

## Notat

2. maj 2011  
Projektnr. 2000208  
KIJ/LHAN

### Kvantificering af FAME - "intern standard" metode

Kirsten Jensen

#### *Baggrund*

Ved afrapportering af resultater fra fedtsyreanalyser har der på DMRI været tradition for at anvende "areal procent" metoden, der angiver de relative værdier. I forbindelse med indførelse af en afgift på mættet fedt fra 1. oktober 2011 vil der fremover også være behov for at kende absolutte værdier. Kvantificering af fedtsyreindholdet som absolutte værdier kan fastlægges ved "intern standard" metoden.

For at få klarlagt de kritiske punkter i analyse- og beregningsproceduren er der gennemført en række indledende undersøgelser. De beslutninger, der er truffet undervejs i forløbet, samt de uafklarede spørgsmål, der er opstået, er beskrevet i det følgende.

#### *Fastlæggelse af fedtsyreprofil*

Fedtsyreprofilen fastlægges ud fra DMRI's standardreferenceblanding. Det kan være hensigtsmæssigt at opdele metoden efter de tre primære kødtyper: svinekød, oksekød og kyllingekød, da de har forskellige fedtsyreprofiler. Passende kommercielle standardreferenceblandinger kan indkøbes hos f.eks. Nu-check-prep.

#### *Intern standard*

For at korrigere for tab under transesterificeringen af triglycerider til methylestre tilsættes en intern standard til den afvejede mængde ekstraheret fedt. Sædvanligvis er baggrunden for valg af en passende intern standard, at den repræsenterer de væsentligste fedtsyrer i den pågældende fedtsyreprofil, og at den ikke er til stede i prøven i forvejen. Den interne standard kan tilsættes som triglycerid, methylester eller fedtsyre. Det frarådes dog at anvende de kortere fedtsyrer, da de er delvist vandopløselige [2].

I en AOAC metode til fødevarer anvendes C:11 [5], mens Fødevarestyrelsen anvender C17:0 til alle prøvetyper [6]. Ved analyse af fisk og andre havdyr, der har en stor andel af langkædede fedtsyrer, anvendes C21:0 [3] eller C23:0 [4].

På DMRI er der identificeret mindre mængder af C17:0 i svine- og kyllingekød. For at få en ide om effekten af at anvende C23:0 i stedet for C17:0 er der kørt et mindre forsøg til sammenligning af de to standarder. Der var ikke umiddelbart forskel på resultaterne, men da materialet var sparsomt, kan der ikke drages en endelig konklusion.

Såfremt Fødevarestyrelsen fastsætter, at C17:0 skal anvendes som intern standard som en forudsætning for, at data kan indgå i fødevaredatabasen

Foodcomp, må det forventes, at det afklares, hvorvidt det naturlige indhold af C17:0 påvirker resultatet af kvantificeringen signifikant.

Under databehandlingen blev det synliggjort, at omstændighederne ved tilsætning af intern standard har afgørende betydning for kvantificeringen. Det er bl.a. vigtigt, at vials med intern standard ikke har været åbnet for mange gange, og at der er en tilstrækkelig mængde til rådighed ved afpipetteringen.

#### **Opfølgning**

***Det er uafklaret, hvilken intern standard der skal anvendes fremover.***

***Der skal udarbejdes procedure for tilsætning af intern standard til prøven, så risikoen for kvantificeringsfejl minimeres.***

#### **Responsfaktorer**

Teoretisk set er arealerne under toppene i kromatogrammet proportionale med vægtmængden af de enkelte fedtsyrer, der eluerer fra kolonnen. En række tekniske forhold kan imidlertid medføre, at teori og praksis ikke altid stemmer overens. Der korrigeres derfor sædvanligvis med responsfaktorer, der fastlægges ud fra signalværdien for en given mængde af de enkelte fedtsyrer, der indgår i kvantificeringen.

Responsfaktorer anvendes ikke konsistent. Et sted beskrives, at såfremt responsfaktorerne ligger mellem 0,95 og 1,05, sættes de til 1, ellers anvendes den aktuelle responsfaktor [7]. Andre baserer beregningerne på teoretiske korrektionsfaktorer. Det anføres, at i de tilfælde, hvor der er store afvigelser fra de teoretiske værdier (>5%), skal årsagen til afvigelsen findes frem for at anvende de eksperimentelt bestemte faktorer [8].

De responsfaktorer, der blev fundet i de indledende undersøgelser, fremgår af bilag 1. Der var usikkerhed omkring, hvorfor de eksperimentelt bestemte responsfaktorer lå så langt fra de teoretiske værdier. Et bud var, at de anførte mængder i standardreferenceblandingen måske ikke var tilstrækkeligt præcist angivet. Denne teori blev dog afvist efter en sammenligning med eksperimentelt bestemte responsfaktorer fra et tidligere forsøg, hvor de enkelte komponenter var afvejet enkeltvis. Her blev der heller ikke fundet overensstemmelse med de teoretiske værdier, mens der blev set ligheder imellem de to uafhængige bestemmelser, jf. figur 1 og 2 i bilag 1. Der er p.t. ikke noget bud på, hvorfor virkeligheden ligger så langt fra teorien.

#### **Opfølgning**

***Det er uafklaret, hvorfor de eksperimentelt bestemte responsfaktorer ikke følger de teoretiske værdier.***

***Det er uafklaret, hvordan der skal korrigeres med responsfaktorer.***

#### **Kvantificering**

Kvantificeringen foretages i forhold til responsfaktorer og indholdet af intern standard. Da fedtfraktionen kan indeholde kulhydrater, langkædede alkoholer og steroler [1], ligesom skelettet fra triglyceriderne vil være tilbage efter for-sæbning, vil andelen af fedtsyrer være mindre end 100%.

*Autooxidation* Polyumættede fedtsyrer autooxiderer meget nemt i atmosfærisk luft. Der er forskellige muligheder for at begrænse omfanget, bl.a. ved at erstatte ilt med nitrogen, hvor det er muligt, se f.eks. [1]. For at bevare fortyndinger af de interne standarder bedst muligt, kan n-heptanen tilsættes 50 mg/L BHT.

**Opfølgning** ***Der skal udarbejdes procedure, så risikoen for autooxidation af polyumættede fedtsyrer minimeres.***

*Holdbarhed, BF<sub>3</sub>-methanol reagens* DMRI har ikke tidligere været opmærksom på, at BF<sub>3</sub>-methanol reagens har en begrænset holdbarhed, selv hvis det opbevares i køleskab. Anvendelse af for gammelt eller for opkoncentreret reagens kan medføre fejl og tab af betragtelige mængder af de polyumættede fedtsyrer cf. [9].

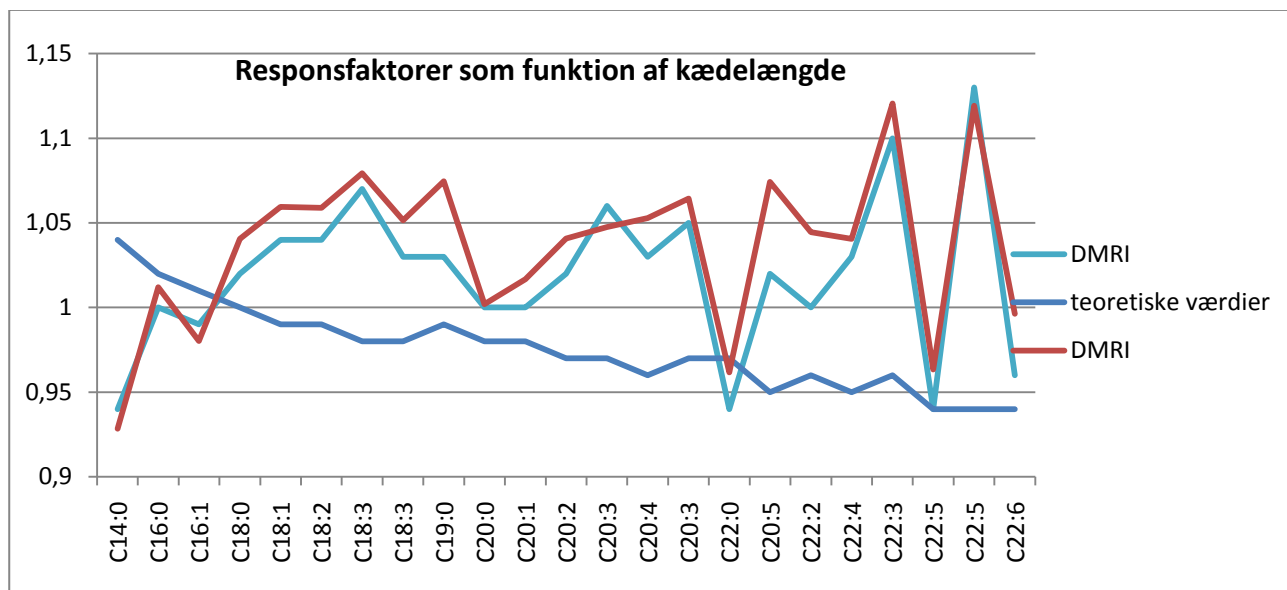
**Opfølgning** ***Opbevaringsforhold samt holdbarhedstid skal fastlægges for BF<sub>3</sub>-methanol reagens.***

*Resultater fra præstationsprøve* Som led i kvalitetssikringen af den afprøvede kvantificeringsmetode blev der analyseret en referenceprøve fra FAPAS (T1490, marts 2011). Resultaterne herfra var tilfredsstillende jf. bilag 2, der viser gennemsnit af en dobbeltbestemmelse.

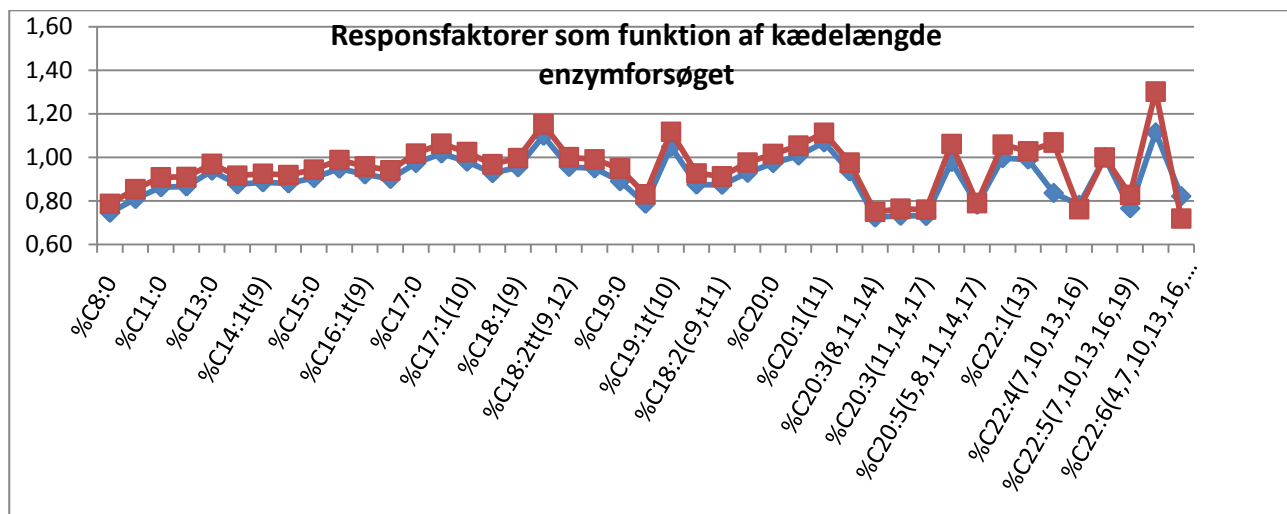
## Referencer

- 1] Lipid analysis. Isolation, separation, identification and lipidomic analysis. William W. Christie and Xianlin Han. Fourth edition. The Oily Press. 2010.
- 2] Per Møller, DTU Fødevarerinstitutionen. Personlig meddelelse.
- 3] Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry. Lipids, vol. 40, no. 4. 2005.
- 4] Fremstilling af fedtsyremethylestre (FAME) FF-Analyseforskrift nr. 108.05. FF, DFU afd. for Fiskeindustriell Forskning. 1984.
- 5] AOAC official method 996.06. Fat (Total, saturated, and unsaturated) in Foods. 41.1.28A. 2002 AOAC International.
- 6] Kirsten Skovmann Hansen, Fødevarestyrelsen. Personlig meddelelse.
- 7] Hansen & Leth. Fødevarestyrelsen. Overvågning af margarine. 2000.
- 8] Fatty acid composition of marine oils by GLC. AOCS official method, Ce 1b-89A. 2009.
- 9] Preparation of methyl esters of fatty acids. AOCS official method Ce 2-66. 2009.

## Bilag 1. Responsfaktorer



Figur 1



Figur 2

**Bilag 2. Resultater fra analyse af referenceprøve fra FAPAS**



The Food and Environment Research Agency  
 Sand Hutton, York, YO41 1LZ  
 Tel: +44 (0)1904 462100 Fax: +44(0)1904 462040  
 testmaterials@fapas.com www.fapas.com

**FAPAS® TEST MATERIAL SPECIFICATION SHEET T1490**  
 T 0172

<b>Reference Number</b>	<b>T1490</b>
<b>Description of Test Material</b>	<b>Oil</b>
<b>Weight / Volume of Contents</b>	30 mL
<b>Storage Instructions</b>	-20°C
<b>Date of Analysis</b>	Jul 2010 - Aug 2010
<b>Available Until †</b>	10 Mar 2012

Analyte	Units	Assigned Value (X)	Satisfactory Range	No. of labs producing X
Saturates	g/100g of sample	39.1	36.8 - 41.5	84
Mono-unsaturates	g/100g of sample	36.0	33.8 - 38.2	84
Poly-unsaturates	g/100g of sample	19.0	17.1 - 20.9	84
Total Trans Fatty Acids	g/100g of sample	0.394	0.134 - 0.654	66
Linoleic Acid (C18:2 n-6)	g/100g of sample	8.35	7.52 - 9.19	81
alpha Linolenic Acid (ALA, C18:3 n-3)	g/100g of sample	0.216	0.168 - 0.263	80
Arachidonic Acid (ARA, C20:4 n-6)	g/100g of sample	4.22	3.80 - 4.65	71
Eicosapentaenoic Acid (EPA, C20:5 n-3)	g/100g of sample	1.08	0.98 - 1.19	79
Docosahexaenoic Acid (DHA, C22:6 n-3)	g/100g of sample	4.27	3.84 - 4.69	78
Palmitic Acid (C16:0)	g/100g of sample	32.2	30.2 - 34.1	79
Stearic Acid (C18:0)	g/100g of sample	4.66	4.19 - 5.13	79
Oleic Acid (C18:1(n9)cis)	g/100g of sample	34.3	32.2 - 36.3	79
Docosapentaenoic Acid (DPA) (C22:5 (n-6) cis)	g/100g of sample	0.212	0.165 - 0.259	37

DMRI
36,5
34,3
17,6
8,15
0,222
4,05
1,04
3,86
32,0
4,53
32,9
0,26

**Comments:**  
 You may use any method of analysis you wish.