

Zusammensetzung von Fettsäuren in der Tierfütterung – Analysemethoden

Silvia Ampuero Kragten¹, Marius Collomb², Sébastien Dubois¹ und Peter Stoll¹

¹Agroscope, Institut für Nutztierwissenschaften INT, 1725 Posieux, Schweiz

²Ehemaliger wissenschaftlicher Mitarbeiter von Agroscope, 1723 Marly, Schweiz

Auskünfte: Silvia Ampuero Kragten, E-Mail: silvia.ampuero@agroscope.admin.ch



Schweine lieben fettreiche Futtermittel.

Einleitung

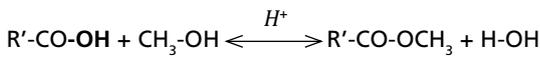
Historisch gesehen dienen Fette in der Tierernährung vor allem als Energielieferanten. Das Interesse an der Zusammensetzung der Fettsubstanzen ist aktuell und steht insbesondere mit dem potenziellen positiven Einfluss auf die Gesundheit des Menschen in Zusammenhang. Ausserdem unterliegt in der Schweiz die technologische Fettqualität des Schlachtkörpers beim Schwein einer *ad-hoc*-Klassifikation, welche das Vorkommen ungesättigter Bindungen in den Fettsäuren berücksichtigt (Christen 2014). Diese Klassifikation, welche in den Schlachthöfen erfolgt, beeinflusst den Schlachtkörperpreis, so dass bei der Herstellung von Schweinefuttermitteln in der Schweiz nicht nur der Fettgehalt (RL) der Rohstoffe als Energiequelle zu berücksichtigen ist, sondern die Futtermittel auch den Empfehlungen betreffend PUFA, MUFA und SFA entsprechen müssen. Deshalb ist eine genaue Analysemethoden erforderlich.

Molekularstruktur der Lipide

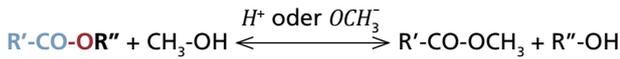
In chemischer Hinsicht bestehen die Lipide aus einer reichen Vielfalt an Einzelkomponenten. Was ihre Löslichkeit betrifft, so lassen sich gemäss ihrer Struktur neutrale und polare Lipide unterscheiden. **A) Die neutralen Lipide** (oder einfachen Lipide) sind die freien Fettsäuren sowie die zur Bildung von Mono-, Di- oder Triglyceriden an ein Glycerolmolekül gebundenen Fettsäuren. Dieser Lipidtyp ist in unpolaren Lösungsmitteln löslich, wohingegen die polaren (oder komplexen) Lipide in mehr oder weniger polaren Lösungsmitteln löslich sind. **B) Die polaren Lipide** können in Form zweier unterschiedlicher Typen vorliegen (Abb 1): **Die Phosphoglyceride** sind Lipide, bei welchen eine der Fettsäuren des Triglycerids durch einen Phosphatester ersetzt ist (O-Acyl-Bindung). Diese Bestandteile können je nach Phosphatester (Stickstoffverbindungen mit eingeschlossen) einen unterschiedlich hohen Komplexitätsgrad aufweisen. Die **Sphingolipide** sind Lipide, bei welchen die Fettsäure an den Stickstoff eines Sphingosinmoleküls (N-Acyl-Bindung) gebunden ist. Das Sphingosin kann an Zucker (Cerebroside, Ganglioside usw.) sowie Phosphate usw. gebunden sein. Diese polaren Lipide können auch danach klassiert werden, ob sie ein Phosphat- oder Zuckermolekül in Form von Phospholipiden oder Glycolipiden enthalten, unabhängig von vorhandenen O-Acyl- oder N-Acyl-Bindungen mit der Fettsäure. Die Lipide umfassen zudem noch Detergenzien (Salze von Fettsäuren), Isoprenoide (Cholesterol, Steroide usw.), Terpene sowie Wachse und andere Lipide mit zyklischen Fettsäuren. Mit Ausnahme der Salze von Fettsäuren können die letztgenannten Moleküle in der Tierernährung als Energiequelle vernachlässigt werden. Ein Teil davon wird jedoch im RL extrahiert (Wachse und andere).

Die Bestimmung der Fettsäuren durch GC-FID (Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor) erfolgt über deren Veresterung (im Allgemeinen Methylierung). Dieser Reaktionstyp der Derivatisierung erfolgt mit einem Katalysator, welcher je nach Lipidtyp entweder sauer oder basisch ist (Christie 1993, Carrapiso *et al.* 2000):

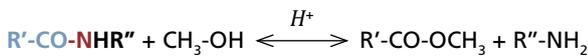
a) Freie Fettsäure:



b) Lipide, bei welchen die Fettsäure durch eine **O-Acyl**-Bindung gebunden ist (z. B.: Triglyceride, Phospholipide):



c) Lipide, bei welchen die Fettsäure durch eine **N-Acyl**-Bindung gebunden ist (z. B.: Sphingolipide, Ceramide usw.):



Analysemethoden

Der Fettgehalt wird heute häufig noch mit gravimetrisch-empirischen Methoden wie Soxhlet (AOAC 1980) und Weibull-Berntrop bestimmt (Rohfett, RL), welche auf Grundlagen basieren, die im 19. Jahrhundert entwickelt wurden (Hammond 2001). Das Prinzip dieser Methoden ist die Lösung der fettlöslichen Substanzen in einem unpolaren Lösungsmittel, häufig Petrolether, Hexan usw. Es ist leicht verständlich, dass ein einzelnes Lösungsmittel mit einer bestimmten Polarität nicht in der Lage ist, die Lipide unterschiedlicher Polarität vollständig zu lösen. Zudem sind generell die Membranlipide (Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide usw.) >

Zusammenfassung

Die Bedeutung der Analysemethode bei der Fettsäurenbestimmung in Tierfuttermitteln ist nicht zu unterschätzen. Wichtig ist sie insbesondere für die Schweinefütterung, da in der Schweiz nicht nur der Lipidgehalt, sondern auch das Fettsäureprofil benötigt wird, um eine Ration zu erstellen, mit welcher eine optimale Fettqualität im Schlachtkörper des Schweins erzielt wird. Die Studie zeigt, dass die GC-Methode (Gaschromatographie) durch *in-situ* Umesterung genauer und vollständiger ist als die GC-Methode in zwei Schritten (Fettextraktion und anschließende Veresterung). Sie ist auch der empirischen Methode durch Gravimetrie überlegen, welche in der Extraktion der löslichen Bestandteile mit einem vorgegebenen Lösungsmittel besteht.

PUFA	Polyensäuren (mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
MUFA	Monoensäuren (einfach ungesättigte Fettsäuren)
SFA	gesättigte Fettsäuren
FT	Gesamtfett
RL	Rohfett

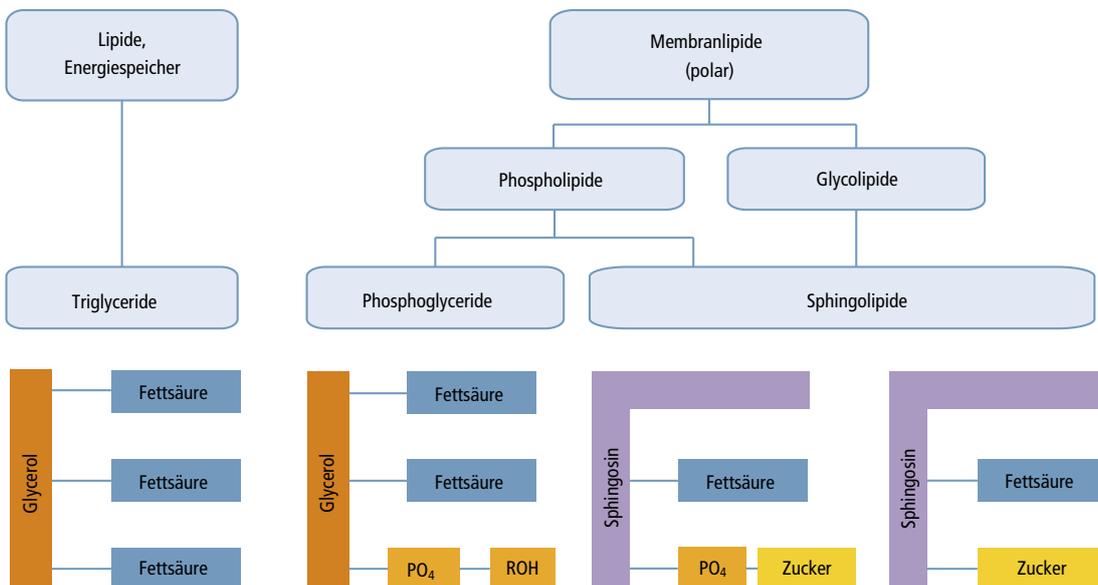


Abb. 1 | Klassifikationsschema für häufig vorkommende Lipide.



Abb. 2 | Einige analysierte Proben. A = Hafer, B = Alikon, C = Gerste, D = Mais, E = Rapskuchen, F = Sojabohnen

weniger gut in unpolaren Lösungsmitteln wie Hexan oder Petrolether löslich, und gleichzeitig werden eine Vielzahl nicht lipider Komponenten (Pigmente, Vitamine, Chlorophyll usw.) wie auch Wachse extrahiert. Werden noch polarere Lösungsmittel, wie z. B. Diethylether verwendet, so werden zusätzlich hydrophyle Bestandteile (Harnstoff, Hexosen) mitextrahiert (Palmquist *et al.* 2003). Obwohl diese empirischen Methoden nur annähernd genau sind, sind sie immer noch aktuell aufgrund ihrer einfachen Anwendung, aber auch weil in der Futteroptimierung der RL verwendet wird.

Der Weg über die Identifizierung/Quantifizierung verschiedener Fettsäuren, z. B. über GC-FID, erlaubt eine rationellere und deskriptivere Analyse des Lipidgehaltes. Die vorhergehende vollständige Extraktion polarer und unpolare Lipide ist hingegen nicht einfach. Folglich steigt das Interesse an Methoden der *in-situ* Umesterung, da sie in einem einzigen Schritt eine Hydrolyse der Lipide einschliesslich sehr komplexer Moleküle durchführen und die auf diese Weise freigesetzten Fettsäuren durch Methylierung verestern (Jenkins 2010). Dies geht im Vergleich mit Methoden, die in zwei Etappen durchgeführt werden, mit weniger strengen Reaktionsbedingungen einher. Zusätzlich werden die Fettsäuren besser geschützt und die Lösungsmittelmenge, die Reagenzien und der benötigte Zeitaufwand wesentlich reduziert (Carrapiso *et al.* 2000). Die hier vorgestellte Methode GC *in-situ* (GC-IS) entspricht einer Weiterentwicklung der Methode von Alves *et al.* (2008, 2009) und von Palmquist *et al.* (2003).

Ziel dieses Artikels ist es, die Ergebnisse der Lipidanalysen von Rohstoffen und Futtermitteln darzustellen und dabei drei verschiedene Methoden miteinander zu vergleichen: eine gravimetrische Methode (Weibull-Berntrop), eine GC-FID-Methode in zwei Schritten (Extraktion und anschließende Veresterung) und eine GC-FID-Methode mit Umesterung *in-situ*. Die beiden letzteren ermöglichen zusätzlich zur Bestimmung der Lipidzusammensetzung die Bestimmung des Gesamtfettes (FT), wohingegen die erstgenannte Methode ausschliesslich den RL bestimmt. Gemäss der FDA (U.S. Food and Drug Administration) wird das FT in Lebensmitteln durch die Summe aller extrahierten Fettsäuren in Form von Triglyceriden bestimmt (Eller 1999). Das FT ist folglich verwendbar wie RL. Im vorliegenden Artikel wird ausserdem die Validierung der Methode GC *in-situ* vorgestellt.

Material und Methoden

Die Proben

Die Vergleichsstudie der Analysemethoden wurde mit einer Serie von 29 Proben durchgeführt (Abb. 2). Dazu gehörten die Rohstoffe Weizen, Gerste, Hafer, Mais, Weizenkeime, Birtreber, Rapskuchen, Sojabohnen und Sonnenblumenkerne, Alleinfutter für Mastschweine, für Ferkel, für Sauen sowie Futtersuppen, Pasta-Abfälle und Alikon (kristallines pflanzliches Fett). Die Genauigkeit der GC-IS-Methode wurde mit einer zertifizierten Referenzprobe bestimmt: BCR® – 163: Beef-Pork Fat Blend (IRMM). Die Unsicherheit wurde mit vier Proben bestimmt, bestehend aus Gerste, zwei Alleinfutter für Schweine und einer Probe aus Fettgewebe vom Schwein.

Mit Ausnahme des Fettgewebes wurden alle Proben mit einer Brabender Messermühle gemahlen (1 mm). Die Proben mit FT > 15 % wurden mit flüssigem N₂ gemahlen. Die Fettgewebeprobe und die Futtersuppen wurden lyophilisiert und anschliessend vermahlen. Der Trockensubstanzgehalt (TS) wurde in allen Proben durch Ofentrocknung bei 105 °C während 2 Std. 40 Min. bestimmt (basierend auf ISO 6496:1999).

Die drei angewendeten Methoden

Die gravimetrische Methode

Gemäss der Weibull-Berntrop-Methode wird die Probe während 1 Std. mit kochender 10 %iger HCl hydrolysiert. Nach einer Spülung mit Wasser bis zu einem neutralen pH-Wert wird die Probe im Mikrowellenofen getrocknet (30 Min., 300 W). Anschliessend wird die Probe in einem Soxtec-System mit Petrolether bei 135 °C während 85 Minuten extrahiert. Der Rückstand (RL) wird nach der Evaporation des Lösungsmittels gewogen und in g/kg TS ausgedrückt.

Die GC Methode in 2 Schritten (GC-2E)

Extraktionsschritt: 0,5 bis 50 g Probenmaterial werden in einen Messbecher gegeben und 1 ml interner Standard (C13 FAME (Fettsäurenmethylester)) und 60 ml Dichloromethan : Methanol 2 : 1 (v : v) hinzugefügt. Das Ganze wird vermischt und anschliessend während 15 Minuten ruhen gelassen. Die nichtlipiden Bestandteile werden durch die Beigabe von 1 ml MgCl₂ (2 % in Wasser) und 20 ml H₂O separiert. Sie konzentrieren sich in der wässrigen Phase, welche sich nach Filtration und einer Stunde Ruhen bildet. Die organische Phase, welche die Lipide enthält (untere Schicht), wird aufgefangen und anschliessend bei 40 °C und 600–550 mbar evaporiert. Der feste Rückstand wird quantitativ in Hexan gesammelt und das Lösungsmittel erneut evaporiert.

Veresterungsschritt: Bei dieser Etappe werden 2 ml NaOH (0,5 M in Methanol) zum festen Rückstand hinzugefügt. Das Ganze lässt man 30 Minuten ruhen, bevor man es 2 Minuten lang kocht (für eine vollständige Verseifung). Anschliessend werden 3 ml BF₃ (10 % in Methanol) hinzugefügt und das Ganze nochmals 4 Minuten lang gekocht. Nach Abkühlung bis auf Umgebungstemperatur werden 7 ml NaCl (1,5 % in H₂O) und 3 ml Heptan beigegeben. Nach Vermischung und Zentrifugierung (5 Min. bei 3000 rpm) wird 1 ml (filtriertes Aliquot) der oberen Schicht, welche den Fettsäurenmethylester (FAME) enthält, direkt in den GC injiziert. Das GC-System (HP 5890) ist mit einer Kolonne vom Typ Supelcowax™ 10 (30 m x 0,32 mm, 0,25 mm) ausgestattet. Die Probe wird mit einem Splitverhältnis von 100 : 1 in einen

N₂-Strom (1,15 ml/Min.) injiziert. Die Temperatur des FID-Detektors liegt bei 250 °C. Das thermische Programm des Ofens lautet folgendermassen: 1 Min. bei 170 °C, Erhöhung auf 210 °C bei 2,5°C/Min., anschliessend auf 220 °C mit einer Erhöhung von 0,5 °C/Min., gefolgt von 5 Min. bei 220 °C, erneute Erhöhung auf 250 °C mit 15 °C/Min. und schlussendlich 6 Min. bei 250 °C.

Die *in-situ* Umesterungsmethode (GC-IS)

Umesterung: 250 mg Probenmaterial werden mit 0,25 bis 2 ml internem Standard (C19 FAME), 3 bis 6 ml HCl (5 % in Methanol) und zwischen 0 und 1,75 ml Toluol (Proportionen wurden angepasst und können je nach Probentyp variieren) in ein hermetisch schliessendes Teflonrohr gegeben. Das verschlossene Rohr wird während 3 Std. bei 70 °C belassen. Nachdem Umgebungstemperatur erreicht ist, wird die Mischung mit 5 bis 8 ml K₂CO₃ (6 % in H₂O) neutralisiert. Nach Beigabe von 2 ml Pentan wird die Mischung zentrifugiert (5 Min. bei 2500 rpm) und anschliessend die organische Phase (obere Schicht) in ein Röhrchen umgefüllt, welches 1 g wasserfreies Na₂SO₄ und 0,2 g Aktivkohle enthält. Nach einer Stunde Ruhen und anschliessendem Zentrifugieren (5 Min. bei 2500 rpm) wird die organische Phase gewonnen und bei 40 °C evaporiert. **Aufreinigung mittels SPE:** Zum festen Rückstand wird 1 ml Dichlormethan hinzugefügt. 250 bis 500 ml dieser Lösung werden bei 40 °C evaporiert. Der Rückstand wird in 100 ml Dichloromethan gegeben und anschliessend in einer vorkonditionierten SPE-Kartusche platziert (LiChrolut Si (40–63 mm), Merck 1.02024.0001). Die FAME-Mischung wird mit 2,5 ml Dichloromethan eluiert. Die ersten 0,5 ml werden verworfen, da sie Verunreinigungen wie Phytadiene aufweisen könnten (Alves *et al.* 2009). Die zwei folgenden Milliliter werden aufgefangen und bei 40 °C bis zur Trocknung evaporiert. Der feste Rückstand wird in 1 ml Pentan aufgelöst und in den GC injiziert. Das GC-System (Agilent 6810) ist mit einer polaren Säule des Typs Supelcowax™ 10 (15 m x 0,1 mm, 0,1 mm) ausgestattet. Die Probe wird mit einem Splitverhältnis von 150 : 1 und einem H₂-Strom von 1 ml/Min. eingespritzt. Die Temperatur des FID-Detektors liegt bei 250 °C. Das thermische Programm des Ofens lautet folgendermassen: 0,2 Min. bei 170 °C, anschliessend Erhöhung auf 210 °C mit 11 °C/Min., danach auf 220 °C mit 2 °C/Min., 2 Min. bei 220 °C, anschliessend Erhöhung auf 230 °C mit 50 °C/Min. und Aufrechterhaltung von 230 °C während 5 Min.

Für beide GC-Methoden erfolgt die Quantifizierung jeder FAME mit Hilfe des internen Standards. Die Summe aller identifizierten FAME, erfasst als Triglyceride (durch Division durch 0,956), bildet das Gesamtfett (FT), ausgedrückt in g/kg TS.

Tab. 1 | Gehalte (Durchschnitt von 2 Wiederholungen ± sd) in FT (Gesamtfett), SFA (gesättigte Fettsäuren), MUFA (einfach ungesättigte Fettsäuren) und PUFA (mehrfach ungesättigte Fettsäuren) gemäss 3 Methoden: GC-IS (GC-FID In-Situ), GC-2E (GC-FID 2 Schritte) und Extraktion

Probe	*FT [g/kg TS]			SFA [g/kg TS]		MUFA [g/kg TS]		PUFA [g/kg TS]	
	GC-IS	GC-2E	Extraktion	GC-IS	GC-2E	GC-IS	GC-2E	GC-IS	GC-2E
Weizen a	24,0 ± 0,0	15,9 ± 1,1	15,9 ± 1,9	5,9 ± 0,0	3,2 ± 0,2	2,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	14,1 ± 0,0	10,2 ± 0,6
Weizen b	26,1 ± 0,2	14,2 ± 0,7	21,9 ± 1,7	5,6 ± 0,0	2,6 ± 0,1	3,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	15,9 ± 0,1	9,2 ± 0,4
Gerste a	30,9 ± 1,2	21,4 ± 0,5	24,5 ± 0,7	8,3 ± 0,3	4,6 ± 0,1	4,7 ± 0,1	3,2 ± 0,1	15,2 ± 0,7	12,6 ± 0,3
Gerste b	37,5 ± 1,2	18,4 ± 0,5	23,6 ± 2,0	8,7 ± 0,1	4,0 ± 0,1	6,0 ± 0,2	2,9 ± 0,1	21,2 ± 0,9	10,8 ± 0,3
Hafer a	43,1 ± 1,1	35,6 ± 0,4	43,1 ± 0,2	11,3 ± 0,1	7,1 ± 0,0	15,4 ± 0,5	12,4 ± 0,2	14,3 ± 0,5	14,6 ± 0,2
Hafer b	47,3 ± 2,1	42,0 ± 0,5	45,5 ± 2,5	11,8 ± 0,4	8,2 ± 0,1	17,9 ± 0,7	15,7 ± 0,2	15,1 ± 0,9	16,2 ± 0,3
Mais a	59,4 ± 2,2	43,8 ± 0,3	50,1 ± 1,9	8,6 ± 0,2	5,8 ± 0,0	14,0 ± 0,5	10,6 ± 0,1	34,1 ± 1,3	25,5 ± 0,2
Mais b	70,1 ± 3,0	55,2 ± 0,1	51,0 ± 0,9	9,5 ± 0,2	6,9 ± 0,0	19,8 ± 0,9	16,0 ± 0,0	37,7 ± 1,8	29,9 ± 0,1
Pasta a	36,0 ± 1,5	17,2 ± 1,0	29,6 ± 0,0	9,7 ± 0,3	4,6 ± 0,3	9,6 ± 0,4	5,2 ± 0,3	15,0 ± 0,7	6,6 ± 0,4
Pasta b	38,3 ± 0,4	16,5 ± 0,6	30,8 ± 0,4	10,0 ± 0,1	4,2 ± 0,2	9,8 ± 0,1	4,9 ± 0,2	16,0 ± 0,2	6,6 ± 0,2
Futtersuppe a	42,2 ± 0,3	26,8 ± 0,2	34,4 ± 0,6	16,2 ± 0,1	10,9 ± 0,2	12,8 ± 0,2	8,2 ± 0,1	10,8 ± 0,1	6,6 ± 0,0
Futtersuppe b	268,0 ± 4,1	172,8 ± 0,0	273,0 ± 13,3	110,7 ± 1,7	74,2 ± 0,1	89,3 ± 1,2	57,3 ± 0,0	51,1 ± 0,7	33,6 ± 0,1
Schweinemastfutter	24,6 ± 1,1	24,9 ± 0,1	29,0 ± 0,1	6,3 ± 0,2	5,3 ± 0,1	4,4 ± 0,2	4,7 ± 0,1	12,8 ± 0,7	13,8 ± 0,3
Ferkelfutter a	62,6 ± 2,5	46,4 ± 0,5	57,9 ± 0,2	18,1 ± 0,7	12,5 ± 0,1	19,4 ± 0,9	14,5 ± 0,2	21,7 ± 0,8	17,3 ± 0,2
Ferkelfutter b	65,5 ± 0,4	46,5 ± 0,3	59,1 ± 2,9	23,9 ± 0,5	17,3 ± 0,1	20,6 ± 0,1	15,2 ± 0,1	17,1 ± 0,1	12,0 ± 0,0
Sauenfutter a	75,9 ± 1,1	55,5 ± 0,9	61,2 ± 2,2	23,3 ± 0,5	17,8 ± 0,3	26,0 ± 0,4	19,1 ± 0,3	22,2 ± 0,3	16,1 ± 0,2
Sauenfutter b	77,5 ± 0,8	64,8 ± 0,4	66,1 ± 2,2	24,6 ± 0,1	21,2 ± 0,2	23,2 ± 0,2	19,6 ± 0,1	25,2 ± 0,3	21,2 ± 0,1
Weizenkeime a	76,0 ± 4,6	64,0 ± 0,0	67,4 ± 4,2	15,4 ± 0,7	13,3 ± 0,0	11,4 ± 0,8	9,8 ± 0,0	44,9 ± 3,3	38,1 ± 0,0
Weizenkeime b	78,6 ± 0,7	64,6 ± 0,0	n.b.	15,8 ± 0,1	13,2 ± 0,0	12,4 ± 0,1	10,4 ± 0,0	46,6 ± 0,5	38,1 ± 0,0
Treber a	108,9 ± 0,7	86,1 ± 0,3	101,6 ± 0,7	31,3 ± 0,1	23,1 ± 0,1	14,4 ± 0,1	9,8 ± 0,2	57,9 ± 0,5	49,3 ± 0,3
Treber b	109,1 ± 0,1	86,5 ± 1,3	90,7 ± 2,2	30,1 ± 0,1	23,1 ± 0,3	14,0 ± 0,0	10,1 ± 0,3	58,8 ± 0,2	49,5 ± 0,7
Rapskuchen a	112,6 ± 3,5	109,0 ± 0,1	105,9 ± 1,8	15,7 ± 0,7	15,8 ± 0,1	61,2 ± 1,7	58,5 ± 0,1	30,2 ± 1,0	29,8 ± 0,0
Rapskuchen b	106,8 ± 3,5	102,0 ± 0,5	92,9 ± 1,5	10,8 ± 0,7	9,9 ± 0,0	59,7 ± 1,7	57,3 ± 0,3	30,9 ± 1,0	30,3 ± 0,1
Sojabohnen a	248,7 ± 5,4	250,8 ± 2,0	216,4 ± 1,6	38,1 ± 0,4	39,4 ± 0,0	56,1 ± 1,2	56,3 ± 0,0	142,9 ± 3,7	144,0 ± 1,9
Sojabohnen b	272,9 ± 0,4	258,7 ± 1,2	213,8 ± 1,6	43,0 ± 0,0	41,2 ± 0,3	63,2 ± 0,6	59,0 ± 0,2	154,4 ± 0,3	147,0 ± 0,7
Sonnenblume a	374,8 ± 10,0	357,5 ± 4,7	351,7 ± 24,1	40,2 ± 1,2	38,0 ± 0,5	90,6 ± 1,8	84,5 ± 0,8	225,7 ± 6,2	219,1 ± 3,1
Sonnenblume b	517,7 ± 0,1	511,3 ± 1,1	486,3 ± 27,0	55,6 ± 0,4	54,1 ± 0,2	103,7 ± 0,2	103,3 ± 0,5	333,5 ± 0,3	331,2 ± 0,8
Alikon a	998,1 ± 1,5	1031 ± 4,6	935,9 ± 7,4	947,7 ± 1,1	979,7 ± 4,0	4,7 ± 0,2	4,4 ± 0,3	1,1 ± 0,0	1,4 ± 0,1
Alikon b	1010,1 ± 10,9	1011,6 ± 3,7	n.b.	959,5 ± 10,1	961,0 ± 3,2	4,5 ± 0,3	4,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,2

*FT: Für Extraktion entspricht dies RL.
n.b.: nicht bestimmt.

Die analytische Charakterisierung der GC-IS-Methode

Die Genauigkeit dieser Methode wurde über einen Vergleich mit einer zertifizierten Probe bestimmt unter Verwendung der kombinierten Unsicherheit des zertifizierten Werts und des Messwerts (für 95 % Konfidenzintervall des zweiseitigen Student-t-Tests).

$$u_{\Delta} = \sqrt{u_{GC-IS}^2 + u_{BCR163}^2}$$

u_{GC-IS} ist die Unsicherheit der GC-IS-Methode, u_{BCR163} ist die der zertifizierten Probe und u_{Δ} die kombinierte Unsicherheit ($u = sd/\sqrt{n}$, sd ist die Standardabweichung und n die Anzahl Messungen).

$$U_{\Delta} = k u_{\Delta}$$

k ist der Erweiterungsfaktor (Faktor t des zweiseitigen Student-Tests für 95 % Konfidenzintervall) und U_{Δ} die kombinierte erweiterte Unsicherheit.

Für die Bestimmung der Unsicherheit wurden zehn Replikate von vier verschiedenen Proben während zwei Monaten von verschiedenen Laboranten, jedoch im gleichen Labor, analysiert. Die erweiterte Unsicherheit U wurde in % des Mittelwerts berechnet für 95 % Konfidenzintervall des zweiseitigen Student-t-Tests, mit $u = sd/\sqrt{2}$ da die Routineanalyse mit zwei Wiederholungen durchgeführt wurde.

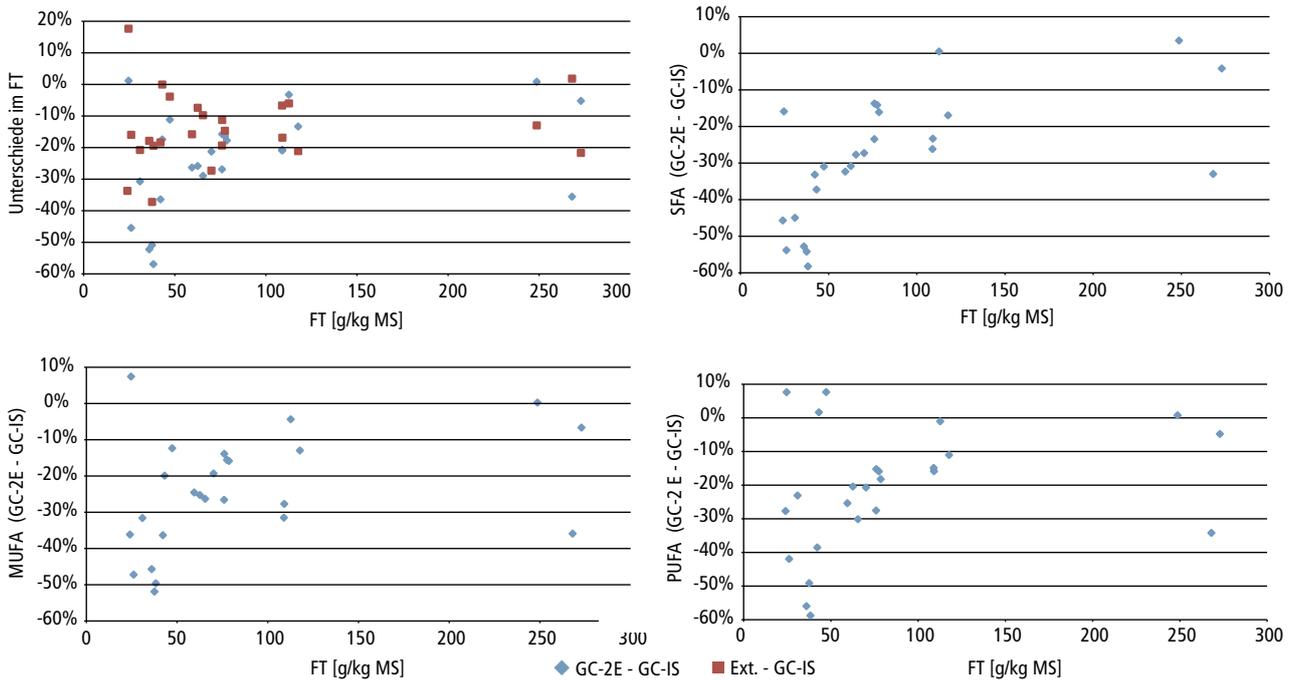


Abb. 3 | Unterschiede zwischen GC-2E und GC-IS sowie zwischen Extraktion und GC-IS für FT (in % bezogen auf FT gemäss GC-IS) versus FT gemäss GC-IS.

Resultate und Diskussion

Lipidgehalt gemäss drei Analysemethoden

Tabelle 1 zeigt die Lipidgehalte in 29 unterschiedlichen Proben, welche jeweils mit drei verschiedenen Analysemethoden bestimmt wurden. Jedes Ergebnis ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Bestimmungen. Bei den in dieser Studie verwendeten Proben sind im Allgemeinen die mit der GC-IS-Methode bestimmten Gesamtfettgehalte höher als bei den beiden anderen Methoden, wohingegen die GC-2E-Methode häufig zu den tiefsten Werten führt. Die deutlichsten Unterschiede im Gesamtfettgehalt zwischen GC-2E und GC-IS lassen sich bei Getreide (FT von 24 bis 47 g/kg TS in der Abbildung 3) und Getreideprodukten beobachten mit Unterschieden in Höhe von 30 bis 50% bei Weizen und Gerste, 10 bis 26% bei Hafer, Mais, Weizenkeimen und Biertreber. Im Gegensatz zu anderen Getreiden wurden die PUFA im

Hafer durch die beiden Methoden korrekt bestimmt (Tab. 2). Die Fraktion der neutralen/polaren Lipide liegt bei Hafer in der Grössenordnung von 80 bis 90% mit > 94% in Form von Triglyceriden (Banas *et al.* 2007), wohingegen diese Fraktion bei den übrigen Getreide schwächer ausfällt (75% bei Gerste gemäss Newman *et al.* 2008). Diese Besonderheit lässt sich auch bei Anwendung der Extraktionsmethode beobachten. Bei den Futtermitteln kann diese Differenz vernachlässigbar sein (1,2%) oder im Bereich von 16 bis 29% liegen. Bei Mischfuttermitteln ist dies von deren Zusammensetzung abhängig. Zudem erleichtert das Vorhandensein von Neutrallipiden deren Extraktion. Schlussendlich weisen die untersuchten Proben mit einem FT > 110 g/kg TS wie Rapskuchen, Sojabohnen, Sonnenblumenkerne und Alikon nur sehr geringe Differenzen von 0 bis 5% auf, da Alikon wie auch Fettgewebe hauptsächlich aus Triglyceriden besteht (Doreau *et al.* 1991, Murphy *et al.* 1998). >

Tab. 2 | Mit den Methoden GC-IS und GC-2E in Getreide bestimmte Fettsäuren

[g/kg TS]	Weizen a		Weizen b		Gerste a		Gerste b		Hafer a		Hafer b	
	GC-SI	GC-2E	GC-SI	GC-2E	GC-SI	GC-2E	GC-SI	GC-2E	GC-SI	GC-2E	GC-SI	GC-2E
C16:1 t3	5,3	2,4	5,6	2,9	7,6	4,1	8,1	3,6	10,2	6,2	10,7	7,2
C18:1 c9	2,9	1,7	2,5	1,7	4,1	3,0	5,4	2,7	14,2	11,4	16,7	14,8
C18:2 c9c12	14,8	8,5	13,2	9,4	15,2	11,4	19,8	9,9	13,9	13,9	14,6	15,5
C18:3 c9c12c15	1,0	0,7	0,9	0,7	1,2	1,1	1,4	0,8	0,4	0,6	0,4	0,6

Tab. 3 | Genauigkeitsbestimmung der GC-IS Methode durch Vergleich zwischen den Unterschieden der Mittelwerte, Δ_m , und der kombinierten erweiterten Unsicherheit, U_Δ (in Absolutwerten)

BCR® - 163: Beef – Pork Fat Blend								
	%	C14	C16	C16 : 1	C18	C18 : 1	C18 : 2	C18 : 3
BCR163	MRC	2,29	25,96	2,58	18,29	38,3	7,05	0,86
	U	0,04	0,3	0,16	0,17	0,4	0,17	0,14
	n	11	11	11	11	12	11	10
GC-IS	Durchschnitt	2,22	26,23	2,55	18,18	39,51	8	0,76
	U	0,08	0,54	0,06	0,16	0,48	0,11	0,02
	n	28	28	28	28	28	28	28
	Δ_m	0,07	0,27	0,03	0,11	1,21	0,95	0,1
	U_Δ	0,08	0,59	0,16	0,22	0,59	0,19	0,12

BCR163: Zertifizierte Referenzprobe: BCR® – 163: Beef-Pork Fat Blend (IRMM). MRC: Zertifizierter Wert. U: erweiterte Unsicherheit für 95 % Vertrauensintervall des zweiseitigen Student-t-Tests. n: Anzahl der Replikate.

Tab. 4 | Unsicherheit (in % des Durchschnitts) der GC-IS-Methode, berechnet für 95 % Vertrauensintervall des zweiseitigen Student-t-Tests

	[g/kg TS]	n	SFA	MUFA	PUFA	FT
Gerste	Mittelwert	20	6,9	4,5	18,9	31,7
	U		7,30 %	11,70 %	11,20 %	10,10 %
Futter a	Mittelwert	20	10,3	6,6	16	34,5
	U		6,30 %	8,50 %	9,40 %	7,70 %
Futter b	Mittelwert	20	12,4	26,3	31,9	74,3
	U		3,50 %	6,90 %	7,70 %	6,40 %
Fettgewebe	Mittelwert	16	348,5	440,8	139,5	973,1
	U		1,70 %	3,80 %	3,80 %	2,70 %

Der mittels Extraktionsmethode bestimmte Gesamtfettgehalt wird in Ölsaatenproben wahrscheinlich aufgrund einer unvollständigen Extraktion generell unterschätzt (6 bis 22 %). Auch in Getreide wird das FT unterschätzt mit Ausnahme von Hafer (0 bis 4 %) unterschätzt (16 bis 37 %). In Alleinfuttermitteln kann die Extraktionsmethode hingegen zu unter- oder überschätzten Werten führen.

Genauigkeit und Unsicherheit der GC-IS-Methode

Die GC-IS Bestimmungen korrelieren gut mit den zertifizierten Werten des BCR-163 (Tab. 3). Einzig bei Ölsäure und bei Linolsäure, C18 : 1 und C18 : 2, überschreitet die Differenz der Mittelwerte die kombinierte erweiterte Unsicherheit ($\Delta_m > U_\Delta$). In diesen Fällen ist jedoch der GC-IS-Wert grösser als der zertifizierte Wert, was darauf hindeutet, dass die GC-IS-Methode vollständiger ist.

Wie in Tabelle 4 ersichtlich, weisen die in den vier Proben für FT, SFA, MUFA und PUFA berechneten Unsicherheiten Werte von unter 12 % auf.

Schlussfolgerungen

Bestimmt man das Gesamtfett sowie die Zusammensetzung der Lipide in verschiedenen Rohstoffen und Futtermitteln mit der GC-IS-Methode, so erweist sich diese als genauer als die GC-2E-Methode oder die Extraktion (nur RL), was bei der Optimierung von Schweinefuttermitteln einen offensichtlichen Vorteil darstellt. Aber auch die beiden letztgenannten Methoden können in gewissen Fällen zu korrekten Ergebnissen führen (Proben, die hauptsächlich aus Triglyceriden bestehen). Es ist von Vorteil, die RL-Analyse mit der GC-IS durch die FT-Analyse zu ersetzen. ■

Riassunto

Composizione di acidi grassi negli alimenti per animali – metodi di analisi

Il presente articolo illustra l'importanza del metodo analitico nella determinazione della composizione di acidi grassi negli alimenti per animali. In particolare nell'alimentazione dei suini in cui, in Svizzera, sono necessari per formulare una razione adatta a fornire una qualità ottimale di grasso nella carcassa del suino non solo il tenore in grasso ma anche il profilo di acidi grassi. Lo studio mostra che il metodo GC (cromatografia in fase gassosa) mediante transesterificazione *in situ* è più preciso e completo rispetto al metodo GC in due fasi (mediante estrazione dei corpi grassi, poi esterificazione) e al metodo empirico, mediante gravimetria, che consiste nell'estrazione dei composti solubili in un solvente dato.

Summary

Determination of fatty acid composition in feed – analytical methods

This paper illustrates the importance of the analytical method for the determination of fatty acid composition in feed. In Switzerland, not only the lipid content but also the fatty acids profile are necessary to formulate a ration that will produce an optimum quality of fat in the pig carcass. Results of this study showed that the fatty acid profile obtained by gas chromatography (GC) with *in situ* transesterification was more accurate and complete than that obtained by a GC method in two steps (fat extraction followed by esterification) or by a gravimetric empirical method which employed the extraction of soluble compounds in a given solvent.

Key words: FAME, fatty acid composition, GC-FID trans-esterification, total fat content.

Literatur

- Alves S. P. Cabrita A. R. J. Fonseca A. J. M. & Bessa R. J. B., 2008. Improved method for fatty acid analysis in herbage based on direct transesterification followed by solid-phase extraction. *J. of Chromatography A* **1209**, 212–219.
- Alves S. P. Cabrita A. R. J. Fonseca A. J. M. & Bessa R. J. B., 2009. Effect of a Purification Step and the Type of Internal Standard Used on Fatty Acid Determination of Grass and Maize Silages. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 10793–10797.
- Banaś A., Dębski H., Banaś W., Heneen W. K., Dahlgvist A., Bafor M., Gummeson P.-O., Marttila S., Ekman Å., Carlsson A. S. & Stymne S., 2007. Lipids in grain tissues of oat (*Avena sativa*): differences in content, time of deposition, and fatty acid composition. *J. of Experimental Botany* **58** (10), 2463–2470.
- Carrapiso A. I. & García C., 2000. Development in Lipid Analysis: Some New Extraction Techniques and *in situ* Transesterification. *Lipids* **35** (11), 1167–1177.
- Christen P., 2014. Neue Bewertung der Fettqualität bei Schweinen. Zugang: http://www.schweizerfleisch.ch/fileadmin/dokumente/downloads/Medienmitteilung/2014/20140305/Faktenblatt_d_20140224.pdf.
- Christie W. W., 1993. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *In: Advances in Lipid Methodology – Two* (Ed. W. W. Christie). The Oily Press LTD. Vol 4, 69–112.
- Doreau M. Chilliard Y. Bauchart D. & Michalet-Doreau B., 1991. Influence of different fat supplements on digestibility and ruminal digestion in cows. *Ann. Zootech.* **40**, 19–30.
- Eller F. J., 1999. Interference by methyl levulinate in determination of total fat in low-fat, high sugar products by gas chromatographic fatty acid methyl ester (GC-FAME) analysis. *J. Assoc. of Anal. Chem. Int.* **82**, 766–769.
- Hammond E. W., 2001. Lipid analysis – a 20th century success?. *J. Science & Food Agriculture* **82**, 5–11.
- Jenkins T. C., 2010. Technical note: Common analytical errors yielding inaccurate results during analysis of fatty acids in feed and digesta samples. *J. Dairy Sciences* **93**, 1170–1174.
- Murphy D. J. & Vance J., 1999. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends in Biochemical Sciences (TiBS)* **24** – March, 109–115.
- Newman R. K. & Newman C. W., 2008. Lipids. *In: Barley for Food and Health* (Ed. J. Wiley & Sons) Technology & Engineering, 72–74.
- Palmquist D. L. & Jenkins T. C., 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. *J. of Animal Science* **81**, 3250–3254.