



Universität für Bodenkultur Wien

MASTERARBEIT

Analyse von Minorfettsäuren in Milchprodukten

Verfasser:

Gregor Wailzer, B.Sc.

(Matrikelnummer: 01340633)

Angestrebter akademischer Grad:

Diplom-Ingenieur

Masterstudium: Lebensmittelwissenschaften und –technologie

Betreuer: Matthias Schreiner, Priv.-Doz. Dr.

Departement für Lebensmittelwissenschaften und Lebensmitteltechnologie

Wien, 30. 04. 2021

Danksagung

Ich möchte mich als Erstes herzlich bei Priv.-Doz. Dr. Matthias Schreiner für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön gebührt auch meiner Familie und meiner Partnerin Marlies Strnad, B.Sc., die mich im Laufe dieser Arbeit immer unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Frau Fachinspektorin Iris Biedermann und Nicole Schamberger für ihre Hilfsbereitschaft und möchte mich zugleich für den einen oder anderen längeren Labortag entschuldigen.

Außerdem möchte ich meinen Diplomanden-KollegInnen für die gute Gesellschaft und Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Abschließend danke ich Mag.a iur. Ines Beneder für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Masterarbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüferin/ keinem anderen Prüfer als Prüfungsleistung eingereicht.

Mir ist bekannt, dass Zuwiderhandeln geahndet wird („Verwendung unerlaubter Hilfsmittel“) und weitere rechtliche Schritte nach sich ziehen kann.

Diese Arbeit wurde neben der gedruckten Version auch in digitaler Form zur Prüfung der o.g. Erklärung bei der zuständigen Prüferin/dem zuständigen Prüfer hinterlegt.



Gregor Wailzer, B.Sc.

Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis	V
2. Tabellenverzeichnis.....	VI
3. Abkürzungsverzeichnis	IX
4. Zusammenfassung.....	1
5. Abstract	3
6. Einleitung	5
6.1. Milch.....	5
6.1.1. Definition.....	5
6.1.2. Kuhmilchproduktion in Österreich.....	5
6.1.3. Bio-Milch	5
6.1.4. Heumilch	6
6.1.5. Bio-Wiesenmilch.....	6
6.1.6. Zusammensetzung von Milch.....	7
6.2. Silage	8
6.3. Lipide & Fettsäuren	9
6.3.1. Fettsäuren	9
6.4. Milchfett.....	11
6.5. Cyclopropanfettsäuren	13
6.6. Verzweigte Fettsäuren	14
6.6.1. Phytansäure.....	14
6.6.2. Pristansäure.....	15
6.6.3. Gesundheitliche Aspekte	15
6.7. Gaschromatographie	16
6.8. Derivatisierung.....	17
6.8.1. Methylierung	17

II

6.8.2. Silylierung	19
7. Zielsetzung	20
8. Materialien	21
8.1. Chemikalien	21
8.2. Geräte	22
8.2.1. GC-Säulen	22
9. Methoden	23
9.1. Herstellung der Lösungen	23
9.2. Basenkatalysierte Ethylierung mit nachfolgender säurekatalysierter Methylierung	24
9.2.1. Basenkatalysierte Ethylierung	24
9.2.2. Herstellung von Ethylester	25
9.2.3. Säurekatalysierte Methylierung	25
9.3. Basenkatalysierte Methylierung mit anschließender Silylierung	27
9.3.1. Basenkatalysierte Methylierung	27
9.3.2. Silylierung	28
9.4. Herstellung eines internen Standards	32
9.4.1. Synthese von 10,11-Dichloro-Undecansäure	32
9.4.2. Methylierung von 10,11-Dichloro-Undecansäure	32
9.4.3. Reinigung von 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester	33
9.4.4. Methylierung von Undecansäure	34
9.4.5. Reinigung von Undecansäure	34
9.4.6. Herstellung des internen Standards	35
9.5. Herstellung des Kalibrationsstandards	37
9.5.1. Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation	37
9.5.2. Identifikation von Pristan- und Phytansäure	39

9.5.3.	Bestimmung der Konzentration von Pristan- und Phytansäuremethylester ...	41
9.5.4.	Herstellung des Kalibrationsstandards	41
9.6.	Auswahl der Massenfragmente für die Quantifizierung.....	42
9.6.1.	Standards	42
9.6.2.	Analyten	44
9.7.	Entwicklung der Analysemethode	48
9.8.	Kalibration der Analysemethode	49
9.9.	Probenvorbereitung.....	51
9.9.1.	Fettextraktion von Milch nach adaptierter Röse-Gottlieb-Methode.....	51
9.9.2.	Fettextraktion von Käse	51
9.9.3.	Methylierung von Milchfett	53
9.10.	Gaschromatographische Analyse.....	54
9.11.	Statistische Auswertung.....	55
9.12.	Validierung	55
9.12.1.	Bestimmung der Wiederholbarkeit.....	55
9.12.2.	Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ)	55
10.	Proben.....	58
10.1.	Milchproben.....	58
10.2.	Käseproben	59
11.	Ergebnisse & Diskussion	60
11.1.	Basenkatalysierte Ethylierung mit anschließender säurekatalysierter Methylierung	60
11.1.1.	Basenkatalysierte Ethylierung von Heptadecansäuremethylester	60
11.1.2.	Herstellung von Heptadecansäureethylester	61
11.1.3.	Säurekatalysierte Methylierung	62

IV

11.2. Basenkatalysierte Methylierung mit anschließender Silylierung	64
11.2.1. Basenkatalysierte Methylierung mit Na-Methanolat	64
11.2.2. Silylierung.....	65
11.2.3. Methylierung von Milchfett mit anschließender Silylierung.....	67
11.3. Herstellung des internen Standards.....	69
11.3.1. Reinigung von 10,11-Dichloro-Undecensäuremethylester.....	69
11.3.2. Analyse von 10,11-Dichloro-Undecensäuremethylester	70
11.3.3. Reinigung von 10-Undecensäuremethylester	71
Herstellung des internen Standards	71
11.4. Herstellung des Kalibrationsstandards.....	73
11.4.1. Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation	73
11.4.2. Identifikation von Pristan- und Phytansäure.....	74
11.4.3. Konzentrationsbestimmung von Pristan- und Phytansäuremethylester.....	78
11.4.4. Herstellung des Kalibrationsstandards.....	79
11.5. Entwicklung des Temperaturprogramms.....	81
11.6. Kalibration	83
11.7. Gaschromatographische Analyse der Proben	86
11.7.1. Milchproben.....	86
11.7.2. Käseproben:	92
11.8. Validierung	95
11.8.1. Wiederholbarkeit	95
11.8.2. Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ)	95
12. Schlussfolgerungen	98
13. Literaturverzeichnis.....	101

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Maßnahmen Bio-Wiesenmilch.....	7
Abbildung 2: Strukturen der meistvorkommenden Cyclopropanfettsäuren in Milch	14
Abbildung 3: Massenspektrum von 10-Undecensäuremethylester	42
Abbildung 4: Massenspektrum von 10,11-Dichloro-Undecensäuremethylester.....	43
Abbildung 5: Massenspektrum von Pristansäuremethylester.....	44
Abbildung 6: Massenspektrum von Phytansäuremethylester.....	45
Abbildung 7: Charakteristische Ionenfragmente für Phytan- (a) und Pristansäuremethylester (b)	46
Abbildung 8: Massenspektrum von Dihydrosterculiasäuremethylester	47
Abbildung 9: Probenaufarbeitungsschema.....	53
Abbildung 10: Umsetzung von Ethylester und freier Fettsäure bei säurekatalysierter Methylierung	63
Abbildung 11: Chromatogramm von Butterschmalz mit C13-TMS-Ester	67
Abbildung 12: GC-MS-Analyse der Silylierungsprobe 7 mittels SP2560.....	68
Abbildung 13: Vergleich Butterschmalz vor und nach Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation	73
Abbildung 14: GC-MS Analyse des Hauptversuchs der Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation	74
Abbildung 15: Ausschnitt Pristan- und Phytansäure-ME (GC-MS)	76
Abbildung 16: Ausschnitt Pristan- und Phytansäure-ME (GC-FID)	77
Abbildung 17: Analyse von Butterschmalz mittels entwickelter GC-MS-Methode.....	82
Abbildung 18: Kalibrationsgerade Pristansäure.....	83
Abbildung 19: Kalibrationsgerade Phytansäure.....	84
Abbildung 20: Kalibrationsgerade Dihydrosterculiasäure	84
Abbildung 21: Minorfettsäuregehalt der Milchproben.....	87

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Milch in Prozent	8
Tabelle 2: Name, Summenformel und Schmelzpunkt ausgewählter gesättigter Fettsäuren .	10
Tabelle 3: Name, Summenformel und Schmelzpunkt ausgewählter ungesättigter C18-Fettsäuren	11
Tabelle 4: Mittlere Zusammensetzung der Milchfettfraktion.....	11
Tabelle 5: Fettsäurezusammensetzung von Kuhmilch	12
Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte	21
Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte	22
Tabelle 8: Liste der verwendeten GC-Säulen.....	22
Tabelle 9: Probenliste basenkatalysierte Ethylierung.....	24
Tabelle 10: HP-FFAP-Analysemethode 1	25
Tabelle 11: Probenliste säurekatalysierte Methylierung 1	26
Tabelle 12: Probenliste säurekatylsierte Methylierung 2	26
Tabelle 13: Probenliste Silylierungsvorversuch	29
Tabelle 14: Probenliste Silylierungsversuch	29
Tabelle 15: HP5-Analysemethode.....	30
Tabelle 16: DB17HT-Analysemethode	31
Tabelle 17: SP2560-Analysemethode 1	34
Tabelle 18: HP-FFAP-Analysemethode 2.....	35
Tabelle 19: SP2560-Analysemethode 2	36
Tabelle 20: SP2560-Analysemethode 3	37
Tabelle 21: BPX70-Analysemethode 1	38
Tabelle 22: BPX70-Analysemethode 2	40
Tabelle 23: SP2560-Analysemethode 4	40
Tabelle 24: BPX70-Analysemethode 3	48
Tabelle 25: BPX70-Methodenentwicklung.....	49
Tabelle 26: Einstellungen Massenspektrometer	49
Tabelle 27: Verdünnungsstufen & Konzentrationen für Methodenkalibration.....	50
Tabelle 28: Parameter für Peakidentifikation und Flächenbestimmung	50
Tabelle 29: GC-FID-Methode für die Minorfettsäureanalyse	54

Tabelle 30: Verdünnungsstufen für LOD und LOQ.....	56
Tabelle 31: Analyisierte Milchproben.....	58
Tabelle 32: Analyisierte Käseproben	59
Tabelle 33: Ergebnisse basenkatalysierte Ethylierung	60
Tabelle 34: Ergebnisse Herstellung von Heptadecansäurethylester.....	61
Tabelle 35: Ergebnisse säurekatalysierte Methylierung 1	62
Tabelle 36: Ergebnisse säurekatalysierte Methylierung 2	62
Tabelle 37: Ergebnisse basenkatalysierte Methylierung	64
Tabelle 38: Ergebnisse Silylierungsvorversuch	65
Tabelle 39: Ergebnisse Silylierungsversuch 1	66
Tabelle 40: Ergebnisse Silylierungsversuch 2.....	66
Tabelle 41: Ergebnisse Reinigung von Cl ₂ C11 Vorversuch	69
Tabelle 42: Ergebnisse Reinigung von Cl ₂ C11 Hauptversuch.....	70
Tabelle 43: Ergebnisse gaschromatographische Analyse von Cl ₂ C11-ME.....	70
Tabelle 44: Ergebnisse Reinigung von 10-Undecensäuremethylester	71
Tabelle 45: Berechnung der Konzentration des internen Standards	72
Tabelle 46: Vergleich zwischen gravimetrischer und gaschromatographischer Konzentrationsbestimmung.....	72
Tabelle 47: Peakidentifikation des Hauptversuchs der Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation	75
Tabelle 48: Ergebnisse Konzentrationsbestimmung von Pristan- und Phytansäure-ME.....	78
Tabelle 49: Ermittlung des Korrekturfaktors.....	79
Tabelle 50: Konzentrationsberechnung Kalibrationsstandard.....	80
Tabelle 51: Konzentrationen mit und ohne Korrekturfaktor	80
Tabelle 52: Retentionszeiten und Massenfragmente der analysierten FAME	82
Tabelle 53: Ergebnisse Kalibration interner Standard.....	83
Tabelle 54: Ergebnisse der Minorfettsäureanalyse der Milchproben	86
Tabelle 55: Durchschnittsgehalt & p-Werte der analysierten Minorfettsäuren (Milchproben)	87
Tabelle 56: Durchschnittswerte in Prozent & p-Werte der Fettsäuremuster-Analyse (Milchproben).....	90
Tabelle 57: Ergebnisse Minorfettsäureanalysen der Käseproben.....	92
Tabelle 58: Ergebnisse Fettsäuremuster-Analyse der Käseproben in Prozent.....	93

VIII

Tabelle 59: Ergebnisse der Wiederholbarkeit	95
Tabelle 60: Berechnung von LOD und LOQ für Pristansäure	96
Tabelle 61: Berechnung von LOD und LOQ für Phytansäure	96
Tabelle 62: Berechnung von LOD und LOQ für Dihydrosterculiasäure	96
Tabelle 63: Zusammenfassung der Ergebnisse für LOD und LOQ	97

3. Abkürzungsverzeichnis

A	Peakfläche (Area)
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
chrom.	chromatographisch
Cl ₂ C11	10,11-Dichloro-Undecansäure
CPFA	Cyclopropanfettsäuren
DHSA	Dihydrosterculiasäure
EE	Ethylester
FA	Fettsäure (fatty acid)
FAME	Fettsäuremethylester
FFA	Freie Fettsäure (free fatty acid)
FFAP	Free fatty acid phase
FID	Flammenionisationsdetektor
F.I.T.	Fett in Trockenmasse
GC	Gaschromatographie
grav.	Gravimetrisch
HM	Heumilch
I	Intensität
idgF.	in der geltenden Fassung
KalStd	Kalibrationsstandard
korr.	korrigiert
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
ME	Methylester

X

MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
MS	Massenspektrometer
n.n.	nicht nachweisbar
PhA	Phytansäure
PrA	Pristansäure
Pyr.	Pyridin
rest.	restlich
Rpm	Umdrehungen pro Minute
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
system.	systematisch
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilyl
UHQ	Ultra high quality
VM	Vollmilch
WM	Wiesenmilch

4. Zusammenfassung

Mit über 400 verschiedenen Fettsäuren ist Milchfett eines der komplexesten in der Natur vorkommenden Fette. Der Anteil einiger Minorfettsäuren in Kuhmilch ist abhängig von der Haltungsform und der Futterzusammensetzung und könnte somit als Indikator eingesetzt werden. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Methode zur Quantifizierung von Pristan-, Phytan-, und Dihydrosterculiasäure in Milchfett.

Pristansäure und Phytansäure entstehen durch den bakteriellen Abbau von Chlorophyll im Pansen der Kuh und geben somit Auskunft über den Grünfutteranteil bei der Tierernährung. Cyclopropanfettsäuren wie Dihydrosterculiasäure werden bei der Fermentation von Silage produziert und sollten somit nicht in Heumilch zu finden sein, da bei dieser eine Fütterung von Silage verboten ist.

Im Zuge dieser Arbeit wurden insgesamt 16 Handelsproben analysiert, wovon 11 Milchproben und 5 Käseproben waren. Die Fettextraktion der Milchproben erfolgte mittels adaptierter Röse-Gottlieb-Methode, während Käseproben mittels Lösungsmittlextraktion aufgeschlossen wurden. 10-Undecensäuremethylester und 10,11-Dichloro-Undecensäuremethylester wurden anschließend als interner Standard zugegeben. Das Milchfett wurde durch Zugabe von Natriummethanolat methyliert, welches durch Lösen von metallischem Natrium in Methanol hergestellt wurde. Die Probenanalyse erfolgte mittels GC-MS, wobei Single-Ion-Monitoring zur Analyse der spezifischen Massenfragmente der jeweiligen Fettsäuremethylester eingesetzt wurde. Um festzustellen, ob sich Heumilchproben von Silomilch anhand anderer Fettsäuren unterscheiden, wurde eine Analyse des Fettsäuremusters mittels GC-FID durchgeführt.

Der Pristansäuregehalt der analysierten Milchproben schwankte zwischen 0,39 und 0,54 mg/g Fettextrakt, während der Phytansäuregehalt mit 1,83-2,50 mg/g deutlich höher war. Der Gehalt an Dihydrosterculiasäure in Milch reichte von 1,06 bis 1,36 mg/g Milchfett. Anhand der mittels GC-MS analysierten Minorfettsäuren konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Heumilch und Silomilch festgestellt werden. Käseproben enthielten mit 0,13-0,39 mg/g Pristansäure und 0,31-1,70 mg/g Phytansäure geringere Mengen dieser

Fettsäuren als Milch. Der Gehalt an Dihydrosterculiasäure in Käse schwankte zwischen 0,88 und 1,36 mg/g.

Die Analyse der Fettsäuremuster zeigte auf, dass Heumilch im Vergleich zu Silomilch durchschnittlich geringere Mengen der meisten ungesättigten Fettsäuren enthielt, während der Anteil an α -Linolensäure und konjugierter Linolsäuren deutlich höher war.

5. Abstract

Containing over 400 different fatty acids, milk fat is one of the most complex naturally occurring fats. The content of some minor fatty acids varies between cow's milk from different feeding- and farming systems and could be used as an indicator. The aim of this study was the development of a gas chromatography-mass spectroscopy method for the simultaneous quantification of phytanic-, pristanic- and dihydrosterculic acid in milk fat.

Phytanic- and pristanic acids are synthesized by rumen bacteria out of chlorophyll and provide information about the animals' green fodder intake. Cyclopropane fatty acids like dihydrosterculic acid are produced at the fermentation of silage, thus should not be present in hay milk.

In the course of this study 11 commercial milk samples and 5 commercial cheese samples were analyzed. Milk samples were extracted using an adapted Röse-Gottlieb method, while fat extraction in cheese was carried out by solvent extraction. 10-undecenoic acid methyl ester and 10,11-dichloroundecanoic acid methyl ester were added afterwards as a quantification standard. The methylation of samples was carried out by adding sodium methanolate, obtained by dissolving metallic sodium in water-free methanol. The samples were analyzed by GC-MS, using single ion monitoring to scan for the characteristic mass fragments of the demanded fatty acids. To obtain and compare the fatty acid patterns of hay- and silage milk samples, GC-FID analysis was carried out.

Pristanic acid contents in milk samples ranged from 0,39 to 0,54 mg/g milk fat, while phytanic acid contents were significantly higher at 1,83-2,50 mg/g. Dihydrosterculic acid contents ranged from 1,06-1,36 mg/g. Based on the GC-MS analysis no significant differences between hay milk and silage milk could be found. With 0,13-0,39 mg/g pristanic acid and 0,31-1,70 mg/g phytanic acid, cheese samples contained lower amounts of these fatty acids in comparison to milk samples. The content of dihydrosterculic acid in cheese ranged from 0,88 to 1,36 mg/g.

The analysis of the fatty acid patterns showed that hay milk contained - compared to silage milk - on average lower amounts of most saturated fatty acids and higher amounts of α -linolenic acid and conjugated linoleic acids.

6. Einleitung

6.1. Milch

6.1.1. Definition

Im Österreichischen Lebensmittelbuch (Codex Alimentarius) wird Milch folgendermaßen definiert: „Milch ist das durchmischte, unveränderte Gesamtgemelk einer oder mehrerer Milchtiere. Unter Milch ohne Artenbezeichnung wird Kuhmilch verstanden, die Milch anderer Tierarten wird entsprechend der jeweiligen Tierart bezeichnet (z.B. Schafmilch, Ziegenmilch, Büffelmilch).

Die Rohmilch entspricht zumindest den lebensmittelrechtlichen Bestimmungen, insbesondere der Verordnung (EG) Nr.853/2004 idgF.“ (Gesundheitsministerium, 2017).

Biologisch gesehen ist Milch das Sekret, das weibliche Tiere in der Milchdrüse nach der Geburt bilden und an das Jungtier abgeben (Märtlbauer & Becker, 2016).

6.1.2. Kuhmilchproduktion in Österreich

2018 wurden von 27.963 österreichischen Milchbetrieben 3.390.669 t Kuhmilch an Molkereien geliefert, was im Vergleich zum Vorjahr einer Steigerung von 2,3% entspricht (BMNT, 2019). Die Zahl der Betriebe ist im Vergleich zu 2017 jedoch um 3,6% zurückgegangen (BMNT, 2019). Des Weiteren stammten rund zwei Drittel der Milchlieferungen von Bergbauernbetrieben (BMNT, 2019). Die Gesamtproduktion von Milch aus biologischer Tierhaltung betrug 635.751 t, geliefert von insgesamt 6.798 Betrieben, wobei die Liefermenge im Vergleich zum Vorjahr um 3,9% gestiegen ist (BMNT, 2019).

6.1.3. Bio-Milch

Produktion, Verarbeitung und Kontrolle von Bio-Milch werden durch verpflichtend einzuhaltenden EU-Verordnungen 834/2007 & 889/2008 gedeckt. Wichtige Eckpunkte sind dabei der Verzicht auf den Einsatz von Gentechnik, ausreichend Platz und Auslauf für die Tiere und die Verwendung ökologischer bzw. biologischer Futtermittel (Verordnung (EG) Nr. 889/2008 Der Kommission, 2008; Verordnung (EG). Juni Nr. 834/2007 Des Rates, 2007). Neben diesen EU-Verordnungen existiert eine Vielzahl von Vereinen und

Programmen mit strengeren Richtlinien und Qualitätsstandards (Bio Austria, 2015; Ja! Natürlich, 2019).

6.1.4. Heumilch

Der Begriff Heumilch ist durch das Heumilchregulativ der Arbeitsgemeinschaft Heumilch Österreich geregelt, wobei der wichtigste Punkt der Verzicht auf Silage, Gärheu und Feuchtheu ist (ARGE Heumilch Österreich, 2018). Die ARGE Heumilch wurde 2004 gegründet und umfasst rund 8.000 Landwirte, sowie über 60 Molkereien, Käsereien und Sennereien (ARGE Heumilch Österreich). Neben der Verfütterung ist auch die Herstellung von Silagen verboten, des Weiteren muss der Raufutteranteil in der Jahresration mindestens 75% der Trockenmasse betragen (ARGE Heumilch Österreich, 2018). Heumilch kann sowohl aus konventioneller als auch aus biologischer Haltung stammen, wobei für Bio-Heumilch die EU-Bioverordnung 834/2007 idgF. einzuhalten ist (ARGE Heumilch Österreich, 2018). Im Jahr 2018 wurden in Österreich 303.223 t Heumilch aus konventioneller Produktion und 205.707 t Bio-Heumilch erzeugt (BMNT, 2019). Ein Vorteil von Heumilch ist das verringerte Risiko der Spätblähung von Käse, da durch Silage die dafür verantwortlichen Endosporen von *Clostridium tyrobutyricum* in die Milch gelangen können (Buxton et al., 2003). Die *Clostridium*-Sporen in der Silage passieren den Verdauungstrakt der Kuh und werden beispielsweise durch fäkale Verunreinigung des Euters in die Milch übertragen (Buxton et al., 2003). Aufgrund ihrer hohen Hitzeresistenz überstehen die Sporen den Pasteurisationsprozess und keimen in Käse aus, wodurch es zur Buttersäuregärung unter starker Gasbildung im Käse kommt, was in Geschmacksfehlern und Rissbildung resultiert (Buxton et al., 2003).

6.1.5. Bio-Wiesenmilch

Die ARGE Bio-Wiesenmilch wurde 2013 in Zusammenarbeit von BIO AUSTRIA und Kärntnermilch gegründet, wobei die BIO AUSTRIA-Richtlinien um einige Punkte erweitert wurden (ARGE Bio-Wiesenmilch, 2020). Als Grundlage dient dabei ein Punktesystem mit sieben definierten Maßnahmen, wodurch hohe Standards gesichert werden sollen (ARGE Bio-Wiesenmilch, 2020).

Besondere Energieeffizienz & Klimaschutz

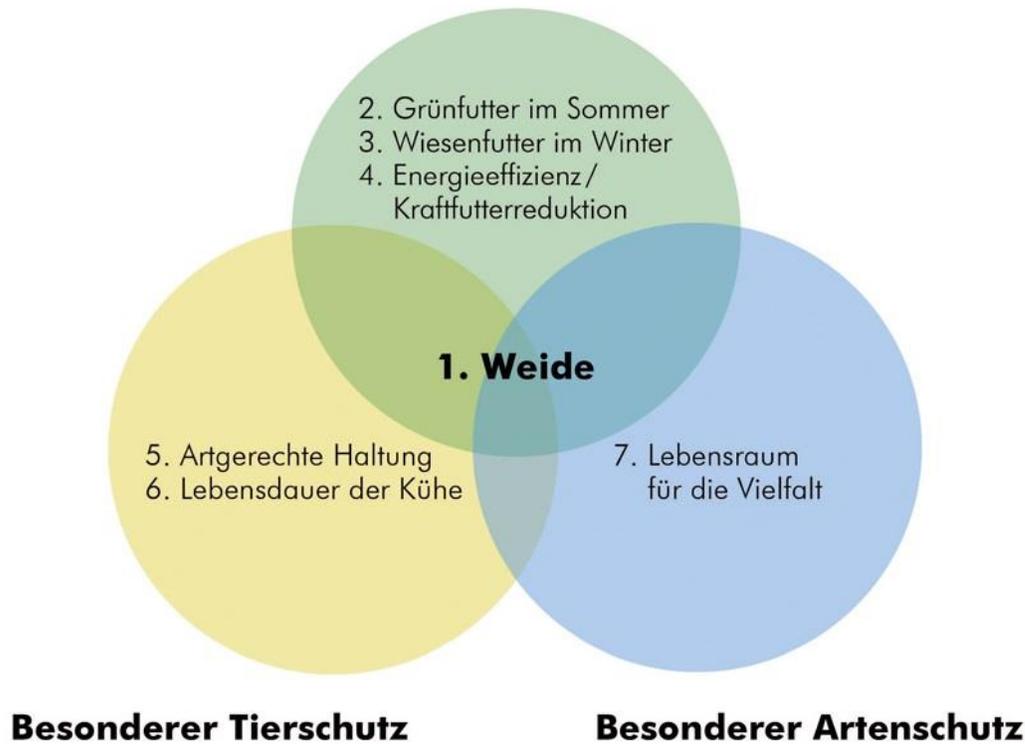


Abbildung 1: Maßnahmen Bio-Wiesensmilch

Abbildung aus ARGE Bio-Wiesensmilch (2020)

Für jede Maßnahme kann eine bestimmte Anzahl von Punkten erreicht werden, wobei die Maximalanzahl 63 Punkte beträgt, mindestens 30 Punkte erreicht werden müssen und die Mindestpunktzahl periodisch erhöht wird (ARGE Bio-Wiesensmilch, 2020). Im Gegensatz zu Heumilch kann bei Bio-Wiesensmilch zur Fütterung der Kühe in eingeschränktem Maße auch Maissilage verwendet werden (ARGE Bio-Wiesensmilch, 2020).

6.1.6. Zusammensetzung von Milch

Hauptbestandteile von Milch sind Wasser, Fett, Proteine und Laktose, deren Verhältnis sich je nach Spezies stark unterscheidet.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Milch in Prozent

Spezies	Trockenmasse	Protein	Fett	Laktose	Asche
Kuh	12,7	3,4	3,9	4,7	0,7
Ziege	13,3	3,2	3,5	4,3	0,8
Schaf	18,0	5,5	7,2	4,8	0,8
Mensch	12,9	0,9	1,0	7,1	0,2

Daten von Märtlbauer & Becker (2016)

Die Milchproteine können aufgrund ihrer Struktur in Caseine (α -, β -, und κ -) und Molkenproteine, zu denen β -Laktoglobulin, α -Laktalbumin, Albumin und Immunglobuline gehören, eingeteilt werden (Märtlbauer & Becker, 2016). Neben diesen Hauptbestandteilen beinhaltet Milch auch zahlreiche Vitamine, Enzyme, Geruchs- und Geschmacksstoffe, sowie somatische Zellen des Tieres (Märtlbauer & Becker, 2016). Änderungen in der Zusammensetzung von Milch können durch einen veränderten Gesundheitsstatus des Tieres verursacht werden und Auskunft über diesen geben (Märtlbauer & Becker, 2016).

6.2. Silage

Unter Silagen versteht man Grünfüttermittel, welche in Silos anaerob gelagert werden und durch Milchsäuregärung haltbar gemacht werden. Im Gegensatz zu Heu ist dabei keine Trocknung am Feld bzw. auf der Wiese notwendig, was zur Erleichterung der Ernte führt, da der Faktor Wetter nicht beachtet werden muss (Buxton et al., 2003). Für die Silagefermentation hauptverantwortliche Mikroorganismen sind homo- und heterofermentative Milchsäurebakterien, vor allem *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* und *Streptococcus*, wobei auch Enterobakterien an der Fermentation beteiligt sind (Buxton et al., 2003). Eine Fehlgärung durch Clostridien stellt bei der Silageproduktion ein großes Problem dar, da zum einen durch die stattfindende Buttersäuregärung die Futtermittelqualität gemindert wird und zum anderen die Clostridien sporen Spätblähung bei der Käseherstellung verursachen (Buxton et al., 2003). Neben der Fütterung kann Silage auch zur Biogasproduktion eingesetzt werden. 2018 wurden in Österreich 4.700 ha Grünlandfläche zur Herstellung von Biogas aus Grassilage aufgebracht (BMNT, 2019).

6.3. Lipide & Fettsäuren

Lipide können sowohl einfache Substanzen sein, jedoch auch aus mehreren Bausteinen bestehen, da sie lediglich aufgrund ihrer Hydrophobizität und der daraus resultierenden Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln, wie beispielsweise Hexan, eingeteilt werden (Belitz et al., 2008). In die Gruppe der Lipide fallen sowohl eigentliche Fette (Triglyceride), als auch deren Begleitstoffe, wie z.B. Lipovitamine, freie Fettsäuren, Wachse, und Kohlenwasserstoffe (Baltes & Matissek, 2011).

Die Einteilung der Lipide kann nach mehreren Kriterien erfolgen, wobei sich zwei Arten der Klassifizierung durchgesetzt haben. Während Lipide wie Glyceride, Phospholipide und Sterinester eine Esterbindung enthalten und deswegen verseifbar sind, handelt es sich bei Isoprenoid-Lipiden, freien Fettsäuren und Tocopherolen um unverseifbare Lipide (Belitz et al., 2008).

Eine weitere Möglichkeit ist die Einteilung aufgrund der Polarität: Dabei werden freie Fettsäuren, Glyceride, Wachse und Lipovitamine zu den neutralen Lipiden gezählt, während Phospho- und Glykolipide den polaren (amphiphilen) Lipiden zugerechnet werden (Belitz et al., 2008).

6.3.1. Fettsäuren

In Triglyceriden sind jeweils drei Fettsäuren mit dem dreiwertigen Alkohol Glycerol verestert. Bei Fettsäuren handelt es sich um die Carbonsäuren aliphatischer Kohlenwasserstoffe mit einer meist geradzahlgigen Anzahl von C-Atomen, welche sich in Kettenlänge und Vorhandensein, Anzahl, Position und Stellung von Doppelbindungen voneinander unterscheiden (Belitz et al., 2008). Das Fettsäuremuster von Ölen & Fetten unterscheidet sich stark je nach Spezies und ist für diese charakteristisch, wobei natürliche Schwankungen aufgrund von Rasse/Sorte, Klima und Tierernährung auftreten. (Baltes & Matissek, 2011).

Aufgrund des Vorkommens von Doppelbindungen lassen sich Fettsäuren in gesättigte und ungesättigte Fettsäuren unterteilen.

Gesättigte Fettsäuren

Bei gesättigten Fettsäuren ist das Kohlenstoffgerüst ausschließlich mit Einfachbindungen miteinander verbunden. Obwohl unverzweigte Fettsäuren, mit geradzahlgiger Anzahl von C-

Atomen in der Natur dominieren, kommen in vielen Fetten auch verzweigte und ungeradzahlige Fettsäuren in geringen Mengen vor (Belitz et al., 2008). Mit höherer Kettenlänge erhöhen sich auch die Schmelzpunkte der Fettsäuren, jedoch haben ungeradzahlige Fettsäuren eine geringere Molekülsymmetrie, was deren Anordnung im Kristallgitter erschwert, weswegen ihr Schmelzpunkt niedriger als der Schmelzpunkt der nächstniedrigeren geradzahligen Fettsäure ist (Belitz et al., 2008).

Tabelle 2: Name, Summenformel und Schmelzpunkt ausgewählter gesättigter Fettsäuren

Kurzschreibweise	Trivialname	System. Name	Summenformel	Schmelzpunkt [°C]
4:0	Buttersäure	Butansäure	C ₃ H ₇ COOH	-7,9
12:0	Laurinsäure	Dodecansäure	C ₁₁ H ₂₃ COOH	44,0
14:0	Myristinsäure	Tetradecansäure	C ₁₃ H ₂₇ COOH	54,4
16:0	Palmitinsäure	Hexadecansäure	C ₁₅ H ₃₁ COOH	62,9
17:0	Margarinsäure	Heptadecansäure	C ₁₆ H ₃₃ COOH	61,3
18:0	Sterinsäure	Octadecansäure	C ₁₇ H ₃₅ COOH	69,6
20:0	Arachinsäure	Eicosansäure	C ₁₉ H ₃₉ COOH	75,4

Daten von Belitz et al. (2008)

Ungesättigte Fettsäuren

Ungesättigte Fettsäuren enthalten mindestens eine Doppelbindung, wobei zwischen einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren unterschieden wird. Diese Doppelbindungen können in cis- oder trans-Konfiguration vorliegen, wobei in der Natur Fettsäuren mit konjugierten Doppelbindungen in cis-Stellung dominieren (Baltes & Matissek, 2011). Trans-Fettsäuren sind generell unerwünscht und kommen natürlich nur in geringen Mengen vor, entstehen aber bei der Erhitzung und Härtung von Fetten (Belitz et al., 2008). Im Vergleich zur gesättigten Fettsäure mit der gleichen Anzahl an C-Atomen, sind die Schmelzpunkte von ungesättigten Fettsäuren deutlich geringer und sinken mit zunehmender Anzahl von Doppelbindungen weiter (Belitz et al., 2008). Bei der Nomenklatur unterscheidet man zwischen zwei Systemen: Während systematisch die Position der Doppelbindung von der Carboxylgruppe ausgehend gezählt wird, gibt die Zählung vom Methylenende aus Auskunft über deren Biosynthese (Belitz et al., 2008). Demnach lassen sich ungesättigte Fettsäuren in ω3-, ω6- und ω9-Fettsäuren einteilen, wobei Linolsäure (ω6) und α-Linolensäure (ω3) ausschließlich von Pflanzen produziert werden können und somit mit der Nahrung aufgenommen werden müssen (Belitz et al., 2008).

Tabelle 3: Name, Summenformel und Schmelzpunkt ausgewählter ungesättigter C18-Fettsäuren

Kurzschreibweise	Trivialname	System. Name	Summenformel	Schmelzpunkt [°C]
18:1 (9)	Ölsäure	9c-Octadecensäure	C ₁₇ H ₃₃ COOH	13,4
18:1 (tr9)	Elaidinsäure	t9-Octadecensäure	C ₁₇ H ₃₃ COOH	46
18:2 (9,12)	Linolsäure	9c,12c-Octadecadiensäure	C ₁₇ H ₃₁ COOH	-5,0
18:3 (6,9,12)	α-Linolensäure	9c,12c,15c-Octadecatriensäure	C ₁₇ H ₂₉ COOH	-11,0

Daten von Belitz et al. (2008)

6.4. Milchfett

Der Milchfettgehalt liegt, je nach Nutztierart, zwischen 3,5% und 6%, wobei dieser von verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren, wie Fütterung, Rasse, Laktationszeitpunkt und Gesundheitsstatus abhängig ist (Märtlbauer & Becker, 2016). Milch ist eine Öl-in-Wasser-Emulsion, in der das Milchfett in Form von winzigen Kügelchen verteilt ist (Amores & Virto, 2019). Im Inneren dieser Milchfettkügelchen befinden sich unpolare Lipide, hauptsächlich Triacylglyceride, umhüllt von einer Membran, die sich aus amphiphilen Lipiden und Proteinen zusammensetzt (Amores & Virto, 2019). Die Lipidfraktion der Milch setzt sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 4: Mittlere Zusammensetzung der Milchfettfraktion

Lipid/Lipoide	Gewichts-%
Triglyceride	97-98%
Diglyceride	0,3-0,6%
Monoglyceride	0,02-0,04%
Ketosäureglyceride	0,9-1,3%
Hydroxysäureglyceride	0,6-0,8%
Freie Fettsäuren	0,1-0,4%
Freie Sterine (Cholesterin)	0,2-0,4%
Phospholipide	0,1-1%
Glycolipide	Spuren
Kohlenwasserstoffe	Spuren

Daten von Märtlbauer & Becker (2016)

Milchfett ist eines der komplexesten natürlich vorkommenden Fette, da es über 400 verschiedene Fettsäuren enthält (Amores & Virto, 2019). Im Gegensatz zu anderen natürlich vorkommenden Fetten, enthält Milchfett große Mengen kurzkettiger Fettsäuren. (Ulberth et al., 1999). Die Kettenlängen der in Milch enthaltenen Fettsäuren schwanken zwischen 4 und 26 Kohlenstoffatomen, wobei auch ungeradzahlige und verzweigte Fettsäuren vorkommen (Amores & Virto, 2019). Das Fettsäuremuster der Milch ist technologisch und ernährungsphysiologisch von hoher Bedeutung und hängt vor allem von der Fütterung und dem Pansenmikrobiom ab (Märtlbauer & Becker, 2016). Der Hauptanteil des Milchfettes besteht aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit gerader Anzahl an Kohlenstoffatomen, wogegen der Gehalt an ungeradzahligen, verzweigten, cyclischen, Oxy- und Hydroxyfettsäuren nur bei rund 8% liegt (Märtlbauer & Becker, 2016).

Tabelle 5: Fettsäurezusammensetzung von Kuhmilch

Fettsäure	Summenformel (Lage der Doppelbindung)	Anteil in %
gesättigte Fettsäuren		
Buttersäure	$C_4H_8O_2$	3,2
Capronsäure	$C_6H_{12}O_2$	1,6
Caprylsäure	$C_8H_{16}O_2$	1,0
Caprinsäure	$C_{10}H_{20}O_2$	2,9
Laurinsäure	$C_{12}H_{24}O_2$	4,8
Myristinsäure	$C_{14}H_{28}O_2$	11,8
Palmitinsäure	$C_{16}H_{32}O_2$	27,4
Stearinsäure	$C_{18}H_{36}O_2$	10,4
Arachinsäure	$C_{20}H_{40}O_2$	0,2
Behensäure	$C_{22}H_{44}O_2$	0,2
einfach ungesättigte Fettsäuren		
Myristoleinsäure	$C_{14}H_{26}O_2$ (9)	1,8
Palmitoleinsäure	$C_{16}H_{30}O_2$ (9)	2,6
Ölsäure	$C_{18}H_{34}O_2$ (9)	22,9
mehrfach ungesättigte Fettsäuren		
Linolsäure	$C_{18}H_{32}O_2$ (9,12)	3,6
α -Linolensäure	$C_{18}H_{30}O_2$ (9, 12, 15)	1,1
Arachidonsäure	$C_{20}H_{32}O_2$ (5, 8, 11, 14)	0,4

Daten von Märtlbauer & Becker (2016)

6.5. Cyclopropanfettsäuren

Fettsäuren die einen Cyclopropanring besitzen, kommen in den Membranen von sowohl Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien vor (Caligiani et al., 2014). Sie spielen eine wichtige Rolle beim Schutz gegen Stressreaktionen: Es konnte beispielsweise bei *Lactobacillus*-Arten, die einen geringen Anteil an ungesättigten Fettsäuren enthalten, höhere Gefrier-/Taubstabilität nachgewiesen werden, je höher ihr Gehalt an Cyclopropanfettsäuren war (Zavaglia et al., 2000). Der Cyclopropanfettsäuregehalt von Milch ist stark von der Fütterung abhängig: Während Milchfett von Kühen, die mit Maissilage gefüttert wurden, zwischen 0,06% und 0,22% Cyclopropanfettsäuren enthält, liegt der Anteil bei Milch aus silagefreier Fütterung unter 0,01% (Marseglia et al., 2013). Caligiani et al. zeigten 2014, dass Bakterienstämme, welche bei der kommerziellen Joghurtproduktion eingesetzt werden, keine signifikanten Mengen an Cyclopropanfettsäuren produzieren und diese nicht in Triglyceride einbauen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Cyclopropanfettsäuren bei der Silagefermentation entstehen und somit in die Milch gelangen, was deren Verwendung als Marker für Lebensmittel wie Parmigiano Reggiano, bei denen der Einsatz von silagefreier Milch vorgeschrieben ist, ermöglicht (Caligiani et al., 2016).

Cis-11,12-Methylen-Octadecansäure, kommt in vielen Bakterien vor und wurde 1950 erstmals aus den Phospholipiden von *Lactobacillus arabinosus* isoliert, weswegen diese den Trivialnamen Lactobacillsäure trägt (Hofmann & Lucas, 1950; Caligiani et al., 2014). Neben Lactobacillsäure sind cis-9,10-Methylen-Octadecansäure (Dihydrosterculiasäure) und cis- 9,10-Methylen-Hexadecansäure die überwiegend vorkommenden Fettsäuren in bakteriellen Membranen (Grogan & Cronan, 1997). Als Precursor dienen dabei ungesättigte Fettsäuren, an deren Doppelbindungen mit Hilfe von S-Adenosylmethionin eine Methylgruppe addiert wird, wodurch der Cyclopropanring entsteht (Grogan & Cronan, 1997).

Neben Bakterienmembranen beinhaltet Litchisaatöl eine signifikante Menge an Cyclopropanfettsäuren: Die CPFA-Fraktion macht dabei 42% der Gesamtfettsäuren aus, wobei der überwiegende Teil davon Dihydrosterculiasäure (37%) ist (Gaydou et al., 1993).

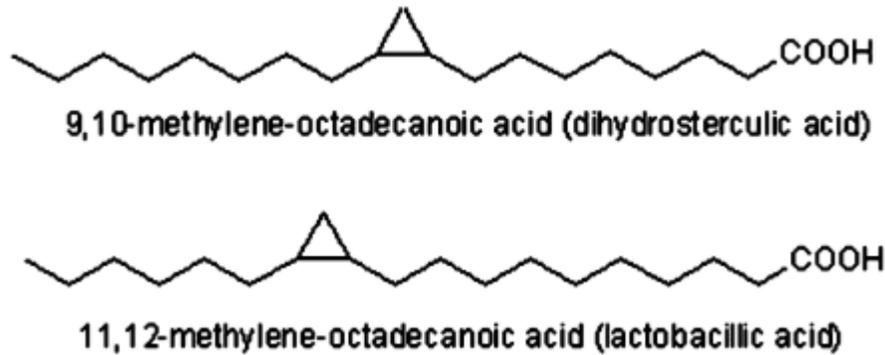


Abbildung 2: Strukturen der meistvorkommenden Cyclopropanfettsäuren in Milch

Abbildung aus Caligiani et al. (2014)

6.6. Verzweigte Fettsäuren

6.6.1. Phytansäure

3,7,11,15-Tetramethyl-Hexadecansäure, mit dem Trivialnamen Phytansäure, ist eine mehrfachverzweigte Fettsäure, welche im Pansen von Wiederkäuern durch die bakterielle Zersetzung von Chlorophyll entsteht und von Säugetieren nicht synthetisiert werden kann (Capuano et al., 2014). Der in Chlorophyll a, b & d enthaltene Alkoholrest Phytol wird durch Pansenbakterien von Chlorophyll abgespalten, dessen Doppelbindungen gesättigt und die Hydroxylgruppe wird oxidiert, wodurch eine Carboxylgruppe entsteht (Patton & Benson, 1966). Bei der Hydrierung der Doppelbindungen entsteht am C3-Atom ein chirales Zentrum, wodurch die zwei natürlich vorkommenden Stereoisomere von Phytansäure (3R,7R,11R,15-PhA & 3S,7R,11R,15-PhA) entstehen (Schröder & Vetter, 2011). Der durchschnittliche Anteil von Phytansäure in der Lipidfraktion, liegt bei Kuhmilchprodukten aus konventioneller Tierhaltung bei 0,18%, während der Anteil in Bioprodukten 0,27% ausmacht (Vetter & Schröder, 2010). Begründet wird dies durch den höheren Anteil an Grünfütter bei der biologischen Tierhaltung im Vergleich zur konventionellen Haltung, da die Tiere mehr Chlorophyll zu sich nehmen (Vetter & Schröder, 2010).

6.6.2. Pristansäure

Pristansäure (2,6,10,14-Tetramethyl-Pentadecansäure) ist das Primärprodukt beim Abbau von Phytansäure, mit welcher es in Tieren und Lebensmitteln koexistiert (Lough, 1975). Aufgrund der Struktur kann Phytansäure nicht wie viele andere Fettsäuren durch β -Oxidation abgebaut werden, weswegen diese durch α -Oxidation in den Peroxisomen zu Pristansäure metabolisiert wird (Lough, 1975). Da sich bei Pristansäure die Methylgruppe am zweiten anstatt am dritten C-Atom befindet, kann diese wieder durch β -Oxidation abgebaut werden (Lough, 1975). Wie auch bei Phytansäure, wurde in biologischen Milchprodukten, mit 0,056% des MilCHFettes, ein höherer Gehalt an Pristansäure gegenüber Milchprodukten aus konventioneller Tierhaltung nachgewiesen (0,043% des MilCHFettes) (Vetter & Schröder, 2010).

6.6.3. Gesundheitliche Aspekte

Refsum Syndrom

Beim Refsum-Syndrom handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, bei der eine Akkumulation von Phytansäure in Blut und Gewebe stattfindet, während Pristansäure darin in normalen Mengen vorkommt (Verhoeven & Jakobs, 2001). Aufgrund eines Defizites an Phytanoyl-CoA- α -Hydroxylase, dem ersten Enzym bei der α -Oxidation von Phytansäure, kann diese nicht abgebaut werden, was zur Akkumulation von Phytansäure führt (Mihalik et al., 1997). Im Laufe der Krankheit kommt es zur Dysfunktion des Nervensystems und zur Zerstörung der Netzhaut (Mihalik et al., 1997).

Weitere Aspekte

Während Phytol und dessen Metaboliten mit der Vorbeugung von Krebs in Verbindung gebracht werden, scheinen diese in höheren Konzentrationen cytotoxisch für gesunde Zellen zu sein (Bobe et al., 2020). Dies lässt auf einen engen Effizienzbereich dieser Stoffe schließen, über welchen noch wenig bekannt ist, wodurch weitere Forschung auf diesem Gebiet notwendig ist (Bobe et al., 2020).

6.7. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie stellt die am besten geeignete und am häufigsten eingesetzte Methode zur Fettsäureanalyse dar (Cruz-Hernandez & Destailats, 2012). Dabei werden kleine Volumina (Mikroliterbereich) mittels Spritze in den Injektor des Gaschromatographs injiziert, wobei zwischen Split/Splitless und direkter Injektion in die Säule (on-Column) unterschieden wird (Gey, 2008). Nach der Probeninjektion kommt es im Injektor zum Verdampfen der leicht flüchtigen Probe, die anschließend im Trägergas (mobile Phase) durch die Trennsäule transportiert wird (Gey, 2008). Eingesetzte Trägergase sind unter anderem Helium, Wasserstoff und Stickstoff, wobei die Flussrate für eine optimale Trennung je nach Trägergas unterschiedlich ist (Blumberg, 2012). In der Trennsäule, welche sich im Säulenofen befindet, kommt es durch Wechselwirkungen der Probenbestandteile mit der stationären Phase zur unterschiedlichen Retention der Bestandteile, wodurch diese getrennt werden. Für die Analyse von Fettsäuremethylester werden häufig hochpolare Cyanoproyl-Polysiloxan-Säulen mit einem Innendurchmesser von unter einem Millimeter verwendet, deren Länge 100 m überschreiten kann (Cruz-Hernandez & Destailats, 2012).

Für die Detektion der Probenbestandteile existieren viele Detektoren mit unterschiedlichen Funktionsprinzipien und Anwendungen, wobei der Flammenionisationsdetektor (FID) der am häufigsten eingesetzte Detektor für die quantitative Analyse ist (Klee, 2012). Dabei wird die Probe in einer Wasserstoffflamme verbrannt und ionisiert (Klee, 2012). Die dadurch entstehenden positiven Ionen werden am Kollektor aufgefangen, der entstandene elektrische Strom elektrisch verstärkt und das Signal aufgezeichnet (Klee, 2012). Ein großer Vorteil des FID ist der weite lineare Arbeitsbereich des Detektors (Klee, 2012). Außerdem reagiert dieser annähernd gleich auf verschiedenen Kohlenwasserstoffe, weswegen die Peakflächen der Probenbestandteile mit deren Anteil in Massenprozent gleichgesetzt werden können (Klee, 2012). Da es sich dabei jedoch um einen destruktiven Detektortyp handelt, kann dieser nicht für präparative Zwecke eingesetzt werden. Die Identitätsbestimmung von Probenbestandteilen kann bei der Detektion mittels FID nur durch Vergleich der Retentionszeiten mit einem Standard erfolgen.

Ist eine Strukturaufklärung der Probenbestandteile notwendig, kann die GC in Kopplung mit einem Massenspektrometer durchgeführt werden, wodurch Nachweisgrenzen in Nano-

bzw. Femtogramm erzielt werden (Gey, 2008). In einem Hochvakuum werden dabei die Probenbestandteile durch eine Ionenquelle ionisiert und die entstandenen Ionen im Analysator nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt (Gey, 2008). Die gebildeten Fragmente sind charakteristisch für Substanzen und werden mittels Detektor registriert und anschließend zur Strukturbestimmung mit Referenzspektren aus einer Massenspektrenbibliothek verglichen.

6.8. Derivatisierung

Für die gaschromatographische Analyse von Fetten werden die gebundenen Fettsäuren meist in flüchtigere Derivate umgewandelt. Vorteile davon sind niedrigere Analysentemperatur und kürzere Retentions- und somit auch Analysezeiten. Die Umesterung zu Methylestern ist die dabei am häufigsten angewandte Methode (Amores & Virto, 2019). Neben Methanol können auch länger-kettige Alkohole, wie beispielsweise Ethanol, Propanol und Butanol verwendet werden, wodurch sich mit zunehmender Kettenlänge die Flüchtigkeit der Ester verringert, was zu längeren Retentionszeiten führt (Ulberth et al., 1999). Für spezielle Anwendungen wie Strukturaufklärung durch GC-MS, liefern Methylester oft nichtzufriedenstellende Ergebnisse, weswegen dabei andere Derivate wie Picolinylester eingesetzt werden (Harvey, 1998).

6.8.1. Methylierung

Bei der Umesterung in Methylester wird der mit den Fettsäuren veresterte Glycerol- bzw. Spinghosin-Rest durch Methanol ersetzt, wodurch Fettsäuremethylester (FAME) entstehen (Poole, 2012). Für die Herstellung von Fettsäuremethylester können einerseits isolierte Lipide verwendet werden, andererseits kann der Umesterungsschritt auch mit der Lipidextraktion kombiniert werden (Poole, 2012). Die Methylierung der Proben erfolgt in einem Überschuss an Methanol, in Gegenwart eines Katalysators (Poole, 2012).

Basenkatalysierte Methylierung

Im Zuge der basenkatalysierten Transmethylierung wird die Probe mit Natrium-, bzw. Kaliummethanolat umgesetzt, welches durch Lösen der jeweiligen Metalle in wasserfreiem Methanol hergestellt wird (Christie, 1993). In Gegenwart einer Base (Methanolat-Anion) bildet sich aus dem ursprünglichen Ester ein negativ geladenes Zwischenprodukt, woraus ein Methylester gebildet werden kann, oder das Zwischenprodukt wieder zum

ursprünglichen Ester zurückdissoziiert (Christie, 1993). Durch den großen Überschuss an Methanol verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Methylesters, was dazu führt, dass die ursprünglichen Glyceride fast vollständig umgeestert werden (Christie, 1993). Im Gegensatz zu Glyceriden werden freie Fettsäuren in der Probe nicht in Methylester umgewandelt, weswegen basenkatalysierte Methylierungsmethoden nur für Proben mit niedrigem Anteil an freien Fettsäuren eingesetzt werden (Kramer et al., 1997; Poole, 2012). Des Weiteren werden N-Acyl-Lipide wie Sphingomyelin durch Methanolat ebenfalls nicht umgeestert (Kramer et al., 1997). Parallel zur Umesterungsreaktion läuft jedoch, vor allem in Gegenwart von Wasser, eine Hydrolyse der Ester (Verseifungsreaktion) ab (Christopherson & Glass, 1969). Obwohl diese Reaktion deutlich langsamer fortschreitet, stellt diese vor allem bei Milch ein Problem dar, da die enthaltenen kurzkettigen Fettsäuren deutlich schneller verseift werden, was zu Änderungen der Probenzusammensetzung binnen kurzer Zeit führt (Bannon et al., 1982). Um Verluste durch Verseifung zu vermeiden, werden kurze Reaktionszeiten (sechs Minuten) und ein anschließendes Neutralisieren der Probe empfohlen (Bannon et al., 1985)

Säurekatalysierte Methylierung

Neben Basen können auch Säuren als Katalysatoren für die Methylierung von Ölen und Fetten eingesetzt werden. Nach der Protonierung des Esters durch die Säure entsteht durch die Addition von Methanol ein Zwischenprodukt (Christie, 1993). Obwohl dieser Schritt reversibel ist entsteht durch den Überschuss an Methanol fast ausschließlich Methylester (Christie, 1993). Im Gegensatz zu den basisch katalysierten Methylierungsmethoden werden bei der säurekatalysierten Methylierung sowohl gebundene Fettsäuren (Triglyceride, Phospholipide), als auch freie Fettsäuren methyliert (Gresti et al., 1993). Der Grund dafür ist, dass durch den Katalysator auch aus freien Fettsäuren Oxonium-Ionen entstehen, welche anschließend durch den Methanolüberschuss in Methylester umgesetzt werden (Christie, 1993). Am häufigsten wird dabei 5% HCl in Methanol verwendet, was jedoch zeitintensiv ist, da zur vollständigen Methylierung eine Reaktionsdauer von zwei Stunden bei 70°C benötigt wird (Christie, 1993). Neben HCl kann auch H₂SO₄ verwendet werden, welche fast identische Eigenschaften bei der Methylierung aufweist und einfach herzustellen ist (Christie, 1993). Wird 14% BF₃ in Methanol zur Methylierung verwendet, können kürzere Methylierungszeiten und niedrigere Temperaturen (15 min, 50°C) verwendet werden (Kramer et al., 1997). Neben des höheren Zeitaufwands ist auch der

Verlust von cis/trans-konjugierter Linolsäureisomeren, welche in trans/trans-Isomere sowie Methoxyartefakte umgesetzt werden, ein weiterer Nachteil der säurekatalysierten Methylierungsmethoden (Kramer et al., 1997).

6.8.2. Silylierung

Bei der Silylierung handelt es sich um eine milde Derivatisierungsmethode, bei der aktive Wasserstoffatome von Carboxyl- und Hydroxylgruppen durch Trimethylsilyl-Gruppen (TMS) ersetzt werden, wodurch TMS-Ester und -Ether entstehen (Wan et al., 2007). Durch das Verschwinden von Wasserstoffbrückenbindungen erhöht sich die Flüchtigkeit der silylierten Komponenten, sowie deren Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln, was von Vorteil bei der gaschromatographischen Analyse ist (Kashutina et al., 1975). Aufgrund der fehlenden labilen Wasserstoffatome werden Triglyceride im Gegensatz zu freien Fettsäuren und Diglyceriden nicht silyliert, wodurch die Bestimmung von freien Fettsäuren in glyceridhaltigen Proben ermöglicht wird (Kashutina et al., 1975). Die benötigte Reaktionszeit variiert stark zwischen verschiedenen Stoffgruppen: Während primäre Alkohole durch N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BTSFA) nach 5 Minuten vollständig silyliert werden, werden für andere Komponenten Katalysatoren wie Chlor(trimethyl)silan (TMCS) und Temperaturen von 150°C benötigt (Thermo Scientific, 2008a). Bei der Silylierung muss auf vollständige Wasserfreiheit geachtet werden, da Wasser sowohl TMS-Reagenzien, als auch Reaktionsprodukte zerstört (Thermo Scientific, 2008b). Des Weiteren sind stationäre Phasen wie FFAP und Polyethylenglycol nicht für die Trennung silylierter Proben einsetzbar, da diese aktive Wasserstoffatome enthalten, die mit den silylierten Probenbestandteilen und Silylierungsreagenzien reagieren (Thermo Scientific, 2008b).

7. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, durch Analyse verschiedener Fettsäuren in Milchfett Indikatoren festzulegen, anhand welcher Heumilch von Silomilch unterschieden werden kann. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf die mehrfach verzweigten Minorfettsäuren Phytan- und Pristansäure, sowie auf die Cyclopropanfettsäure Dihydrosterculiasäure gelegt. Die Analyse dieser Fettsäuren soll mittels GC-MS erfolgen, wobei die gesuchten Fettsäuren in Form von freien Fettsäuren als Standard zugegeben und in unterschiedliche Derivate umgewandelt werden sollen. Im Zuge einiger Vorversuche mit kostengünstigeren Standards soll eine geeignete Derivatisierungsmethode entwickelt und anschließend für die Analyse von Milchfett verwendet werden.

Der Anteil dieser Fettsäuren in Milch- und Käseproben aus unterschiedlichen Haltungsformen soll bestimmt werden und eine mögliche Korrelation der Ergebnisse mit der Haltungsform untersucht werden. Neben diesen Minorfettsäuren, soll das Gesamtfettsäuremuster der Proben mittels GC-FID analysiert und ebenfalls etwaige statistisch signifikante Unterschiede zwischen Heu- und Silomilch festgestellt werden.

8. Materialien

8.1. Chemikalien

Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte

Name	Hersteller	Artikelnummer
Hexan	Sigma-Aldrich	32293-2.5L-M
Toluol	Carl Roth	T166.1
Ethanol 100%	Chem-Lab NV	CL00.0505.5000
Methanol	VWR	20864.320
Petroleumbenzin	Carl Roth	9320.5
Diethylether	VWR	23806.328
Pyridin	Sigma-Aldrich	270970-100ML
Chloroform	Carl Roth	T901.1
Natrium	Riedel-deHaen	13401
Acetylchlorid	Sigma-Aldrich	00990-100ML
Natriumsulfat	Sigma-Aldrich	31481-1KG-M
Natriumhydrogensulfat-Monohydrat	Merck	6352.0500
Essigsäure 99-100%	Chem-Lab NV	CL00.0116.2500
Silyl 991 BSTFA-TCMS (99:1)	Machery-Nagel	701490
Undecansäure 99%	Sigma-Aldrich	U-5503
10-Undecensäure 98%	Sigma-Aldrich	124672-100ML
Tridecansäure 99%	Sigma-Aldrich	T-0502
Palmitinsäure 99%	Sigma-Aldrich	P-0500
Stearinsäure	Sigma-Aldrich	S-4751
Pentadecansäuremethylester Bezugssubstanz	Merck	9641
Heptadecansäuremethylester analytical standard	Sigma-Aldrich	51633-5G
Tripalmitat 99%	Sigma-Aldrich	T-5888
37 Komponenten FAME-Mix	Supelco	CRM47885
Harnstoff	Merck	8487
Sulfurylchloride 95%	Sigma-Aldrich	157767-25ML
Ammoniaklösung 25%	Carl Roth	6774.1
Silica-Gel	Sigma-Aldrich	60741-1KG

8.2. Geräte

Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Gaschromatograph	Thermo Scientific	TRACE GC ULTRA
Gaschromatograph	Carlo Erba Instruments	HRGC 5300
Gaschromatograph	Thermo Scientific	FOCUS GC
Massenspektrometer	Thermo Scientific	DSQ II
Analysenwaage	Acculab	ATILON
Zentrifuge	Funke Gerber	SuperVario-N
Zentrifuge	Beckman	J2-HS Centrifuge
Rotationsverdampfer	Büchi	Rotavapor R-134
Wasserbad	Büchi	Waterbath B-480
Kühlgerät	Lauda	Microcool MC 250
Trockenschrank	Thermo Scientific	HERAEUS Oven
Lösungsmittelextraktor	Velp Scientifica	SER 148 Solvent Extractor
Vibrationsmischer	Bender & HOBEIN AG	VORTEX-GENIE
Gefriertrockner	Edwards	FREEZE DRYER Modulyo

8.2.1. GC-Säulen

Tabelle 8: Liste der verwendeten GC-Säulen

Säule	Hersteller	Stationäre Phase	Länge	Durchmesser	Schichtdicke
HP-FFAP	Agilent	Nitroterephthalsäure-modifiziertes Polyethylenglycol	25 m	0,32 mm	0,52 μm
BPX70	SGE	(70% Cyanopropyl)-Polysilphenylen-siloxan	50 m	0,22 mm	0,25 μm
HP5	Agilent	(5%-Phenyl)-Methylpolysiloxan	30 m	0,25 mm	0,25 μm
SP-2560	Supelco	Poly-Biscyanopropyl-Siloxan	100 m	0,25 mm	0,2 μm
JW DB17HT	J&W Scientific	(50%-Phenyl)-Methylpolysiloxan	30 m	0,25 mm	0,15 μm
RTX65 TG	Restek	Crossbond Diphenyl(65%)-Dimethyl(35%)-Polysiloxan	30 m	0,32 mm	0,1 μm

9. Methoden

9.1. Herstellung der Lösungen

Natriummethanolat

9,2 g metallisches Natrium wurden mit einem Messer abgeschnitten und die Oxidschicht mit Methanol abgespült. Anschließend wurde dieses im Abzug, mittels Magnetrührers, in 200 mL Methanol in einem Becherglas gelöst. Die Öffnung des Becherglases wurde mit Aluminiumfolie bedeckt und die Lösung mit Stickstoff begast. Da während des Lösungsvorgangs Methanol verdampfte, wurde die Lösung anschließend wieder auf ein Gesamtvolumen von rund 200 mL aufgefüllt.

Natriumethanolat

Die Herstellung von Natriumethanolat erfolgte analog zu Natriummethanolat, jedoch wurde anstelle von Methanol, wasserfreies Ethanol verwendet.

HCl/Methanol

80 mL gekühltem, wasserfreiem Methanol wurden im Abzug unter Rühren tropfenweise 8 mL Acetylchlorid zugegeben, was einer Konzentration von rund 5% entspricht. Da diese Reaktion stark exotherm ist, muss die Zugabe von Acetylchlorid langsam erfolgen. Das dabei entstehende Methylacetat stört bei der säurekatalysierten Methylierung nicht (Christie, 2003).

Fettsäure/Fettsäuremethylester-Standards

Die benötigte Menge an Standard wurde auf der Analysenwaage in ein Wägeschiffchen mit Trichter eingewogen und das genaue Gewicht notiert. Anschließend wurde der Inhalt des Schiffchens mit Lösungsmittel sorgfältig in einen Messkolben gespült und dieser bis zur Marke aufgefüllt.

9.2. Basenkatalysierte Ethylierung mit nachfolgender säurekatalysierter Methylierung

Laut Tserng, et al. (1981) und Lepage & Roy (1988) ist es möglich gezielt freie Fettsäuren zu methylieren, indem man die Methylierungszeit bei der sauren Methylierung verkürzt. Um gleiche Fettsäuren in gebundener und freier Form chromatographisch trennen zu können, soll die Probe zuerst mittels basenkatalysierter Ethylierung ethyliert werden, wodurch nur gebundene Fettsäuren ethyliert werden. Anschließend soll darauf eine verkürzte Methylierung mit HCl/Methanol folgen, um die freien Fettsäuren zu methylieren.

9.2.1. Basenkatalysierte Ethylierung

Als Grundlage für die basische Ethylierung diente eine Methode zur basischen Methylierung nach Christie (2003), wobei anstelle von 0,5-molarem Natriumethanolat 2-molares Natriumethanolat verwendet wurde. Um die Hydrolyse zu freien Fettsäuren möglichst gering zu halten, wurden Reaktionszeit und –temperatur variiert.

2 mL Heptadecansäuremethylester in Hexan (10 mg/mL) wurden in ein Pyrexröhrchen pipettiert und anschließend 2 mL Natriumethanolat (2N) zugegeben. Danach wurde das Röhrchen zugeschraubt und eine Minute geschüttelt, worauf je nach Probe, eine Minute im Wasserbad bei 50°C und eine Standzeit bei Raumtemperatur folgte (siehe Tabelle 9). Nach der Standzeit wurde die Reaktion mit 0,4 mL Eisessig gestoppt und die Proben 5 min bei 1100 rpm in der Gerber-Zentrifuge zentrifugiert. Um überschüssiges Ethanol zu entfernen wurde die Probe 2x mit jeweils 5 mL UHQ-Wasser gewaschen, wobei immer die obere Phase mittels Pasteurpipette abgezogen und weiterverwendet wurde. Zuletzt wurde die obere Phase zur Trocknung in ein Pyrexröhrchen mit Na₂SO₄ überführt, geschüttelt und in ein Probefläschchen überführt.

Tabelle 9: Probenliste basenkatalysierte Ethylierung

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8
t(50°C) [min]	0	0	0	0	1	1	1	1
t(20°C) [min]	0	5	11	30	0	5	10	30

Die gaschromatographische Analyse der Proben erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 10: HP-FFAP-Analysemethode 1

Gerät	Focus-GC
Säule	HP-FFAP
Injektionsvolumen	1 μ L
Starttemperatur/Haltezeit	100°C; 1 min
Rampe 1	15°C/min bis 170°C; 0 min
Rampe 2	5°C/min bis 240°C; 5 min
Trägergas	Wasserstoff
Flussrate	2 mL/min
Temperatur Inlet	250°C
Split	1:100
Detektor	FID
Temperatur Detektor	250°C

9.2.2. Herstellung von Ethylester

Der für die weiteren Analysen benötigte Heptadecansäureethylester wurde aus 50 mL Heptadecansäuremethylester in Hexan (10 mg/mL) mittels basenkatalysierter Ethylierung nach Methode 3 hergestellt, wobei die verwendeten Volumina an Reagenzien mit dem Faktor 25 multipliziert wurden. Nach der Ethylierung erfolgte eine Abtrennung des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer (400 mbar; 40°C), worauf der Druck anschließend auf 60 mbar reduziert wurde, um Spuren von Wasser zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Kontrolle der Reinheit mittels Gaschromatographie, unter den in Tabelle 10 angeführten Analysebedingungen.

9.2.3. Säurekatalysierte Methylierung

1 mL Heptadecansäureethylester in Toluol (10 mg/mL) und 1 mL in Stearinsäure in Toluol (10 mg/mL) wurden in ein Pyrexröhrchen pipettiert. Nach der Zugabe von 3 mL HCl/Methanol wurde die Luft mit Stickstoff verdrängt und das Röhrchen fest zugeschraubt. Die Proben wurden eine Minute lang geschüttelt, worauf je nach Probe eine Standzeit bei Raumtemperatur folgte. Anschließend erfolgte eine Neutralisation der Probe mit 5 mL K_2CO_3 (6%), wonach die Proben 5 Minuten in einer Gerber-Zentrifuge bei 1100 rpm

zentrifugiert wurden. Die obere Phase wurde zur Trocknung in ein Röhrchen mit Na_2SO_4 überführt, geschüttelt und in ein Probefläschchen abgefüllt.

Um die Reaktionszeit genauer einhalten zu können, erfolgte bei Probe 1 keine Luftverdrängung durch Stickstoff.

Tabelle 11: Probenliste säurekatalysierte Methylierung 1

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8
Standzeit [min]	0	5	10	15	30	45	60	75

Die Probenvorbereitung für Proben 9 & 10 erfolgte analog zu den Proben 1-8, aber mit einminütiger Erhitzung im Wasserbad bei 70°C nach dem Schütteln. Des Weiteren wurden zur besseren Peaktrennung statt Stearinsäure, 1 mL Palmitinsäure in Toluol (10 mg/mL) verwendet.

Tabelle 12: Probenliste säurekatalysierte Methylierung 2

Probe	9	10
t 70°C [min]	1	2

Die gaschromatographische Analyse der Proben erfolgte mittels Focus-GC, unter den in Tabelle 10 angeführten Analysebedingungen.

9.3. Basenkatalysierte Methylierung mit anschließender Silylierung

Triglyceride in Milchfett sollen mittels Natriummethanolat in Fettsäuremethylester umgeestert werden, während die als Standard eingesetzten freien Fettsäuren dabei nicht methyliert werden und im Anschluss in Trimethylsilyl-Derivate überführt werden.

9.3.1. Basenkatalysierte Methylierung

Ziel der Basenkatalysierten Methylierung ist die vollständige Methylierung der Probe bei möglichst geringer Verseifung dieser, da die dabei entstehenden freien Fettsäuren anschließend ebenfalls silyliert werden würden.

Als Standard wurde Heptadecansäuremethylester (5 mg/mL) und Tripalmitat (5 mg/mL) in Hexan verwendet. Die Konzentration des Reaktionsproduktes Palmitinsäuremethylester wurde mittels der Konzentration an Heptadecansäuremethylester berechnet.

Basenkatalysierte Methylierung nach Christie (2003)

2 mL Standard wurden in ein Pyrexröhrchen pipettiert und danach 2 mL Na-Methanolat (2N) dazupipettiert. Anschließend wurde das Röhrchen zugeschraubt und die Probe eine Minute lang geschüttelt. Danach erfolgte die Neutralisation der Probe mit 400 μ L Eisessig (Christie, 2003). Die Probe wurde anschließend bei 1100 rpm, 2 Minuten lang zentrifugiert und die obere Phase abgezogen, in ein Pyrexröhrchen mit Na_2SO_4 überführt, ausgeschüttelt und in ein Probefläschchen abgefüllt.

Basenkatalysierte Methylierung nach Christopherson & Glass (1969)

Bei der Methode nach Christopherson & Glass (1969), wurde eine weitaus geringere Menge an Natriummethanolat verwendet, was dazu dient Methylbutyrat quantitativ bestimmen zu können, da große Mengen an Methanol bei dessen Quantifizierung stören (Christopherson & Glass, 1969)

2 mL Standard wurden dabei in einem Pyrexröhrchen mit 100 μ L Na-Methanolat versetzt und 20 Sekunden lang geschüttelt (Christopherson & Glass, 1969). Die obere Phase wurde danach in ein Pyrexröhrchen mit Na_2SO_4 überführt, ausgeschüttelt und in ein Probefläschchen abgefüllt.

Basenkatalysierte Methylierung nach Ulberth et al. (1999)

Bei einer Methode zur Methylierung von Milch nach Ulberth et al. (1999), wurde ebenfalls eine geringere Menge an Natriummethanolat verwendet, um kurzkettige Fettsäuren bestimmen zu können. Des Weiteren erfolgte nach 5 Minuten Standzeit ein Stoppen der Reaktion.

2 mL Standard wurden in ein Pyrexröhrchen pipettiert und anschließend 50 µL Natriummethanolat (2N) zugegeben. Danach wurde das Röhrchen zugeschraubt und die Probe eine Minute lang geschüttelt. Nach einer 5-minütigen Standzeit bei Raumtemperatur wurde die Probe durch Zugabe von 0,2 g NaHSO₄ neutralisiert und bei 1100 rpm für 2 Minuten zentrifugiert (Ulberth et al., 1999). Danach wurde die obere Phase abgezogen, in ein Pyrexröhrchen mit Na₂SO₄ pipettiert, anschließend ausgeschüttelt und in ein Probefläschchen überführt.

Analog dazu erfolgte ein zweiter Ansatz, wobei jedoch die Probe mit 10 µL Eisessig neutralisiert wurde und auf eine Zentrifugation verzichtet wurde. Die Probenanalyse erfolgte sofort nach der Probenvorbereitung unter den in Tabelle 10 angeführten Analysebedingungen.

9.3.2. Silylierung

Die Silylierung der Proben erfolgte mit Silyl 991 (Macherey-Nagel). Dabei handelt es sich um eine Mischung aus 99% BSTFA (N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid) und 1% TMCS (Trimethylchlorsilan). In einem Vorversuch wurde die notwendige Menge ermittelt und anschließend Lösungsmittel, Reaktionszeit und Temperatur variiert.

Als Standard wurde eine Lösung aus Tridecansäure, Pentadecansäuremethylester und Heptadecansäure in Hexan verwendet (jeweils 10 mg/mL).

Bestimmung der notwendigen Menge an Silyl 991

1 mL Standard wurde in ein Pyrexröhrchen pipettiert und das Lösungsmittel vorsichtig im Stickstoffstrom entfernt. Anschließend wurde je nach Probe 100, 200 oder 300 µL Silyl 991 (Macherey-Nagel) hinzugefügt und die Proben im Trockenschrank 60 Minuten lang bei 80°C erhitzt (La Nasa et al., 2018). Die Proben wurden zuletzt mit Hexan auf ein Gesamtvolumen von 800 µL verdünnt und in ein Probefläschchen abgefüllt.

Tabelle 13: Probenliste Silylierungsvorversuch

Probe	1	2	3
Silyl 911 [μL]	100	200	300
Hexan [μL]	700	600	500

Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

1 mL Standard wurde in ein Pyrexröhrchen pipettiert und das Lösungsmittel mittels Einblasen von Stickstoff verdampft. Danach wurde 100 μL Silyl 991 (Macherey-Nagel) und je nach Probe 200 μL Pyridin dazupipettiert. Reaktionszeiten und -temperaturen sind für die jeweiligen Proben unterschiedlich und in Tabelle 14 ersichtlich. Abschließend erfolgte die Verdünnung der Proben mit Hexan auf ein Gesamtvolumen von 800 μL und deren Abfüllung in Probefläschchen.

Tabelle 14: Probenliste Silylierungsversuch

Probe	V(Pyridin) [μL]	T [°C]	t [min]	V(Hexan) [μL]
1	0	80	10	700
2	0	80	30	700
3	0	80	60	700
4	0	80	90	700
5	0	20	10	700
6	0	20	30	700
7	0	20	60	700
8	0	20	90	700
9	200	80	10	500
10	200	80	30	500
11	200	80	60	500
12	200	80	90	500
13	200	20	10	500
14	200	20	30	500
15	200	20	60	500
16	200	20	90	500

Die gaschromatographische Analyse sämtlicher Silylierungs-Proben erfolgte direkt nach der Probenvorbereitung unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 15: HP5-Analysemethode

Gerät	HRGC 5300
Säule	HP5
Injektionsvolumen	1 μ L
Starttemperatur/Haltezeit	100°C; 1 min
Rampe 1	20°C/min bis 170°C; 0 min
Rampe 2	3.5°C/min bis 250°C; 5 min
Trägergas	Wasserstoff
Druck	50 kPa (konstant)
Temperatur Inlet	250°C
Split	1:50
Detektor	FID
Temperatur Detektor	250°C

Methylierung von Milchfett mit anschließender Silylierung

Zuvor im Trockenschrank bei 60°C aufgeschmolzenes Butterschmalz (Milfina, MHD: 07.07.2017) wurde mit Hexan auf eine Konzentration von 40 mg/mL verdünnt. Davon wurden 0,5 mL in ein Pyrexröhrchen pipettiert und 0,5 mL Tridecansäure in Hexan (1 mg/mL) zugegeben. Die Methylierung erfolgte durch Zugabe von 50 μ L Natriummethanolat, danach wurde die Probe eine Minute lang geschüttelt, 10 Minuten stehen gelassen und die Methylierung mit 10 μ L Eisessig gestoppt. Anschließend wurde die obere Phase mittels Pasteurpipette abgezogen und in ein Pyrexröhrchen mit Na₂SO₄ überführt. In das zur Methylierung verwendete Pyrexröhrchen wurden 0,5 mL Hexan pipettiert, kurz geschüttelt und die obere Phase ebenfalls in das Pyrexröhrchen mit Na₂SO₄ überführt, welches zur Trocknung anschließend kurz geschüttelt wurde. Die flüssige Phase wurde in ein Probefläschchen überführt und anschließend 100 μ L Silyl 991 (Macherey-Nagel) zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Analyse der Proben mittels GC-MS unter den folgenden Bedingungen:

Tabelle 16: DB17HT-Analysemethode

Gerät	Trace-GC
Säule	J&W DB17HT
Injektionsvolumen	1 µL
Starttemperatur/Haltezeit	140°C; 3 min
Rampe 1	5°C/min bis 240°C; 10 min
Trägergas	Helium
Flussrate	1,5 mL/min
Temperatur Inlet	250°C
Split	1:50
Temperatur Übergangszone	250°C
Detektor	MS
Temperatur Ionenquelle	200°C
Mass Range	50-400
Scans pro Sekunde	4

9.4. Herstellung eines internen Standards

Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Ergebnisse musste ein neuer Standard für die Quantifizierung der gesuchten Minorfettsäuren gefunden werden. Dabei fiel die Wahl auf 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester, welcher einfach und billig aus 10-Undecensäure hergestellt werden kann, und bisher noch nicht in Lebensmittel gefunden wurde (Thurnhofer et al., 2008). Da bei den vorherigen Analysen von Milchfett dessen Precursor 10-Undecensäure ebenfalls nicht gefunden werden konnte, wurde 10-Undecansäuremethylester ebenfalls als Standard verwendet. Die Zugabe der Standards soll als Methylester erfolgen, wodurch eine vorherige Methylierung und Reinigung notwendig war. Des Weiteren soll ihr Anteil dem Anteil der gesuchten Minorfettsäuren in Milchfett entsprechen, welcher im Fall von Phytansäure bei rund 0,2% liegt, was bei 10 mg Milchfett 20 µg entspricht (Vetter & Schröder, 2010).

9.4.1. Synthese von 10,11-Dichloro-Undecansäure

Die Herstellung von 10,11-Dichloro-Undecansäure erfolgte nach einer Methode von Thurnhofer, et al. (2008) aus Undecensäure. Dabei wurden 100,5 mg Undecensäure in ein Becherglas eingewogen und in 2 mL Chloroform gelöst. Anschließend wurde, unter Rühren mittels Magnetrührer, 500 µL Sulfurylchlorid zugegeben und das Becherglas mit Aluminiumfolie bedeckt. Um eine starke Hitzeentwicklung während der Reaktion zu vermeiden erfolgte diese im Wasserbad. Nach einer Reaktionszeit von drei Stunden wurden 2 mL UHQ-Wasser zugegeben und die Lösung über Nacht weiter gerührt. Um das überschüssige Sulfurylchlorid zu entfernen, wurde die Lösung 4-mal mit jeweils 3 mL UHQ-Wasser gewaschen, das Lösungsmittel danach im Rotationsverdampfer abgedampft und der Rückstand in 1 mL Hexan gelöst

9.4.2. Methylierung von 10,11-Dichloro-Undecansäure

Die zuvor synthetisierte 10,11-Dichloro-Undecansäure wurde in einem Pyrexröhrchen mit 2 mL Hexan verdünnt und danach 6 mL 5% HCl/Methanol zugegeben. Anschließend wurde die Luft mit durch Begasen mit Stickstoff verdrängt und das Röhrchen fest zugeschraubt. Die Transmethylierung erfolgte im Wasserbad bei 65°C und dauerte 2 Stunden. Da freie Fettsäuren wesentlich schneller methyliert werden als Triglyceride, wurde anstelle von Toluol Hexan als Lösungsmittel verwendet, wobei die Probe aufgrund

der raschen Phasentrennung alle 15 Minuten geschüttelt wurde (Tserng et al., 1981). Nach 2 Stunden wurde die Probe aus dem Wasserbad genommen, in ein Becherglas überführt und mit 10 mL Kaliumcarbonat-Lösung (6%) neutralisiert. Danach wurde die Probe in 2 Pyrexröhrchen überführt, bei 1100 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgezogen und mit einer Spatelspitze Natriumsulfat getrocknet.

9.4.3. Reinigung von 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester

Vorversuch:

Eine Pasteurpipette wurde mit Watte verschlossen und mit 0,7430 g Silica-Gel befüllt. Anschließend wurde diese bei 120°C für eine Stunde in den Trockenschrank gestellt und danach im Exsikkator abkühlen gelassen. Nach einer Konditionierung mit Hexan wurde rund ein Zehntel des zuvor hergestellten 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylesters aufgetragen und mit 10 mL Hexan/Diethylether (95:5) eluiert. Vom Eluat wurden insgesamt sechs Fraktionen zu je 2 mL gesammelt.

Hauptversuch:

Eine Chromatographiesäule wurde mit 7,430 g Silica-Gel befüllt und diese anschließend bei 120°C für eine Stunde in den Trockenschrank gestellt. Danach wurde die Säule aus dem Trockenschrank genommen und zum Abkühlen in einen Exsikkator gestellt. Die Säule wurde mit Hexan konditioniert und danach die Probe aufgetragen. Als Laufmittel diente ebenfalls Hexan/Diethylether (95:5). Die insgesamt 90 mL Laufmittel wurden auf sieben Fraktionen aufgeteilt gesammelt und das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer abgedampft. Zum Schluss wurde jeweils 1 mL Hexan zu den einzelnen Fraktionen zugegeben.

Jede einzelne Fraktion des Vor- und Hauptversuches wurde gaschromatographisch unter den folgenden Bedingungen analysiert:

Tabelle 17: SP2560-Analysemethode 1

Gerät	Trace-GC
Säule	SP2560
Injektionsvolumen	1 µL
Starttemperatur/Haltezeit	100°C; 1 min
Rampe 1	5°C/min bis 240°C; 5 min
Trägergas	Wasserstoff
Flussrate	2 mL/min
Temperatur Inlet	250°C
Split	1:50
Detektor	FID
Temperatur Detektor	250°C

9.4.4. Methylierung von Undecensäure

99,3 mg Undecensäure wurden in einem Pyrexröhrchen mit 4 mL Hexan gelöst und zur Transmethylierung 6 mL 5% HCl in Methanol zugegeben. Durch Begasen mit N₂ wurde die Luft aus dem Röhrchen verdrängt und dieses anschließend für 2 Stunden in ein 65°C heißes Wasserbad gestellt, wobei die Probe alle 15 Minuten geschüttelt wurde. Der Inhalt des Röhrchens wurde in ein Becherglas überführt, mit 10 mL K₂CO₃ (6%) neutralisiert und auf 2 Pyrexröhrchen aufgeteilt. Danach erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 1100 rpm für 5 Minuten und der mittels Pasteurpipette gesammelte Überstand wurde mit einer Spatel Na₂SO₄ getrocknet.

9.4.5. Reinigung von Undecensäure

7,4911 g Silica-Gel wurden in eine Chromatographiesäule eingewogen, welche danach bei 120°C für eine Stunde in den Trockenschrank gestellt wurde. Die Säule wurde anschließend zum Abkühlen in den Exsikkator gestellt und darauffolgend mit Hexan konditioniert. Nach dem Probenauftrag des zuvor hergestellten Undecensäuremethylesters wurde dieser mit 100 mL Hexan/Diethylether (95:5) aus der Säule eluiert und das Eluat, auf 7 Fraktionen aufgeteilt, in Spitzkolben gesammelt. Das Lösungsmittel wurde mittels

Rotationsverdampfer aus den Proben entfernt, die einzelnen Fraktionen mit jeweils 1 mL Hexan verdünnt und unter folgenden Bedingungen gaschromatographisch analysiert:

Tabelle 18: HP-FFAP-Analysemethode 2

Gerät	Focus-GC
Säule	HP-FFAP
Injektionsvolumen	1 µL
Starttemperatur/Haltezeit	100°C; 1 min
Rampe 1	15°C/min bis 170°C; 0 min
Rampe 2	5°C/min bis 240°C; 5 min
Trägergas	Wasserstoff
Flussrate	2 mL/min
Temperatur Inlet	250°C
Split	1:100
Detektor	FID
Temperatur Detektor	250°C

9.4.6. Herstellung des internen Standards

Gravimetrische- und gaschromatographische Analyse von 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester

Die Inhalte der Fraktionen 3 aus dem Vorversuch, sowie 4 und 5 aus dem Hauptversuch wurden in einen tarierten Spitzkolben überführt und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgedampft. Anschließend wurde der Kolben in einen Exsikkator gestellt und mittels Wasserstrahlpumpe ein Unterdruck angelegt. Nach zwei Tagen wurde der Kolben ausgewogen und der lösungsmittelfreie 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester (9 mg) auf ein Gesamtvolumen von 50 mL in einem Messkolben mit Hexan verdünnt, was einer Konzentration von 0,18 mg/mL entspricht. Von einem Milliliter dieser Lösung wurde ein Teil des Lösungsmittels im Stickstoffstrom ausgetrieben und die Probe anschließend mittels folgendem Programm gaschromatographisch analysiert:

Tabelle 19: SP2560-Analysemethode 2

Gerät	Trace-GC
Säule	SP2560
Injektionsvolumen	1 µL
Starttemperatur/Haltezeit	100°C; 1 min
Rampe 1	5°C/min bis 240°C; 5 min
Trägergas	Wasserstoff
Flussrate	2 mL/min
Temperatur Inlet	250°C
Split	1:10
Detektor	FID
Temperatur Detektor	250°C

Gravimetrische Analyse & Verdünnung von Undecensäuremethylester

Die Fraktionen 3, 4, 5 und 6 wurden in einem tarierten Spitzkolben gesammelt und das Lösungsmittel danach mittels Rotationsverdampfer entfernt. Der Kolben wurde in einen Exsikkator gestellt und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe ein Unterdruck angelegt. Nach 4 Tagen wurde der Kolben aus dem Exsikkator genommen und ausgewogen. Der lösungsmittelfreie Undecensäuremethylester (55,4 mg) wurde in einem Messkolben mit Hexan auf ein Gesamtvolumen von 200 mL verdünnt, um eine Konzentration von 0,277 mg/mL zu erhalten.

Herstellung und Konzentrationsbestimmung des internen Standards

Um dem Anteil der gesuchten Minorfettsäuren bei Verwendung von 10 mg Milchfett zu entsprechen, soll von jedem der beiden Standards 100 µL vor der Methylierung der Probe zugegeben werden. Zur einfacheren Handhabung wurden die Standards zusammenpipettiert und die genauen Konzentrationen durch Messung mittels internem Standard ermittelt.

Jeweils 25 mL Undecensäuremethylester und 10,11-Dichloro-Undecensäuremethylester wurden in ein Schraubfläschen pipettiert und dieses fest verschlossen. Zu 1 mL dieses Standards wurden 0,1 mL Heptadecensäuremethylester-Standard (1,01 mg/mL) zugegeben und die Lösung unter folgenden Bedingungen gaschromatographisch analysiert:

Tabelle 20: SP2560-Analysemethode 3

Gerät	Trace-GC
Säule	SP2560
Injektionsvolumen	1 μ L
Starttemperatur/Haltezeit	60°C; 1 min
Rampe 1	15°C/min bis 150°C; 0 min
Rampe 2	2,5°C/min bis 230°C; 20 min
Trägergas	Wasserstoff
Flussrate	1,5 mL/min
Temperatur Inlet	250°C
Split	1:50
Detektor	FID
Temperatur Detektor	250°C

9.5. Herstellung des Kalibrationsstandards

9.5.1. Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation

Mittels Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation ist es möglich, gesättigte Fettsäuremethylester aus einer Probe zum Großteil zu entfernen und somit mehrfach ungesättigte- und verzweigte Fettsäuremethylester anzureichern (Christie, 2003). Wenn Harnstoff in Gegenwart aliphatischer Komponenten, wie gesättigter Fettsäuremethylester, kristallisiert, bildet dieser Kristalle mit Kanälen, in welchen aliphatische Fettsäuremethylester eingeschlossen werden (Christie, 2003). Die Bildung solcher Einschlusskomplexe erfolgt bei ungesättigten- und verzweigten Fettsäuren, je nach Anzahl der Doppelbindungen deutlich schlechter, wodurch sich deren Anteil in der Lösung stark erhöht (Christie, 2003). Der Ansatz erfolgte nach einer Schnellmethode nach Christie (2003), wobei aufgrund der größeren Probenmenge ein Upscaling erfolgte.

Vorversuch:

106,6 mg zuvor im Trockenschrank (60°C) geschmolzenes Butterschmalz (Milfina, MHD: 07.07.2017) wurden mittels Pasteurpipette in ein Pyrexröhrchen eingewogen und in 2 mL Hexan gelöst. Anschließend wurden zur Transmethylierung 2 mL Natriummethanolat (2N) in das Röhrchen pipettiert und dieses für 1 Minuten lang geschüttelt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 1100 rpm für 2 Minuten und die obere Phase wurde zur Trocknung in

ein Pyrexröhrchen überführt, mit einer Spatelspitze Na_2SO_4 getrocknet und der Überstand auf ein Gesamtvolumen von 4 mL mit Hexan verdünnt.

1,52 g Harnstoff wurden mit 15 Tropfen Methanol angefeuchtet und anschließend die aus Butterschmalz hergestellten Fettsäuremethylester zugegeben. Die Lösung wurde zur Kristallbildung über Nacht stehen gelassen. Um den Harnstoff zu entfernen, wurde die Flüssigkeit abfiltriert und der kristallisierte Harnstoff gründlich mit Hexan gewaschen, welches zum Filtrat zugegeben wurde. Das Filtrat wurde mit UHQ-Wasser gewaschen und die obere Phase abgezogen, mit Na_2SO_4 getrocknet und in einen Spitzkolben überführt. Das Lösungsmittel wurde mittels Rotationsverdampfer bei 40°C und 400 mbar entfernt, wobei danach der Druck weiter auf 60 mbar erniedrigt wurde um Spuren von Wasser abzudestillieren. Zuletzt wurde die Probe mit 1 mL Hexan verdünnt und unter folgenden Bedingungen mittels GC-MS analysiert:

Tabelle 21: BPX70-Analysemethode 1

Gerät	Trace-GC
Säule	BPX70
Injektionsvolumen	1 μL
Starttemperatur/Haltezeit	100°C; 1 min
Rampe 1	15°C/min bis 160°C; 0 min
Rampe 2	2°C/min bis 174°C; 0 min
Rampe 3	10°C/min bis 240°C; 12 min
Trägergas	Helium
Flussrate	1 mL/min
Temperatur Inlet	250°C
Split	Splitless
Temperatur Übergangszone	250°C
Detektor	MS
Temperatur Ionenquelle	200°C
Mass Range	50-400
Scans pro Sekunde	4

Upscaling

In 4 Pyrexröhrchen wurden jeweils 250 mg flüssiges Butterschmalz (Milfina, MHD: 07.07.2017) eingewogen und in jedes Röhrchen 5 mL Hexan und 5 mL Natriummethanolat (2N) pipettiert. Anschließend wurden die Proben 1 Minuten lang geschüttelt und in einer Gerber-Zentrifuge bei 1100 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Die oberen Phasen wurden mit einer Spatelspitze Na_2SO_4 getrocknet und in einem Schraubfläschchen gesammelt.

15 g Harnstoff wurden mit 150 Tropfen Methanol angefeuchtet und in das Schraubfläschchen mit der FAME-Lösung überführt. Die Lösung wurde über Nacht stehengelassen, anschließend filtriert und der zurückbleibende Harnstoff mit Hexan gewaschen. Das zum Waschen verwendete Hexan wurde zum Filtrat zugegeben und das Filtrat mit UHQ-Wasser gewaschen. Danach wurde die obere Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und in einen tarierten Spitzkolben überführt. Das Lösungsmittel wurde mittels Rotationsverdampfer bei 400 mbar und 40°C abdestilliert und der Druck anschließend auf 60 mbar gesenkt, um Spuren von Wasser zu entfernen. Der Spitzkolben wurde zur Berechnung der ungefähren Konzentration ausgewogen und die darin enthaltenen Fettsäuremethylester mit 15 mL Hexan verdünnt.

9.5.2. Identifikation von Pristan- und Phytansäure

Die Identifikation von Pristan- und Phytansäure bei der Analyse mittels GC-FID, erfolgte durch Vergleich der Elutionsreihenfolge mit der GC-MS-Messung. Da in beiden Trace-GC-Geräten Säulen ähnlich hoher Polarität eingebaut waren (BPX70 & SP2560), traten keine großen Schwankungen bei der Elutionsreihenfolge der einzelnen Fettsäuremethylester auf, wodurch ein Vergleich der Chromatogramme möglich war.

Die Analyse der Fettsäuremethylester erfolgte mittels folgenden Programmen:

Tabelle 22: BPX70-Analysemethode 2

Gerät	Trace-GC
Säule	BPX70
Injektionsvolumen	1 µL
Starttemperatur/Haltezeit	50°C; 1 min
Rampe 1	20°C/min bis 170°C; 0 min
Rampe 2	2°C/min bis 225°C; 7 min
Trägergas	Helium
Flussrate	1 mL/min
Temperatur Inlet	250°C
Split	1:50
Temperatur Übergangszone	250°C
Detektor	MS
Temperatur Ionenquelle	200°C
Mass Range	50-400
Scans pro Sekunde	3

Tabelle 23: SP2560-Analysemethode 4

Gerät	Trace-GC
Säule	SP2560
Injektionsvolumen	1 µL
Starttemperatur/Haltezeit	60°C; 1 min
Rampe 1	15°C/min bis 150°C; 0 min
Rampe 2	2,5°C/min bis 230°C; 20 min
Trägergas	Wasserstoff
Flussrate	1,5 mL/min
Temperatur Inlet	250°C
Split	1:50
Detektor	FID
Temperatur Detektor	250°C

9.5.3. Bestimmung der Konzentration von Pristan- und Phytansäuremethylester

Zur Messung der Konzentration an Pristan- und Phytansäuremethylester wurden 0,9 mL der zuvor hergestellten FAME-Lösung 0,1 mL Heptadecansäuremethylester in Hexan (1,01 mg/mL) als interner Standard zugegeben und die Probe unter denselben Bedingungen wie zuvor (Tabelle 23), mittels GC-FID analysiert. Da durch die Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation der größte Teil der gesättigten Fettsäuren entfernt wurde und nach der Zugabe von Dihydrosterculiasäuremethylester die Konzentration erneut gemessen wurde, konnte der geringe Gehalt von Heptadecansäuremethylester nach der Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation vernachlässigt werden.

9.5.4. Herstellung des Kalibrationsstandards

0,5 mL Dihydrosterculiasäuremethylester in Methanol (10 mg/mL) wurden in einen Spitzkolben überführt und das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer bei 40°C und 300 mbar Unterdruck entfernt. Der Rückstand wurde mit 1,25 mL Hexan verdünnt und davon 0,1 mL zur mittels Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation aufgereinigten FAME-Lösung zugegeben, um den Kalibrationsstandard herzustellen.

Zur Konzentrationsbestimmung der Komponenten wurden zu 1 mL Kalibrationsstandard 0,1 mL Heptadecansäuremethylester-Standard (1,01 mg/mL) hinzugefügt und mittels dem in Tabelle 23 angeführten Programm analysiert.

Des Weiteren erfolgte eine zweite Analyse unter Verwendung desselben Programmes, wobei dem Standard kein Heptadecansäuremethylester zugegeben wurde. Dies diente der Ermittlung eines Korrekturfaktors für Heptadecansäuremethylester, um ein genaueres Analysenergebnis zu erhalten. Dabei wurde das Verhältnis zwischen Pristansäuremethylester und Heptadecansäuremethylester im Kalibrationsstandard berechnet und zur Korrektur der Fläche von Heptadecansäuremethylester bei der vorherigen Analyse verwendet.

9.6. Auswahl der Massenfragmente für die Quantifizierung

9.6.1. Standards

10-Undecensäure

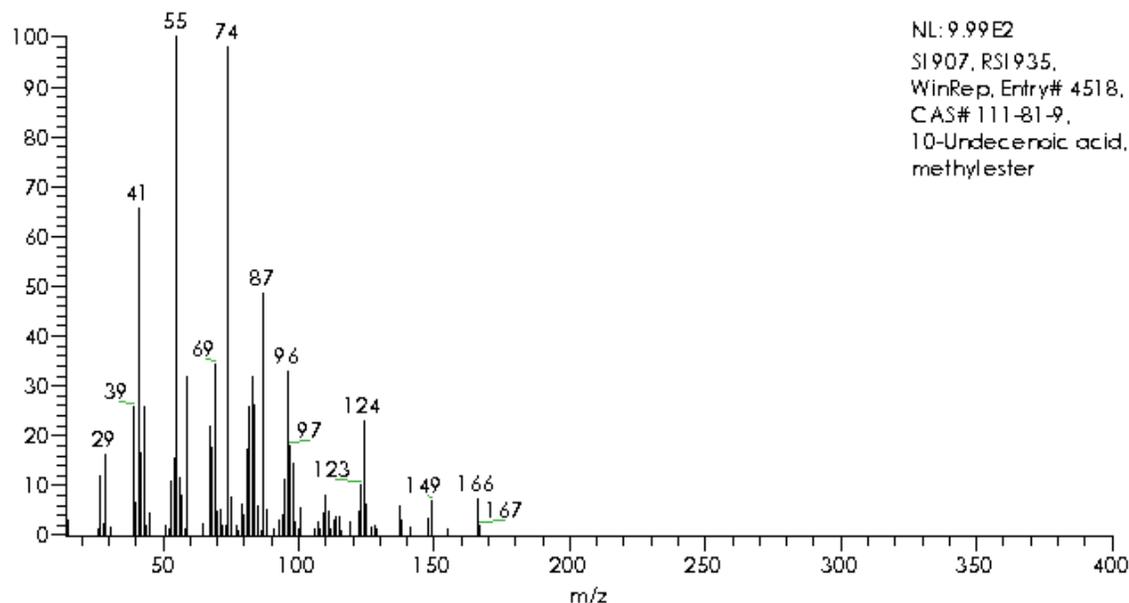


Abbildung 3: Massenspektrum von 10-Undecensäuremethylester

Abbildung aus WinRep-Spektrenbibliothek

Die für Methylester ungesättigter Fettsäuren typischen Fragmentecluster sind im Massenspektrum von 10-Undecensäuremethylester deutlich zu erkennen. Grund dafür ist, dass Doppelbindungen Ladungen aufnehmen können und damit die Kohlenstoffkette entlangwandern, wodurch eine Vielzahl verschiedener Massenfragmente entsteht (Christie, 2020a). Da das Massenfragment mit dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis von 124 relativ isoliert vorliegt und die Intensität des Signals ausreichend groß ist, wurde dieses zur Quantifizierung von 10-Undecensäuremethylester herangezogen.

10,11-Dichloro-Undecansäure

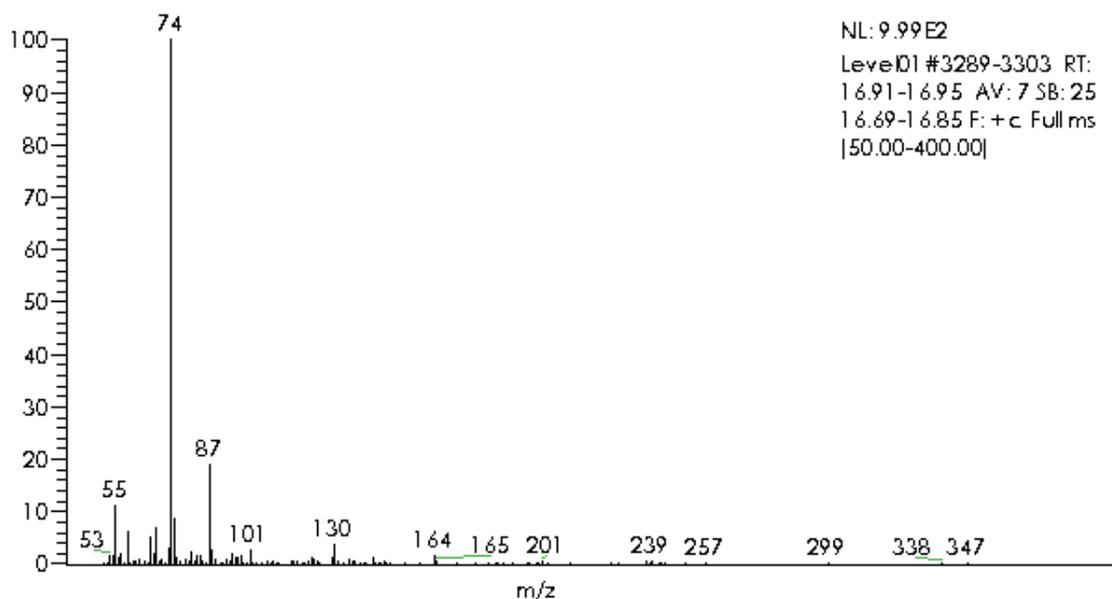


Abbildung 4: Massenspektrum von 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester

10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester war nicht in der Datenbank vorhanden, weswegen das Massenspektrum in Abbildung 4 aus den eigenen Analyseergebnissen stammt. Die Chlorierung ist lediglich an den durch α -Spaltung des Moleküls entstanden Fragmenten mit m/z 237 und 239 erkennbar, wobei aufgrund der Chlorisotope ^{35}Cl und ^{37}Cl zwei Peaks vorliegen (Thurnhofer et al., 2008). Da im Massenspektrum keine spezifischen Massenfragmente mit hoher Intensität vorkommen, wurde analog zu Thurnhofer et al. (2008) das Massenfragment mit m/z 87 zur Quantifizierung ausgewählt.

9.6.2. Analyten

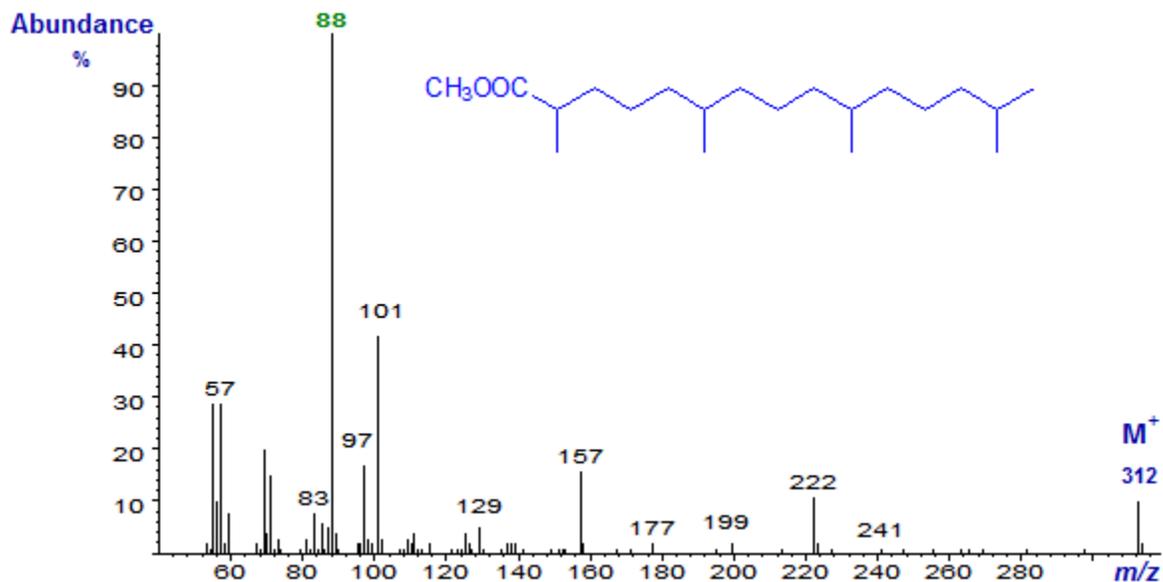
Pristansäure

Abbildung 5: Massenspektrum von Pristansäuremethylester

Abbildung aus Christie (2020b)

Durch die Methylverzweigung am 2. Kohlenstoffatom von Pristansäure ändert sich die Masse des für Methylester typischen McLafferty-Ions von m/z 74 auf m/z 88 (Vetter & Schröder, 2010). Da dieses Massenfragment der höchsten Intensität vorliegt und Auskunft über die 2-Methyl-Struktur von Pristansäure gibt, wurde m/z 88 für die Quantifizierung von Pristansäure verwendet.

Phytansäure

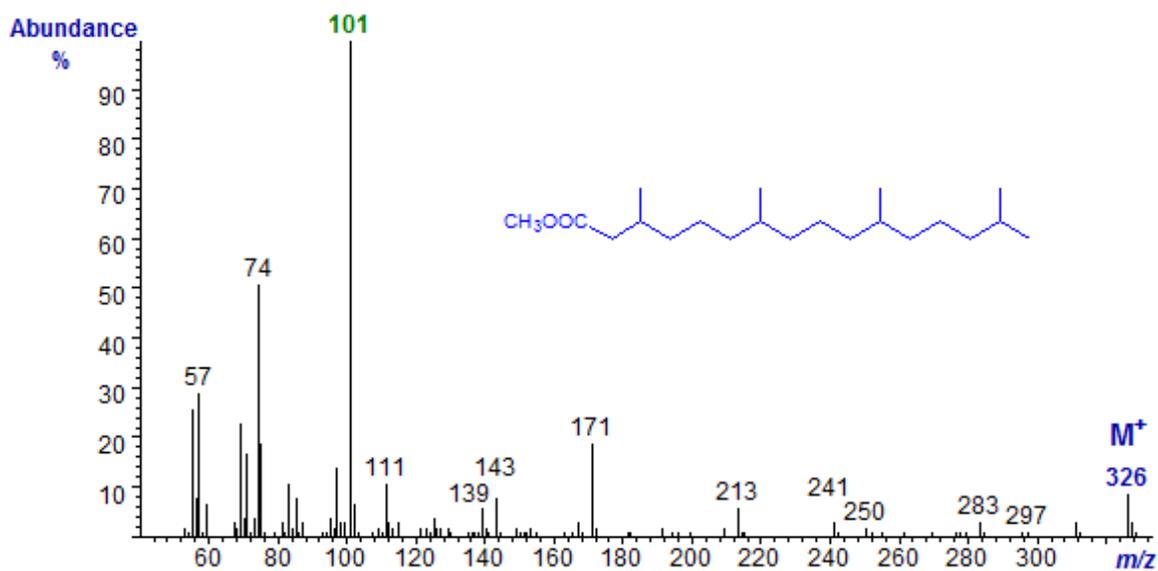


Abbildung 6: Massenspektrum von Phytansäuremethylester

Abbildung aus Christie (2020b)

Bei Phytansäuremethylester befindet sich der größte Peak bei m/z 101, weswegen dieser für die Quantifizierung mittels Single-Ion-Monitoring verwendet wurde. Dieses Massenfragment entsteht durch γ -Spaltung bei der Ionisierung, wobei sich jedoch aufgrund der Methylgruppe am 3. Kohlenstoffatom die Masse von m/z 87 auf m/z 101 ändert (Vetter & Schröder, 2010).

Die charakteristischen Massenfragmente für Pristan und Phytansäure sind zur Veranschaulichung in folgender Abbildung dargestellt:

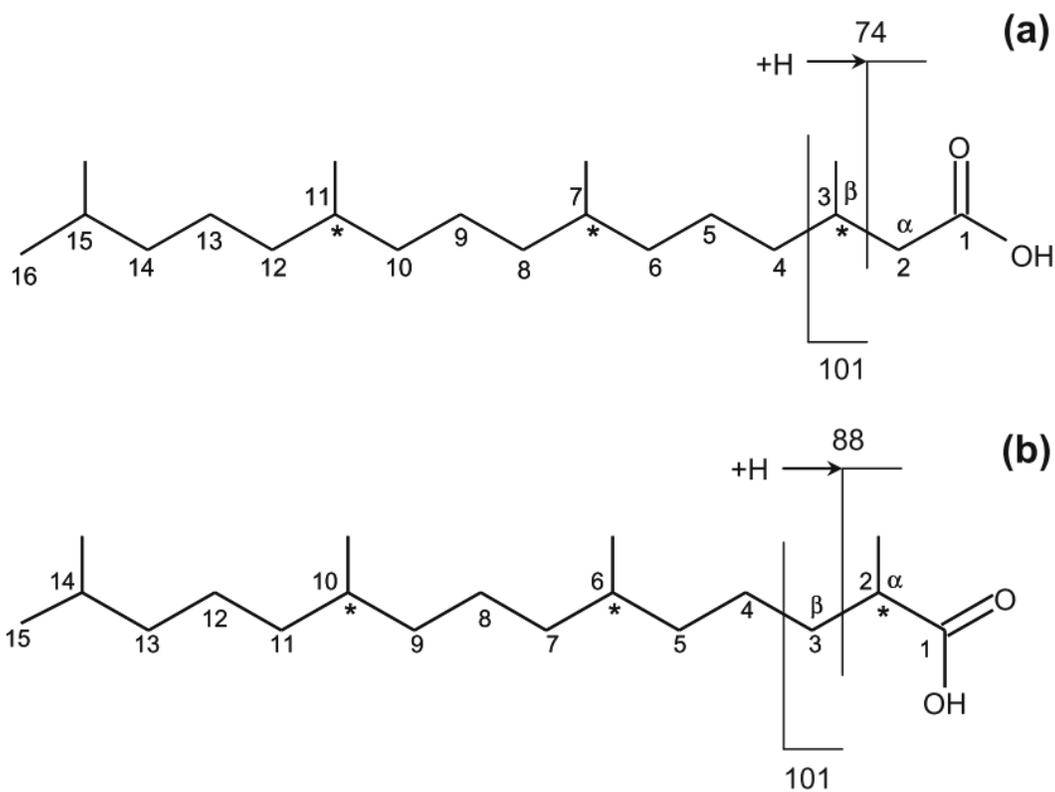


Abbildung 7: Charakteristische Ionenfragmente für Phytan- (a) und Pristansäuremethylester (b)

Abbildung aus Vetter & Schröder (2010)

Dihydrosterculiasäure

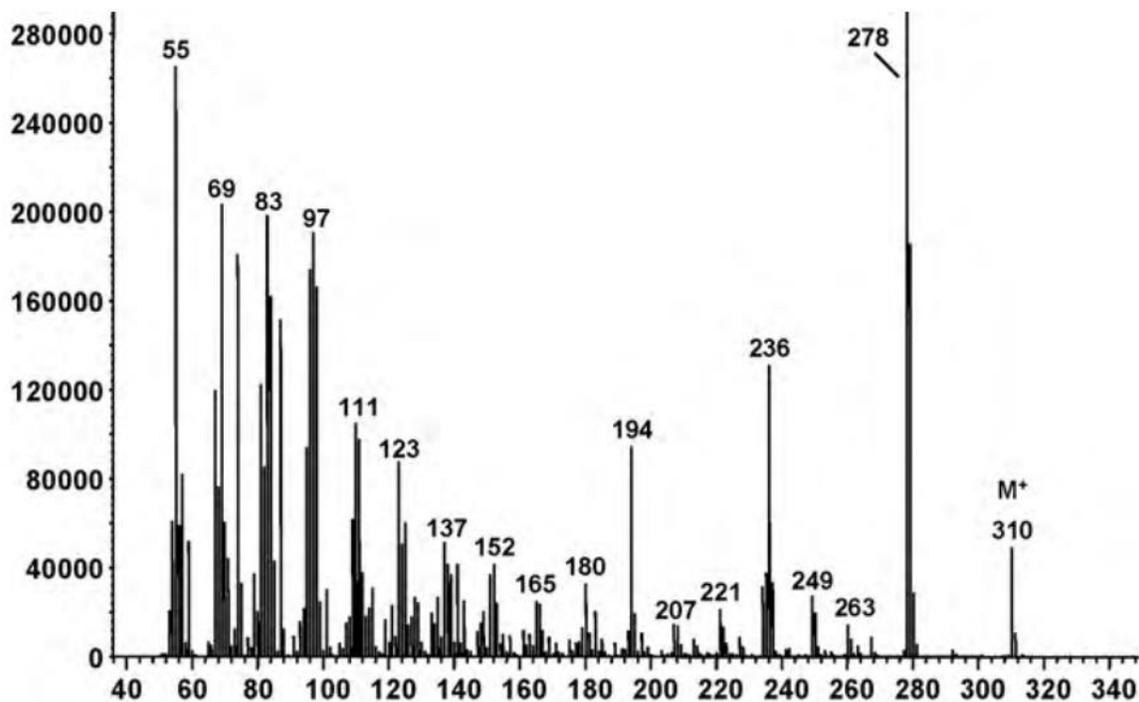


Abbildung 8: Massenspektrum von Dihydrosterculiasäuremethylester

Abbildung aus Berdeaux et al. (2010)

Im Fall von Dihydrosterculiasäure wurde das Massenfragment mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis 278 zur Quantifizierung verwendet. Dies entspricht der Molekülmasse von Dihydrosterculiasäuremethylester abzüglich von Methanol (Berdeaux et al., 2010). Durch die Ionisierung im Massenspektrometer werden C18-Cyclopropanfettsäuremethylester in die korrespondierenden Nonadecensäuremethylester umgewandelt, weswegen sich deren Spektren nicht voneinander unterscheiden (Christie & Holman, 1966). Zur Unterscheidung ist es somit notwendig, die verschiedenen Retentionszeiten dieser Komponenten zu berücksichtigen.

9.7. Entwicklung der Analysemethode

Die Entwicklung der Analysemethode erfolgte in zwei Schritten. Als Erstes wurde ein geeignetes Temperaturprogramm entwickelt, bei dem die gesuchten Minorfettsäuren, unter möglichst geringem Zeitaufwand, vollständig von anderen Milchfettbestandteilen getrennt werden können. Anschließend wurden in die Methode Zeitsegmente eingefügt, wo neben dem Gesamtspektrum (m/z 50-400) die ausgewählten Massenfragmente für die jeweilige Minorfettsäure gescannt wurden. Als Probe diente Butterschmalz (Milfina, MHD: 07.07.2017). Zu 13,6 mg Butterschmalz wurden dabei 1 mL Hexan und 200 µL interner Standard zugegeben. Die Methylierung der Probe erfolgte nach der Methode „Ulbert et al. (1999) + CH₃COOH“ (Seite 28).

Als Grundlage diente folgende Milchmethode, welche im weiteren Verlauf der Arbeit modifiziert wurde:

Tabelle 24: BPX70-Analysemethode 3

Gerät	Trace-GC
Säule	BPX70
Injektionsvolumen	1 µL
Starttemperatur/Haltezeit	50°C; 1 min
Rampe 1	20°C/min bis 170°C; 0 min
Rampe 2	2°C/min bis 225°C; 7 min
Trägergas	Helium
Flussrate	1 mL/min
Temperatur Inlet	250°C
Split	1:100
Temperatur Übergangszone	250°C
Detektor	MS
Temperatur Ionenquelle	200°C
Mass Range	50-400
Scans pro Sekunde	3

Folgende Methoden wurden dabei getestet, wobei nur die im Vergleich zur Originalmethode veränderten Parameter angeführt sind:

Tabelle 25: BPX70-Methodenentwicklung

	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Methode 4
Starttemperatur; Haltezeit	100°C; 1 min	100°C; 1 min	100°C; 1 min	100°C; 1 min
Rampe 1	20°C/min bis 170°C; 0 min	15°C/min bis 160°C; 0 min	15°C/min bis 160°C; 0 min	15°C/min bis 160°C; 0 min
Rampe 2	2°C/min bis 194°C; 0 min	2°C/min bis 180°C; 0 min	2°C/min bis 174°C; 0 min	2°C/min bis 174°C; 0 min
Rampe 3	10°C/min bis 225°C; 10 min	10°C/min bis 225°C; 10 min	10°C/min bis 225°C; 10 min	10°C/min bis 240°C; 12 min
Split	1:100	1:50	1:50	1:50
Scans pro Sekunde	4	4	4	4

Anhand der Retentionszeiten der gesuchten Fettsäuremethylester wurden in Methode 4 Segmente eingefügt, bei denen neben dem Gesamtspektrum (m/z 50-400) die ausgewählten Massenfragmente mittels Single-Ion-Monitoring gemessen wurden, was in Tabelle 26 ersichtlich ist.

Tabelle 26: Einstellungen Massenspektrometer

Laufzeit [min]	m/z	Komponenten
4 - 30,6	50-400	Gesamtspektrum
5,9 - 6,5	124	10-Undecensäure-ME
9,6 - 10,3	88	Pristansäure-ME
11,4 - 12,1	101	Phytansäure-ME
14,8 - 15,4	278	Dihydrosterculiasäure-ME
16,6 - 17,2	87	10,11-Dichloro-Undecensäure-ME

9.8. Kalibration der Analysemethode

Kalibration der Methode erfolgte durch Messung von 6 unterschiedlichen Verdünnungen des Kalibrationsstandards, wobei immer dieselbe Menge an C₁₁:1-ME und Cl₂C₁₁-ME zugegeben wurde. Dabei wurden einem Milliliter der mit Hexan hergestellten Verdünnung des Kalibrationsstandard 0,2 mL interner Standard zugefügt und die Probe dann mit der entwickelten Analysemethode (Methode 4 + eingefügte Segmente) analysiert.

Folgende Proben wurden hergestellt, wobei sich die Konzentrationen der Komponenten immer auf das Probenvolumen von 1,2 mL beziehen:

Tabelle 27: Verdünnungsstufen & Konzentrationen für Methodenkalibration

Verdünnung	c [$\mu\text{g/mL}$]				
	PrA-ME	PhA-ME	DHSA-ME	C11:1-ME	Cl ₂ C11-ME
1:200	0,090	0,419	0,103	20,802	8,511
1:50	0,361	1,675	0,412	20,802	8,511
1:10	1,804	8,377	2,062	20,802	8,511
1:5	3,607	16,753	4,125	20,802	8,511
1:2	9,018	41,883	10,312	20,802	8,511
1:1	18,036	83,765	20,624	20,802	8,511

Für die Quantifizierung von Pristansäure wurde 10-Undecensäuremethylester als Standard verwendet, während für Phytansäure und Dihydrosterculiasäure 10,11-Dichloro-Undecensäuremethylester als Referenz diente.

Folgende Parameter wurden im Zuge der Kalibration für die Identifikation und Flächenbestimmung der Peaks angewandt:

Tabelle 28: Parameter für Peakidentifikation und Flächenbestimmung

	Undecensäure -ME	Pristansäure -ME	Phytansäure -ME	DHSA- ME	Cl ₂ C11:0 -ME
tR expected [min]	6,19	9,94	11,73	15,10	16,93
Window [s]	20	20	20	20	30
Smoothing points	5	5	5	5	3
Baseline window	20	40	40	50	50
Area noise factor	18	5	20	9	5
Peak noise factor	20	10	10	30	30
Peak height %	/	/	/	2	3
Tailing factor	/	/	/	1	3
Minimum peak height (S/N)	3	10	10	10	3

9.9. Probenvorbereitung

9.9.1. Fettextraktion von Milch nach adaptierter Röse-Gottlieb-Methode

Die Fettextraktion nach Röse-Gottlieb (AOAC Official Method 905.02) dient zur quantitativen Extraktion von Fett aus Milchproben. Da keine quantitative Bestimmung notwendig war, sondern lediglich das Fettsäuremuster analysiert wurde, beschränkte sich die Fettextraktion auf einen Extraktionsvorgang. Des Weiteren wurde Methanol an Stelle von Ethanol verwendet.

10 mL einer gut durchmischten Milchprobe wurden in einen Mojonnier-Kolben pipettiert und mit 2 mL NH_3 -Lösung (25%) vermischt. Anschließend wurden 10 mL Methanol zugesetzt und die Probe geschüttelt. Danach erfolgte die Zugabe von 25 mL Diethylether und die Probe wurde zur Extraktion ausgeschüttelt. Nach Zugabe von 25 mL Petroleumbenzin erfolgte ein weiterer Extraktionsvorgang durch starkes Schütteln. Danach wurde die Probe bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und die obere Phase in einen Spitzkolben überführt. Das Abdestillieren des Lösungsmittels erfolgte mittels Rotationsverdampfer bei 40°C und 400 mbar, wobei anschließend der Druck weiter bis auf 60 mbar verringert wurde, um Spuren von Wasser zu entfernen. Vom verbleibenden Fettextrakt wurden rund 100 mg mittels Pasteurpipette in einen tarierten 10 mL-Messkolben überführt, die genaue Einwaage notiert und dieser mit Hexan bis zur Marke aufgefüllt.

9.9.2. Fettextraktion von Käse

Die Proben wurden, falls notwendig mittels Käsereibe zerkleinert und jeweils 5-10 g in eine Petrischale eingewogen. Anschließend wurden die Proben im Gefrierschrank eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet.

Die Fettextraktion erfolgte gemäß Herstellerangaben des verwendeten Lösungsmittlextraktors. Dazu wurden die trockenen Proben in fettfreie Extraktionshülsen überführt und diese mit Watte verschlossen. In Extraktionsgläser wurden 70 mL Petroleumbenzin pipettiert und diese auf der Heizplatte platziert. Die Extraktionshülsen wurden anschließend mittels Magnetring, welcher auf die Hülsen gesteckt wurde, in der Apparatur eingespannt, die Zuleitung für das Kühlwasser aufgedreht und die Heizplatte auf eine Temperatur von 110°C eingestellt und eingeschalten. Um die Extraktionshülsen in das

Lösungsmittel einzutauchen wurde der Hebel auf „Immersion“ gestellt und die Proben für 60 Minuten im kochenden Lösungsmittel belassen. Dabei war auf den Füllstand des Lösungsmittels zu achten, um etwaige Undichtheiten auszuschließen. Danach wurde der Hebel auf „Washing“ gestellt, wodurch die Extraktionshülsen aus dem Lösungsmittel gehoben und nur mehr mit kondensierendem Lösungsmittel gewaschen wurden. Nach 60 Minuten wurde die Heizplatte ausgeschaltet und die Proben abkühlen gelassen.

Das Lösungsmittel wurde anschließend in einen Spitzkolben überführt und mittels Rotationsverdampfer bei 40°C und 400 mbar abdestilliert, wobei nach Entfernen des Lösungsmittels der Druck auf 60 mbar abgesenkt wurde um Spuren von Wasser zu entfernen. Mittels Pasteurpipette wurden rund 250 mg Fettextrakt in einen tarierten 25 mL-Messkolben überführt, das genaue Gewicht notiert und dieser mit Hexan aufgefüllt.

9.9.3. Methylierung von Milchfett

1 mL der nach der Fettextraktion hergestellten Verdünnungen wurden in ein Pyrexröhrchen pipettiert und anschließend 200 μL des internen Standards zugesetzt. Die Methylierung erfolgte durch Zugabe von 50 μL Na-Methanolat (2N), wonach die Probe eine Minute geschüttelt wurde. Nach einer Standzeit von 5 Minuten wurde die Reaktion mit 10 μL Eisessig gestoppt. Die obere Phase wurde zur Trocknung in ein Pyrexröhrchen mit Na_2SO_4 überführt, ausgeschüttelt und danach in ein Probefläschchen abgefüllt.

Insgesamt ergibt sich für die Aufbereitung der Proben folgendes Schema:

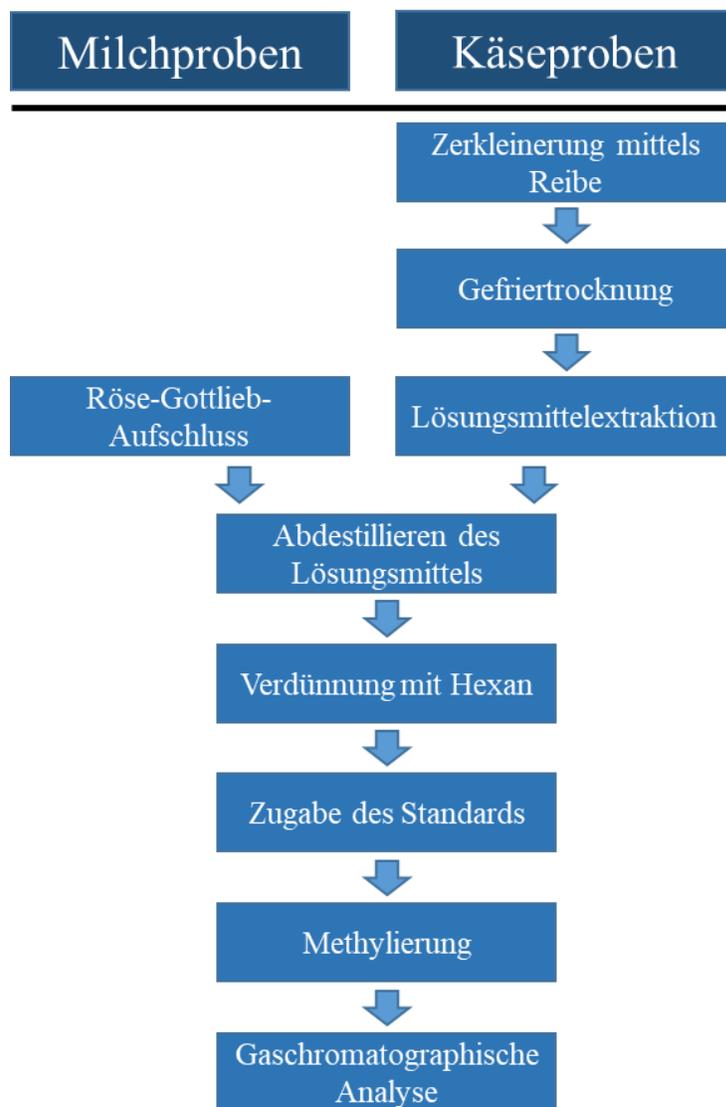


Abbildung 9: Probenaufarbeitungsschema

9.10. Gaschromatographische Analyse

Die Bestimmung von Pristan-, Phytan- und Dihydrosterculiasäure erfolgte mittels der zuvor entwickelten GC-MS-Analysemethode.

Um festzustellen, ob sich Heumilch von konventioneller Milch anhand des Anteils anderer Fettsäuren unterscheidet, wurde das Fettsäuremuster der Proben bestimmt. Dazu wurden die Proben mittels GC-FID unter den folgenden Bedingungen analysiert:

Tabelle 29: GC-FID-Methode für die Minorfettsäureanalyse

Gerät	Trace-GC
Säule	SP2560
Injektionsvolumen	1 µL
Starttemperatur/Haltezeit	60°C; 1 min
Rampe 1	15°C/min bis 150°C; 0 min
Rampe 2	2,5°C/min bis 230°C; 20 min
Trägergas	Wasserstoff
Flussrate	1,5 mL/min
Temperatur Inlet	250°C
Split	1:50
Detektor	FID
Temperatur Detektor	250°C

Die Identifikation der Fettsäuren in der Probe erfolgte durch Vergleich mit 37 Komponenten FAME-Mix (Supelco). Die prozentuellen Anteile der Fettsäuren wurden mittels Flächennormierung berechnet, wobei die Peakfläche von 10,11-Dichloro-Undecensäuremethylester von der Gesamtfläche abgezogen wurde. Bei 10-Undecensäuremethylester war dies nicht möglich, da eine Co-Elution mit Laurinsäure stattfand, wobei die Menge des zugegebenen Standards ohnehin vernachlässigbar klein war. Zur Korrektur der Peakflächen wurden Response-Faktoren nach Schreiner & Hulan (2004) verwendet. Nicht bekannte Response-Faktoren wurden durch Interpolation bestimmt.

9.11. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Analyseergebnisse erfolgte mittels SPSS, wobei für sämtliche Analysen ein Signifikanzniveau von 0,05 gewählt wurde. Ziel der statistischen Auswertung war es, festzustellen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen Heumilch und Silomilch besteht.

Die Ergebnisse der Fettsäureanalyse wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft.

Im Falle einer Normalverteilung folgte eine Überprüfung der Varianzhomogenität mittels Levene-Test. Wurde auch diese Bedingung erfüllt, konnte durch den Zweistichproben-t-Test überprüft werden, ob ein signifikanter Unterschied des Gehaltes einer bestimmten Fettsäure zwischen den beiden Gruppen besteht. Ergab der Levene-Test keine Varianzhomogenität ($p < 0,05$), wurde der Welch-Test anstelle des Zweistichproben t-Tests verwendet.

In jenen Fällen, in denen keine Normalverteilung der Ergebnisse vorlag, wurde der Mann-Whitney-U-Test zur Ermittlung signifikanter Unterschiede eingesetzt.

9.12. Validierung

9.12.1. Bestimmung der Wiederholbarkeit

Die Bestimmung der Wiederholbarkeit der Methode erfolgte durch mehrmalige Analyse derselben Probe. Dabei wurde die Probe „Ja! Natürlich Bio Vollmilch“ binnen 2 Tagen fünfmal nach dem in Abbildung 9 beschriebenen Schema aufgearbeitet und anschließend sofort analysiert. Anhand der Ergebnisse wurden Mittelwert, Standardabweichung und Relative Standardabweichung berechnet.

9.12.2. Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection; LOD) ist definiert als die kleinste Menge des Analyten, welche zwar detektiert, aber nicht unbedingt quantifiziert werden kann (United States Pharmacopeial Convention, 2012). Die Nachweisgrenze kann in Zusammenhang mit dem Signal-Rausch-Verhältnis gesetzt werden, welches den Quotienten des Signals, geteilt durch das Basislinienrauschen, beschreibt. Die Nachweisgrenze entspricht der berechneten

Konzentration des Analyten bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3 (United States Pharmacopeial Convention, 2012).

Die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification; LOQ) wird als niedrigste Konzentration eines Analyten, welche noch mit ausreichender Richtigkeit und Präzision bestimmt werden kann, definiert, was einem Signal-Rausch-Verhältnis von 10 entspricht (United States Pharmacopeial Convention, 2012).

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden die Signal-Rausch-Verhältnisse der Analyten bei den zur Kalibration verwendeten Verdünnungen des Kalibrationsstandards berechnet. Des Weiteren wurden noch 4 zusätzliche Verdünnungsstufen (1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:10000) hergestellt und analysiert, wobei wie bei der Kalibration zu einem Milliliter Kalibrationsstandard, 0,2 mL interner Standard zugegeben wurden.

Folgende Verdünnungsstufen wurden für die Ermittlung von LOD und LOQ herangezogen, wobei die in der Tabelle angegebene Konzentration der Konzentration vor der Zugabe des internen Standards entspricht:

Tabelle 30: Verdünnungsstufen für LOD und LOQ

Verdünnung	c [$\mu\text{g/mL}$]		
	Pristansäure-ME	Phytansäure-ME	DHS-ME
1:2	10,822	50,259	12,374
1:5	4,329	20,104	4,95
1:10	2,164	10,052	2,475
1:50	0,4329	2,0104	0,495
1:200	0,1082	0,5026	0,1237
1:1000	0,0216	0,1005	0,0247
1:2000	0,0108	0,0503	0,0124
1:4000	0,0054	0,0251	0,0062
1:10000	0,0022	0,0101	0,0025

Anhand der Chromatogramme wurden die Intensitäten des Basislinienrauschen und der maximalen Peakhöhe bestimmt und die Signal-Rausch-Verhältnisse der Analyten berechnet. Anschließend wurden für jeden Analyten die berechneten Signal-Rausch-

Verhältnisse der Verdünnungsstufen gegen die Konzentration in einem Diagramm aufgetragen und LOD und LQD mittels Geradengleichung berechnet.

10. Proben

10.1. Milchproben

Im Zuge dieser Arbeit wurden folgende Milchproben analysiert:

Tabelle 31: Analytierte Milchproben

Bezeichnung	Abkürzung	Milchtyp	Haltung	Abfüller	Chargennummer	MHD	Fettgehalt
milfina Vollmilch pasteurisiert	milfina VM	Konventionell	Konventionell	Gmundtner Molkerei	11:47/E T02/4	28.08.2020	3,5%
clever frische VM	clever VM	Konventionell	Konventionell	NÖM	L524905:21	05.09.2020	3,5%
NÖM VM länger frisch	NÖM VM	Konventionell	Konventionell	NÖM	0124403:382T	08.09.2020	3,5%
Spar niederösterreichische VM pasteurisiert länger frisch	Spar VM	Konventionell	Konventionell	Berglandmilch	L7.1/251/03:46/A/S	28.09.2020	3,5%
Ja! Natürlich Bio Vollmilch	Ja Bio-VM	Konventionell	Bio	Pinzgau Milch Produktions GmbH	L1243 15:39	24.09.2020	3,5%
Spar Natur Pur BioVM aus Wiesenmilch	Spar Bio-VM WM	Wiesenmilch	Bio	Kärntnermilch	L200229/0 86/A/01572	07.09.2020	3,5%
Billa Bergbauern-Heumilch	Billa HM	Heumilch	Konventionell	Salzburgermilch	00:00 L7	05.09.2020	3,6%
Ja! Natürlich frische Bio-Heu-Blumenmilch	Ja Bio-HM	Heumilch	Bio	Salzburgermilch	14:10 L6	02.09.2020	3,8%
zurück zum Ursprung original Kitzbühler Bergbauern-Heumilch länger frisch	zzU HM Kitz 04.09	Heumilch	Bio	Berglandmilch	F5 101 02:22 W1S	04.09.2020	3,6%
zurück zum Ursprung original Kitzbühler Bergbauern-Heumilch länger frisch	zzU HM Kitz 15.09	Heumilch	Bio	Berglandmilch	Y503 9:17 W1S	15.09.2020	3,6%
zurück zum Ursprung frische Mühlviertler Bergbauern-Heumilch	zzU HM MV	Heumilch	Bio	Berglandmilch	L7.3/241/03:14AS	07.09.2020	3,6%

10.2. Käseproben

Folgende Käseproben wurden im Lauf dieser Arbeit analysiert:

Tabelle 32: Analytierte Käseproben

Bezeichnung	Abkürzung	Milchtyp	Haltung	Hersteller	Chargennummer	MHD	F.I.T.
clever Mozzarella gerieben	clever Mozzarella	Konventionell	Konventionell	Berglandmilch	021600503:28	12.10.2020	45,0%
milfina österreichischer Tilsiter	milfina Tilsiter	Konventionell	Konventionell	Gebrüder Woerle	72206 13:01 S2	03.11.2020	35,0%
milfina Emmentaler aus Heumilch aus dem Salzburger- und Mondseerland	Milfina HM-Emmentaler	Heumilch	Konventionell	Gebrüder Woerle	224 09:20:53	15.11.2020	45,0%
Woerle Emmentaler aus Heumilch	Woerle HM-Emmentaler	Heumilch	Konventionell	Gebrüder Woerle	11183 16:57	04.10.2020	45,0%
Alnatura Parmigiano Reggiano	Alnatura Parmigiano	Heumilch*	Bio	Hergestellt in Italien	L31 LUG	22.12.2020	32,0%

* Wird als Heumilch mitgezählt, da Silagefütterung bei der Herstellung verboten ist.

11. Ergebnisse & Diskussion

11.1. Basenkatalysierte Ethylierung mit anschließender säurekatalysierter Methylierung

11.1.1. Basenkatalysierte Ethylierung von Heptadecansäuremethylester

Tabelle 33: Ergebnisse basenkatalysierte Ethylierung

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8
A(C17-ME)	3428	3875	2013	3752	4689	4154	3160	2341
A(C17-EE)	1943414	1833164	1579500	1380179	1553154	1490417	1395658	1078267
A(C17-FFA)	10078	7382	47424	244143	158202	416142	640896	834224
%C17-ME	0,2%	0,2%	0,1%	0,2%	0,3%	0,2%	0,2%	0,1%
%C17-EE	99,3%	99,4%	97,0%	84,8%	90,5%	78,0%	68,4%	56,3%
%C17-FFA	0,5%	0,4%	2,9%	15,0%	9,2%	21,8%	31,4%	43,6%

Bei jedem Versuchsaufbau erfolgte eine fast vollständige Umesterung von Heptadecansäuremethylester zu -ethylester. Mit zunehmender Reaktionszeit ist bei beiden Temperaturvarianten ein starker Anstieg der Verseifungsrate zu erkennen, weswegen lange Reaktionszeiten bei der Ethylierung mit 2-molarem Natriumethanolat zu vermeiden sind. Ein Erwärmen im Wasserbad bei 50°C nach Christie (2003) (Probe 5), führte bereits ohne Standzeit bei Raumtemperatur zu einer Verseifungsrate von 9,2% und kann somit nicht für eine quantitative Ethylierung verwendet werden. Die niedrigsten Verseifungsraten wurden bei der Ethylierung bei Raumtemperatur ohne Standzeit, bzw. bei einer Standzeit von 2 Minuten erzielt. Anstelle der in Milch enthaltenen Triglyceride wurde Methylester als Probe verwendet, was den Vorteil hatte die Vollständigkeit der Ethylierung kontrollieren zu können. Für den weiteren Verlauf wäre eine Wiederholung der Ethylierung bei Raumtemperatur mit Milchlipid bzw. Tripalmitat-Standard sinnvoll.

11.1.2. Herstellung von Heptadecansäureethylester

Umsetzung und Reinheit von Heptadecansäureethylester wurden anhand folgender Formeln berechnet:

$$\%Umsetzung = \frac{A_{C17EE}}{A_{C17ME} + A_{C17EE} + A_{C17FFA}} * 100$$

$$\%Reinheit = \frac{A_{C17EE}}{A_{Gesamt}} * 100$$

Tabelle 34: Ergebnisse Herstellung von Heptadecansäureethylester

	A
C17-ME	2409
C17-EE	1045465
C17-FFA	2277
Weitere Peaks	7847
Umsetzung	99,6%
Reinheit	98,8%

Im Vergleich zur Probe 3 konnte eine höhere Umsetzung zu Ethylester erreicht werden, was vermutlich durch die höhere Menge an Reagenzien zustande gekommen ist. Durch die hohe Umsetzungsrate und einer Reinheit von 98,8% wurden die geringen Anteile von Methylester und freier Fettsäure bei den nachfolgenden Versuchen vernachlässigt.

11.1.3.Säurekatalysierte Methylierung

Die Berechnung der Umsetzung erfolgte mittels folgender Formel:

$$\%Umsetzung = \frac{A_{Produkt}}{A_{Produkt} + A_{Ausgangsstoff}} * 100$$

Tabelle 35: Ergebnisse säurekatalysierte Methylierung 1

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8
t(20°C) [min]	0	5	10	15	30	45	60	75
A(C17-ME)	3135	13003	21938	29384	60105	68279	82094	111585
A(C17-EE)	502365	504455	472720	445820	498472	458825	430454	478177
A(C18-ME)	60282	219478	361448	440209	535833	826194	753072	809423
A(C18-FFA)	20837	24357	21783	17070	25150	16329	7032	2708
Umsetzung EE	0,6%	2,5%	4,4%	6,2%	10,8%	13,0%	16,0%	18,9%
Umsetzung FFA	74,3%	90,0%	94,3%	96,3%	95,5%	98,1%	99,1%	99,7%

Tabelle 36: Ergebnisse säurekatalysierte Methylierung 2

Probe	9	10
t(70°C) [min]	1	2
A(C17-ME)	38720	63022
A(C17-EE)	459343	435937
A(C16-ME)	491077	721447
A(C16-FFA)	41682	34256
Umsetzung EE	7,8%	12,6%
Umsetzung FFA	92,2%	95,5%

Trotz Variation der Reaktionszeiten- und -temperatur war kein Versuchsaufbau zufriedenstellend, da entweder keine annähernd vollständige Methylierung freier Fettsäure stattfand, oder große Teile des Ethylesters umgeestert wurden. Bei einer Reaktionszeit von 15 Minuten wurden bereits 96,3% der freien Fettsäure methyliert, jedoch wurde dabei 6,2% des Ethylesters zu Methylester umgesetzt. Wurde die Probe bei 70°C für eine Minute ins Wasserbad gestellt, betrug die Umesterungsrate von Heptadecansäureethylester bereits 7,8% was einer Reaktionszeit von über 15 Minuten bei Raumtemperatur entspricht. Das Verhältnis zwischen Umesterung und Reaktionszeit bei Raumtemperatur ist in Abbildung 10 dargestellt.

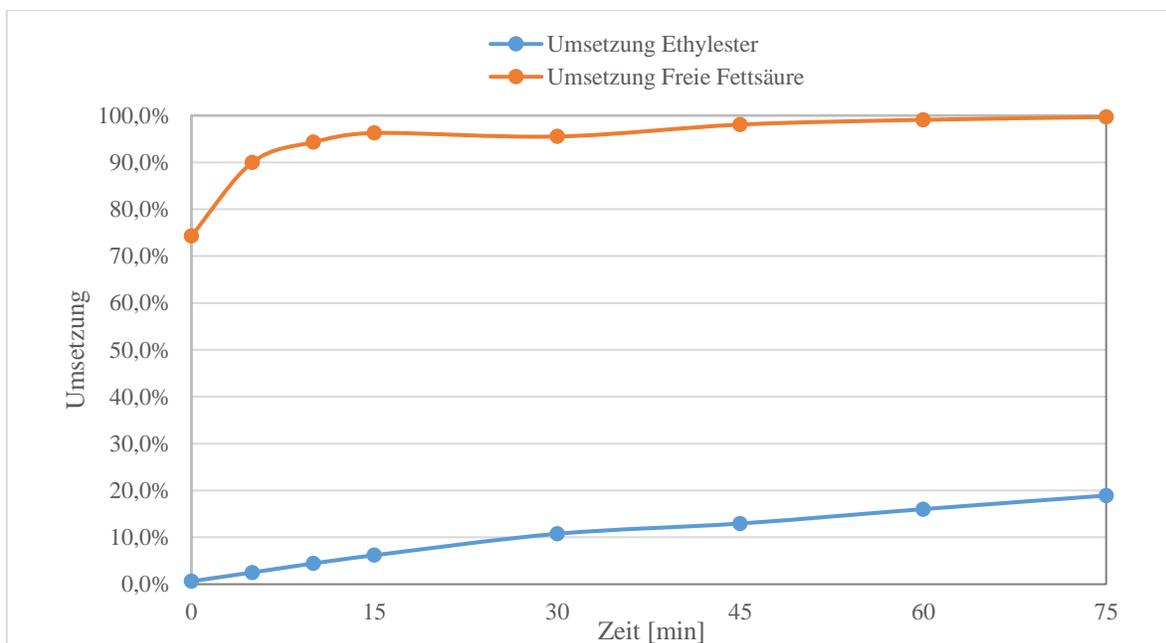


Abbildung 10: Umsetzung von Ethylester und freier Fettsäure bei säurekatalysierter Methylierung

Bei der von Lepage & Roy (1988) verwendeten Reaktionszeit von 45 Minuten wurde der größte Teil der freien Fettsäure methyliert, jedoch fand daneben eine Umsetzung von 13% des verwendeten Heptadecansäureethylesters zu Methylester statt, was für eine genaue Quantifizierung deutlich zu hoch ist. Bestätigt wird dies durch eine Studie von Hallaq et al. (1993), in der aufgezeigt wurde, dass bei der Methylierung nach Lepage & Roy (1988), ein signifikanter Anteil an bereits veresterten Fettsäuren methyliert wird. Des Weiteren werden gebundene mehrfach-ungesättigte Fettsäuren deutlich leichter methyliert als gesättigte Fettsäuren, wodurch ein höherer Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren vorgetäuscht wird (Hallaq et al., 1993). Durch die Methylierung mit HCl/Methanol konnte keine exklusive Methylierung freier Fettsäuren erzielt werden, weswegen auf andere Derivatisierungsmethoden zurückgegriffen werden musste.

11.2. Basenkatalysierte Methylierung mit anschließender Silylierung

11.2.1. Basenkatalysierte Methylierung mit Na-Methanolat

Die Konzentration von Palmitinsäuremethylester wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$c_{C16ME} [mg/mL] = \frac{A_{C16ME} * c_{C17ME}}{A_{C17ME}} = \frac{A_{C16ME} * 5,22}{A_{C17ME}}$$

Tabelle 37: Ergebnisse basenkatalysierte Methylierung

Methoden	Christie (2003)	Christopherson & Glass (1969)	Ulberth et al. (1999)	Ulbert et al. (1999) + CH ₃ COOH
A(C16-ME)	3406758	3174112	3188357	3042583
A(C17-ME)	3177617	2918798	2893196	2777643
A(C16-FFA)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
c(C16-ME) [mg/mL]	5,60	5,68	5,75	5,72

Trotz unterschiedlicher Mengen und Reaktionszeiten sind keine großen Schwankungen der Konzentration an Heptadecansäuremethylester erkennbar. Eine Hydrolyse von Tripalmitin zu freier Palmitinsäure konnte bei keiner der verwendeten Methoden nachgewiesen werden.

Die niedrigste Konzentration an Palmitinsäuremethylester wurde mittels Methylierung nach Christie (2003) erzielt. Des Weiteren können bei dieser Methode, auf Grund der großen Menge an Natriummethanolat, Schwierigkeiten bei der Bestimmung von kurzkettigen Fettsäuren auftreten, weswegen diese Methode nicht zu empfehlen ist. Ein weiterer Grund der gegen die Verwendung großer Mengen Methanolat spricht, ist die gute Löslichkeit freier Fettsäuren in Methanol, was dazu führen kann, dass zur anschließenden Silylierung zugegebene freie Fettsäuren in die methanolische Phase übergehen und somit verloren gehen (Ichihara et al., 2020).

Trotz der zufriedenstellenden Methylierung und einfachem Versuchsaufbau wurde die Methode nach Christopherson & Glass (1969), nicht weiter verwendet, da dabei kein Stoppen der Reaktion stattfindet, was zu folgenden Problemen führen kann: Durch schlechte Phasentrennung könnte Methoxid in der Probe verbleiben, was zum einen zur Beschädigung der Säule führen kann, zum anderen verläuft dadurch die Methylierung der

Proben weiter, wodurch eine Verfälschung der Ergebnisse stattfinden kann, wenn die Proben nicht sofort nach der Methylierung gemessen werden (Bannon et al., 1982).

Die höchsten Konzentrationen an Palmitinsäuremethylester und somit die beste Umesterung, konnten bei der Methylierung nach Ulberth et al. (1999) erzielt werden. Zwischen der Neutralisation mit Essigsäure bzw. NaHSO₄ konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Aufgrund der Einfachheit und schnelleren Neutralisation wurde dabei für weitere Versuche die Neutralisation mit 100% Essigsäure gewählt.

11.2.2. Silylierung

Bestimmung der notwendigen Menge an Silyl 991

Tabelle 38: Ergebnisse Silylierungsvorversuch

Probe	1	2	3
V(Silyl 991) [µL]	100	200	300
A(C13-TMS)	1425831	2134690	1693551
A(C13-FFA)	n.n.	n.n.	n.n.
A(C15-ME)	1090105	1624886	1304405
A(C17-TMS)	1096945	1716159	1355366
A(C17FFA)	n.n.	n.n.	n.n.
C13-TMS	39,5%	39,0%	38,9%
C15-ME	30,2%	29,7%	30,0%
C17-TMS	30,4%	31,3%	31,1%

Bei keiner der Proben waren im Chromatogramm FFA-Peaks zu erkennen, was auf eine vollständige Silylierung aller Proben schließen lässt. Die Verwendung größerer Mengen als 100 µL Silyl 991 bewirkte keine signifikante Steigerung der Trimethylsilyl-Derivatbildung, weswegen für die Silylierung von rund 20 mg freier Fettsäuren 100 µL als ausreichend anzusehen sind. Für die Durchführung des Hauptversuches wurden somit 100 µL Silyl 991 verwendet.

Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Tabelle 39: Ergebnisse Silylierungsversuch 1

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8
T [°C]	80	80	80	80	20	20	20	20
t [min]	10	30	60	90	10	30	60	90
V(Pyr.) [µL]	0	0	0	0	0	0	0	0
A(C13-TMS)	1994791	1642980	1789287	2366956	1780790	2021186	2213927	1977644
A(C15-ME)	1596929	1282303	1361377	1841412	1454299	1667419	1687430	1647847
A(C17-TMS)	1620225	1264703	1352489	1913369	1410795	1603250	1768058	1581960
C13-TMS	38,3%	39,2%	39,7%	38,7%	38,3%	38,2%	39,1%	38,0%
C15-ME	30,6%	30,6%	30,2%	30,1%	31,3%	31,5%	29,8%	31,6%
C17-TMS	31,1%	30,2%	30,0%	31,3%	30,4%	30,3%	31,2%	30,4%

Tabelle 40: Ergebnisse Silylierungsversuch 2

Probe	9	10	11	12	13	14	15	16
T [°C]	80	30	80	80	20	20	20	20
t [min]	10	20	60	90	10	30	60	90
V(Pyr.) [µL]	200	200	200	200	200	200	200	200
A(C13-TMS)	2065675	1756715	1805626	1980597	2442736	1847365	1874213	2215552
A(C15-ME)	1604750	1420079	1486482	1568862	1855988	1527464	1575441	1717019
A(C17-TMS)	1632530	1320377	1389835	1550352	1854514	1459439	1490965	1755066
C13-TMS	39,0%	39,1%	38,6%	38,8%	39,7%	38,2%	37,9%	39,0%
C15-ME	30,3%	31,6%	31,7%	30,8%	30,2%	31,6%	31,9%	30,2%
C17-TMS	30,8%	29,4%	29,7%	30,4%	30,1%	30,2%	30,2%	30,9%

Trotz unterschiedlicher Temperatur, Reaktionszeiten und Zugabe von Pyridin, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der einzelnen Versuche zu erkennen. Wie auch im Vorversuch lagen keine FFA-Peaks vor. Dies lässt darauf schließen, dass bereits nach 10 Minuten bei Raumtemperatur freie Fettsäuren vollständig in Trimethylsilyl-Derivate überführt werden. Eine etwaige Beschleunigung der Reaktion durch Zugabe polarer Lösungsmittel wie Pyridin ist nicht notwendig, da das in Silyl 991 enthaltene Chlor(trimethyl)silan bereits als Katalysator fungiert (Gehrke & Leimer, 1970). Für die Probenaufbereitung wurde somit eine möglichst kurze Reaktionszeit bei Raumtemperatur gewählt, da dadurch zum einen die Probenaufbereitungszeit vermindert wird und zum

anderen eine etwaige temperaturbedingte Schädigung ungesättigter Fettsäuremethylester ausgeschlossen werden kann.

11.2.3. Methylierung von Milchfett mit anschließender Silylierung

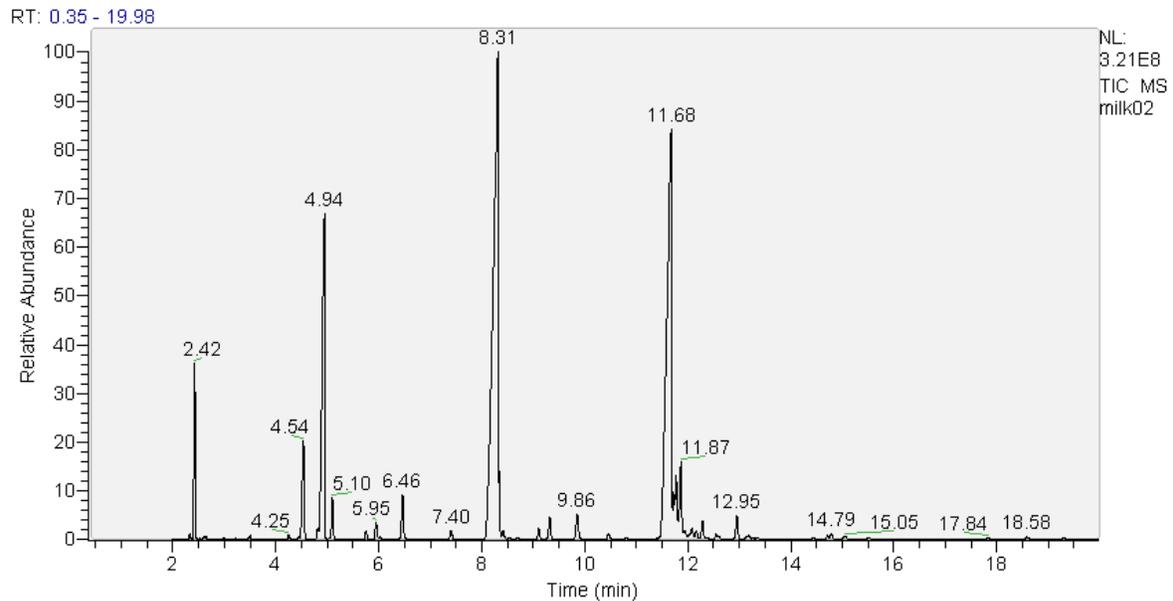


Abbildung 11: Chromatogramm von Butterschmalz mit C13-TMS-Ester

Abbildung 11 zeigt die durch Methylierung von Butterschmalz erhaltenen Fettsäuremethylester. Beim Peak mit einer Retentionszeit von 4,54 Minuten handelte es sich um Tridecansäure-Trimethylsilylester, was durch Abgleich mit der Spektrenbibliothek bestätigt wurde.

Die Zugabe von freier Fettsäure zu einer Probe als interner Standard, welcher als Trimethylsilylester nachgewiesen wird, ist somit möglich. Dabei sind jedoch folgende Punkte zu beachten: Eine Analyse von Trimethylsilylestern war nur mit Säulen niedriger bis mittlerer Polarität möglich. Bei hochpolaren Säulen wie z.B. SP-2560 kam es, wie in Abbildung 12 ersichtlich, bei der Analyse von Trimethylsilylderivaten zu einer Spaltung der Reaktionsprodukte, weswegen diese nicht für die Analyse von Trimethylsilylderivaten eingesetzt werden konnten.

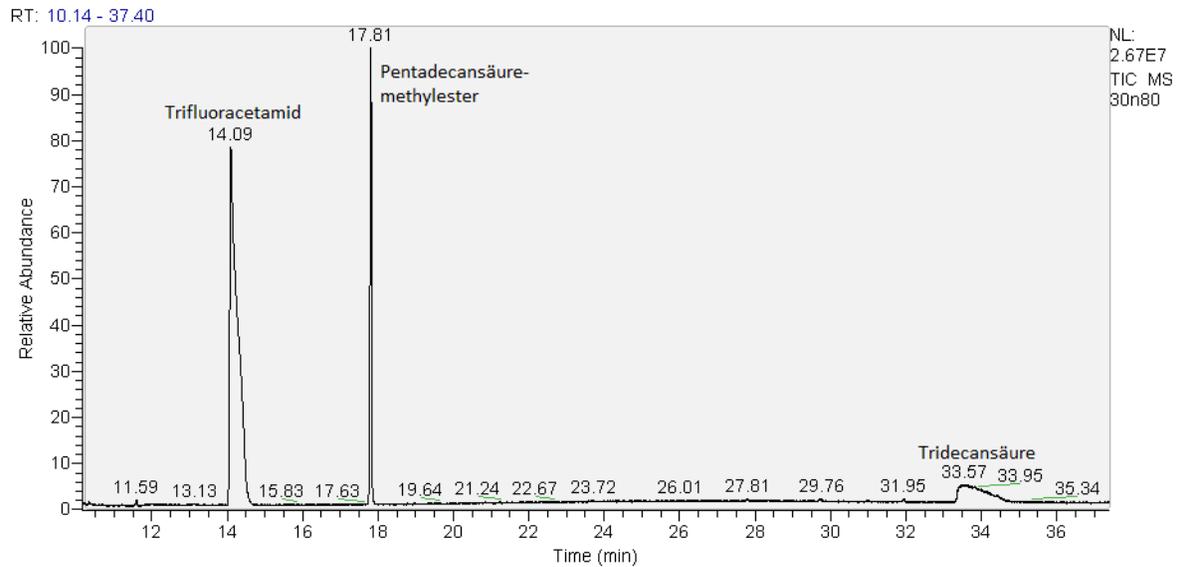


Abbildung 12: GC-MS-Analyse der Silylierungsprobe 7 mittels SP2560

Jedoch sind gerade Säulen mit hoher Polarität für komplexe Proben wie Milchfett besser geeignet, da damit auch eine Trennung von Fettsäureisomeren möglich ist (Zeng et al., 2013). Des Weiteren ist darauf zu achten, dass sich freie Fettsäure gut in Methanol lösen, was zu Verlusten während der Methylierung führen könnte (Ichihara et al., 2020).

Insgesamt ist die Verwendung einer freien Fettsäure als Standard zwar möglich, ist aber neben den vorhin beschriebenen Hürden mit einer aufwendigeren und längeren Probenaufbereitung verbunden, weswegen letztendlich die Wahl auf einen anderen Standard fiel.

11.3. Herstellung des internen Standards

11.3.1. Reinigung von 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester

Von den einzelnen Fraktionen des Vor- und Hauptversuches wurden Reinheit und der prozentuelle Anteil von 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester mittels folgender Formeln berechnet:

$$\%Reinheit_{Cl_2C11ME} = \frac{A_{Cl_2C11ME}}{A_{Cl_2C11ME} + A_{Restl.Peaks}} * 100$$

$$\%Anteil_{Cl_2C11ME} = \frac{A_{Cl_2C11ME}}{\sum A_{Cl_2C11ME}} * 100$$

Da bei der Injektion von 1 µL Probe Schwankungen der Injektionsmenge verschiedener Messungen auftreten können und kein interner Standard verwendet wurde, können geringe Abweichungen zwischen den Peakflächen verschiedener Messungen auftreten, was sich auf die Ergebnisse der Verteilung der Zielkomponente zwischen den Fraktionen auswirkt. Dies wurde jedoch vernachlässigt, da eine genaue Quantifizierung bei diesem Schritt nicht von Nöten war und ohnehin im späteren Verlauf dieser Arbeit erfolgte.

Vorversuch

Tabelle 41: Ergebnisse Reinigung von Cl₂C11 Vorversuch

Fraktion	1	2	3	4	5	6
A(C11:1-ME)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
A(Cl₂C11-ME)	n.n.	545470	504986	21729	6813	3639
A(Restl. Peaks)	0	76694	2465	0	39754	55519
Reinheit(Cl₂C11-ME)	/	87,7%	99,5%	100,0%	14,6%	6,2%
Anteil(Cl₂C11-ME)	0%	50,4%	46,6%	2,0%	0,6%	0,3%

In keiner der gesammelten Fraktionen war 10-Undecensäuremethylester zu finden, was auf eine vollständige Chlorierung schließen lässt. Der mengenmäßig größte Anteil an 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester war in den Fraktionen 2 und 3 zu finden, wobei Fraktion 2 aufgrund der zu niedrigen Reinheit von 87,8% nicht für die Herstellung des internen Standards verwendet wurde. Da bei den anderen Fraktionen vergleichsweise

geringe Mengen an Cl₂C11-Methylester gemessen wurden, wurde lediglich Fraktion 3 weiterverwendet.

Hauptversuch:

Tabelle 42: Ergebnisse Reinigung von Cl₂C11 Hauptversuch

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7
A(C11:1-ME)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
A(Cl ₂ C11-ME)	n.n.	n.n.	11517	1559442	3295208	407351	144232
A(Restl. Peaks)	0	0	6239	21684	23187	5496	1203
Reinheit(Cl ₂ C11-ME)	/	/	64,9%	98,6%	99,3%	98,7%	99,2%
Anteil(Cl ₂ C11-ME)	0%	0%	0,2%	28,8%	60,8%	7,5%	2,7%

Wie auch im Vorversuch konnte kein 10-Undecensäuremethylester nachgewiesen werden. In Fraktion 4 war die höchste Konzentration und somit der höchste Anteil von 10,11-Dichloro-Undecensäuremethylester zu finden, gefolgt von Fraktion 3. Da in diesen beiden Fraktionen die Reinheit von Cl₂C11-ME über 98% betrug, wurden diese zur Herstellung des internen Standards herangezogen.

11.3.2. Analyse von 10,11-Dichloro-Undecensäuremethylester

Tabelle 43: Ergebnisse gaschromatographische Analyse von Cl₂C11-ME

	Area
Cl ₂ C11-ME	23761320
Restl. Peaks	460650
Reinheit	98,1%

Aus den rund 9 mg 10,11-Dichloro-Undecensäuremethylester wurden 50 mL Standard hergestellt, welcher eine Reinheit von 98,1% hat. Die Messung der genauen Konzentration erfolgte im Verlauf der Arbeit durch Verwendung eines Standards bekannter Konzentration.

11.3.3. Reinigung von 10-Undecensäuremethylester

Die Berechnung der Reinheit und des Anteils an 10-Undecensäuremethylester erfolgte mittels folgender Formeln:

$$\%Reinheit_{C_{11:1}ME} = \frac{A_{C_{11:1}ME}}{A_{C_{11:1}ME} + A_{Restl.Peaks}} * 100$$

$$\%Anteil_{C_{11:1}ME} = \frac{A_{C_{11:1}ME}}{\sum A_{C_{11:1}ME}} * 100$$

Tabelle 44: Ergebnisse Reinigung von 10-Undecensäuremethylester

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7
A(C11:1-ME)	6992	n.n.	9320753	5456592	3797618	2843692	964870
A(Rest)	0	1176	59191	48338	26788	18730	4854
Reinheit(C11:1-ME)	100%	/	99,4%	99,1%	99,3%	99,3%	99,5%
Anteil(C11:1-ME)	0%	0%	41,6%	24,4%	17,0%	12,7%	4,3%

Bei jeder Fraktion, die 10-Undecensäuremethylester enthielt, konnte eine Reinheit von über 99% gemessen werden. Der höchste Anteil von C11:1-Methylester war in Fraktion 3 zu finden, während die Fraktionen davor kaum bzw. keinen C11:1-ME enthielten. Für die Herstellung des internen Standards wurden die Fraktionen 3, 4, 5 und 6 herangezogen, da in allen Fraktionen verhältnismäßig große Mengen an 10-Undecensäuremethylester nachgewiesen werden konnten.

Herstellung des internen Standards

Die Berechnung der Konzentrationen an 10-Undecensäuremethylester und 10,11-Dichloro-Undecensäuremethylester erfolgte mittels folgender Formeln:

$$C_{C_{17}ME\ Probe} [\mu g/mL] = \frac{C_{C_{17}ME} * V_{C_{17}ME}}{V_{Probe}} = \frac{1010 \mu g/mL * 0,1 mL}{1,1 mL}$$

$$C_{C_{11:1}ME\ Probe} [\mu g/mL] = \frac{A_{C_{11:1}ME} * C_{C_{17}ME\ Probe}}{A_{C_{17}ME}}$$

$$C_{Cl_2C_{11}ME\ Probe} [\mu g/mL] = \frac{A_{Cl_2C_{11}ME} * C_{C_{17}ME\ Probe}}{A_{C_{17}ME}}$$

$$C_{C_{11:1}ME\ Standard} [\mu g/mL] = \frac{V_{Probe} * C_{C_{11:1}ME\ Probe}}{V_{C_{11:1}ME\ Probe}}$$

$$c_{Cl_2C11ME\ Standard} [\mu g/mL] = \frac{V_{Probe} * c_{Cl_2C11ME\ Probe}}{V_{Cl_2C11ME\ Probe}}$$

$$m_{Standard} [\mu g] = c_{Standard} * 0,2\ mL$$

Tabelle 45: Berechnung der Konzentration des internen Standards

	C17-ME	C11:1-ME	Cl₂C11-ME
tR [min]	22,84	14,89	35,33
Area	209317	258664	105830
V [mL]	0,1		1
c(Probe) [μg/mL]	91,818	113,465	46,423
c(Standard) [μg/mL]	1010	124,811	51,065
m(Standard/200 μL) [μg]	/	24,962	10,213

Tabelle 46: Vergleich zwischen gravimetrischer und gaschromatographischer Konzentrationsbestimmung

	C11:1-ME	Cl₂C11-ME
c(grav.) [μg/mL]	138,5	90
c(chrom.) [μg/mL]	124,8	51,1

Die chromatographisch ermittelten Konzentrationen der Standardkomponenten sind deutlich niedriger als die gravimetrisch ermittelten Konzentrationen, insbesondere im Fall von 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester. Grund dafür könnten Spuren von Lösungsmittel bei der Wägung der Probe gewesen sein, bzw. mangelnde Empfindlichkeit der Waage, da die Differenz bei der Wägung von 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester lediglich 9 mg betrug. Trotz der Schwankungen der Konzentrationen wurde das geplante Volumen an Standard von 200 μL Standard bei rund 10 mg Milchfett beibehalten.

Bei der Berechnung der Konzentrationen wurden keine Response-Faktoren miteinbezogen, da diese für die Komponenten des Standards nicht bekannt waren.

11.4. Herstellung des Kalibrationsstandards

11.4.1. Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation

Vorversuch

In Abbildung 13 ist ein Vergleich des Ergebnisses der Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation mit dem, als Probe verwendeten, methylierten Butterschmalz dargestellt.

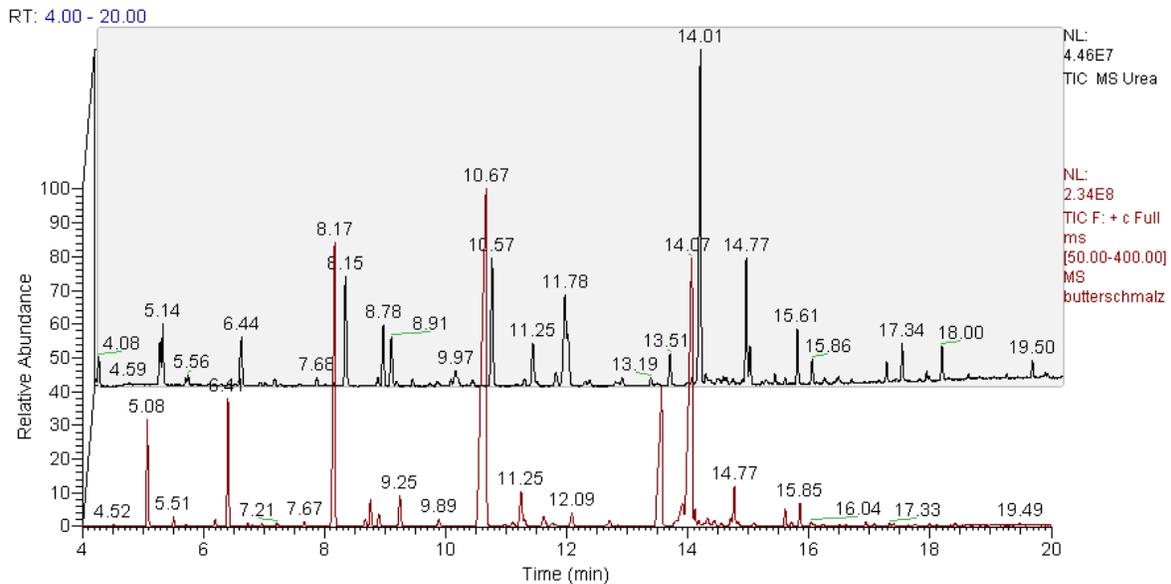


Abbildung 13: Vergleich Butterschmalz vor und nach Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation

Wie in Abbildung 13 ersichtlich, konnte durch die Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation eine deutliche Anreicherung von ungesättigten und verzweigten Fettsäuren erzielt werden. Anstatt Palmitinsäuremethylester ($t_R=10,6$ min) ist nun Ölsäuremethylester ($t_R=14$ min) der flächenmäßig größte Peak im Chromatogramm. Des Weiteren ist eine starke Anreicherung von langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren festzustellen. Da der Vorversuch zufriedenstellende Ergebnisse brachte, konnte der Versuchsmaßstab zur Herstellung eines Standards vergrößert werden.

Upscaling

Um die ungefähre Konzentration der aufgereinigten Lösung zu erhalten, wurde der lösungsmittelfreie Rückstand ausgewogen.

Masse und Konzentration der erhaltenen Fettsäuremethylester wurden wie folgt berechnet:

$$m_{UreaME} = \text{Auswaage} - \text{Tara} = 46,1698 \text{ g} - 45,8924 \text{ g} = 0,2774 \text{ g} = 277,4 \text{ mg}$$

$$c_{UreaME} = \frac{m_{UreaME}}{V} = \frac{277,4 \text{ mg}}{15 \text{ mL}} = 18,493 \text{ mg/mL}$$

11.4.2. Identifikation von Pristan- und Phytansäure

Wie im Vorversuch konnten ungesättigte und verzweigte Fettsäuren mittels Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation angereichert werden. Im Vergleich zum Vorversuch verblieben mehr kurzkettige Fettsäuremethylester in der Lösung, was vermutlich auf die größere Probenmenge zurückzuführen ist.

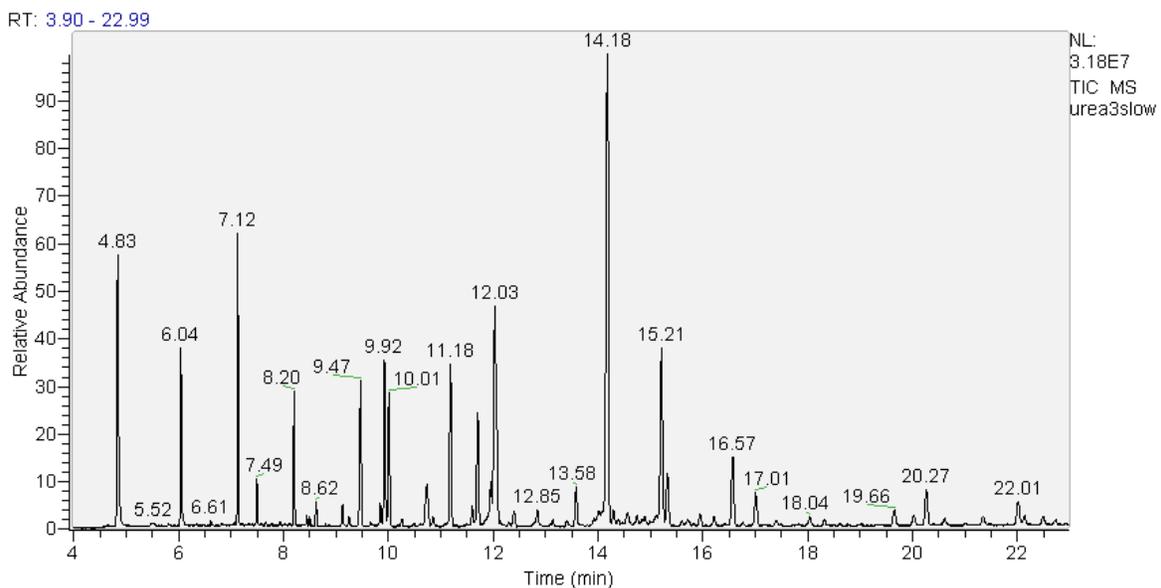


Abbildung 14: GC-MS Analyse des Hauptversuchs der Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation

Die Zuordnung der Peaks erfolgte anhand der GC-MS-Messung durch Abgleich mit der Spektrenbibliothek, wobei folgende Fettsäuren in der Probe identifiziert wurden:

Tabelle 47: Peakidentifikation des Hauptversuchs der Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation

t_R [min]	Abkürzung	Fettsäure
4,38	C6:0	Capronsäure
6,04	C8:0	Caprylsäure
7,12	C10:0	Caprinsäure
7,46	C10:1	Decensäure
8,20	C12:0	Laurinsäure
9,47	C14:0	Myristinsäure
9,92	C14:1	Myristoleinsäure
10,01	C14:0 iso	12-Methyltetradecansäure
10:26	C15:0	Pentadecansäure
10,73	PrA	Pristansäure
11,18	C16:0	Palmitinsäure
11,71	C16:1	Palmitoleinsäure
12,03	PhA	Phytansäure
13,58	C18:0	Stearinsäure
14,18	C18:1	Ölsäure
15,21	C18:2	Linolsäure
16,57	C18:3	Linolensäure
17,01	CLA	Konjugierte Linolsäuren
20,27	C20:4	Arachidonsäure
22,01	C20:5	Eicosapentaensäure

Sowohl Pristan- als auch Phytansäure konnten in der aufgereinigten FAME-Lösung nachgewiesen werden. Da die Konzentrationsbestimmung der beiden Fettsäuren mittels Flammenionisationsdetektor erfolgte, mussten diese zuerst im Chromatogramm identifiziert werden, was durch einen Vergleich mit der GC-MS-Analyse erfolgte.

In Abbildung 15 und Abbildung 16 ist der Elutionsbereich von Pristansäuremethylester und Phytansäuremethylester von beiden chromatographischen Analysen zur Veranschaulichung dargestellt.

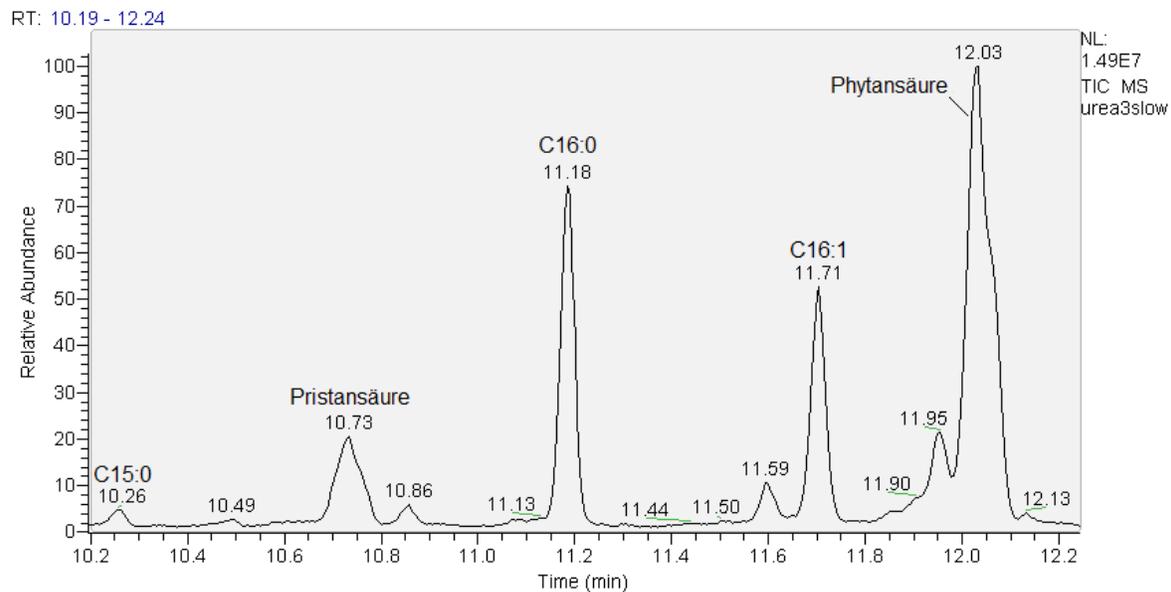


Abbildung 15: Ausschnitt Pristan- und Phytansäure-ME (GC-MS)

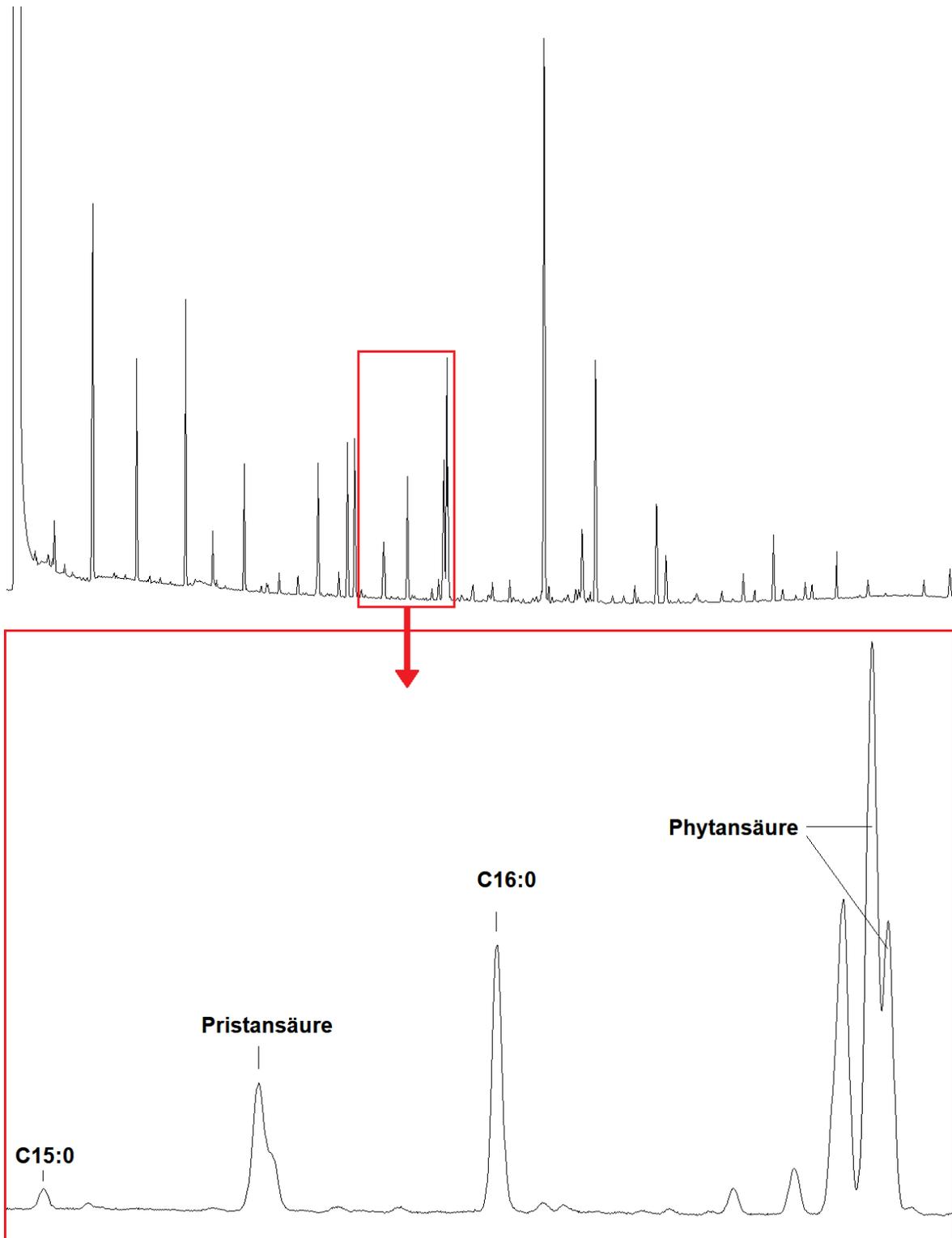


Abbildung 16: Ausschnitt Pristan- und Phytansäure-ME (GC-FID)

In den beiden Chromatogrammen sind bei Pristan- und Phytansäure aufgrund ihrer verschiedenen Isomere deutlich Doppelpeaks zu erkennen. Während Pristansäuremethylester bei einer Laufzeit von 19,97 Minuten nach Pentadecansäuremethylester eluiert, liegt die Retentionszeit von Phytansäuremethylester mit 22,31 Minuten knapp vor Palmitoleinsäuremethylester. Da eine Identifikation der gesuchten Fettsäuren bei der GC-FID Analyse möglich war, konnten anschließend deren Konzentrationen unter Verwendung eines internen Standards ermittelt werden.

11.4.3. Konzentrationsbestimmung von Pristan- und Phytansäuremethylester

Die Berechnung der Konzentration an Phytan- und Pristansäuremethylester erfolgte mittels folgender Formeln:

$$c_{PrAME\ Probe} [\mu g/mL] = \frac{A_{PrAME} * C_{C17ME\ Probe}}{A_{C17ME}}$$

$$c_{PhAME\ Probe} [\mu g/mL] = \frac{A_{PhAME} * C_{C17ME\ Probe}}{A_{C17ME}}$$

$$c_{PrAME\ Standard} [\mu g/mL] = \frac{V_{Probe} * C_{PrAME\ Probe}}{V_{PrAME\ Probe}}$$

$$c_{PhAME\ Standard} [\mu g/mL] = \frac{V_{Probe} * C_{PhA\ Probe}}{V_{PhAME\ Probe}}$$

Tabelle 48: Ergebnisse Konzentrationsbestimmung von Pristan- und Phytansäure-ME

	C17-ME	PrA-ME	PhA-ME
tr [min]	22,73	19,97	22,31
Area	216971	45171	205389
V [mL]	0,1		0,9
c(Probe) [μg/mL]	101	21,027	95,609
c(Standard) [μg/mL]	1010	23,363	106,232

Da die Konzentrationen von Pristansäuremethylester und Phytansäuremethylester bestimmt wurden, konnte anschließend Dihydrosterculiasäuremethylester zugegeben werden, um einen Standard für die Kalibration herzustellen.

11.4.4. Herstellung des Kalibrationsstandards

Ermittlung des Korrekturfaktors:

Tabelle 49: Ermittlung des Korrekturfaktors

	Pristansäure-ME	C17-ME
t_R [min]	19,97	22,72
Area	44702	1355

Die Berechnung des Korrekturfaktors erfolgte mittels der folgenden Formel:

$$F = A_{PrAME} / A_{C17ME} = 32,9904$$

Die Konzentration von Pristansäuremethylester im Standard ist somit rund 33-mal so hoch wie die von Heptadecansäuremethylester. Der Faktor F wurde somit zur Berichtigung der Konzentration von Heptadecansäuremethylester bei der folgenden Auswertung miteinbezogen.

Die Berechnung der Konzentrationen der Standardkomponenten erfolgte mittels folgender Formeln:

$$A_{korr. C17ME} = A_{C17ME} - \frac{A_{C17ME}}{F}$$

$$C_{KalStd Probe} [\mu g/mL] = \frac{A_{KalStd} * C_{C17ME Probe}}{A_{C17ME}}$$

$$C_{KalStd} [\mu g/mL] = \frac{V_{Probe} * C_{KalStd}}{V_{KalStd Probe}}$$

$$C_{korr. KalStd Probe} [\mu g/mL] = \frac{A_{KalStd} * C_{C17ME Probe}}{A_{korr.C17ME}}$$

$$C_{korr. KalStd} [\mu g/mL] = \frac{V_{Probe} * C_{korr. KalStd}}{V_{KalStd Probe}}$$

Tabelle 50: Konzentrationsberechnung Kalibrationsstandard

	C17-ME	PrA-ME	PhA-ME	DHSA-ME
tR [min]	22,76	20,00	22,33	27,75
Area	198932	41337	191982	47268
Area korr.	192902		/	
V [mL]	0,1		1	
c(Probe) [µg/mL]	91,818	19,079	88,610	21,817
c [µg/mL]	1010	20,987	97,471	23,998
c(korr. Probe) [µg/mL]	/	19,676	91,380	22,499
c(korr) [µg/mL]	/	21,643	100,518	24,749

Tabelle 51: Konzentrationen mit und ohne Korrekturfaktor

	PrA-ME	PhA-ME	DHSA-ME
c [µg/mL]	20,987	97,471	23,998
c korr. [µg/mL]	21,643	100,518	24,749

Beim Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Korrekturfaktor ist eine Schwankung von rund 3% feststellbar. Für den weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Konzentration unter Miteinbezug des Korrekturfaktors verwendet, da dadurch der nach der Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation in der Probe verbliebene Heptadecansäuremethylester vom zugegebenen internen Standard abgezogen wurde.

11.5. Entwicklung des Temperaturprogramms

Die bei der ursprünglichen Methode gewählte Starttemperatur von 50°C dient dazu kurzkettige Fettsäuren analysieren zu können, ist jedoch für die Analyse der gewählten Minorfettsäuren nicht notwendig, weswegen die Starttemperatur auf 100°C erhöht wurde. Die neu eingefügte steile Rampe 3 diente dazu, die Analysendauer kurz zu halten.

Bei Methode 1 wurde die Heizrate von 20°C/min bis 170°C beibehalten. Daraus resultierte eine schnelle Elution der FAME, was dazu führte, dass Phytansäure-ME nicht sauber von anderen FAME getrennt werden konnte.

Da die gesuchten Fettsäuren in Milch nur in sehr geringen Mengen vorkommen, wurde das Splitverhältnis von 1:100 auf 1:50 verändert, wodurch mehr Probe in die Säule kommt. Um die höhere Starttemperatur zu kompensieren, wurde bei Methode 2 die Steigung und Endtemperatur der Rampe 1 verringert, wodurch sich die Trennung von Phytansäure-ME verbesserte. Die Retentionszeiten von Dihydrosterculiasäure-ME (16,25 min) und Dichloro-Undecansäure-ME (18,6 min) lagen jedoch weit hinter den meisten anderen in der Probe vorkommenden FAME, weswegen Rampe 3 bei der Methode 3 nach vorne verschoben wurde.

Der Übergang auf Rampe 3 findet bei Methode 3 nach 12 Minuten statt, also knapp nach der Elution von Phytansäure-ME (11,78 min). Dies führte zur Verringerung der Retentionszeit von Dihydrosterculiasäure-ME um 1,2 Minuten, wobei dennoch keine Überlagerung mit anderen Peaks zu sehen war.

Bei Methode 4 wurde lediglich die Endtemperatur auf 240°C erhöht, um etwaige schwerflüchtige Komponenten schneller aus der Säule zu entfernen. Letztendlich wurde Methode 4 im Verlauf dieser Arbeit weiterverwendet, da eine gute Trennung der gesuchten Minorfettsäuren unter geringem Zeitaufwand möglich war. Anhand von Erfahrungswerten wäre es auch möglich, die Haltezeit bei 240°C zu verkürzen, wodurch die Analysezeit weiter verringert werden könnte.

In Abbildung 17 ist die Analyse des zuvor methylierten Butterschmalzes mit der entwickelten Analyseverfahren dargestellt.

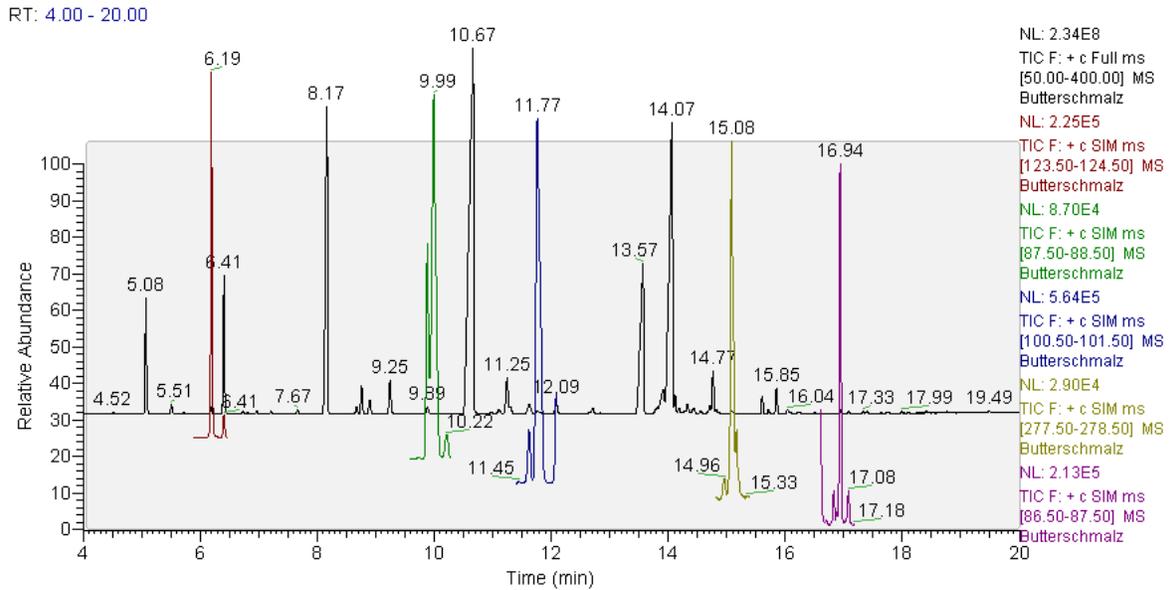


Abbildung 17: Analyse von Butterschmalz mittels entwickelter GC-MS-Methode

Tabelle 52: Retentionszeiten und Massenfragmente der analysierten FAME

FAME	tr [min]	m/z
Undecensäure-ME	6,19	124
Pristansäure-ME	9,99	88
Phytansäure-ME	11,77	101
Dihydrosterculiasäure-ME	15,08	278
10,11-Dichloro-Undecansäure-ME	16,94	87

Wie im Chromatogramm ersichtlich, konnten die gesuchten Fettsäuremethylester anhand der ausgewählten Massenfragmente detektiert werden. Obwohl deren Peaks im Gesamtspektrum kaum zu erkennen sind machen diese, bei der Analyse mittels Single-Ion-Monitoring die flächenmäßig größten Peaks innerhalb des Detektionszeitraums aus. Dies macht eine Analyse der gesuchten Minorfettsäuren mit höherer Genauigkeit möglich. Da somit eine Trennung und Detektion der nachzuweisenden Fettsäuremethylester möglich ist, konnte die Kalibration der Methode vorgenommen werden.

11.6. Kalibration

Für die zwei verwendeten Standards ergab die Kalibration die folgenden Ergebnisse:

Tabelle 53: Ergebnisse Kalibration interner Standard

	10-Undecensäure-ME	Cl ₂ C11-ME
tr [min]	6,19	16,92
Average Response Factor	13359,2	43375,3
Relative Standardabweichung	9,3%	8,9%

Folgende Kalibrationsgeraden für die Standardkomponenten wurden ermittelt:

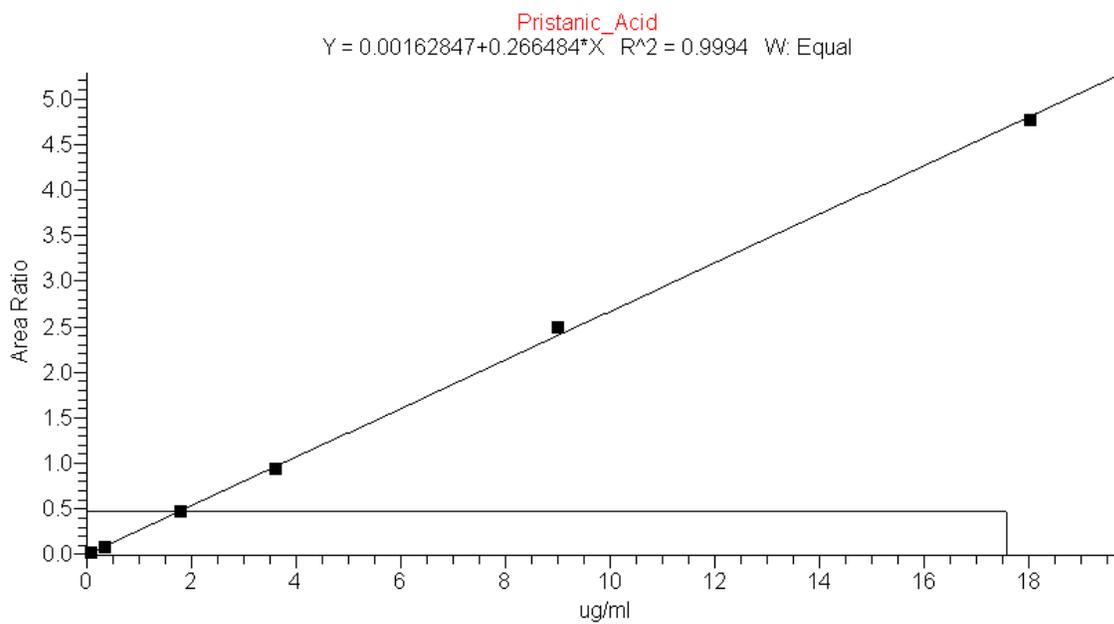


Abbildung 18: Kalibrationsgerade Pristansäure

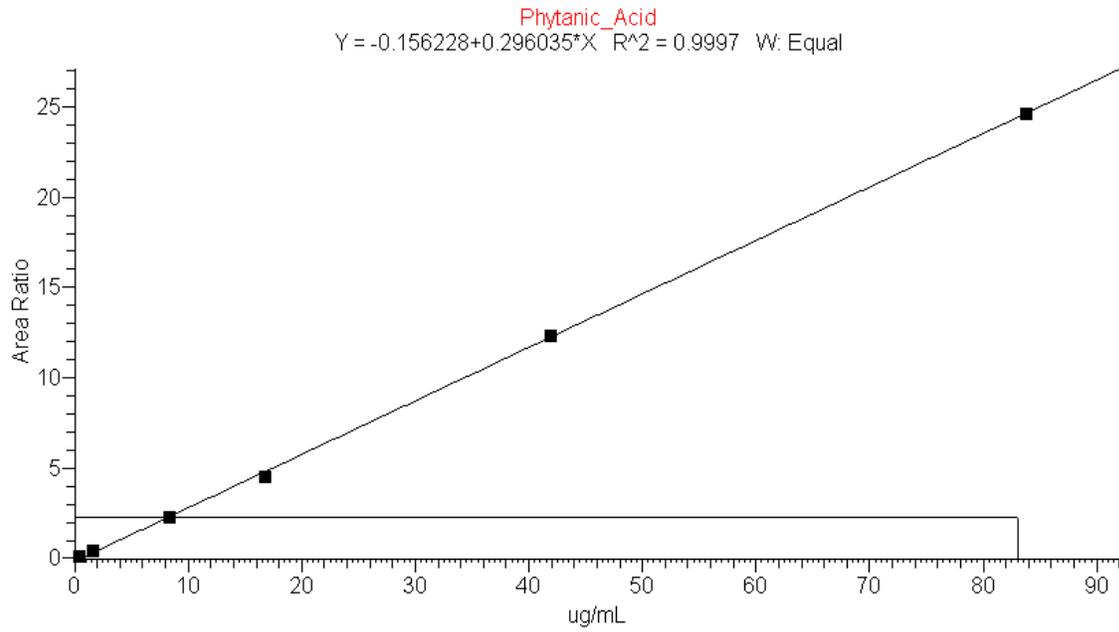


Abbildung 19: Kalibrationsgerade Phytansäure

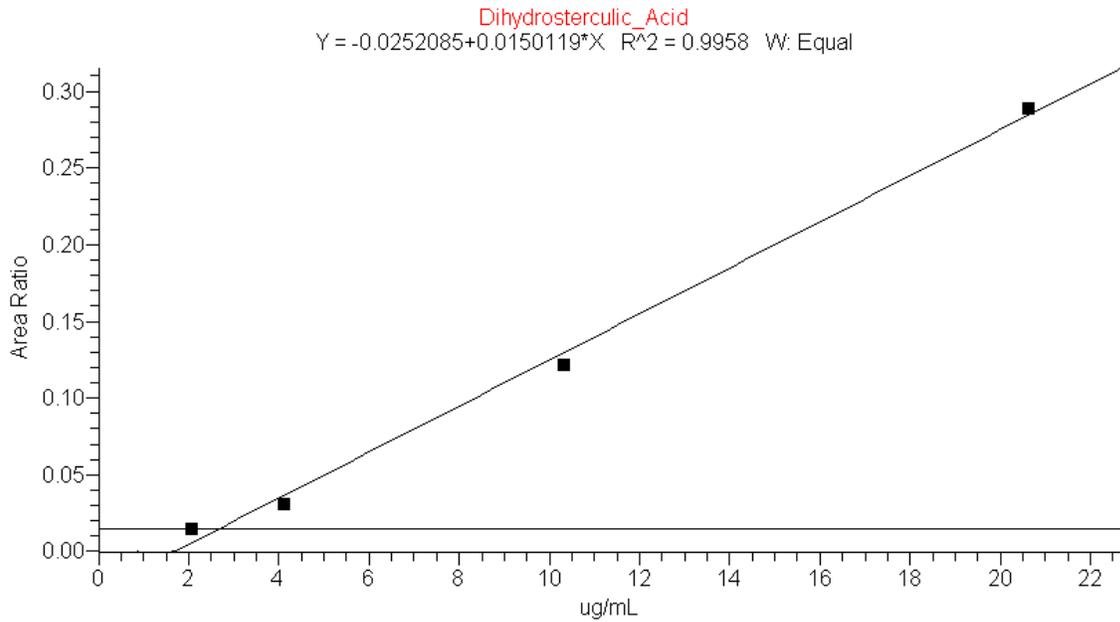


Abbildung 20: Kalibrationsgerade Dihydrosterculiasäure

Die Relative Standardabweichung von rund 9% zwischen den Peakflächen verschiedener Injektionen der Standardkomponenten lässt sich durch Schwankungen des geringen Injektionsvolumens von 1 μL erklären, da die Injektionen händisch und somit ohne Autosampler erfolgt sind.

Die Kalibration für die Analyse von Pristan- und Phytansäure ergab ein hohes Bestimmtheitsmaß, weswegen der Zusammenhang zwischen Messergebnissen und Konzentration dieser Fettsäuren sehr gut mittels linearem Regressionsmodell beschrieben werden kann.

Bei der Kalibration von Dihydrosterculiasäure wurden die Messwerte der Verdünnungsstufen 1:200 und 1:50 wegen schlechterer Linearität nicht in die Berechnung der Kalibrationsgerade miteinbezogen. Dies ist vermutlich auf die, im Vergleich zu Pristan- und Phytansäure, geringeren gemessenen Intensitäten des zur Quantifizierung verwendeten Massenfragmentes zurückzuführen. Das Bestimmtheitsmaß der Kalibrationsgerade liegt mit 99,58% jedoch noch im akzeptablen Bereich.

11.7. Gaschromatographische Analyse der Proben

11.7.1. Milchproben

Minorfettsäureanalyse

Die durch die massenspektrometrische Analyse erhaltenen Ergebnisse beziehen sich auf das Probenvolumen von 1,2 mL. Um den Gehalt der einzelnen Fettsäuren pro Gramm Fettextrakt zu erhalten wurde die folgende Formel verwendet:

$$w_{FA}[mg/g] = \frac{c_{FA} * V_{Probe}}{c_{Verdünnung}}$$

c_{FA} : Konzentration der Fettsäure in der Probe (Messergebnis)

V_{Probe} : Probenvolumen (1,2 mL)

$c_{Verdünnung}$: Konzentration Fettextrakt in Verdünnung

Die Analyse der Milchproben ergab folgende Ergebnisse:

Tabelle 54: Ergebnisse der Minorfettsäureanalyse der Milchproben

Probe	Pristansäure [mg/g]	Phytansäure [mg/g]	Dihydrosterculiasäure [mg/g]
milfina VM	0,42	2,03	1,36
clever VM	0,40	1,91	1,17
NÖM VM	0,41	2,08	1,33
Spar VM	0,39	1,83	1,06
Ja Bio-VM*	0,54	2,42	1,12
Spar Bio-VM WM	0,50	2,19	1,22
Billa HM	0,50	2,40	1,29
Ja Bio-HM	0,54	2,50	1,27
zzU HM Kitz 04.09	0,46	1,99	1,32
zzU HM Kitz 15.09	0,48	2,00	1,29
zzU HM MV	0,50	2,39	1,30

* Durchschnitt aus Bestimmung der Wiederholbarkeit (5 Messungen)

Im Durchschnitt ergeben sich für Heumilch und Silomilch (einschließlich Bio-Wiesenmilch) folgende Anteile der analysierten Minorfettsäuren:

Tabelle 55: Durchschnittsgehalt & p-Werte der analysierten Minorfettsäuren (Milchproben)

	Silomilch [mg/g]	Heumilch [mg/g]	p-Wert
Pristansäure	0,44	0,50	0,117
Phytansäure	2,05	2,26	0,218
Dihydrosterculiasäure	1,21	1,29	0,151

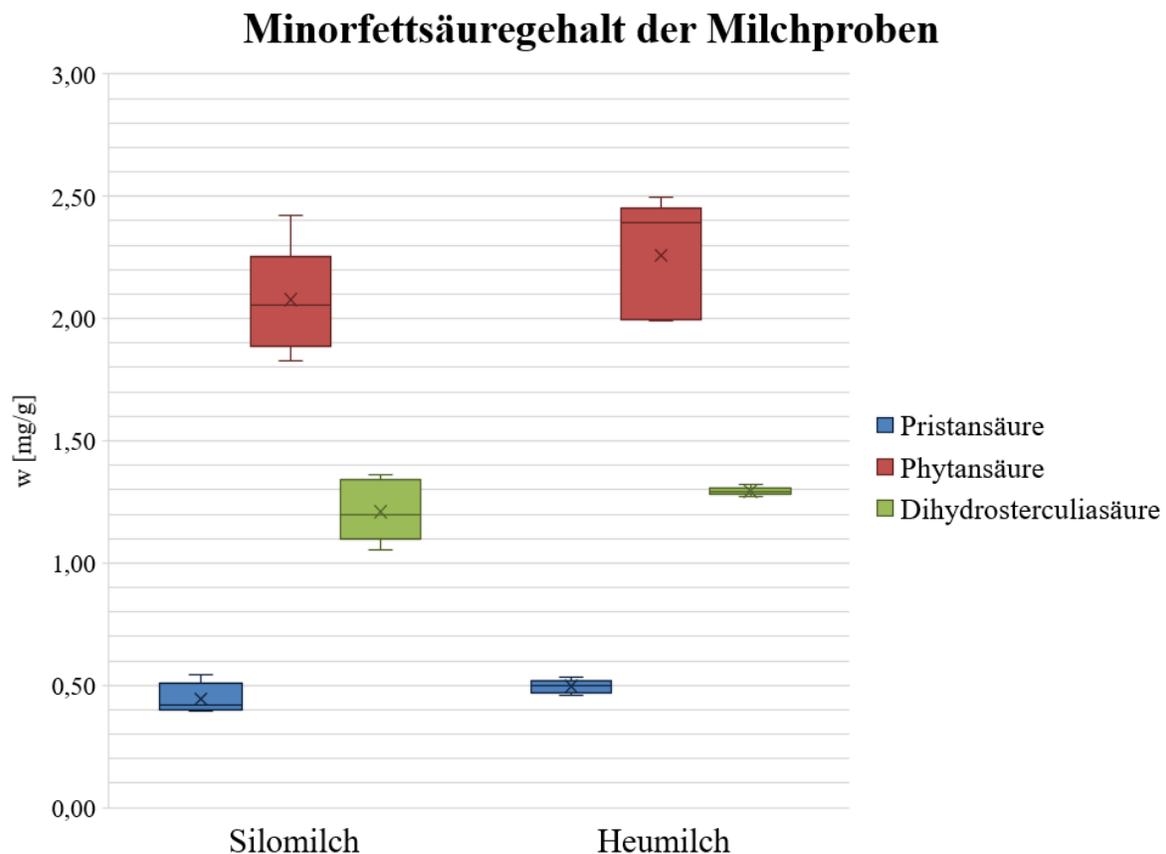


Abbildung 21: Minorfettsäuregehalt der Milchproben

Im Durchschnitt enthielt Heumilch im Vergleich zu Milch, bei der Silagefütterung erlaubt ist, höhere Anteile jeder der drei analysierten Minorfettsäuren. Dabei ist jedoch zu beachten, dass kein expliziter Unterschied anhand der analysierten Minorfettsäuren zwischen Heumilch und Bio- bzw. Wiesenmilch feststellbar war.

Bei keiner der analysierten Minorfettsäuren war der Unterschied zwischen Heumilch und Silomilch statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Der höhere Grünfütteranteil bei der Erzeugung von Heu- und Biomilch, im Vergleich zu konventioneller Milch, führt zu höheren Anteilen von Pristan- und Phytansäure. Der Phytansäuregehalt der Milchproben stimmt mit einer Studie von Capuano et al. (2014), in welcher Phytansäureanteile von 65-328 mg/100 g Milchfett gemessen wurden, größenordnungsmäßig überein. Im Fall von Pristansäure sind die gemessenen Werte höher, stimmen aber mit einer Studie von Vetter & Schröder (2010) überein. Capuano et al. (2014) fanden heraus, dass weniger der Anteil von Pristan- und Phytansäure Auskunft über den Grünfütteranteil gibt, sondern das Diastereomerverhältnis, wobei dies im Zuge dieser Arbeit nicht verfolgt wurde.

Die Ergebnisse für Dihydrosterculiasäure stehen im Widerspruch zu einer Studie von Marseglia et al. (2013), in welcher Cyclopropanfettsäuren in Milch, bei deren Herstellung Silagefütterung verboten ist, nicht nachgewiesen wurden. In Heumilch war der durchschnittliche Gehalt von Dihydrosterculiasäure sogar höher als Milch aus konventioneller Tierhaltung. Eine Unterscheidung zwischen Heumilch und Silomilch war anhand des Gehaltes von Dihydrosterculiasäure somit nicht möglich. Laut Marseglia et al. (2013), lag der Gehalt von Cyclopropanensäuren in Milchproben bei bis zu 0,22%, was mit den gemessenen Werten größenordnungsmäßig übereinstimmt, wobei zu beachten ist, dass neben Dihydrosterculiasäure auch andere Cyclopropanensäuren wie Lactobacillsäure in Milch vorkommen.

Fettsäuremuster

Tabelle 59: Ergebnisse der Fettsäuremuster-Analyse der Milchproben in Prozent

	milfina VM	clever VM	NÖM VM	Spar VM	Ja Bio- VM	Spar Bio- VM WM	Billa HM	Ja Bio- HM	zzU HM Kitz 04.09	zzU HM Kitz 15.09	zzU HM MV
C4:0	4,05	4,48	4,48	4,19	4,07	4,39	4,27	4,32	4,55	4,00	3,90
C6:0	2,66	2,68	2,66	2,72	2,53	2,71	2,55	2,78	2,42	2,41	2,68
C8:0	1,52	1,55	1,64	1,56	1,43	1,47	1,48	1,52	1,28	1,26	1,55
C10:0	3,32	3,44	3,41	3,43	3,03	3,11	3,20	3,18	2,65	2,59	3,32
C11:0	0,36	0,36	0,36	0,38	0,34	0,34	0,35	0,36	0,28	0,29	0,37
C12:0	3,97	4,07	4,66	4,08	3,58	3,75	3,79	3,83	3,16	3,10	3,90
C13:0	0,20	0,19	0,19	0,19	0,17	0,17	0,17	0,17	0,15	0,15	0,18
C14:0	12,16	12,05	12,07	12,17	11,52	11,71	11,97	11,99	10,83	10,81	12,06
C14:1	0,90	0,87	0,89	0,94	0,87	0,90	0,96	0,94	0,79	0,80	0,89
C15:0	1,21	1,18	1,17	1,17	1,29	1,19	1,21	1,18	1,24	1,24	1,27
C16:0	30,42	29,84	30,19	30,75	27,79	28,74	29,15	28,27	25,93	26,09	27,41
C16:1	1,95	1,87	1,89	1,94	1,71	1,70	1,80	1,64	1,65	1,65	1,64
PhA	0,19	0,17	0,18	0,17	0,23	0,21	0,22	0,21	0,17	0,18	0,21
C17:0	0,66	0,65	0,65	0,65	0,68	0,67	0,70	0,68	0,69	0,69	0,69
C17:1	0,22	0,21	0,21	0,22	0,22	0,21	0,22	0,20	0,23	0,23	0,20
C18:0	8,80	9,02	8,65	8,38	9,61	10,16	9,34	8,98	10,29	10,32	9,33
C18:1n9t	0,16	0,20	0,20	0,19	0,22	0,18	0,17	0,16	0,18	0,27	0,17
C18:1n9c	18,66	18,51	18,19	18,13	18,60	18,63	17,90	17,41	19,87	20,18	18,21
C18:2n6c	1,31	1,44	1,39	1,32	1,38	1,32	1,15	1,21	1,42	1,43	1,28
C20:0	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,10	0,10	0,15	0,15	0,11
C18:3n3	0,48	0,49	0,50	0,48	0,78	0,60	0,64	0,84	0,80	0,82	0,85
CLA	0,68	0,61	0,57	0,62	1,24	0,93	1,15	1,26	1,48	1,58	1,32

Aus den gemessenen Fettsäurespektren der Milchproben wurden anschließend die Mittelwerte für Heumilch und Milch, bei der Silagefütterung erlaubt ist, berechnet.

Tabelle 56: Durchschnittswerte in Prozent & p-Werte der Fettsäuremuster-Analyse (Milchproben)

	Silomilch	Heumilch	p-Wert
C4:0	4,28	4,21	0,626
C6:0	2,66	2,57	0,297 ⁱ
C8:0	1,53	1,42	0,164 ⁱ
C10:0	3,29	2,99	0,127 ⁱ
C11:0	0,36	0,33	0,224 ⁱ
C12:0	4,02	3,55	0,074
C13:0	0,19	0,17	0,018
C14:0	11,95	11,53	0,177 ⁱⁱ
C14:1	0,90	0,87	0,596 ⁱ
C15:0	1,20	1,23	0,329
C16:0	29,62	27,37	0,016
C16:1	1,84	1,68	0,017ⁱⁱ
Phytans.	0,19	0,20	0,714
C17:0	0,66	0,69	0,005
C17:1	0,22	0,22	0,953 ⁱ
C18:0	9,10	9,65	0,192
C18:1n9t	0,19	0,19	0,329 ⁱⁱ
C18:1n9c	18,45	18,72	0,931 ⁱⁱ
C18:2n6c	1,36	1,30	0,345 ⁱ
C20:0	0,12	0,12	0,826 ⁱ
C18:3n3	0,55	0,79	0,009ⁱⁱ
CLA	0,78	1,36	0,002
gesättigte FA	69,2	66,0	/
ungesättigte FA	24,3	25,1	/
Einfach ungesättigte FA	21,6	21,7	/
PUFA	2,7	3,4	/

Verglichen mit Silomilch enthielt Heumilch im Durchschnitt eine geringere Menge der meisten gemessenen gesättigten Fettsäuren, wobei der Unterschied bei Palmitinsäure am deutlichsten erkennbar war. Während der Anteil einfach ungesättigter Fettsäuren in

ⁱ Keine Varianzhomogenität (Auswertung mittels Welch-Test)

ⁱⁱ Messwerte nicht normalverteilt (Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test)

Heumilch geringfügig höher als in Silomilch war, enthielt Heumilch geringere Anteile an Myristoleinsäure und Palmitoleinsäure. Der durchschnittliche Gehalt von Linolsäure war in Heumilch niedriger als in Silomilch, während Heumilch höhere Anteile der anderen analysierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthielt. Am deutlichsten ist dieser Unterschied bei konjugierter Linolsäure (CLA) zu erkennen: Während der Durchschnittswert bei Silomilch 0,78% betrug, enthielten die analysierten Heumilchproben durchschnittlich 1,36% CLA.

Das Fettsäuremuster der analysierten Wiesenmilchprobe lässt sich zwischen konventioneller Milch und Heumilch einordnen. Des Weiteren lässt sich erkennen, dass die mittels FID ermittelten Messwerte des Phytansäuregehaltes mit denen der GC-MS-Analyse übereinstimmen.

Bei den analysierten gesättigten Fettsäuren, konnte bei Tridecansäure, Palmitinsäure und Heptadecansäure ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Heumilch und Silomilch festgestellt werden. Außerdem war bei den ungesättigten Fettsäuren Palmitoleinsäure, α -Linolensäure und CLA ein signifikanter Unterschied zwischen Heumilch und Silomilch zu erkennen. Um anhand des Fettsäuremusters Heumilch von Silomilch differenzieren zu können, wäre dabei jedoch ein größerer Stichprobenumfang nötig gewesen, da die analysierte Bio-Milchprobe „Ja Bio-VM“ nicht von den gemessenen Heumilchproben unterschieden werden konnte. Des Weiteren ist das Fettsäuremuster von Milch stark von der Jahreszeit abhängig, da Kühe den Sommer oft auf der Weide verbringen, wodurch eine Unterscheidung verschiedener Milchtypen zusätzlich erschwert wird (Larsen et al., 2014).

11.7.2. Käseproben:

Minorfettsäureanalyse

Tabelle 57: Ergebnisse Minorfettsäureanalysen der Käseproben

Probe	Pristansäure [mg/g]	Phytansäure [mg/g]	Dihydrosterculiasäure [mg/g]
clever Mozzarella	0,38	1,70	1,19
milfina Tilsiter	0,39	1,71	1,10
Milfina HM-Emmentaler	0,36	1,58	1,15
Woerle HM-Emmentaler	0,33	1,37	1,36
Alnatura Parmigiano	0,13	0,31	0,88

Im Vergleich zu Milch enthielten die untersuchten Käseproben rund 30% weniger Pristan- und Phytansäure pro Gramm Fettextrakt, während der Gehalt an Dihydrosterculiasäure annähernd gleich war. Im Gegensatz zu Milch wurde bei den analysierten Heumilchkäseproben weniger Pristan- und Phytansäure als bei den konventionellen Käseproben gemessen. Dies könnte daran liegen, dass im Lauf der Käsereifung Pristan- und Phytansäure abgebaut wird, da deren Anteil bei 24 Monate gereiftem Parmigiano Reggiano im Vergleich zu den anderen kürzer gereiften Käsesorten deutlich geringer war. Des Weiteren wurde im untersuchten Parmigiano Reggiano Dihydrosterculiasäure nachgewiesen, was im Widerspruch zu einer Studie von Caligiani et al. (2016) steht, in welcher keine Cyclopropanfettsäuren in Parmesan gefunden wurden.

Fettsäuremuster

Tabelle 58: Ergebnisse Fettsäuremuster-Analyse der Käseproben in Prozent

	clever Mozzarella	milfina Tilsiter	Milfina HM- Emmentaler	Woerle HM- Emmentaler	Alnatura Parmigiano
C4:0	3,92	3,90	4,87	4,00	3,62
C6:0	2,73	2,68	2,82	2,74	2,55
C8:0	1,56	1,64	1,65	1,62	1,56
C10:0	3,52	3,84	3,63	3,71	3,72
C11:0	0,38	0,41	0,39	0,40	0,43
C12:0	4,22	4,47	4,24	4,44	4,52
C13:0	0,20	0,22	0,19	0,21	0,27
C14:0	12,65	12,64	12,63	13,38	11,61
C14:1	0,89	0,92	0,97	0,99	0,90
C15:0	1,17	1,19	1,24	1,33	1,36
C16:0	30,08	29,95	28,46	30,62	27,29
C16:1	1,90	1,80	1,73	1,85	1,66
PhA	0,15	0,15	0,14	0,12	0,03
C17:0	0,63	0,63	0,71	0,74	0,77
C17:1	0,22	0,19	0,20	0,22	0,22
C18:0	8,70	8,56	8,76	7,54	10,04
C18:1n9t	0,16	0,16	0,16	0,16	0,19
C18:1n9c	18,17	17,41	16,82	15,74	18,89
C18:2n6c	1,35	1,37	1,25	1,24	2,83
C20:0	0,12	0,12	0,11	0,11	0,14
C18:3n3	0,45	0,47	0,67	0,77	0,47
CLA	0,51	0,52	1,05	0,81	0,29
gesättigte FA	69,92	70,41	69,85	70,98	67,91
ungesättigte FA	23,65	22,84	22,86	21,79	25,45
einfach ungesättigte FA	21,34	20,48	19,88	18,97	21,86
PUFA	2,31	2,36	2,97	2,82	3,59

Wie bei den analysierten Milchproben, enthielten die Käseproben, bei deren Herstellung die Verfütterung von Silage verboten ist, einen höheren Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Der Anteil ungesättigter- und gesättigter Fettsäuren schwankte je nach Käsesorte, wobei keine eindeutigen Unterschiede zwischen Heumilchkäse und Käse aus Silomilch erkennbar waren.

Sämtliche Heumilchkäseproben enthielten höhere Anteile an Pentadecansäure und Heptadecansäure, während der Anteil an Phytansäure niedriger als in Käseproben aus Silomilch war. Analog zu den analysierten Milchproben stimmen die mittels Flammenionisationsdetektor ermittelten Phytansäurewerte mit den Messwerten der GC-MS-Analyse überein.

Auf eine statistische Auswertung der Messergebnisse der Käseproben wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

11.8. Validierung

11.8.1. Wiederholbarkeit

Tabelle 59: Ergebnisse der Wiederholbarkeit

Messung	Pristansäure [mg/g]	Phytansäure [mg/g]	Dihydrosterculiasäure [mg/g]
1	0,54	2,45	1,03
2	0,55	2,43	1,12
3	0,52	2,38	1,01
4	0,56	2,47	1,21
5	0,55	2,39	1,21
Mittelwert	0,54	2,42	1,12
Standardabweichung	0,014	0,038	0,098
Relative Standardabweichung	2,6%	1,6%	8,8%

Bei allen analysierten Fettsäuren liegt die relative Standardabweichung weit unter dem, von der U.S. Food & Drug Administration (FDA), für chromatographische Methoden empfohlenen Grenzwert von $\pm 15\%$ (FDA, 2018). Während bei Pristan- und Phytansäure die relative Standardabweichung unter 3% liegt, beträgt diese bei Dihydrosterculiasäure fast 9%. Ein möglicher Grund dafür ist, dass das zur Quantifizierung von Dihydrosterculiasäure verwendete Massenfragment, im Gegensatz zu Pristan- und Phytansäure, nicht das Massenfragment mit dem verhältnismäßig größten Anteil am Gesamtspektrum war.

11.8.2. Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die Berechnung der Signal-Rausch-Verhältnisse erfolgte mittels folgender Formel:

$$S/N = \frac{2 * H}{h}$$

H: Peakhöhe ($=\Delta I_{\text{Peak}}$; gemessen von Mitte der Basislinie)

h: maximales Signalrauschen ($=\Delta I_{\text{Basislinie}}$)

In die Auswertung wurden Verdünnungen, bei denen S/N größer 100 war, nicht miteinbezogen. Das Gleiche gilt für Verdünnungen, bei denen keine Peaks zu sehen waren.

Die Auswertung ist in den folgenden Tabellen einsehbar:

Tabelle 60: Berechnung von LOD und LOQ für Pristansäure

Pristansäure				
Verdünnung	1:4000	1:2000	1:1000	1:200
c [µg/mL]	0,011	0,022	0,108	0,433
ΔI_{Peak}	123	212	477	1459
ΔI_{Basislinie}	136	114	91	72
S/N	1,8	3,7	10,5	40,8
Geradengleichung	$c = 0,00266 \times S/N - 0,00122$			
LOD	6,8 ng/mL			
LOQ	25,4 ng/mL			

Tabelle 61: Berechnung von LOD und LOQ für Phytansäure

Phytansäure				
Verdünnung	1:10000	1:4000	1:2000	1:1000
c [µg/mL]	0,010	0,025	0,050	0,101
ΔI_{Peak}	697	978	2674	8340
ΔI_{Basislinie}	181	137	181	129
S/N	4,1	7,7	14,3	29,5
Geradengleichung	$c = 0,00352 \times S/N - 0,00247$			
LOD	8,1 ng/mL			
LOQ	32,7 ng/mL			

Tabelle 62: Berechnung von LOD und LOQ für Dihydrosterculiasäure

Dihydrosterculiasäure					
Verdünnung	1:1000	1:200	1:50	1:10	1:5
c [µg/mL]	0,025	0,124	0,495	2,475	4,950
ΔI_{Peak}	77	159	523	3143	4891
ΔI_{Basislinie}	114	134	141	149	154
S/N	1,4	2,4	7,4	42,2	63,5
Geradengleichung	$c = 0,0745 \times S/N - 0,1265$				
LOD	97 ng/mL				
LOQ	619 ng/mL				

Für die Analyten ergeben sich somit die folgenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen:

Tabelle 63: Zusammenfassung der Ergebnisse für LOD und LOQ

	Pristansäure	Phytansäure	Dihydrosterculiasäure
Nachweisgrenze [ng/mL]	6,8	8,1	97
Bestimmungsgrenze [ng/mL]	25,4	32,7	619

Für sämtliche Analyten ergeben sich Bestimmungs- und Nachweisgrenzen im Nanogrammbereich, wobei diese bei Pristan- und Phytansäure deutlich niedriger sind als bei Dihydrosterculiasäure. Dies liegt daran, dass das zur Bestimmung von Dihydrosterculiasäure verwendete Massenfragment, im Vergleich zu ähnlichen Konzentrationen der anderen Analyten, mit niedrigerer Intensität vorliegt.

Obwohl theoretisch zwar Konzentrationen im zweistelligen Nanogrammbereich gemessen werden können, wurde die Methode für den Konzentrationsbereich dieser Fettsäuren in Milch kalibriert. Dies führte dazu, dass aufgrund des Achsenabschnittes der Kalibrationsgerade bei solch geringen Konzentrationen große Schwankungen zwischen den berechneten Konzentrationen der Verdünnungsstufe und den mittels Methode ermittelten Messwerten auftreten. Daher wäre es sinnvoller, die höchste zur Kalibration verwendete Verdünnungsstufe als Bestimmungsgrenze zu wählen.

12. Schlussfolgerungen

Durch den eigens synthetisierten internen Standard 10,11-Dichloro-Undecansäuremethylester wurde eine Bestimmung von Pristan-, Phytan- und Dihydrosterculiasäure in Milch- und Käseproben, mittels GC-MS ermöglicht, da 10,11-Dichloro-Undecansäure nicht in Milchfett vorkommt. Pristan- und Phytansäure konnten erfolgreich mittels Harnstoff-Extraktiv-Kristallisation von Butterschmalz angereichert werden, wodurch für die Kalibration der Methode bei diesen Fettsäuren nicht auf teure Standards zurückgegriffen werden musste. Für Pristan- und Phytansäure lag die relative Standardabweichung der Methode unter 3%, während diese für Dihydrosterculiasäure mit 8,8% deutlich höher war.

Beim Vergleich von Heumilch mit Silomilch enthielten Heumilchproben höhere Anteile aller drei analysierten Minorfettsäuren, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu wurden in Heumilchkäse und Parmesan, im Vergleich zu konventionellen Käseproben, geringe Mengen der analysierten Minorfettsäuren gemessen. Entgegen anderer Studien wurde Dihydrosterculiasäure in Milch- und Käseproben, bei deren Herstellung die Verfütterung von Silage verboten ist, nachgewiesen, wobei der Nachweis durch Vergleich mit analytischem Standard erfolgte.

Um eventuelle Unterschiede der Anteile anderer Fettsäuren zu untersuchen, wurden die Fettsäuremuster sämtlicher Proben, mittels GC-FID bestimmt. Dabei enthielten Heumilchproben verglichen mit Silomilch durchschnittlich höhere Anteile ungesättigter Fettsäuren und geringere Anteile gesättigter Fettsäuren. Signifikante Unterschiede zwischen Heumilch und Silomilch konnten bei Tridecansäure, Palmitinsäure, Heptadecansäure, Palimtoleinsäure, α -Linolensäure und CLA festgestellt werden. Heumilchkäse und Parmesan enthielten, verglichen mit konventionellen Käseproben, höhere Mengen mehrfach ungesättigter Fettsäuren, Pentadecansäure und Heptadecansäure. Beim Vergleich der gemessenen Phytansäurewerte zeigte sich eine Übereinstimmung zwischen der Analyse mittels GC-MS und GC-FID.

Da das Fettsäuremuster von Milch im Laufe des Jahres deutlichen Schwankungen ausgesetzt ist, wäre für eine genaue Differenzierung zwischen Heumilch und Silomilch ein größerer Stichprobenumfang, mit Proben über das ganze Jahr verteilt, notwendig. Dabei ist

besonders auf eine deutliche Unterscheidung von Heumilch und gewöhnlicher Biomilch zu achten.

Anhand des Gehaltes von Pristan-, Phytan- und Dihydrosterculiasäure konnte Heumilch nicht eindeutig von Silomilch unterschieden werden. Um dies zu erreichen, könnte die Analyse anderer Cyclopropansäuren, wie Lactobacillsäure, oder des Diastereomerenverhältnis der Minorfettsäuren weiterverfolgt werden. Durch die weniger aufwendige Analyse von α -Linolensäure und CLA könnten außerdem Heumilch und Biomilch von konventioneller Milch unterschieden werden.

13. Literaturverzeichnis

- Amores, G., & Virto, M. (2019). Total and free fatty acids analysis in milk and dairy fat. *Separations*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/separations6010014>
- ARGE Bio-Wiesenschmelz. (2020). *Bio-Wiesenschmelz*. www.biowiesenschmelz.at
- ARGE Heumilch Österreich. (o. J.). *ARGE Heumilch*. Abgerufen 31. März 2020, von www.heumilch.com/heumilch/die-arge-heumilch/
- ARGE Heumilch Österreich. (2018). *Österreichisches Heumilchregulativ - Vorschriften für silofreie Milch*. November. http://www.heumilch.at/wp-content/uploads/2017/05/Heumilchregulativ_01_2018.pdf
- Baltes, W., & Matissek, R. (2011). *Lebensmittelchemie* (7. Auflage). Springer Berlin Heidelberg.
- Bannon, C. D., Breen, G. J., Craske, J. D., Hai, N. T., Harper, N. L., & O'Rourke, K. L. (1982). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. III. Literature review of and investigations into the development of rapid procedures for the methoxide-catalysed methanolysis of fats and oils. *Journal of Chromatography A*, 247(1), 71–89. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)84857-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)84857-8)
- Bannon, C. D., Craske, J. D., & Hilliker, A. E. (1985). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. IV. Fats with fatty acids containing four or more carbon atoms. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(10), 1501–1507. <https://doi.org/10.1007/BF02541903>
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2008). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (6. Auflage). Springer Berlin Heidelberg.
- Berdeaux, O., Gregoire, S., Fournier, C., Christie, W. W., Lambelet, P., & Sébédio, J. L. (2010). Detection of lactobacillic acid in low erucic rapeseed oil - A note of caution when quantifying cyclic fatty acid monomers in vegetable oils. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(7), 698–702. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.07.002>
- Bio Austria. (2015). *Richtlinienvergleich BIO AUSTRIA – EU-Bio-Verordnung* (S. 1–5). https://www.bio-austria.at/app/uploads/17-03-Rili_Vgl_BA_EU.pdf

- Blumberg, L. M. (2012). Theory of Gas Chromatography. In *Gas Chromatography*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00002-X>
- BMNT. (2019). *Grüner Bericht 2019 - Die Situation der österreichischen Land- und Forstwirtschaft*. <https://gruenerbericht.at/cm4/jdownload/download/2-gr-bericht-terreich/2007-gb2019>
- Bobé, G., Zhang, Z., Kopp, R., Garzotto, M., Shannon, J., & Takata, Y. (2020). Phytol and its metabolites phytanic and pristanic acids for risk of cancer: current evidence and future directions. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 29(2), 191–200. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000534>
- Buxton, D. R., Muck, R. E., Harrison, J. H., Buxton, D. R., Muck, R. E., & Harrison, J. H. (2003). *Silage science and technology*. American Society of Agronomy : Crop Science Society of America : Soil Science Society of America,. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780891182344>
- Caligiani, A., Marseglia, A., & Palla, G. (2014). An overview on the presence of cyclopropane fatty acids in milk and dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31), 7828–7832. <https://doi.org/10.1021/jf4057204>
- Caligiani, A., Nocetti, M., Lolli, V., Marseglia, A., & Palla, G. (2016). Development of a Quantitative GC-MS Method for the Detection of Cyclopropane Fatty Acids in Cheese as New Molecular Markers for Parmigiano Reggiano Authentication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(20), 4158–4164. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00913>
- Capuano, E., Elgersma, A., Tres, A., & van Ruth, S. M. (2014). Phytanic and pristanic acid content in Dutch farm milk and implications for the verification of the farming management system. *International Dairy Journal*, 35(1), 21–24. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.003>
- Christie, W. W. (1993). *Advances in Lipid Methodology — Two* (W. W. Christie (Hrsg.); Bd. 2). PJ Barnes & Associates.
- Christie, W. W. (2003). *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural*

Analysis of Lipids (Third Edit). PJ Barnes & Associates.

Christie, W. W. (2020a). *A Beginner's Guide to Mass Spectrometry of Fatty Acids; Part 1. Methyl Esters*. www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/basics/ms-begin-1/index.htm

Christie, W. W. (2020b). *Mass Spectrometry of Methyl Esters Saturated Branched-Chain Fatty Acids*.
www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=ms/methesters/me-0dbbr/index.htm

Christie, W. W., & Holman, R. T. (1966). Mass spectrometry of lipids. I. Cyclopropane fatty acid esters. *Lipids*, *1*(3), 176–182. <https://doi.org/10.1007/BF02531869>

Christopherson, S. W., & Glass, R. L. (1969). Preparation of Milk Fat Methyl Esters by Alcoholysis in an Essentially Nonalcoholic Solution. *Journal of Dairy Science*, *52*(8), 1289–1290. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86739-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86739-1)

Cruz-Hernandez, C., & Destailats, F. (2012). Analysis of Lipids by Gas Chromatography. In *Gas Chromatography* (S. 529–544). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00023-7>

Verordnung (EG) Nr. 889/2008 Der Kommission, L 250 Amtsblatt der Europäischen Union L250/1 1 (2008). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32008R0889:DE:NOT>

Verordnung (EG). Juni Nr. 834/2007 Des Rates, 2007 Amtsblatt der Europäischen Union L 189/1 23 (2007). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:189:0001:0023:DE:PDF>

FDA. (2018). *Bioanalytical Method Validation; Guidance for Industry*. (Nummer May, S. 1–41). <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

Gaydou, E. M., Ralaimanarivo, A., & Bianchini, J. P. (1993). Cyclopropanoic Fatty Acids of Litchi (*Litchi chinensis*) Seed Oil. A Reinvestigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(6), 886–890. <https://doi.org/10.1021/jf00030a009>

- Gehrke, C. W., & Leimer, K. (1970). Trimethylsilylation of amino acids: Effect of solvents on derivatization using bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. *Journal of Chromatography A*, 53(2), 201–208. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)98459-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)98459-6)
- Gesundheitsministerium. (2017). Österreichisches Lebensmittelbuch. *Österreichisches Lebensmittelbuch*, B30.
- Gey, M. H. (2008). Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. In *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik* (2. Auflage). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-73804-6>
- Gresti, J., Bugaut, M., Maniongui, C., & Bezard, J. (1993). Composition of Molecular Species of Triacylglycerols in Bovine Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, 76(7), 1850–1869. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(93\)77518-9](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(93)77518-9)
- Grogan, D. W., & Cronan, J. E. (1997). Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(4), 429–441. <https://doi.org/10.1128/.61.4.429-441.1997>
- Hallaq, Y., Becker, T. C., Manno, C. S., & Laposata, M. (1993). Use of acetyl chloride/methanol for assumed selective methylation of plasma nonesterified fatty acids results in significant methylation of esterified fatty acids. *Lipids*, 28(4), 355–360. <https://doi.org/10.1007/BF02536323>
- Harvey, D. J. (1998). Picolinyl esters for the structural determination of fatty acids by GC/MS. *Molecular Biotechnology*, 10(3), 251–260. <https://doi.org/10.1007/BF02740846>
- Hofmann, K., & Lucas, R. A. (1950). THE CHEMICAL NATURE OF A UNIQUE FATTY ACID. *Journal of the American Chemical Society*, 72(9), 4328–4329. <https://doi.org/10.1021/ja01165a560>
- Ichihara, K., Kohsaka, C., Tomari, N., Yamamoto, Y., & Masumura, T. (2020). Determination of free fatty acids in plasma by gas chromatography. *Analytical Biochemistry*, 603(June), 113810. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113810>

- Ja! Natürlich. (2019). *Österreichs höchster Milchstandard*.
<https://www.janatuerlich.at/magazin/bio-heumilch-heublumenmilch-kaese-unterschiede/>
- Kashutina, M. V, Ioffe, S. L., & Tartakovskii, V. A. (1975). Silylation of Organic Compounds. *Russian Chemical Reviews*, 44(9), 733–747.
<https://doi.org/10.1070/rc1975v044n09abeh002373>
- Klee, M. S. (2012). Detectors. In *Gas Chromatography*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00012-2>
- Kramer, J. K. G., Fellner, V., Dugan, M. E. R., Sauer, F. D., Mossoba, M. M., & Yurawecz, M. P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids*, 32(11), 1219–1228. <https://doi.org/10.1007/s11745-997-0156-3>
- La Nasa, J., Modugno, F., Aloisi, M., Lluveras-Tenorio, A., & Bonaduce, I. (2018). Development of a GC/MS method for the qualitative and quantitative analysis of mixtures of free fatty acids and metal soaps in paint samples. *Analytica Chimica Acta*, 1001, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.017>
- Larsen, M. K., Andersen, K. K., Kaufmann, N., & Wiking, L. (2014). Seasonal variation in the composition and melting behavior of milk fat. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 4703–4712. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7858>
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1988). Specific methylation of plasma nonesterified fatty acids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*, 29(2), 227–235.
<http://www.jlr.org/content/29/2/227.abstract>
- Lough, A. K. (1975). The chemistry and biochemistry of phytanic, pristanic and related acids. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, 14, 1–48.
[https://doi.org/10.1016/0079-6832\(75\)90001-4](https://doi.org/10.1016/0079-6832(75)90001-4)
- Marseglia, A., Caligiani, A., Comino, L., Righi, F., Quarantelli, A., & Palla, G. (2013). Cyclopropyl and ω -cyclohexyl fatty acids as quality markers of cow milk and cheese. *Food Chemistry*, 140(4), 711–716. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.029>

- Märtlbauer, E., & Becker, H. (Hrsg.). (2016). *Milchkunde und Milchhygiene* /
Erwin Märtlbauer, Heinz Becker (Hg.). Verlag Eugen Ulmer.
- Mihalik, S. J., Morrell, J. C., Kim, D., Sacksteder, K. A., Watkins, P. A., & Gould, S. J. (1997). Identification of pahx, a refsum disease gene. *Nature Genetics*, 17(2), 189. <https://doi.org/10.1038/ng1097-185>
- Patton, S., & Benson, A. A. (1966). Phytol metabolism in the bovine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 125(1), 22–32. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(66\)90140-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(66)90140-8)
- Poole, C. F. (2012). *Gas chromatography* (First edit). Elsevier., <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&AN=465005>
- Schreiner, M., & Hulan, H. W. (2004). Determination of the carbon deficiency in the flame ionization detector response of long-chain fatty acid methyl esters and dicarboxylic acid dimethyl esters. *Journal of Chromatography A*, 1045(1–2), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.038>
- Schröder, M., & Vetter, W. (2011). GC/EI-MS determination of the diastereomer distribution of phytanic acid in food samples. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 341–349. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1682-y>
- Thermo Scientific. (2008a). *INSTRUCTIONS BSTFA* (S. 1–4).
- Thermo Scientific. (2008b). *INSTRUCTIONS BSTFA + TMCS* (S. 1–7).
- Thurnhofer, S., Lehnert, K., & Vetter, W. (2008). Exclusive quantification of methyl-branched fatty acids and minor 18:1-isomers in foodstuff by GC/MS in the SIM mode using 10,11- dichloroundecanoic acid and fatty acid ethyl esters as internal standards. *European Food Research and Technology*, 226(5), 975–983. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0619-7>
- Tserng, K. Y., Kliegman, R. M., Miettinen, E. L., & Kalhan, S. C. (1981). A rapid, simple, and sensitive procedure for the determination of free fatty acids in plasma using glass capillary column gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, 22(5), 852–

858. <http://www.jlr.org/content/22/5/852.abstract>

- Ulberth, F., Gabernig, R. G., & Schrammel, F. (1999). Flame-Ionization Detector Response to Methyl, Ethyl, Propyl, and Butyl Esters of Fatty Acids. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(2), 263–266. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0228-7>
- United States Pharmacopeial Convention. (2012). *U.S. Pharmacopeial 37. Chapter (1225) Validation of Compendial Procedures* (S. 877–882).
- Verhoeven, N. M., & Jakobs, C. (2001). Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. *Progress in Lipid Research*, 40(6), 453–466. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00011-X)
- Vetter, W., & Schröder, M. (2010). Concentrations of phytanic acid and pristanic acid are higher in organic than in conventional dairy products from the German market. *Food Chemistry*, 119(2), 746–752. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.027>
- Wan, P. J., Dowd, M. K., Thomas, A. E., & Butler, B. H. (2007). Trimethylsilyl derivatization/gas chromatography as a method to determine the free fatty acid content of vegetable oils. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(8), 701–708. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1101-1>
- Zavaglia, A. G., Disalvo, E. A., & De Antoni, G. L. (2000). Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli. *Journal of Dairy Research*, 67(2), 241–247. <https://doi.org/10.1017/S0022029900004179>
- Zeng, A. X., Chin, S. T., Nolvachai, Y., Kulsing, C., Sidisky, L. M., & Marriott, P. J. (2013). Characterisation of capillary ionic liquid columns for gas chromatography-mass spectrometry analysis of fatty acid methyl esters. *Analytica Chimica Acta*, 803, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.002>