



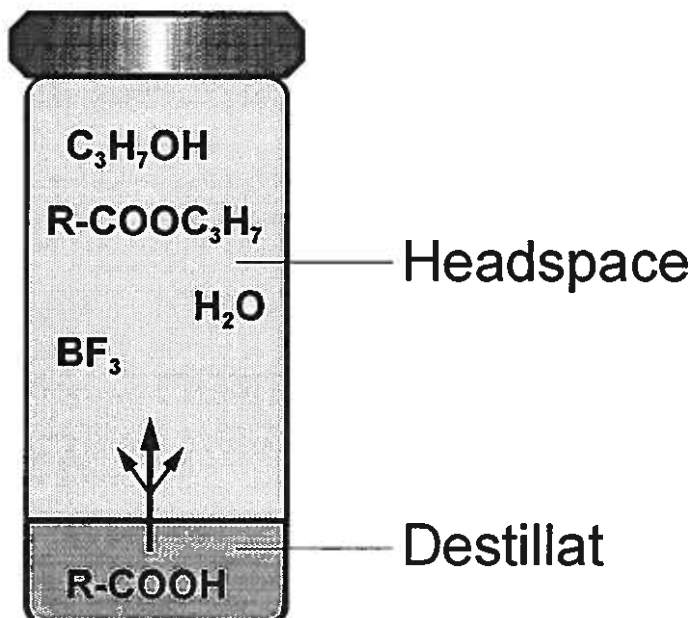
— INFORMATION

Juni 1993 / 272 W
Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft
Sektion Chemie

CH-3097 Liebefeld-Bern

Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren in Käse aus dem Wasserdampfdestillat mit "Headspace - GC/FID"

R. Badertscher
A. Liniger
G. Steiger



Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren in Käse aus dem Wasserdampfdestillat mit "Headspace - GC/FID"

Methodenbeschreibung und Vergleich mit der herkömmlichen Routine-Methode

1 Einleitung

Die flüchtigen Fettsäuren gestatten eine Beurteilung der Gärungsvorgänge im reifenden Käse und sind eine wertvolle Hilfe bei der Suche nach den Ursachen von Käsefehlern. Nach der herkömmlichen Methode (1) werden die flüchtigen Fettsäuren durch Wasserdampfdestillation aus schwefelsaurem Milieu freigesetzt und mittels visueller Titration (Indikator Phenolphthalein) den Gesamtgehalt ermittelt. Danach wird die übertitrierte Lösung vollständig eingedampft und durch Verreiben mit Kaliumhydrogensulfat in Diethylether gelöst, wobei die flüchtigen Fettsäuren wieder als Säuren freigesetzt werden. Die Lösung wird gaschromatographisch aufgetrennt und mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) das Verhältnis der einzelnen Fettsäuren bestimmt. Dieses Verfahren ist sehr arbeitsintensiv, energieaufwendig und lässt sich kaum automatisieren. Weil die gaschromatographische Bestimmung der freien Ameisensäure einen WLD bedingt, ist auch die Nachweisempfindlichkeit stark limitiert. Es soll daher eine Methode entwickelt werden, die gut repetier- und reproduzierbare Werte liefert, eine höhere Empfindlichkeit aufweist und sich gut automatisieren lässt. In der Literatur (2) wird ein Weg über die Herstellung der Ethylester beschrieben, bei dem jedoch eine saubere Auftrennung des Ameisensäureethylesters Schwierigkeiten bietet.

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine neue Headspace/GC/FID-Methode und zeigt einen Vergleich mit der bisherigen Methode anhand von Käseproben aus der Praxis.

2 Experimenteller Teil

2.1 Proben

- *Wiederfindungsversuche mit Käsematrices:*

Emmentaler und Sbrinz

- *Wiederfindungsversuche mit simulierten Destillaten:*

"Vergleich" : je ca 1-2 mmol der Fettsäuren C1, C2, C3, iC4, C4, iC5, iC6, C6 in alkalischer, wässriger Lösung

"Emmentaler": C2, C3, C4, C6 im Verhältnis wie Emmentaler in alkalischer, wässriger Lösung

- *Methodenvergleich:*

112 Proben aus der Praxis:

10 Alpkäse, 4 Appenzeller, 1 Bergkäse, 39 Emmentaler, 46 Greyerzer, 2 dän. Mozzarella, 5 Sbrinz, 4 Tilsiter und 1 Prop.-Kultur.

2.2 Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Bestellnummer</i>
Ameisensäure C1 98 - 100% p.a.	Merck	264
Essigsäure C2 100% p.a.	Merck	63
Propionsäure C3 puriss	Fluka	81910
iso-Buttersäure i-C4 (2-Methyl-propionsäure) puriss	Fluka	58360
Buttersäure C4 puriss	Fluka	19210
iso-Valeriansäure i-C5 (3-Methyl-buttersäure) purum	Fluka	59850
iso-Caprionsäure i-C6 (4-Methyl-valeriansäure) zur Synthese	Merck	806088
Caprionsäure C6 purum	Fluka	21530
Natronlauge (c = 0.1mol/L)	Merck	9141
10% Bortrifluorid in Propanol (= ~ 1.3 Mol/L)	Fluka	15718
Salzsäure 32% reinst	Merck	313
Phenolphthalein, 1% in Ethanol	Merck	7227
Kaliumhydrogensulfat zur Analyse	Merck	4885
Schwefelsäure 98%	Merck	748

Wässrige Lösungen:

Salzsäure ca. 10%: 30 mL Salzsäure 32% reinst in einem 100 mL Messkolben mit deionisiertem Wasser auf die Marke stellen.

Schwefelsäure ca. 10 %: 60 mL Schwefelsäure 98 % mit deionisiertem Wasser auf 1000 mL stellen.

2.3 Apparate

- *Gaschromatograph*: HP 5890 Series II mit WLD und FID-Detektor und Workstation
- *Headspace Autosampler*: Tekmar 7000
- *Säule für WLD*: DB-FFAP (Polyethylenglycol) 30 m * 0.32 mm * 0.25 µm;
Lieferant: J&W Scientific Part No.: 1233232
- *Säule für FID*: Ultra2 (5 % Phenyl-Methylsilikon) 50 m * 0.32 mm * 0.52 µm;
Lieferant: Hewlett-Packard Part No.: 19091B-115
- *Destillationseinheit mit Steuergerät*: Büchi 325 + 345
- *Dosimat*: Metrohm 655

2.4 Analysenmethoden

2.4.1 Probenvorbereitung mit Wasserdampfdestillation

20.0 g Käse werden mit 5 mL Schwefelsäure 10 % angesäuert und mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat (ca. 250mL) wird mit Natronlauge (c = 0.1 mol/L) auf den Farbumschlag von Phenolphthalein titriert. Die neutralisierte Lösung wird mit 2 mL Natronlauge (c = 0.1 mol/L) übertitriert.

2.4.2 Routinemethode (GC/WLD)

Die übertitrierte Lösung aus 2.4.1 wird auf dem Wasserbad eingedampft. Die Natriumsalze werden in Diethylether mit Kaliumhydrogensulfat verrieben. Die Etherlösung wird abdekantiert, auf einer FFAP-Säule gaschromatographisch aufgetrennt und mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor das Verhältnis der flüchtigen Fettsäuren bestimmt.

GC-Bedingungen:

Säule: DB-FFAP (Polyethylenglycol) Dimensionen: 30 m * 0.32 mm * 0.25 µm

Trägergas: Helium

Splitverhältnis: 1:15

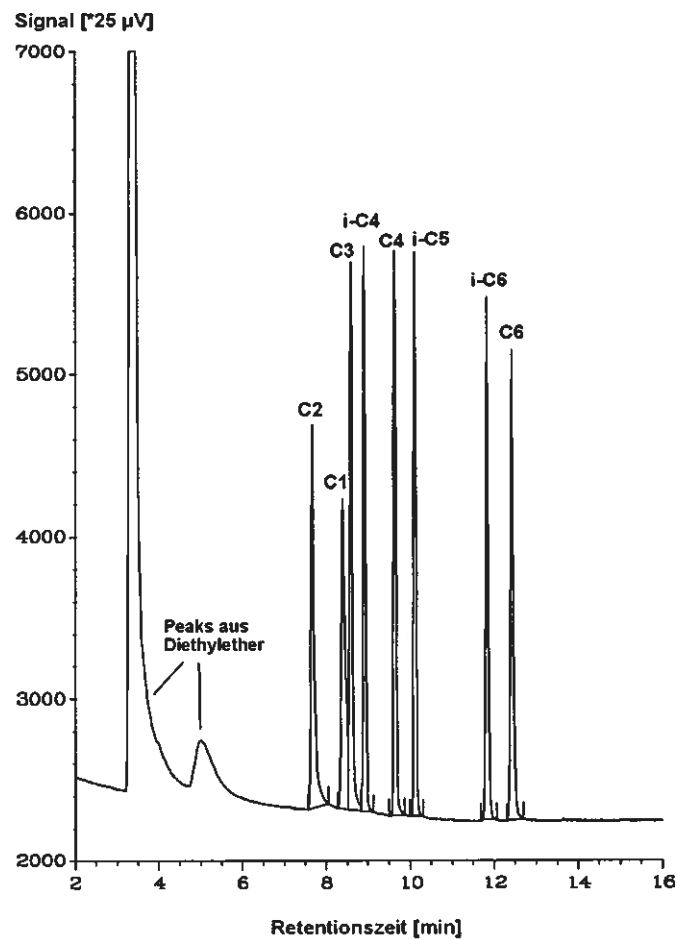
Strömungsgeschwindigkeit: 25 cm/s Volumenstrom: 1.2 mL/min

Injektortemperatur: 180 °C

Detektortemperatur: 220 °C

Säulen-Temperatur	Aufheizrate °C/min	Endtemperatur °C	Verweilzeit min
Injektion		50	0
Stufe 1	25	100	0
Stufe 2	10	180	6

Abb.1: Chromatogramm der flüchtigen Fettsäuren nach der Routinemethode. Standardlösung mit je 2 mg/mL der Säuren. Einspritzvolumen = 1 µL



2.4.3 Vorgeschlagene Methode (Headspace-GC/FID)

Vom übertitrierten Wasserdampfdestillat aus 2.4.1 wird 1 mL in ein Headspace-Fläschchen pipettiert, mit 200 μ l Salzsäure 10 % und 200 μ l Bortrifluorid/Propanol versetzt und sofort verschlossen. Im Headspace-Autosampler wird die Probe bei 75 °C während einer Stunde verestert. Aus einem aliquoten Teil der Dampfphase wird das Verhältnis der Propylester gaschromatographisch auf einer Ultra2-Säule mit einem Flammenionisationsdetektor ermittelt.

Headspace-Bedingungen:

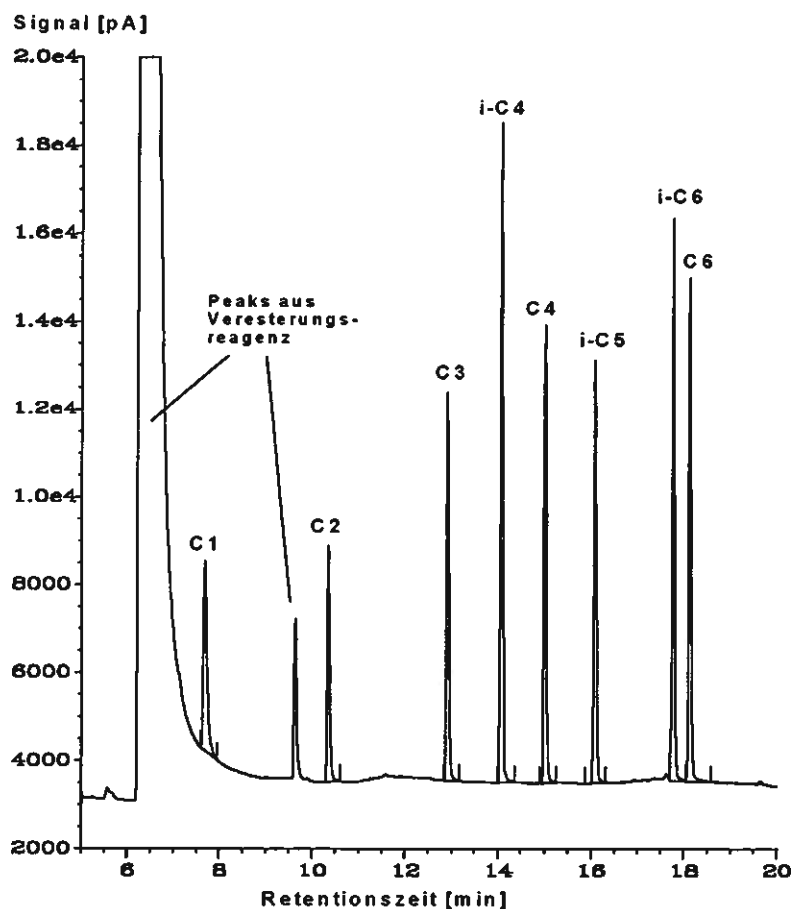
Plattentemperatur:	75 °C	Heliumvolumenstrom:	7 mL/min
Veresterungszeit:	60 min	Loop füllen:	0.3 min
Fläschchengröße:	20 mL	Loop equilibrieren:	0.2 min
Druckaufbau:	0.5 min	Ventiltemperatur:	140 °C
Druck halten:	0.5 min	Leitungstemperatur:	140 °C
Loopgröße:	0.25 mL		

GC-Bedingungen:

Säule: Ultra2 (5 % Phenyl-Methylsilikon)	Dimensionen: 50 m * 0.32 mm * 0.52 μ m
Trägergas: Helium	Splitverhältnis: 1:6
Strömungsgeschwindigkeit: 25 cm/s	Volumenstrom: 1.2 mL/min
Injektortemperatur: 140 °C	Detektortemperatur: 270 °C

Säulen-Temperatur	Aufheizrate °C/min	Endtemperatur °C	Verweilzeit min
Injektion		45	5
Stufe 1	5	60	0
Stufe 2	25	230	5.2

Abb.2: Chromatogramm der Fettsäurepropylester nach der vorgeschlagenen Headspace/GC/FID-Methode. 1.0 mL Standardlösung mit je 0.2 mg/mL der Säuren in 20 mL Headspacefläschchen. Einspritzvolumen = 250 μ L



3 Resultate und Diskussionen

In den Tabellen 1 und 2 werden die Wiederfindungen der flüchtigen Fettsäuren aus Sbrinz und Emmentaler aufgelistet. Mit Ausnahme der Ameisen- und Essigsäurewerte liegen alle Wiederfindungen zwischen 90 und 120 % der zugesetzten Säuremenge. Die ungenügenden Wiederfindungen bei der Ameisen- und Essigsäurebestimmungen sind eindeutig auf Verluste bei der Wasserdampfdestillation zurückzuführen. Es ist kein Unterschied zwischen den gewählten Methoden ersichtlich.

Tab. 1: Wiederfindungen in Sbrinz (n=4)

Säure	Kurzzeichen	im Käse vorhanden mmol/kg	Zusatz mmol/kg	Wiederfindung in %	
				WD-GC/WLD	WD-Head-Space
Ameisensäure	C1	0.3	10.3	23 - 38	33 - 36
Essigsäure	C2	4.2	7.8	62 - 87	68 - 73
Propionsäure	C3	0.6	6.4	90 - 96	86 - 88
iso-Buttersäure	i-C4		5.6	98 - 99	93 - 97
Buttersäure	C4	1.6	5.6	98 - 100	87 - 92
iso-Valeriansäure	i-C5		4.8	98 - 104	106 - 114
iso-Caprönsäure	i-C6		4.3	95 - 107	100 - 114
Caprönsäure	C6	0.5	4.5	90 - 103	99 - 115
	Total	7.2	49.4	78 - 83	78 - 83

Tab. 2: Wiederfindungen in Emmentaler (n=4)

Säure	Kurzzeichen	im Käse vorhanden mmol/kg	Zusatz mmol/kg	Wiederfindung in %	
				WD-GC/WLD	WD-Head-Space
Ameisensäure	C1	0.6	10.3	26 - 29	26 - 28
Essigsäure	C2	41.9	7.8	110 - 156	98 - 122
Propionsäure	C3	79.6	6.4	61 - 87	97 - 117
iso-Buttersäure	i-C4	0.2	5.6	95 - 99	96 - 97
Buttersäure	C4	0.9	5.6	97 - 100	92 - 95
iso-Valeriansäure	i-C5	0.3	4.8	99 - 105	114 - 118
iso-Caprönsäure	i-C6	0.1	4.3	105 - 122	106 - 113
Caprönsäure	C6	0.4	4.5	104 - 123	109 - 117
	Total	124	49.4	86 - 92	86 - 92

Um die Fehlerquelle bei der Wasserdampfdestillation auszuschalten wurden Wiederfindungsversuche an simulierten Wasserdampfdestillaten durchgeführt. Tabelle 3 und 4 zeigen die Wiederfindungsraten beider Methoden aus simulierten Wasserdampfdestillaten, also ab dem eigentlichen Schritt wo sich die beiden Methoden unterscheiden.

Tab. 3: Wiederfindungsraten mit simuliertem Destillat (n=5)

Säure	Kurzzeichen der Säure	Zusatz pro Probe mmol	auf Käse berechnet mmol/kg	Wiederfindungsrate in %	
				Einengen-GC/WLD	Head-Space GC/FID
Ameisensäure	C1	2.2	110.8	86 - 94	99 - 108
Essigsäure	C2	1.7	85.8	94 - 100	96 - 104
Propionsäure	C3	1.8	91.1	105 - 107	101 - 103
iso-Buttersäure	i-C4	1.3	63.6	101 - 103	96 - 99
Buttersäure	C4	1.5	73.8	101 - 104	94 - 101
iso-Valeriansäure	i-C5	1.0	50.9	100 - 105	90 - 100
iso-Caprinsäure	i-C6	0.9	46.5	103 - 109	97 - 106
Caprinsäure	C6	1.0	49.5	101 - 107	97 - 104
	Total	11.4	572.0	86 - 109	90 - 108

Das simulierte Destillat (Tab. 3) enthält alle in dieser Arbeit untersuchten flüchtigen Fettsäuren zwischen 1 bis 2 mmol / mL. Die Wiederfindungsraten streuen sehr eng um den 100 % - Bereich. Eine Ausnahme bildet die Ameisensäure bei der herkömmlichen Methode. Die Wiederfindungsrate schwankt um 90 % des theoretischen Wertes. Es wird vermutet, dass beim Einengen der übertitrierten Lösung und beim Lösen der freien Säuren in Diethylether Verluste bei der leicht flüchtigen Ameisensäure auftreten.

Tab. 4: Wiederfindungsraten mit simuliertem Destillat "Emmentaler" (n=5)

Säure	Kurzzeichen der Säure	Zusatz pro Probe mmol	auf Käse berechnet mmol/kg	Wiederfindungsrate in %	
				Einengen-GC/WLD	Head-Space GC/FID
Essigsäure	C2	0.9	45.0	90 - 98	103 - 106
Propionsäure	C3	1.6	81.7	102 - 106	97 - 98
Buttersäure	C4	0.02	1.0	103 - 116	102 - 132
Caprinsäure	C6	0.01	0.5	80 - 99	71 - 129
	Total	2.53	128.2	80 - 116	71 - 132

Das simulierte Destillat "Emmentaler" (Tab. 4) enthält die im Emmentaler untersuchten flüchtigen Fettsäuren in der entsprechenden Konzentration. Auch diese Wiederfindungsrate streuen bei beiden Methoden um den 100 % - Bereich. Die Spannweite der Wiederfindungsraten ist umgekehrt proportional zur vorhandenen Konzentration der einzelnen Säuren.

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen für jede Säure den Vergleich der Routine-Methode mit der Headspace-Methode. Der Vergleich wurde mit 112 Proben aus der Praxis durchgeführt, wobei nicht jeder Käse jede Säure enthielt.

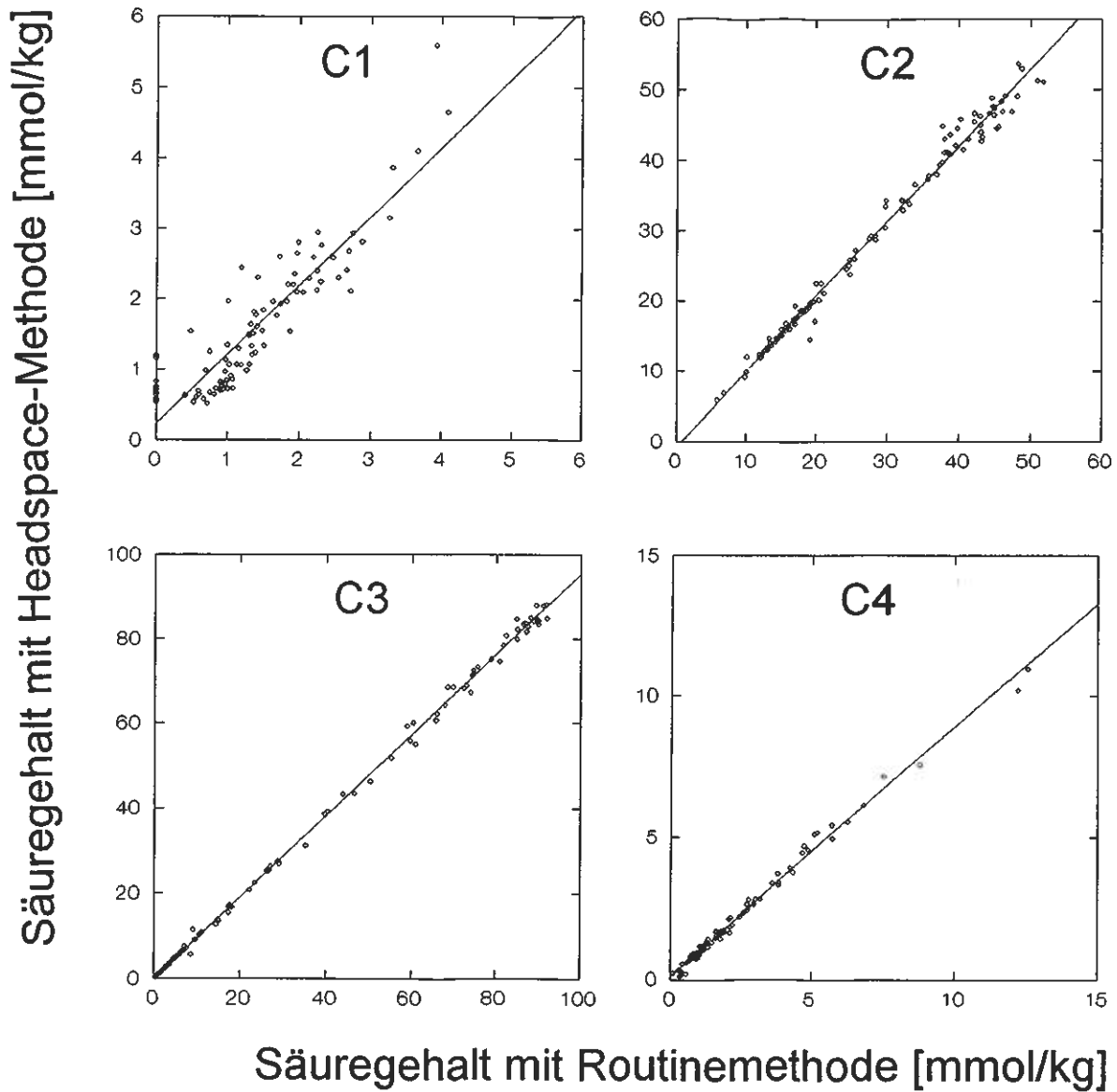


Abb. 3: Vergleich der Fettsäuregehalte nach beiden Methoden

C1	Ameisensäure	(Wertepaare = 89)
C2	Essigsäure	(Wertepaare = 112)
C3	Propionsäure	(Wertepaare = 112)
C4	n-Buttersäure	(Wertepaare = 111)

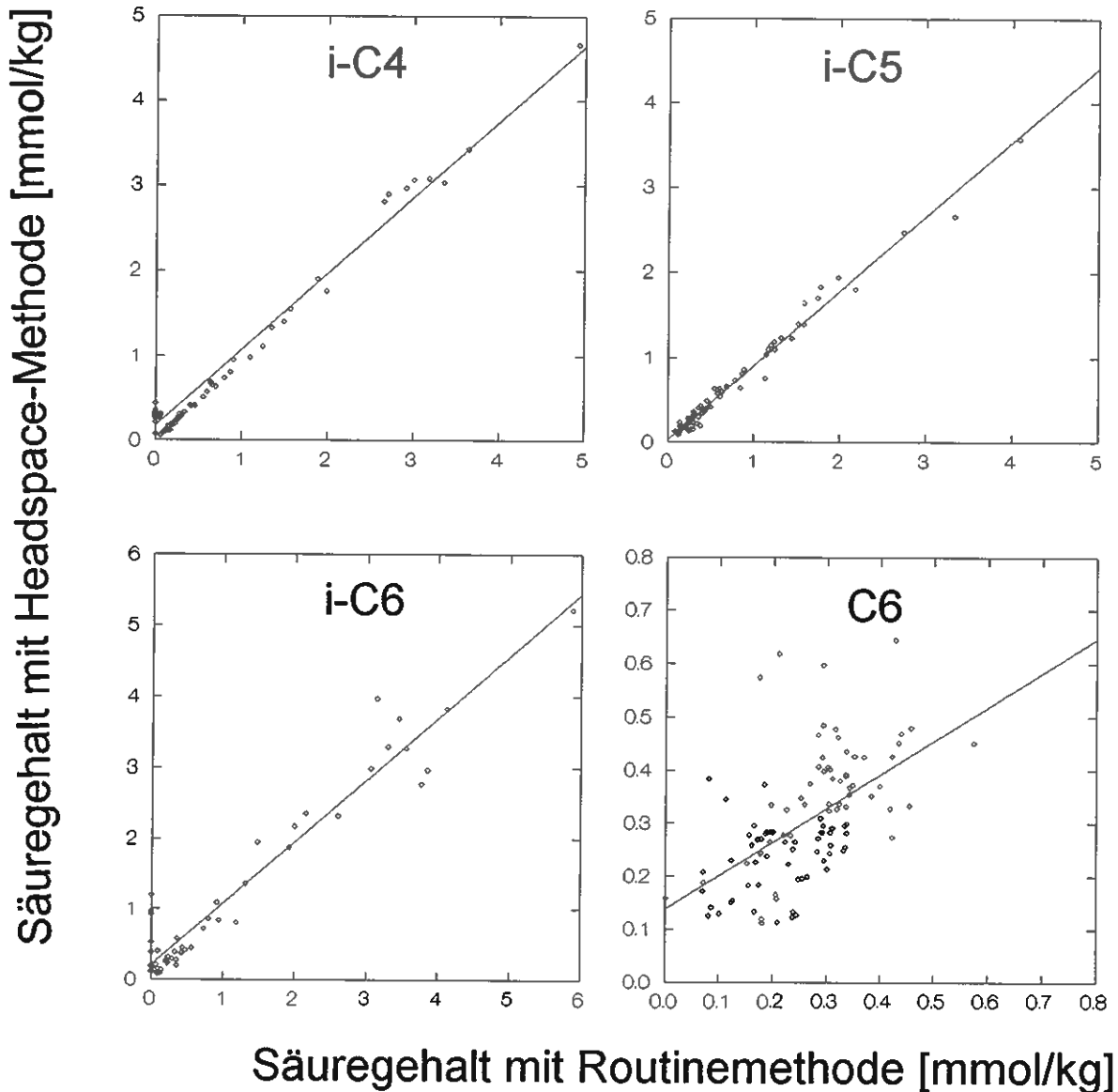


Abb. 4: Vergleich der Fettsäuregehalte nach beiden Methoden

i-C4	iso-Buttersäure	(Wertepaare = 56)
i-C5	iso-Valeriansäure	(Wertepaare = 87)
i-C6	iso-Caprinsäure	(Wertepaare = 44)
C6	n-Caprinsäure	(Wertepaare = 111)

Auf weitere statistische Auswertungen wird bewusst verzichtet, da die absoluten Säuregehalte aus den relativen Anteilen der Einzelkomponenten und dem Gesamtgehalt aus der Titration berechnet wird und daher voneinander abhängig sind.

Allgemein können die Diagramme in Abb. 3 und 4 wie folgt interpretiert werden:

- Die Headspace-Methode liefert für die Ameisen- und Essigsäure höhere Werte als die herkömmliche Routinemethode. Die scheinbar tieferen Werte der anderen Säuren können auf den höheren Anteil der beiden flüchtigsten Säuren zurückgeführt werden. Diese Aussagen decken sich mit den Wiederfindungsraten aus der Tabelle 3.
- Die Headspace-Methode scheint bei Werten um die Nachweisgrenze empfindlicher zu sein.

4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Für die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren in Käse wird eine neue Methode vorgeschlagen. Die Einführung der Headspace-Technik bringt folgende Vorteile:

- rationellere Arbeitsweise durch Automatisierung → höhere Analysensicherheit und Zeiteinsparung
- Einsparung von Chemikalien und Energie → Verbesserung der ökologischen Aspekte der Methode

In umfassenden Wiederfindungsversuchen und Messungen aus Käseproben aus der Praxis konnte gezeigt werden, dass die Resultate der neuen Methode sich nicht von den Resultaten der herkömmlichen Methode unterscheiden.

Auffällig an beiden Methoden ist die schlechte Wiederfindungsrate bei der Ameisen- und Essigsäurebestimmung. Die Verluste müssen bei der Wasserdampfdestillation auftreten. Um diesen Fehler aufzuheben soll in einer weiteren Entwicklung eine direkte Headspace-Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren direkt aus Käse oder eine Optimierung der Wasserdampfdestillation angestrebt werden.

5 Literatur

1. *N.N.*: Methode 5/15. Schweiz. Lebensmittelbuch 5 Aufl., 2. Bd., Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, CH-3000 Bern, 1973
2. *OsI, F.*: Bestimmung der niederen freien Fettsäuren im Hart- und Schnittkäse. Deutsche Molkerei-Zeitung **45**, 1516-1518 (1988).