Ölen vor.**
- **Gehören zur Klasse der Kohlenwasserstoffe.**

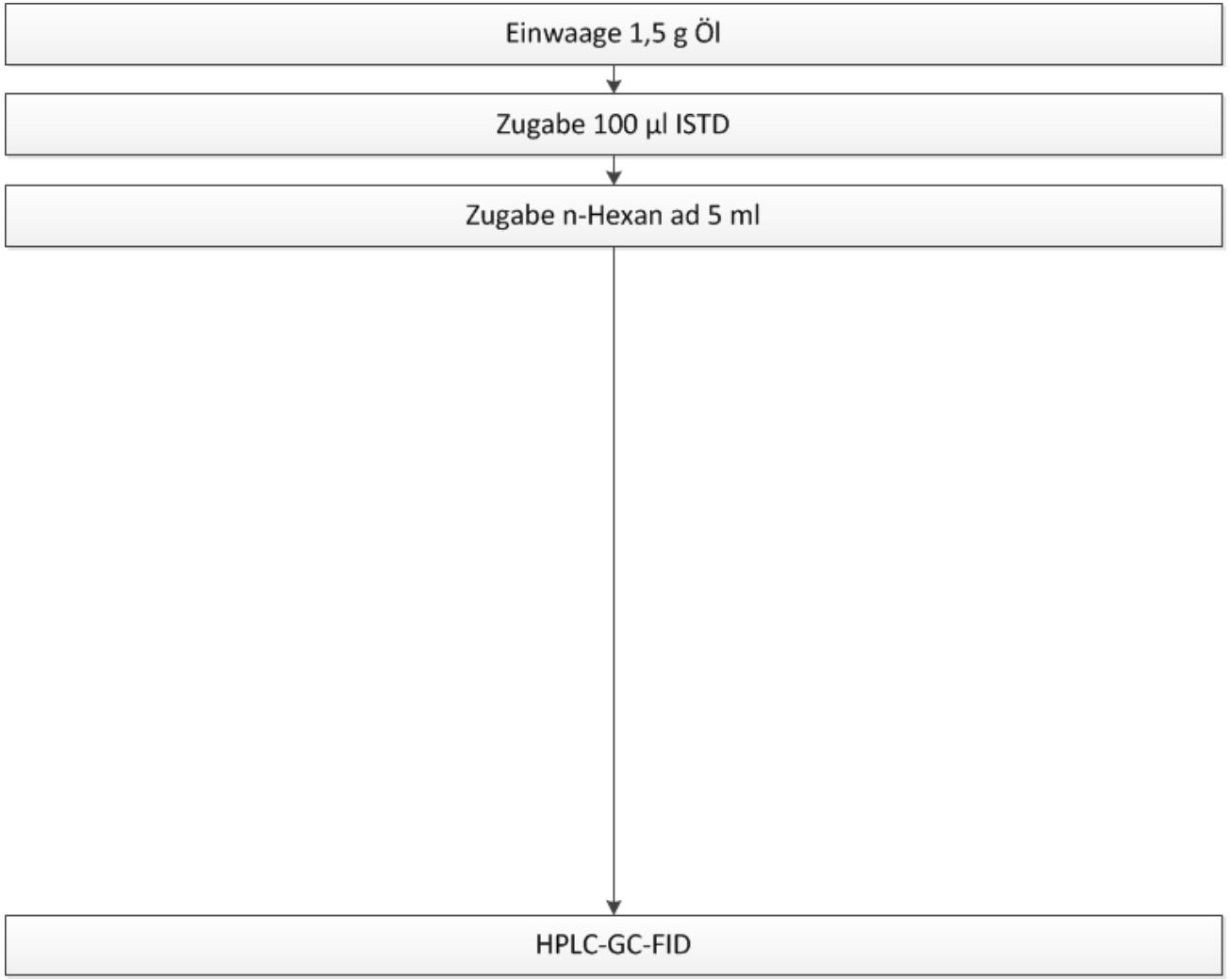
→ Perfekter Marker für den Nachweis einer industriellen Raffination!



Quelle Abbildung: Crews et al. (1999) J. Chrom. A, 847, 179–185.
DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00349-0

Standardmethode (z.B. AOCS Cd 26-96, ISO 15788-1)

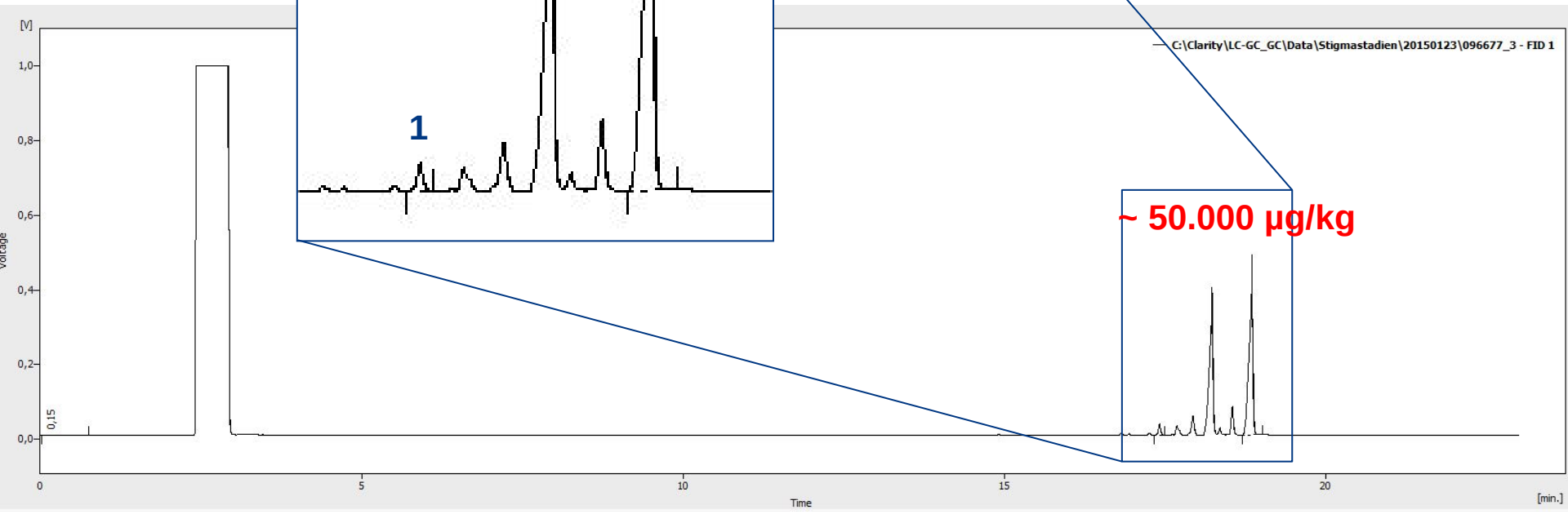
Umsetzung LC-GC



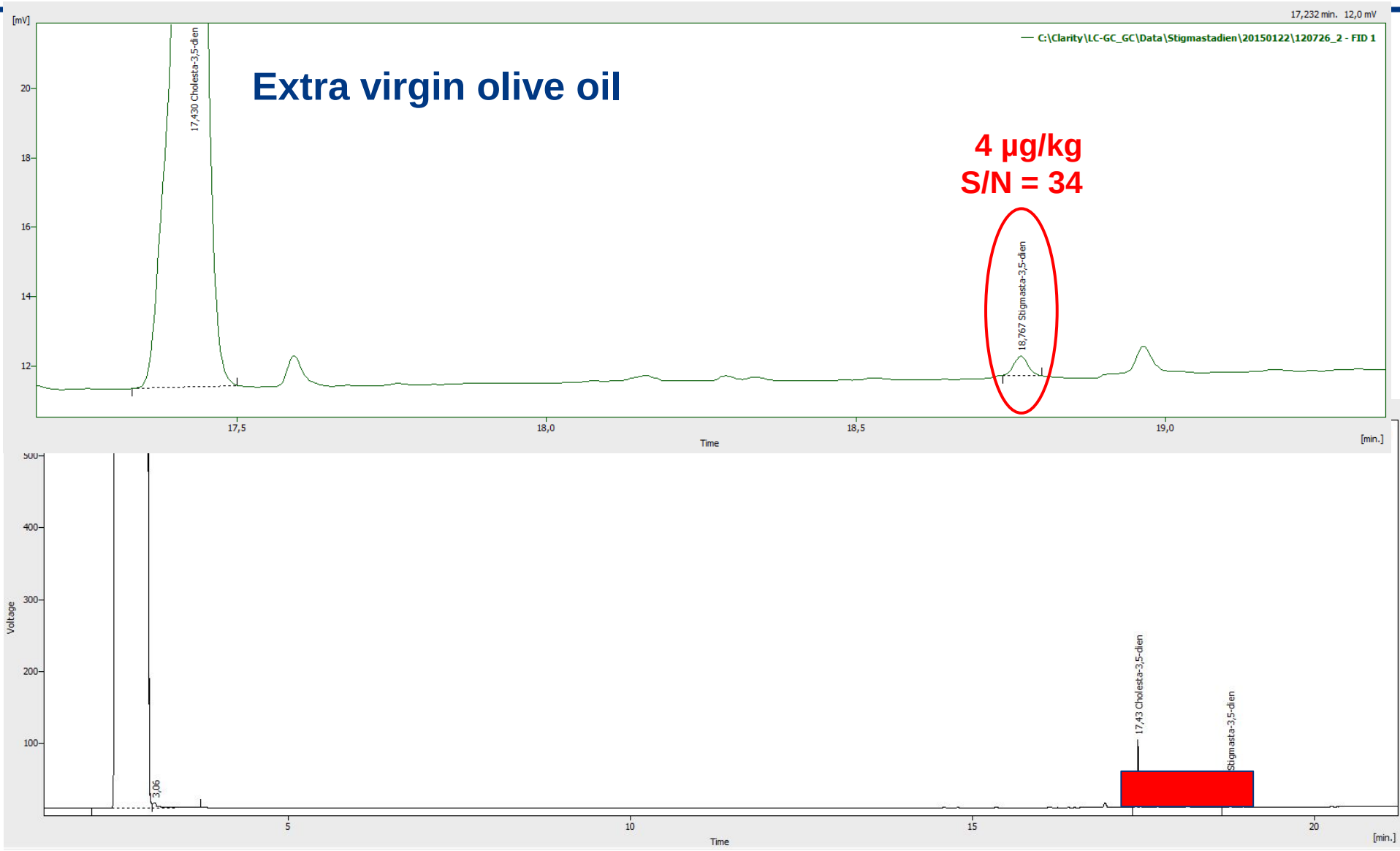
Steradiene

Raffiniertes Rapsöl

[1] 3,5-Cholestadiene (ISTD)
[2] 3,5-Campestadiene
[3] 3,5-Stigmastadiene
[?] 3,5,22-Stigmastatriene
[?] 3,5,22-Brassicastatriene



Steradiene


17,232 min. 12,0 mV
C:\Clarity\LC-GC_GC\Data\Stigmastadien\20150122\120726_2 - FID 1
[mV]
17,430 Cholesta-3,5-dien
Extra virgin olive oil
4 µg/kg
S/N = 34
18,767 Stigmasta-3,5-dien
Time
[min.]
Voltage
3,06
17,43 Cholesta-3,5-dien
Stigmasta-3,5-dien

Wirtschaftlichkeit

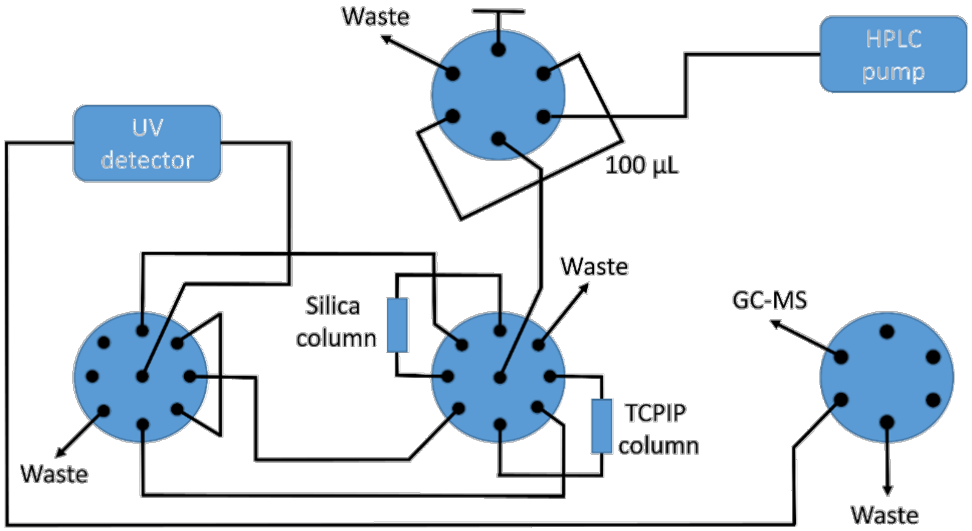
Wirtschaftlichkeit

- **Probenvorbereitung für Sterine und Steradiene ähnlich komplex bzw. aufwendig, wenn man der offiziellen Methode folgt.**
- **Erfahrenes Personal (Laborant, TA) schafft 6-10 Proben pro Tag (praktisch 100 % Mitarbeiterbindung).**
- **Einarbeitung langwierig, durch viele einzelne Schritte fehleranfällig.**
- **LC-GC schafft ca. 30 Proben / Tag, Mitarbeiterbindungszeit etwa 1 Stunde. Aber: Qualifikation muss erhöht werden.**
- **Wandel in den letzten 10 Jahren: Mitarbeiter sind viele Aufgaben losgeworden bzw. Aufgaben brauchen viel weniger Zeit („Nasschemie“, Datenauswertung, Datenübertragung).**
- **Wandel in den nächsten 10 Jahren: Schnellere Durchlaufzeiten, kleinere Analysenserien, Zusammenwachsen der Softwarewelten.**

Ausblick

Ausblick

- **Applikation: PAK in Lebensmitteln**
- **HPLC-UV**
- **LC-GC Interface**
- **GC-MS**



Quelle: Nestola et al. (2015) Anal. Chem., 87, 6195–6203.
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00825

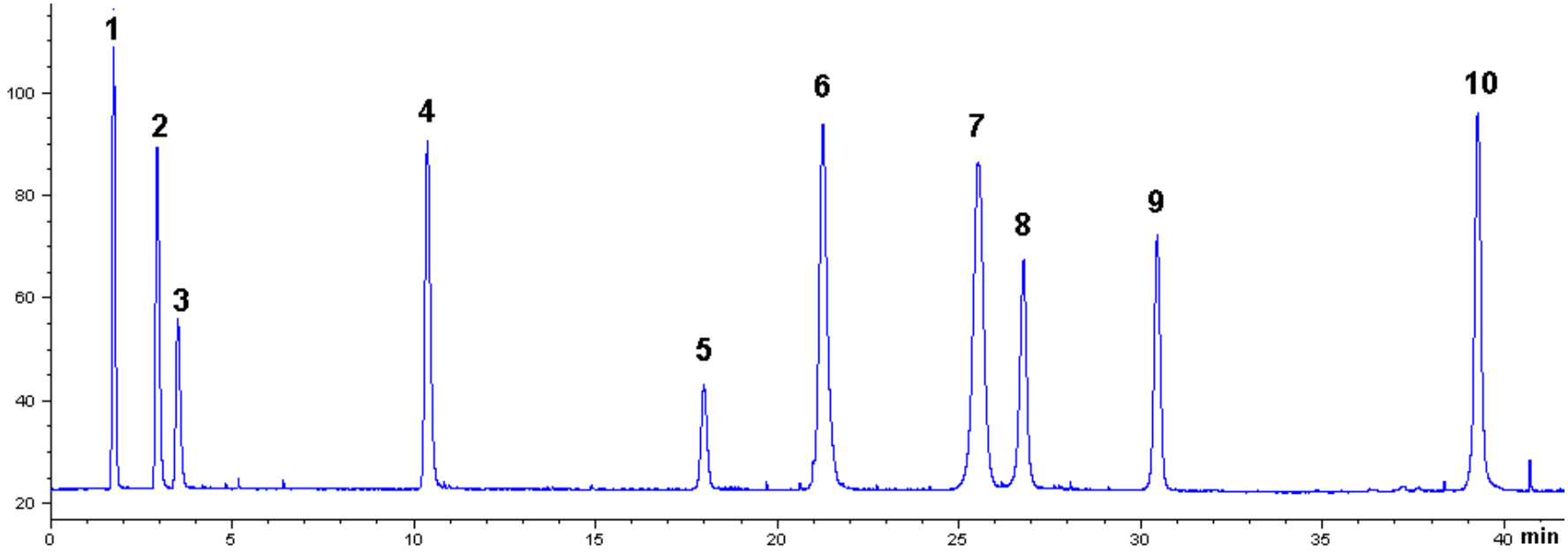
Zusammenfassung

- **LC-GC ist sehr vielfältig, Kombination diverser Selektivitäten (LC bzw. GC) sowie des Detektors möglich.**
- **Hochspezifische Analysemethoden mit hoher Empfindlichkeit sind möglich.**
- **Starke Vereinfachung der Probenvorbereitung.**
- **Geschlossenes System, selbstreinigend**

➢ **Daumenregel: Alle Methoden in der Fettanalytik, bei denen die Analyten auf polaren Festphasen bzw. in unpolaren flüssigen Phasen selektiv aufgereinigt werden können, lassen sich in eine LC-GC Methode übersetzen.**

Zusammenfassung

Typische chromatographische Elutionsreihenfolge von Lipiden auf Kieselgel:



(1) Kohlenwasserstoffe, (2) Wachse, (3) Sterinester, (4) TAG, (5) Fettalkohole, (6) Fettsäuren, (7) Sterine, (8) 1,3-DAG, (9) 1,2-DAG, (10) MAG