

Komm schnapp sie dir!

Derivatisierung und Bestimmung von kurzkettigen ω -oxo-Fettsäuren

Anne Zartmann^{1,2}, Jean-Marie Galano³, Simon Hammann^{1,2}

¹ Universität Hohenheim, Stuttgart/DE, ² Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen/DE, ³ Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier/FR

... eine kurzkettige ω -oxo-FETTSÄURE erscheint!

- Durch Oxidation von Fettsäuren entstehen neben anderen Abbauprodukten ω -oxo-Fettsäuren (FA)¹ (Abb. 1).
- Gebunden an Glycerol, verbleiben ω -oxo-FA im Lebensmittel und werden vom menschlichen Körper aufgenommen².
- ω -oxo-FA sind eine reaktive Spezies und der Einfluss von 9-oxo-9:0-FA (9-A) auf den Leberstoffwechsel³ ist bereits bekannt.

Herausforderungen für die Bestimmung von ω -oxo-FAs als Methylester (FAME) mittels GC-MS

- Die hohe Flüchtigkeit der ω -oxo-Fettsäuremethylester führt zu erheblichen Verlusten und Veränderungen im Fettsäuremuster durch die Probenvorbereitung.
- Bisher nur kurzkettige gesättigte FAMEs kommerziell erhältlich und als interne Standards verwendet.

ZIEL

- Derivatisierung von ω -oxo-FAMEs zu ω -dioxan-FAME zur Verringerung der Flüchtigkeit (siehe Reaktionsschema unten).
- Quantifizierung mit einem synthetisierten ω -oxo-FA-Ester als internen Standard (8-oxo-4,5-methylen-8:0-EE).

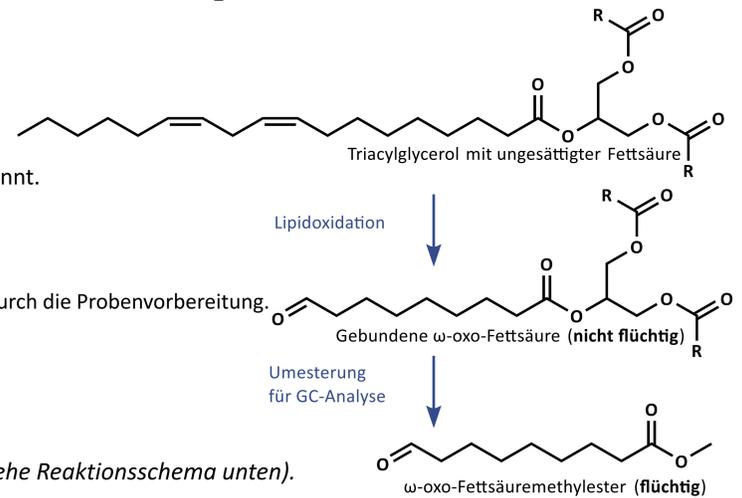


Abb. 1: Reaktionsschema einer an ein Triacylglycerol gebundenen Linolsäure, die durch Fettsäureoxidation zu einer gebundenen ω -oxo-Fettsäure reagiert. Anschließend erfolgt eine Umesterung zu einem Methylester für die GC-Analyse.

GC-MS-Merkmale von ω -dioxan-FAMEs

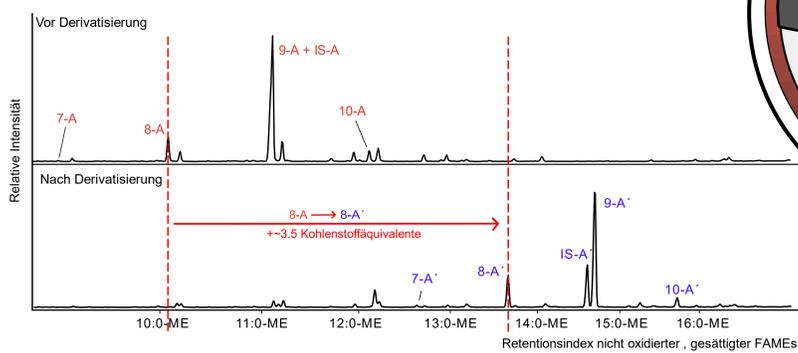


Abb. 2: GC-MS-Chromatogramme von hitzebehandeltem Sonnenblumenöl nach Umesterung und Festphasenextraktion (SPE). Oben: SPE-Fraktion mit ω -oxo-FAMEs (X-A) mit unterschiedlichen Kettenlängen (Nummer X) und der interne Standard (IS-A) Unten: Die selbe SPE-Fraktion nach Derivatisierung zu den entsprechenden ω -dioxan-FAMEs (X-A'). Auf der x-Achse wurde der Retentionsindex verschiedener nicht-oxidiertes gesättigter FAMEs aufgetragen.

- Retentionszeitverschiebung für ω -oxo-FAME nach Derivatisierung von etwa 3,5 Kohlenstoffäquivalenten (Abb. 2).
- Deutliche Verringerung der Flüchtigkeit.
- Trennung des internen Standards (IS-A) und 9-A nach Derivatisierung zu ω -dioxan-FAMEs.

Das GC-MS-Spektrum weist nach der Derivatisierung deutlich weniger Signale auf (Abb. 3).

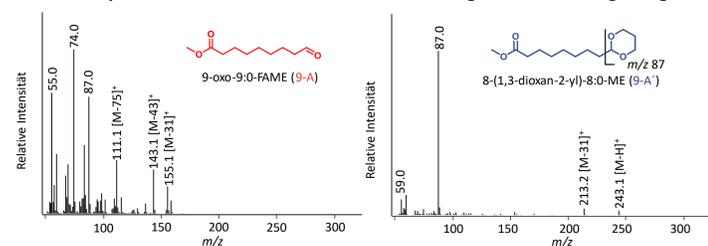
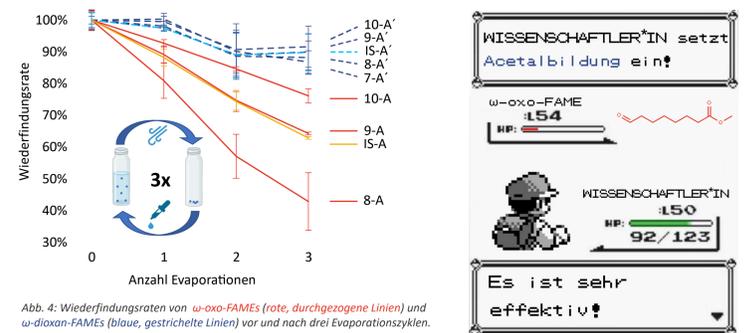


Abb. 3: GC-MS-Spektren von 9-oxo-9:0-FAME (9-A) und dem entsprechenden Dioxan 8-(1,3-dioxan-2-yl)-8:0-ME (9-A').

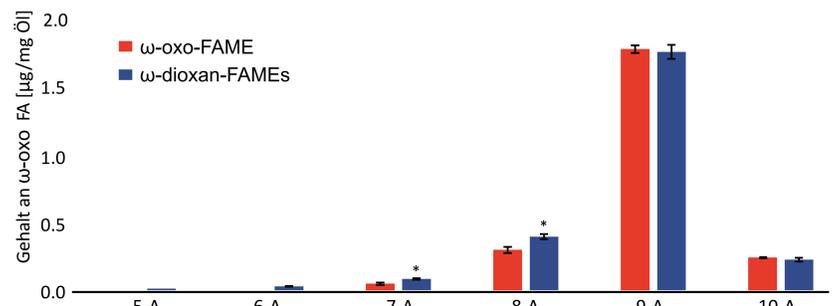
- m/z 87 ist ein geeigneter Quantifier für ω -dioxan-FAMEs.
- Durch hohe Intensität erhöhte Empfindlichkeit im SIM-Modus.
- $[M-31]^+$ & $[M+H]^+$ ermöglicht eine eindeutige Identifizierung der verschiedenen Dioxan-FAMEs.

Wiederfindungsraten nach Evaporation



- Deutlich höhere Wiederfindungsraten (WFR) von ω -dioxan-FAMEs (ø 89%) als ω -oxo-FAMEs (ø 62%).
- Die WFR von 8-A (43%) bis 10-A (76%) korrelierten stark mit der Molekülmasse (Abb. 4).
- Die WFR von 7-A' (87%) bis 10-A' (92%) lagen deutlich näher beieinander.
- Präzise Quantifizierung mit gesteigerten WFR und Verwendung eines internen Standards.

Quantifizierung von ω -oxo-FA in Öl



- 5-A und 6-A konnten nur nach Derivatisierung zu ω -dioxan-FAMEs detektiert werden.
- Ähnliche Gesamtgehalte für beide Methoden, jedoch signifikant geringere Gehalte: 7-A (43% niedriger) und 8-A (25% niedriger) ohne Derivatisierung (ω -oxo-FA) (Abb. 5).

Zusammenfassung

- Die Acetalbildung von ω -oxo-FAMEs führte zu höheren und einheitlicheren Wiederfindungsraten über verschiedene Kettenlängen hinweg.
- Quantifizierung mehrerer ω -oxo-FAMEs mit einem synthetisiertem ω -oxo-Fettsäureester als internem Standard.
- Günstige GC-MS-Fragmentierung von ω -dioxan-FAMEs.
- Eindeutige Identifizierung und erhöhte Empfindlichkeit.

Material und Methoden

- Hitzebehandlung**
- 1 g Sonnenblumenöl wurden bei 180°C für 20 h in einem offenen Probenfläschchen gerührt.
- Interner Standard**
- 8-oxo-4,5-methylen-8:0-EE wurde durch Cyclopropanierung von 1,5-Cyclooctadien und anschließender Ozonolyse synthetisiert (Synthese durchgeführt von Jean-Marie Galano; Zusammenarbeit gefördert von EpiLipidNET).
- Probenvorbereitung**
- 5 mg hitzebehandeltes Sonnenblumenöl und interne Standards (8-oxo-4,5-methylen-8:0-EE, 5 μ g) wurden mit 5 mg Glycerol-monostearat, 200 μ L 1,3-Propanediol mit 0,1% Schwefelsäure (w%) und 50 μ L CHCl_3 versetzt. Das Vial wurde mit Argon gespült, verschlossen, in einem Ultraschallbad für 5 Minuten behandelt und dann für 2 Stunden bei 70°C gerührt.
- SPE der extrahierten Lipide auf einer Kieselgelsäule, unter Verwendung von n-Hexan/Ethylacetat: 95/5 (v/v) und 70/30 (v/v).**
- Verdünnung der Proben auf 0,1 mg/mL.**
- Die Quantifizierung erfolgte durch eine interne Einpunktkalibrierung.**
- GC-MS-Bedingungen**
- Trace GC Ultra mit AS 3000 Autosampler und DSQ II Massenspektrometer (Thermo Scientific) mit Elektronenionisation.
 - DB5-ms Säule (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m; Agilent Technologies).
 - S/SL-Injektor bei 300°C, Trägergas Helium (1,0 mL/min).
 - Temperaturprogramm: 50°C (2 min), 5 K/min bis 180°C, 30 K/min bis 300°C (5 min).
 - Massenbereich im Full-Scan m/z : 50 – 650, zur Quantifizierung im SIM-Modus m/z 74, 87, 115, 129, 140, 143, 157, 215, 229, 241, 243 und 257 (Dwelltime 50 ms).

Literatur:

- Kamal-Eldin A, Marquez-Ruiz G, Dobarganes C et al. (1997) Characterisation of aldehydic acids in used and unused frying oils. J Chromatogr A 776:245–254.
- Márquez-Ruiz G, Pérez-Camino MC, Dobarganes MC (1992) Digestibility of fatty acid monomers, dimers and polymers in the rat. J Am Oil Chem Soc 69:930–934.
- Minamoto S, Kanazawa K, Ashida H et al. (1988) Effect of orally administered 9-oxononanoic acid on lipogenesis in rat liver. Biochim Biophys Acta 958:199–204.

Daten aus Ergebnisteil: Zartmann A., Galano J.-M., Hammann S. (vrs. 2024) Analysis of glycerol bound ω -oxo-fatty acids as ω -dioxane-FAME-derivatives. Food Chem (Manuskript akzeptiert)



Anne Zartmann
Doktorandin