

Bestimmung der Sterinverteilung in Fetten und Ölen

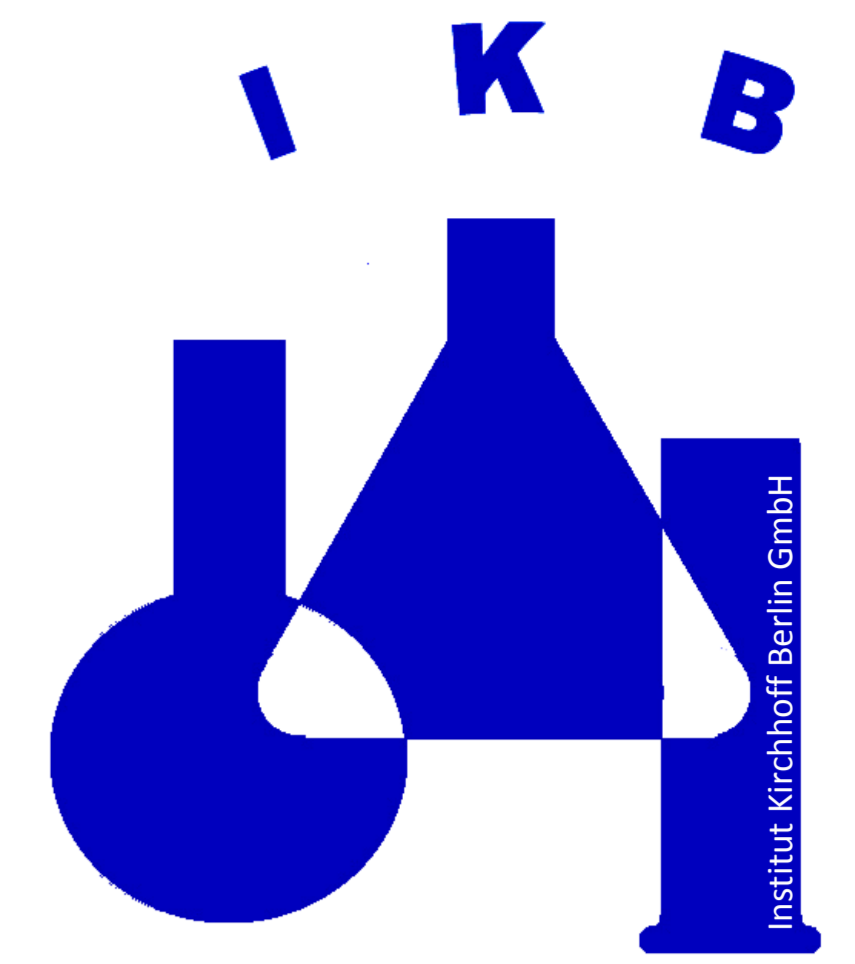
LC-GC-FID mit automatisierter Probenaufarbeitung

Nestola, M.^{1,2}, Tablack, P.², Becker, E.³, Kirchhoff, E.³

¹Universität Duisburg-Essen, Instrumentelle Analytische Chemie, 45141 Essen

²Axel Semrau GmbH & Co.KG, Stefansbecke 42, 45549 Sprockhövel

³Institut Kirchhoff Berlin GmbH, Albestraße 3-4, 12159 Berlin



Hintergrund

Sterine stellen eine wichtige Substanzklasse dar, die zur Identifizierung und Authentifizierung von pflanzlichen Fetten und Ölen beitragen kann. Die gängigen Verfahren zur Bestimmung des Gesamtsteringehalts und der prozentualen Verteilung der Sterine sind aufwendig und bedürfen zahlreicher manueller Probenaufarbeitungsschritte. Die ISO 12228¹ beschreibt die anerkannte Methodik. Nach Verseifung der Probe wird der unverseifbare Rückstand im ersten Schritt mittels einer Festphasenextraktion über Aluminiumoxid von den freien Fettsäuren befreit. Das Eluat wird neutralisiert und eingeeengt. Durch präparative Dünnschichtchromatographie werden die zu quantifizierenden 4-Desmethylsterine von störenden Matrixbestandteilen wie Tocopherolen, Triterpenen sowie 4-Methyl- und 4,4-Dimethylsterinen abgetrennt. Die entsprechende Fraktion wird von der DC-Platte abgenommen, gelöst, nochmalig eingeeengt und derivatisiert. Die Sterine werden abschließend als Trimethylsilylether mittels GC-FID detektiert und mit Hilfe von Cholestanol als internem Standard quantifiziert. Der gesamte Ablauf benötigt ca. einen Arbeitstag, wobei der Durchsatz bei max. 4-6 Proben pro Mitarbeiter liegt.

Ergebnisse

Vergleiche mit gut charakterisierten Referenzmaterialien haben gezeigt, dass das hier vorgestellte Verfahren mit der ISO-Norm vergleichbare Ergebnisse erzeugt. Abb. 2 zeigt exemplarisch den chromatographischen Vergleich zur Normmethode am Beispiel eines Distelöls.

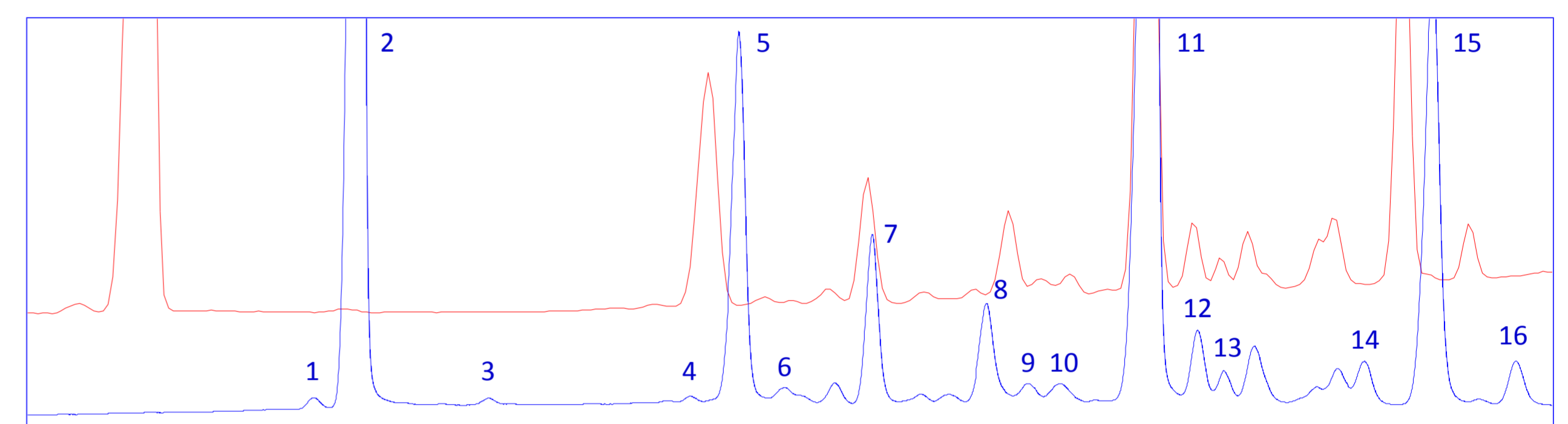


Abb. 2: GC-FID-Chromatogramme eines Distelöls (rot = ISO 12228, blau = LC-GC)

Peak	Sterinverteilung in %	ISO 12228	LC-GC	Abs. Abweichung
1	Cholesterin	0,6	<0,5	-
2	Cholestanol (ISTD)			
3	Brassicasterin	<0,5	<0,5	-
4	24-Methylencholesterin	<0,5	<0,5	-
5	Campesterin	12,0	12,9	0,9
6	Campestanol	<0,5	0,6	-
7	Stigmasterin	5,3	5,4	0,1
8	Δ7-Campesterin	3,8	4,0	0,2
9	Δ5,23-Stigmastadienol	0,8	0,9	0,1
10	Chlerosterin	1,1	1,1	0,0
11	Sitosterin	49,2	50,9	1,7
12	Sitostanol	3,0	2,6	-0,4
13	Δ5-Avenasterin	1,7	1,2	-0,5
14	Δ5,24-Stigmastadienol	3,6	1,6	-2,0
15	Δ7-Stigmastanol	16,7	16,7	0,0
16	Δ7-Avenasterin	1,5	1,6	0,1
Gesamtsteringehalt [mg/100 g]		244,8	231,2	13,6

Tabelle 1: Prozentuale Sterinverteilung sowie Gesamtsteringehalt eines Distelöls

Der Einfluss der Derivatisierung auf die Trennung der Sterine wurde überprüft, indem nach ISO 12228 eine Probe aufgearbeitet und sowohl derivatisiert als auch underivatisiert injiziert wurde. Bei gleichen GC-Bedingungen hat sich gezeigt, dass eine TMS-Derivatisierung weder bessere Peakformen noch eine Verbesserung der chromatographischen Auftrennung ermöglicht. Stattdessen war neben einer methodischen Vereinfachung eine verbesserte chromatographische Trennung, gerade zwischen den Minorkomponenten, zu beobachten. Aktuelle GC-Kapillarsäulen weisen gute Oberflächendesaktivierungen auf, die den Derivatisierungsschritt letztendlich überflüssig machen.

Zusammenfassung

Das hier vorgestellte Prüfverfahren automatisiert die gesamte Sterinaufarbeitung vollständig. Ein Aliquot der Probe wird mittels Normalphasen-HPLC auf hochaktivem Kieselgel von der interferierenden Matrix befreit. Die 4-Desmethylsterinfraktion wird online on-column in den GC übertragen und mittels FID quantifiziert. Es ist keine weitere Aufkonzentrierung notwendig. Hierdurch entfallen potentielle Kontaminationspunkte. Die einzige manuelle Aktion besteht darin, die Probe einzuwägen und in den Autosampler zu überführen. Nach etwa zwei Stunden liegt das abschließende Ergebnis vor.

Optimierte chromatographische Bedingungen, gepaart mit dem Wegfall des TMS-Derivatisierungsschrittes führen zu präzisen, reproduzierbaren Ergebnissen in einer Geschwindigkeit und Qualität, die mit manuellen Methoden nur schwer erhalten werden können.

On-line LC-GC-Methode

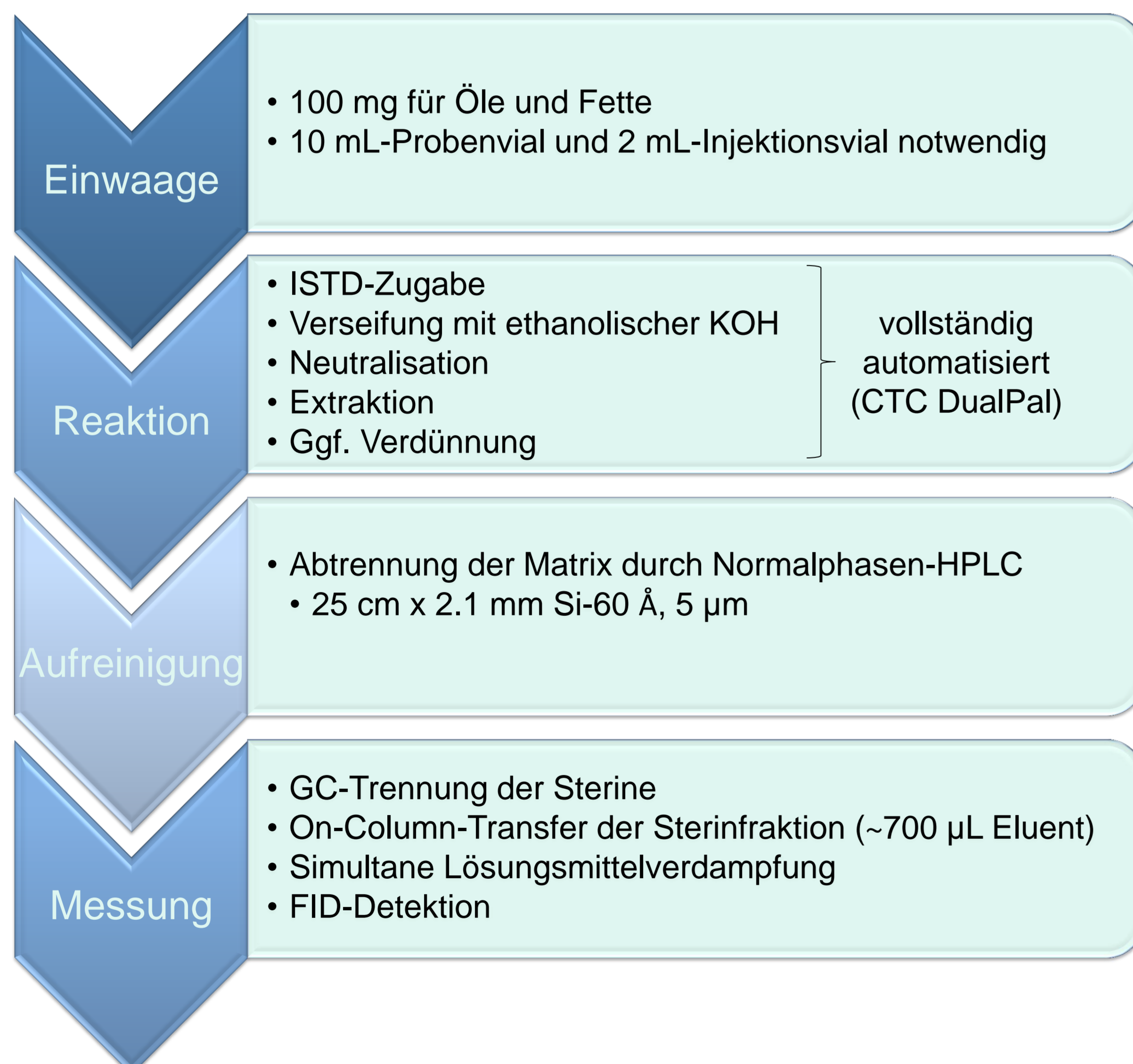


Abb. 1: LC-GC-System bestehend aus Agilent 1260 HPLC mit VWD, DANI MasterGC mit FID sowie CTC DualPAL