

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fakultät Life Sciences**

Entwicklung einer UHPLC-CAD-Methode zur Bestimmung von  
Fettsäuren

Bachelorarbeit

im Studiengang  
Biotechnologie

vorgelegt von

**Patrick Athanasios Ntanos**

Matrikelnummer:

██████████

Hamburg

am

20.04.2025

Erstgutachter: Prof. Dr. Serhat Sezai Çiçek  
HAW Hamburg

Zweitgutachter: Dipl. Ing. Nadja Schnell  
HAW Hamburg

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.- Çiçek für die kontinuierliche Betreuung dieser Arbeit. Seine fachliche Unterstützung und konstruktiven Rückmeldungen haben die Umsetzung dieser Arbeit maßgeblich begleitet.

Darüber hinaus danke ich Frau Dipl.-Ing. Nadja Schnell für ihre engagierte Unterstützung während der gesamten Bearbeitungszeit. Sie hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen, begleitete sowohl die theoretische Ausarbeitung als auch die Laborpraxis mit großem Fachwissen.

Mein herzlicher Dank gilt Tanja Lamprecht-Prüfer, Andreas Graß und Robin Lion Westphal vom Labor für Instrumentelle Analytik an der HAW Hamburg. Ihre Geduld und die tägliche Bereitschaft zur Unterstützung im Labor waren mir eine große Hilfe und haben wesentlich zu meinem Fortschritt beigetragen. Sie standen mir jederzeit mit Fachwissen und Erfahrung zur Seite. Ein besonderes Dankeschön geht an Tanja Lamprecht-Prüfer für ihre herzliche Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die sowohl die anstrengenden als auch die motivierenden Phasen dieser Arbeit mit mir geteilt hat.

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung einer UHPLC-CAD-Methode zur quantitativen Bestimmung ausgewählter Fettsäuren, darunter Linolsäure, Linolensäure, Ölsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure. Die Analyse erfolgte in verschiedenen Reinsubstanzen sowie pflanzlichen Ölproben.

Zur Probenaufarbeitung wurde eine basische Hydrolyse eingesetzt, deren Bedingungen systematisch angepasst wurden. Dabei wurden unterschiedliche Lösungsmittel, Emulgatoren, Tenside und pH-Bereiche getestet. Die optimierte Methode wurde anschließend auf reale Proben angewendet und hinsichtlich Löslichkeit, Homogenität sowie chromatographischer Qualität bewertet.

Die UHPLC-Analysen zeigten über alle Versuchsreihen hinweg stabile Retentionszeiten, akzeptable Peak-Symmetrien und eine klare Trennung der Zielverbindungen. Die qualitative Verteilung der Fettsäuren entsprach weitgehend den erwarteten Mustern, auch wenn einzelne Konzentrationen abwichen. Die Wiederfindungsraten lagen in mehreren Fällen unterhalb der literaturbekannten Werte, was unter anderem auf Matrixeffekte, Probenalter oder Aufarbeitungsverluste zurückgeführt werden könnte.

Die Bewertung der Wiederholpräzision ergab für die quantifizierbaren Komponenten relative Standardabweichungen der Konzentrationen von 3,8 % (Ölsäure) bzw. 7,5 % (Linolsäure) und bestätigte die Eignung der Methode für vergleichende Analysen. Insgesamt erwies sich die entwickelte UHPLC-CAD-Methode als geeignet zur zuverlässigen Identifikation und semiquantitativen Beurteilung von Fettsäuren in komplexen Matrices.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>II</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>2</b>
2.1 Grundlagen der Fettsäuren in natürlichen Ölen und als Reinsubstanzen ...	2
2.1.1 Theoretische Grundlagen der Fettsäuren .....	2
2.1.2 Nomenklatur von Fettsäuren .....	3
2.2 Apparative und methodische Grundlagen der UHPLC .....	5
2.2.1 Historie .....	5
2.2.2 Prinzip der UHPLC .....	5
2.2.3 Aufbau der UHPLC-Anlage .....	7
2.3 Alkalische Hydrolyse von Triglyceriden .....	9
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
3.1 Verwendete Säulen, Geräte und Software .....	11
3.2 Reagenzien und Standardlösungen .....	14
3.3 Angesetzte Lösungen und Standards .....	15
3.3.1 Herstellung der Stammlösungen und Verdünnungen.....	15
3.4 Entwicklung und Optimierung der UHPLC-Methode .....	16
3.5 Verwendete Proben für die Analyse .....	17
3.6 Quantifizierung mittels externer Kalibrierung .....	18
3.6.1 Erstellung der Kalibrierkurve und Peak-Identifizierung.....	18
3.6.2 Anwendung der Kalibrierkurve .....	20
3.6.3 Exemplarisches Berechnungsbeispiel.....	20
3.6.4 Berechnung der Masse und Wiederfindungsrate .....	21
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>22</b>
4.1 Optimierung und Entwicklung der Probenvorbereitung mittels basischer Hydrolyse .....	22
4.1.1 Vorversuche .....	22
4.1.2 Systematische Optimierungen .....	23
4.1.3 Vergleich der Lösungsmittel .....	24
4.1.4 Anwendung auf reale Proben .....	26
4.1.5 Weiterführende Optimierungen: Lösungsmittelkombinationen .....	27
4.1.6 Hydrolyse mit Tensiden und Emulgatoren.....	29
4.1.7 Optimierung der Hydrolyseaufarbeitungsmethode mittels Emulgators .....	30
4.1.8 pH senkende Anpassungen .....	32
4.1.9 Rückkehr zur ursprünglichen Anfangsmethode.....	34

4.1.10 Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Vergleich zweier SPE-Kartuschen .....	35
4.1.11 Hydrolyseaufarbeitungsansatz mit CTAB .....	36
4.1.12 Anpassungen der vorherigen Methode (Linolsäure und Ölsäure) ..	36
4.1.13 Optimierung der Hydrolyse Aufarbeitung (für Leinöl) .....	39
4.1.14 Finale Hydrolyseaufarbeitungsmethoden .....	41
4.2 Finale Hydrolyseaufarbeitungsmethode .....	42
4.2.1 Fettsäureverteilung und Konzentrationen .....	47
4.2.2 Symmetrie der Peaks .....	48
4.2.3 Retentionszeiten .....	49
4.2.4 Trennschärfe .....	49
4.2.5 Bewertung der Fettsäure-Wiederfindung im Kontext literaturbekannter Zusammensetzungen .....	50
4.3 Präzisionsbestimmung .....	51
4.3.1 Quantitative Messergebnisse .....	51
4.3.2 Bewertung der Wiederholpräzision .....	52
<b>5 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>53</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>Anhang A: GC-Referenzmessung zur Peak-Identifikation.....</b>	<b>59</b>
<b>Anhang B: Methodische Entwicklung und Messergebnisse .....</b>	<b>60</b>
Anhang B1: GC-Analysen zur Methylesterbildung (Ansätze 4–6) .....	60
Anhang B2: UHPLC-Analyse von Ansatz Nr. 2 (Messung #20) .....	62
<b>Anhang C: Hinweis zur Nutzung von KI-gestützten Schreibwerkzeugen ..</b>	<b>63</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Basische Hydrolyse eines Triglycerids (Latscha, et al., 2023, p. 460) .....	10
Abbildung 3-1: Ölsäure-Kalibrierung mit linearer Regressionsanpassung .....	19
Abbildung 3-2: Linolsäure-Kalibrierung mit quadratischer Regressionsanpassung .....	20
Abbildung 4-1: Chromatogramm der Fettsäureverteilung in Walnussöl .....	43
Abbildung 4-2: Chromatogramm der Fettsäureverteilung in Erdnussöl .....	44
Abbildung 4-3: Chromatogramm der Fettsäureverteilung in Leinöl (ohne Zoom) .....	45
Abbildung 4-4: Chromatogramm der Fettsäureverteilung in Linolsäure .....	46
Abbildung 4-5: Chromatogramm der Fettsäureverteilung in Ölsäure .....	47
Abbildung A-1: Basische Veresterung von Leinöl .....	59
Abbildung B-1: GC-Chromatogramm von Ansatz 4 (pH 6–7,5), Methanol-Probe nach basischer Hydrolyse .....	60
Abbildung B-2: GC-Chromatogramm von Ansatz 5 (pH 4,5–5), Methanol-Probe nach basischer Hydrolyse .....	61
Abbildung B-3: GC-Chromatogramm von Ansatz 6 (pH 3,5–4), Methanol-Probe nach basischer Hydrolyse .....	61
Abbildung B-4: UHPLC-Chromatogramm und Auswertung der Linolsäure-Probe (Ansatz 2, Messung #20) .....	62

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Strukturelle und physikalische Eigenschaften identifizierter Fettsäuren.....	4
Tabelle 2-2: Prozentuale Fettsäurezusammensetzung ausgewählter pflanzlicher Öle (U.S. Department of Agriculture, 2025) (Krist, 2013, pp. 420,544,669,808).....	4
Tabelle 3-1: Technische Spezifikationen der getesteten Säulen.....	11
Tabelle 3-2: Verwendete Geräte und Software .....	12
Tabelle 3-3: Einwegartikel.....	13
Tabelle 3-4: Verwendete Chemikalien, Standards und Lösungen.....	14
Tabelle 3-5: Angesetzte Lösungen für Probenvorbereitung und Analyse .....	15
Tabelle 3-6: Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierlösungen.....	16
Tabelle 3-7: Parameter des Gradientenprogramms für die Accucore™ RP-MS und Accucore™ aQ C18 Säulen (RP-Modus).....	16
Tabelle 3-8: Parameter des Gradientenprogramms für die Luna® Omega C18 Säule (RP-Modus) .....	17
Tabelle 3-9: Übersicht der eingesetzten Proben im Rahmen der Methodenentwicklung und finalen der Analyse.....	18
Tabelle 4-1: Ergebnis eines exemplarischen Frühversuchs zur pH-Absenkung mit 0,1 % Ameisensäure in Wasser.....	23
Tabelle 4-2: Optimierte Bedingungen und Ergebnisse der Hydrolyseaufarbeitung .....	24
Tabelle 4-3: Vergleich von Lösungsmitteln für Hydrolyseansätze .....	25
Tabelle 4-4: Auswirkungen der Hydrolyse auf reale Proben .....	27
Tabelle 4-5: Untersuchung der Lösungsmittelkombinationen bei der Hydrolyseaufarbeitung .....	28
Tabelle 4-6: Hydrolyse mit Tensid (Brij® 35, Polyethylenglycoldodecylether)....	29
Tabelle 4-7: Hydrolyse mit Emulgator (Triethanolamin) .....	30
Tabelle 4-8: Ergebnisse und Zusammensetzung der modifizierten Emulgator-Hydrolyse .....	31
Tabelle 4-9: Übersicht der Hydrolyseansätze einschließlich der Zusammensetzung, pH-Werten und Beobachtungen .....	32

Tabelle 4-10: Zusammensetzung und Beobachtungen der Hydrolyse-Reproduktionsaufarbeitungsansätze mit altem und neuem Leinöl .....	34
Tabelle 4-11: Übersicht der modifizierten Hydrolyseansätze .....	38
Tabelle 4-12: Übersicht der modifizierten Hydrolyseansätze .....	40
Tabelle 4-13: Übersicht der finalen Hydrolyseansätze für Erdnussöl, Walnussöl, Leinöl, Linolsäure und Ölsäure .....	42
Tabelle 4-14: Retentionszeiten, Peakflächen, Konzentrationen und Symmetriefaktoren identifizierter Fettsäuren in einer Walnussöl-Probe.....	43
Tabelle 4-15: Retentionszeiten, Peakflächen, Konzentrationen und Symmetriefaktoren identifizierter Fettsäuren in einer Erdnussöl-Probe .....	44
Tabelle 4-16: Retentionszeiten, Peakflächen, Konzentrationen und Symmetriefaktoren identifizierter Fettsäuren in einer Leinöl-Probe .....	45
Tabelle 4-17: Retentionszeiten, Peakflächen, Konzentrationen und Symmetriefaktoren identifizierter Fettsäuren in einer Linolsäure-Probe.....	46
Tabelle 4-18: Retentionszeiten, Peakflächen, Konzentrationen und Symmetriefaktoren identifizierter Fettsäuren in einer Ölsäure-Probe.....	47
Tabelle 4-19: Prozentuale Wiederfindungsraten (WFR) der einzelnen Fettsäuren in den untersuchten Proben (Walnussöl, Erdnussöl, Leinöl, Linolsäure, Ölsäure).....	50
Tabelle 4-20: Einzelwerte der sechs Wiederholmessungen für Retentionszeit, Konzentration und Peakfläche .....	51
Tabelle 4-21: Statistische Kenngrößen ( $\bar{x}$ , $s$ und RSD) zur Bewertung der Wiederholpräzision .....	52

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
UHPLC	Ultra Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (engl.: <i>ultra high performance liquid chromatography</i> )
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i> )
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC
NP/NPC	Normalphasenchromatographie
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie (engl.: <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> )
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
µL	Mikroliter
M	molar
mL	Milliliter
RT	Retentionszeit
KOH	Kaliumhydroxid
GC	Gaschromatographie
CAD	<i>Charged-Aerosol-Detektor (engl.: charged aerosol detector)</i>
DAD	Dioden-Array-Detektor (engl.: diode array detector)
n.a.	nicht anwendbar (engl.: <i>not applicable</i> )
Ph. Eur.	Europäische Pharmakopöe
Vials	Autosampler-Fläschchen (2 mL)
FA	Ameisensäure (engl.: <i>formic acid</i> )
WFR	Wiederfindungsrate
RSD	Relative Standardabweichung

# 1 Einleitung

Fettsäuren gehören zu den zentralen Molekülen biologischer Systeme. Sie erfüllen strukturelle Funktionen in Membranen, wirken als Energiespeicher und spielen eine Rolle in Signal- und Regulationsprozessen (Calder, 2015). Für die Untersuchung biologischer Systeme in medizinischen, ernährungsphysiologischen und analytischen Kontexten ist eine sensitive Fettsäureanalytik von zentraler Bedeutung (Görs, 2024).

Insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren kommen in marinen Organismen in hoher Konzentration vor und gelten als wertvolle Inhaltsstoffe funktioneller Lebensmittel (Tang & Row, 2013). Zudem sind Fettsäuren Zwischenprodukte in biotechnologischen Anwendungen, beispielsweise bei der mikrobiellen Herstellung von Biotensiden und langkettigen Dicarbonsäuren durch Fermentationsstämme (Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, o.J.).

Die quantitative Analyse von Fettsäuren stellt jedoch eine analytische Herausforderung dar: Viele Fettsäuren sind thermolabil, nicht flüchtig oder UV-inaktiv, wodurch klassische Verfahren wie HPLC-UV oder GC ohne Derivatisierung oft an ihre Grenzen stoßen (Vehovec & Obreza, 2010). Die Charged-Aerosol-Detection (CAD) bietet in Kombination mit der Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) eine ladungsbasierte, weitgehend matrixunabhängige Methode zur quantitativen Bestimmung unpolarer Verbindungen. Sie gilt als robust, sensitiv und universell einsetzbar und hat sich in verschiedenen Anwendungsbereichen bewährt (Vehovec & Obreza, 2010) (Barnhart, et al., 2024).

In komplexen Matrices wie pflanzlichen Ölen liegen Fettsäuren häufig in gebundener Form vor und müssen über geeignete Hydrolysebedingungen freigesetzt werden. Die Verseifung ermöglicht die Freisetzung gebundener Fettsäuren, sodass diese anschließend in geeigneten analytischen Verfahren bestimmt werden können. Durch Zugabe einer Säure können die dabei entstehenden Carboxylat-Ionen wieder in die entsprechenden Carbonsäuren überführt werden (Latscha, et al., 2023, pp. 295-296, 317).

Ziel dieser Arbeit war es, eine UHPLC-CAD-Methode zur quantitativen Bestimmung ausgewählter Fettsäuren zu entwickeln und die Probenvorbereitung gezielt zu optimieren. Dabei standen insbesondere die systematische Variation von pH-Wert, Reagenzienfolge und Lösungsmittelkombinationen sowie die Anwendung auf verschiedene Ölproben im Fokus. Die Ergebnisse wurden hinsichtlich Wiederfindung, Peakform und chromatographischer Trennung beurteilt.

## 2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen zur Bestimmung von Fettsäuren mittels UHPLC-CAD erläutert. Zunächst werden die chemischen Eigenschaften und die Nomenklatur von Fettsäuren behandelt, wie sie in natürlichen Fetten, Ölen und Reinsubstanzen vorkommen. Es folgen die apparativen und methodischen Grundlagen der UHPLC sowie deren Aufbau und Funktionsweise. Abschließend wird die basische Hydrolyse von Triglyceriden betrachtet, die zur Freisetzung der Fettsäuren dient und den analytischen Zugang ermöglicht.

### 2.1 Grundlagen der Fettsäuren in natürlichen Ölen und als Reinsubstanzen

#### 2.1.1 Theoretische Grundlagen der Fettsäuren

Fettsäuren sind langkettige Monocarbonsäuren, die als zentrale Bausteine vieler Lipide dienen. Sie bestehen aus einer Kohlenwasserstoffkette mit einer terminalen Carboxylgruppe. In natürlichen Lipiden treten Fettsäuren überwiegend mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen auf, da sie aus  $C_2$ -Einheiten (Acetyl-CoA) synthetisiert werden. Typischerweise besitzen Fettsäuren in biologischen Systemen Kettenlängen zwischen 14 und 24 Kohlenstoffatomen, wobei C16- und C18-Fettsäuren am häufigsten vorkommen (Christen, et al., 2016, pp. 70-71) (Belitz, et al., 2008, pp. 162-166).

Aufgrund ihrer chemischen Struktur lassen sich Fettsäuren in verschiedene Kategorien einteilen. Gesättigte Fettsäuren enthalten ausschließlich Einfachbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen und sind ein Hauptbestandteil tierischer Fette (Belitz, et al., 2008, pp. 162-166). Einfach ungesättigte Fettsäuren enthalten eine Doppelbindung, während mehrfach ungesättigte Fettsäuren mehrere Doppelbindungen aufweisen. (Berg, et al., 2018, pp. 407-408). Eine besondere Gruppe stellen die Trans-Fettsäuren dar, die entweder durch bakterielle Biohydrierung im Pansen von Wiederkäuern oder durch technische Fettverarbeitung entstehen (Belitz, et al., 2008, pp. 162-166).

Die physikalischen Eigenschaften von Fettsäuren hängen von der Kettenlänge sowie der Anzahl und Anordnung der Doppelbindungen ab. Längere Fettsäuren weisen einen höheren Schmelzpunkt auf (Berg, et al., 2018, pp. 407-408). Ungesättigte Fettsäuren besitzen hingegen niedrigere Schmelzpunkte als gesättigte Fettsäuren mit gleicher Kettenlänge. Ein wichtiger Einflussfaktor ist die Konfiguration der Doppelbindungen. Die meisten ungesättigten Fettsäuren liegen in der cis-Konfiguration vor, wodurch es zu einem Knick in der Molekülstruktur kommt. Diese strukturelle Veränderung stört die regelmäßige Packung der Moleküle und erhöht dadurch die Fluidität der Fettsäuren und ihrer Lipid-Derivate (Christen, et al., 2016, pp. 70-71).

### 2.1.2 Nomenklatur von Fettsäuren

Fettsäuren werden nach verschiedenen Systemen benannt. In der systematischen Namensgebung basiert der Name auf dem zugrunde liegenden Kohlenwasserstoff mit der Endung „-säure“, z. B. Octadecansäure für Stearinsäure (C18:0). Ungesättigte Fettsäuren erhalten Zusätze wie Octadecensäure (eine Doppelbindung) oder Octadecadiensäure (zwei Doppelbindungen) (Berg, et al., 2018, pp. 407-408).

Die Kurzschreibweise von Fettsäuren gibt an, wie viele Kohlenstoffatome und Doppelbindungen sie enthalten. Zum Beispiel steht C18:0 für eine gesättigte Fettsäure und C18:2 für eine zweifach ungesättigte Fettsäure. Die Lage der Doppelbindungen wird mit dem Symbol  $\Delta$  gekennzeichnet, wobei hochgestellte Indices die genaue Position angibt. So befindet sich bspw. bei der Schreibweise cis-  $\Delta^{11}$  eine cis-Doppelbindung zwischen C11 und C12 (Berg, et al., 2018, pp. 407-408).

Ein weiteres System ist die Zählweise vom Methylende, die als  $\omega$ 3-,  $\omega$ 6- und  $\omega$ 9-System beschrieben wird. Sie gibt an, wo die erste Doppelbindung vom Methylende aus liegt. So gehört eine Fettsäure mit der ersten Doppelbindung am dritten Kohlenstoffatom zur  $\omega$ 3-Familie, während Fettsäuren mit ersten Doppelbindungen an C6 oder C9 den  $\omega$ 6- bzw.  $\omega$ 9-Familien zugeordnet werden (Belitz, et al., 2008, pp. 162-166).

Zusätzlich existiert das n-System, das ebenfalls die Position der ersten Doppelbindung vom Methylende aus angibt. Dabei wird die Schreibweise n-3, n-6 oder n-9 verwendet, ähnlich wie das  $\omega$ -System. Beispielsweise wird Linolsäure als 18:2n-6 oder 18:2 $\omega$ -6 bezeichnet. In dieser Notation müssen die Doppelbindungen cis-konfiguriert und durch Methylengruppen unterbrochen sein, konjugierte Fettsäuren werden nicht berücksichtigt (Seppänen-Laakso, et al., 2002).

Die folgende Tabelle 2-1 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit experimentell identifizierten Fettsäuren mit ihren strukturellen und physikalischen Eigenschaften. Der Tabellenaufbau und die Inhalte basieren auf diesen wissenschaftlichen Fachquellen (Belitz, et al., 2008, pp. 162-166), (Berg, et al., 2018, pp. 407-408) und (Kurreck, et al., 2022, pp. 704-705) sowie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern der Substanzen Linolsäure,  $\gamma$ -Linolensäure und ( $\alpha$ -) Linolensäure und der DGF (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V., 2025). Die Kurzschreibweise (KSW) gibt die Anzahl der Kohlenstoffatome und Doppelbindungen an, wobei die Zahlen in Klammern die Position der Doppelbindungen entlang der Fettsäurekette angeben, beginnend am Carboxylende (COOH).

Tabelle 2-1: Strukturelle und physikalische Eigenschaften identifizierter Fettsäuren

KSW	Trivialname und systematischer Name	Struktur	Smp <sup>1</sup> (°C)
<b>Gesättigte Fettsäuren</b>			
16:0	Palmitinsäure n-Hexadecansäure	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -COOH	63
18:0	Stearinsäure n-Octadecansäure	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -COOH	70
<b>Einfach ungesättigte Fettsäuren</b>			
18:1 (9)	Ölsäure cis-Δ <sup>9</sup> -Octadecensäure	ω-9-Familie CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -COOH	13
<b>Mehrfach ungesättigte Fettsäuren</b>			
18:2 (9,12)	Linolsäure <sup>2</sup> cis, cis-Δ <sup>9</sup> ,Δ <sup>12</sup> - Octadecadiensäure	ω-6-Familie CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(CH=CH-CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -COOH	-5
18:3 (6,9,12)	γ-Linolensäure <sup>3</sup> all-cis-Δ <sup>6</sup> ,Δ <sup>9</sup> ,Δ <sup>12</sup> - Octadecatriensäure	ω-6-Familie CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	-
18:3 (9,12,15)	(α-)Linolensäure <sup>4</sup> all-cis-Δ <sup>9</sup> ,Δ <sup>12</sup> ,Δ <sup>15</sup> - Octadecatriensäure	ω-3-Familie CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH	-11

Die zuvor beschriebenen Fettsäuren kommen in pflanzlichen Ölen in charakteristischen Verhältnissen vor. Tabelle 2-2 zeigt die prozentuale Fettsäurezusammensetzung ausgewählter Öle. Die Daten basieren auf einer Auswertung mehrerer Literaturquellen. Je nach Quelle, Sorte und Herstellungsweise können die Werte variieren. Für jeden Wert wurde ein typischer Bereich angegeben, wobei vereinzelte Extremwerte ausgeschlossen wurden, um eine realistische Spannbreite darzustellen.

Tabelle 2-2: Prozentuale Fettsäurezusammensetzung ausgewählter pflanzlicher Öle (U.S. Department of Agriculture, 2025) (Krist, 2013, pp. 420,544,669,808)

Fettsäuren	Erdnussöl	Walnussöl	Leinöl	Olivenöl	Rapsöl
16:0	8,0-14,0	7-8	4-6	9-17	4
18:0	1-4,5	2-3	2-3	0,5-5	20
18:1	35-69	15-16	10-22	55-84	63
18:2	12-43	61-62	12-18	8-12	20
18:3 n-3	0-0,3	10-13	56-71	0,5-2	9

<sup>1</sup> Smp = Schmelzpunkt

<sup>2</sup> (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 2024)-Linolsäure

<sup>3</sup> (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 2024)- γ-Linolensäure

<sup>4</sup> (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 2024)-α-Linolensäure

## 2.2 Apparative und methodische Grundlagen der UHPLC

### 2.2.1 Historie

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) hat ihre Ursprünge in der traditionellen Flüssigchromatographie, die bereits im frühen 20. Jahrhundert durch den russischen Botaniker Mikhail Tswett entwickelt wurde (Madhuri, et al., 2024).

Sie wurde in den 1960er Jahren auf Basis der theoretischen und praktischen Erkenntnisse aus der klassischen Flüssigchromatographie sowie der Gas- und Dünnschichtchromatographie entwickelt. Ab 1970 kamen die ersten kommerziellen HPLC-Geräte auf den Markt, was zu einer Revolution der Flüssigchromatographie führte (Gey, 2021, p. 116).

Ein wesentlicher Fortschritt war die schrittweise Verkleinerung der Partikelgrößen in der stationären Phase. Während in der klassischen HPLC noch 10- $\mu\text{m}$ -Partikel verwendet wurden, reduzierten sich die Größen auf 5  $\mu\text{m}$  und später auf 3  $\mu\text{m}$ , wodurch sich die Trenneffizienz erheblich verbesserte. Diese Entwicklungen legten den Grundstein zur Einführung der Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC) (Gey, 2021, pp. 141-143).

Ab den 1980er Jahren wurde die Technologie weiter verfeinert, als kugelförmige Partikel und gebundene Phasen eingeführt wurden, was den Anwendungsbereich der HPLC erweiterte. Dies führte in den frühen 2000er Jahren schließlich zur Einführung der UHPLC (Madhuri, et al., 2024).

Dabei wurden Partikelgrößen von 2  $\mu\text{m}$  und kleiner (bis zu 1,3  $\mu\text{m}$  und 1,7  $\mu\text{m}$ ) eingesetzt, wodurch sich die Säulenvordrücke auf mehrere hundert Bar erhöhten. Dies machte eine Anpassung der Systemkomponenten notwendig, um höhere Drücke und reduzierte Totvolumina zu bewältigen (Gey, 2021, pp. 141-143).

Diese weiterentwickelte Technologie führte aber auch zu einer beispiellosen Verbesserung der Auflösung, Geschwindigkeit und Empfindlichkeit. So konnte die Nachfrage nach schnelleren Analysezeiten bei gleichzeitig verbesserter Trennqualität bedient werden (Madhuri, et al., 2024) (Rathod, et al., 2019).

### 2.2.2 Prinzip der UHPLC

Die Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC) basiert, wie auch die HPLC, auf der unterschiedlichen Verteilung der Analyten zwischen der mobilen und der stationären Phase (Madhuri, et al., 2024). Dabei strömt die mobile Phase an der stationären Phase vorbei, wodurch es zu wiederholten Wechselwirkungen zwischen den Probenbestandteilen und den Phasen kommt. Diese Wechselwirkungen bestimmen die Retentionszeiten der Analyten und sind abhängig von deren physikochemischen Eigenschaften (Gey, 2021, p. 117) (Madhuri, et al., 2024).

Die stationäre Phase besteht aus kleinen Teilchen fester, poröser oder oberflächenaktiver Materialien, die entweder selbst als Trägermaterial dienen oder mit einem physikalisch oder chemisch gebundenen Flüssigkeitsfilm überzogen sind.

Als mobile Phase kommen Flüssigkeiten zum Einsatz (Gey, 2021, p. 117). Dies können u.a. organische Lösungsmittel wie Methanol oder Acetonitril sein (Gey, 2021, p. 138) (Malviya, et al., 2010).

Die Qualität der Trennung in der UHPLC wird maßgeblich durch verschiedene Parameter beeinflusst. Dazu gehört insbesondere die Partikelgröße der stationären Phase, die Länge der Trennsäule sowie die Zusammensetzung der mobilen Phase. Auch Betriebsparameter wie Druck und Temperatur spielen eine entscheidende Rolle bei der Effizienz des Trennprozesses (Madhuri, et al., 2024).

### **2.2.2.1 Normalphasen-, Reversed-Phase- und Hydrophilic Interaction Chromatographie (NPC, RP, HILIC)**

Die HPLC, zu der auch die technologisch weiterentwickelte UHPLC gehört, kann abhängig vom verwendeten Phasensystem in verschiedene Typen unterteilt werden. Zu den wichtigsten gehören die NPC und die RP (Malviya, et al., 2010) (Madhuri, et al., 2024).

Die NPC basiert auf adsorptiven Wechselwirkungen mit einer polaren stationären Phase, die meist aus modifiziertem Silicagel oder Aluminiumoxid besteht. Diese stationären Phasen enthalten aktive Oberflächenzentren, wie freie Silanolgruppen oder Aluminium- und Sauerstoffionen, die Wechselwirkungen mit funktionellen Gruppen der Analyten eingehen können. Zur Elution werden unpolare organische Lösungsmittel wie Hexan oder Isooctan verwendet. Die Normalphasenchromatographie wird insbesondere in der Kohlenwasserstoff-Analytik eingesetzt, findet aber in anderen Anwendungen vergleichsweise selten Verwendung (Gey, 2021, p. 136).

Die RP ist die am häufigsten verwendete Technik in der HPLC. Sie nutzt hydrophobe stationäre Phasen, die durch chemische Modifikationen von Silicagelen mit C8- oder C18-Ketten entstehen. Im Gegensatz zur NPC besteht die mobile Phase hier aus polaren Lösungsmitteln, meist Methanol oder Acetonitril in Wasser. Diese Methode eignet sich besonders zur Trennung hydrophiler und mittelpolarer Substanzen. Um unerwünschte Wechselwirkungen mit freien Silanolgruppen zu minimieren, werden die stationären Phasen zusätzlich endgecappt. Dabei werden nicht modifizierte polare Gruppen mit Trimethylchlorsilan (TMCS) oder Hexamethyldisilazan (HMDS) substituiert, was die Stabilität der Säule erhöht und unerwünschte Adsorptionen verhindert. Zur Elution kann sowohl eine isokratische als auch eine Gradientenmethode eingesetzt werden. Während bei der isokratischen Elution die Zusammensetzung der mobilen Phase über die gesamte Trennung hinweg konstant bleibt, wird bei der Gradientenmethode der organische Anteil schrittweise erhöht. Dies verbessert die Peakauflösung und ermöglicht die Elution auch stark hydrophober Analyten. Nach einer Gradientenelution muss die Säule re-equilibriert werden, um die Ausgangsbedingungen für nachfolgende Analysen wiederherzustellen (Gey, 2021, pp. 136-138).

Neben klassischen C8- und C18-Phasen existieren u.a. auch polare chemisch gebundene Phasen, die durch die Silylierung von Silicagel mit Chlorsilanen polarer Struktur hergestellt werden. Zu diesen gehören Amino-, Diol- und Nitrilphasen, die

für spezifische Anwendungen wie die Kohlenhydratanalytik eingesetzt werden (Gey, 2021, p. 138).

Ein weiterer Vertreter ist die HILIC. Dabei handelt es sich um eine Trennmethode, die insbesondere für polare Substanzen eingesetzt wird. Sie basiert auf einer polaren stationären Phase in Kombination mit einer organisch-wässrigen mobilen Phase, wobei ein minimaler Wasseranteil von etwa 2 % erforderlich ist. Diese Wasserschicht bildet sich zwischen der Adsorptionsfläche der stationären Phase und dem organischen Anteil des Eluenten und ist essenziell für den Trennmechanismus (Gey, 2021, pp. 148-150).

Die HILIC funktioniert nach dem Prinzip der Verteilungschromatographie, wobei polare Analyten eine stärkere Wechselwirkung mit der stationären Phase aufweisen und somit eine längere Retentionszeit haben. Eine Erhöhung des Wasseranteils in der mobilen Phase führt dazu, dass die Retentionszeit polarer Analyten verkürzt wird. Dadurch kann HILIC als Gegenstück zur RPC betrachtet werden (Gey, 2021, pp. 148-150).

Für HILIC stehen verschiedene stationäre Phasen zur Verfügung, dazu gehören u.a. die folgenden Phasen: Zwitterionische Sulfobetain-Phase, Aminophase, Nitrilphase, Diolphase, Polyethylenglycolphase, Alkylamidphase. Viele dieser Phasen, insbesondere Amino-, Nitril- und Diolphasen, sind bereits aus der NPC bekannt. Darüber hinaus kommen auch Mixed-Mode-Phasen in der HILIC zum Einsatz (Gey, 2021, pp. 148-150).

Für die finale chromatographische Trennung wurden in dieser Arbeit RP-Säulen verwendet. Eine Übersicht der eingesetzten Säulen befindet sich in der Tabelle 3-1 des Kapitels 3.1 Verwendete Säulen, Geräte und Software.

### 2.2.3 Aufbau der UHPLC-Anlage

Eine UHPLC-Anlage besteht aus mehreren Komponenten, die für eine stabile und präzise Trennung notwendig sind:

**Pumpensystem:** Das Fördersystem der mobilen Phase in der UHPLC besteht aus Hochdruckpumpen, die präzise und reproduzierbare Flussraten liefern (Madhuri, et al., 2024). Dabei wird die mobile Phase aus dem Lösungsmittelreservoir gefördert und durch die Säule sowie den Detektor des Systems geleitet (Malviya, et al., 2010).

Im Vergleich zur HPLC, die Drücke bis etwa 800 bar erreicht, sind UHPLC-Systeme für Drücke bis 1.000 bar und höher ausgelegt, um schnelle Trennungen zu ermöglichen (Gey, 2021, pp. 142-143). Moderne Pumpensysteme nutzen binäre, ternäre oder quaternäre Konfigurationen, die eine exakte Steuerung von Gradientenprofilen ermöglichen (Madhuri, et al., 2024).

**Injektionssystem:** In der UHPLC kommen Hochdruck-Injektionssysteme zum Einsatz, die für eine zuverlässige Probenzufuhr unter hohen Drücken ausgelegt sind (Madhuri, et al., 2024). Dabei sorgen Rheodyne-Ventile für druckstabile und reproduzierbare Injektionsvorgänge (Gey, 2021, p. 143). Moderne Autosampler (Probengeber) ermöglichen dabei Injektionsvolumina von weniger als 1 µL bis zu

mehreren hundert Mikrolitern und verfügen über Mechanismen zur Vermeidung von Verschleppung sowie Temperaturkontrolle (Madhuri, et al., 2024). Da die Analysenzeiten in der UHPLC sehr kurz sind, müssen die automatisierten Injektionssysteme besonders robust, pulsfrei und für sehr kleine Probenmengen optimiert sein (Gey, 2021, p. 143).

**Trennsäulen:** Die Trennsäule ist das zentrale Element der chromatographischen Trennung und bestimmt maßgeblich die Effizienz einer UHPLC-Analyse. In modernen UHPLC-Säulen werden stationäre Phasen auf Siliziumdioxidbasis, Polymerbasis oder hybride organisch-anorganische Materialien eingesetzt (Madhuri, et al., 2024) (Gey, 2021, p. 143).

**Detektionssysteme:** In der UHPLC bilden die Detektionsmethoden der klassischen HPLC die Grundlage für die Detektoren. Dabei kommen vor allem UV/VIS-Detektoren, Diodenarray-Detektoren (DAD) und Massenspektrometrie-Kopplungen (LC-MS) zum Einsatz (Gey, 2021, p. 146). Neben diesen dominierenden Methoden existiert eine Vielzahl weiterer Detektoren, darunter Polarimeter, Leitfähigkeitsdetektoren, Stickstoffdetektoren und Viskositätsdetektoren. Insbesondere Aerosoldetektoren, wie der Lichtstreuendetektor und der Charged Aerosol Detector (CAD), gewinnen zunehmend an Bedeutung, da sie eine zuverlässige Detektion von UV-inaktiven Komponenten im Gradientenmodus ermöglichen (Mladek & Kromidas, 2019). Da in dieser Arbeit der CAD eingesetzt wurde, wird dieser Detektionstyp im Folgenden detaillierter beschrieben.

**Diodenarray-Detektor (DAD):** „Der Diodenarraydetektor (DAD) erfasst einen breiten Wellenlängenbereich (z. B. 210–360 nm) und sendet diesen auf eine Reihe lichtempfindlicher Dioden. Jede Diode wird periodisch abgescannt, wodurch ein dreidimensionales Chromatogramm entsteht. Neben der Signalhöhe und der Retentionszeit kann der DAD auch UV-Spektren zu einem bestimmten Zeitpunkt liefern. Dies ermöglicht eine detaillierte Analyse der absorbierenden Moleküle. Das mit einem DAD aufgenommene Chromatogramm zeigt die Retentionszeit auf der x-Achse und die Extinktion (Absorbance) in mAU auf der y-Achse. Zusätzlich kann die Wellenlänge als dritte Dimension dargestellt werden. Dadurch können Peakreinheiten bestimmt und Spektrendatenbanken erstellt werden. Die Zeitkonstante des Detektors beeinflusst die Signalglättung. Eine falsche Einstellung kann zu einem erhöhten Grundrauschen oder einer verringerten Auflösung führen (aprentas, 2017, pp. 267-271).

**Charged Aerosol Detektor (CAD):** Die CAD ist eine Detektionstechnik, die zur Messung nichtflüchtiger sowie vieler teilflüchtiger Substanzen eingesetzt wird (Barnhart, et al., 2024). Im Vergleich zur UV-Detektion, die vor allem für Analyten mit UV-absorbierenden Chromophoren genutzt wird, oder zur Massenspektrometrie, deren Signal von der Ionisierung des Analyten abhängt, bietet die CAD eine universellere Nachweismöglichkeit (Barnhart, et al., 2024) (Vehovec & Obreza, 2010). Besonders relevant ist dies für Verbindungen, die in der UV-Detektion nur schwer nachweisbar sind. Dazu gehören beispielsweise Zucker, Tenside und Fettsäuren (Vehovec & Obreza, 2010).

Der Detektionsprozess beginnt mit der Zerstäubung des Eluentenstroms in feine Tröpfchen. Diese Tröpfchen werden anschließend getrocknet, sodass feine Analytenpartikel entstehen, die danach durch einen geladenen Stickstoffstrom

aufgeladen werden (Barnhart, et al., 2024). Die Menge der aufgenommenen Ladung ist dabei weitgehend unabhängig von den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Analyten und hängt hauptsächlich von der absoluten Masse des nichtflüchtigen Analyten ab (Vehovec & Obreza, 2010).

Ein wesentlicher Vorteil der CAD liegt in ihrer gleichmäßigen Detektionsreaktion, die es ermöglicht, mehrere Analyten mit nur einem einzigen Kalibrierstandard zu quantifizieren. Dies ist besonders nützlich, wenn spezifische Analytenstandards nicht verfügbar sind (Vehovec & Obreza, 2010).

Der Nachweis erfolgt durch den Ladungstransfer, bei dem ionisierter Stickstoff in einer Reaktionskammer mit den getrockneten Partikeln interagiert und dabei positive Ladungen auf diese überträgt. Anschließend werden die geladenen Partikel zu einem Kollektor geleitet, wo das gesamte Ladungssignal durch ein hochempfindliches Elektrometer gemessen wird. Das erzeugte Detektionssignal ist direkt proportional zur Menge des vorhandenen Analyten (Barnhart, et al., 2024) (Vehovec & Obreza, 2010).

Datenaufnahme und Datenverarbeitung: Das Datensystem verarbeitet die Signale des Detektors, integriert die Reaktionen der einzelnen Komponenten und erstellt ein interpretierbares Chromatogramm. Zudem nutzt es die Detektorsignale zur Bestimmung der Retentionszeit für die qualitative Analyse sowie der Probenmenge für die quantitative Analyse (Ali, 2022).

## 2.3 Alkalische Hydrolyse von Triglyceriden

Carbonsäureester sind eine bedeutende Stoffklasse in der organischen Chemie und finden sich in vielen biologischen Molekülen, darunter Fette und Öle. Die Hydrolyse dieser Ester kann unter sauren oder basischen Bedingungen erfolgen. Während die saure Hydrolyse eine Gleichgewichtsreaktion darstellt, führt die basische Hydrolyse zu irreversiblen Produkten, da die Carboxylat-Ionen nicht leicht wieder verestert werden können. Diese Reaktion ist unter dem Begriff Verseifung (Esterhydrolyse) bekannt und spielt eine zentrale Rolle bei der Spaltung von Triacylglycerolen (Triglyceriden) in Glycerol (Glycerin) und die entsprechenden Salze der Fettsäuren (Latscha, et al., 2023, pp. 295-296).

Triacylglycerole sind Triester des Glycerols mit Fettsäuren und stellen die Hauptkomponente von natürlichen Fetten und Ölen dar. Sie bestehen aus einem Glycerinmolekül, das mit drei Fettsäureresten über Esterbindungen verknüpft ist. Die in Triglyceriden vorkommenden Fettsäuren sind meist langkettige Carbonsäuren mit 12 bis 20 Kohlenstoffatomen. Dazu gehören bspw. Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Linolsäure (Latscha, et al., 2023, pp. 460-461).

Die basische Hydrolyse von Triacylglycerolen verläuft mehrstufig und beginnt mit dem nukleophilen Angriff eines Hydroxid-Ions ( $\text{OH}^-$ ) auf die Estergruppe des Triglycerids. Infolge der Bindungsspaltung entstehen Glycerin sowie die entsprechenden Carboxylat-Ionen (Salze der Fettsäuren). Diese stabilen Ionen verhindern eine Rückreaktion, wodurch die Verseifung irreversibel ist (Latscha et al., 2023, S. 296).

Die schematische Darstellung dieser Reaktion findet sich in Abbildung 2-1. Sie zeigt die Umsetzung eines Triglycerids mit drei Äquivalenten Natriumhydroxid zu Glycerin und den entsprechenden Natriumsalzen der Fettsäuren.

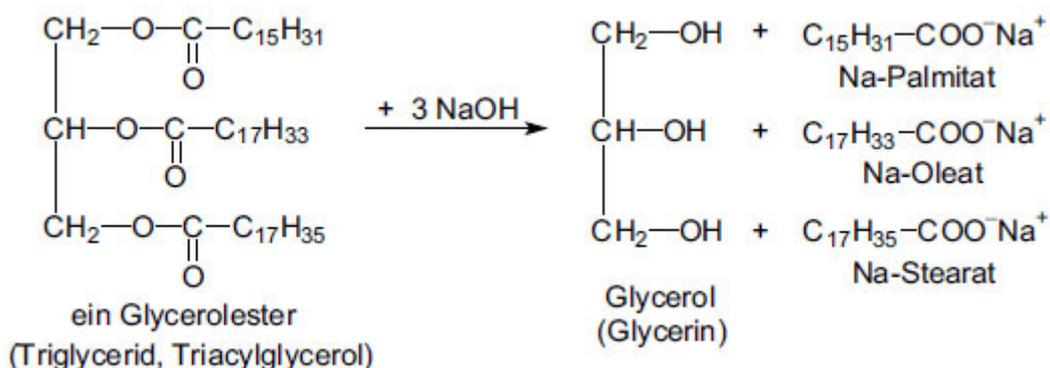


Abbildung 2-1: Basische Hydrolyse eines Triglycerids (Latscha, et al., 2023, p. 460)

Die Verseifung ermöglicht die Freisetzung gebundener Fettsäuren, sodass diese anschließend in geeigneten analytischen Verfahren bestimmt werden können (Latscha, et al., 2023, pp. 295-296). Durch Zugabe einer Säure können die dabei entstehenden Carboxylat-Ionen wieder in die entsprechenden Carbonsäuren überführt werden, wie es für Carboxylatverbindungen beschrieben ist (Latscha, et al., 2023, p. 317).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Säulen, Geräte und Software

Für die Entwicklung und Optimierung der UHPLC-Methode wurden verschiedene chromatographische Säulen getestet. Dabei kamen stationäre Phasen zum Einsatz, die speziell für die RP-Chromatographie entwickelt wurden, als auch solche, die für HILIC konzipiert sind.

Ziel war es, sowohl hydrophobe als auch stark polare Analyten effizient trennen zu können. Tabelle 3-1 zeigt eine Übersicht der eingesetzten Säulen, einschließlich ihrer Bezeichnungen, Herstellerangaben und wesentlicher Eigenschaften. Die technischen Daten wurden den Herstellerwebsites sowie, soweit verfügbar, den Verpackungsangaben der jeweiligen Produkte entnommen (siehe Literaturverzeichnis).

Tabelle 3-1: Technische Spezifikationen der getesteten Säulen

Bezeichnung	Hersteller, Katalog-Nr.	Beschreibung
Accucore™ C8	Thermo Fisher Scientific, 17226-152130	Säulengröße: 150 mm x 2,1 mm; Partikelgröße: 2,6 µm; Material: Silica, kugelförmig, fester Kern, ultrarein; stat. Phase: C8, endcapped, 5 % C, RP; Temperatur: bis 70 °C; pH: 2–9; Porengröße: 80 Å; max. Druck: 1000 bar Anwendung: Hydrophobe Moleküle
Accucore™ aQ C18	Thermo Fisher Scientific, 17326-152130	Säulengröße: 150 mm x 2,1 mm; Partikelgröße: 2,6 µm; Material: Silica, kugelförmig, fester Kern, ultrarein; stat. Phase: C18, polar endcapped, 9 % C, RP; Temperatur: bis 70 °C; pH: 2–9; max. Druck: 1000 bar; Anwendung: Polare Verbindungen
Accucore™ RP-MS	Thermo Fisher Scientific, 17626-152130	Säulengröße: 150 mm x 2,1 mm; Partikelgröße: 2,6 µm; Material: Silica, kugelförmig, fester Kern, ultrarein; stat. Phase: geschützt, endcapped, 7 % C, RP; Temperatur: bis 60 °C; Porengröße: 80 Å; pH: 2–9 max. Druck: 1000 bar; Anwendung: MS-basierte Trennungen
Luna® Omega C18	Phenomenex, 00D-4742-AN	Säulengröße: 100 mm x 2,1 mm; Partikelgröße: 1,6 µm; stat. Phase: C18, TMS-modifiziert;

		Porengröße: 100 Å; Anwendung: Hydrophobe und mäßig polare Verbindungen
bioZen™ Glycan	Phenomenex, 00F-4773-AN	Säulengröße: 150 mm x 2,1 mm; Partikelgröße: 2,6 µm; stat. Phase: Amide Polyol, HILIC Anwendung: Trennung von polaren und hydrophilen Substanzen

Zur Durchführung der Experimente wurden verschiedene Geräte und Software eingesetzt, um eine präzise Analyse zu gewährleisten. Die folgende Tabelle 3-2 gibt einen Überblick über die verwendeten Geräte, deren Modell und spezifischen Einsatzbereiche.

Tabelle 3-2: Verwendete Geräte und Software

Gerät	Name/Modell	Hersteller	Verwendung
Laborgeräte (Glaswaren)	diverse	diverse	divers
Ultraschallbad	Transsonic Digital S T 710DH	Elma®	Lösen der Analyten in Standardlösungen
Analysenwaage	Sartorius analytic A210P	Sartorius GmbH Göttingen	Wägen von Chemikalien
Eismaschine	Ziegra S-No. 117008	Ziegra Eismaschinen GmbH	Probenkühlung mit Eis
Reinstwasseranlage	Arium® Pro	Sartorius	Reinstwasser für Elutionsmittel
UHPLC-System	Vanquish™ Flex	Thermo Scientific™	Probenanalyse und Trennung
DAD-Detektor	Diode Array Detector FG	Thermo Scientific™	UV-Analyse
CAD-Detektor	Charged Aerosol Detector F	Thermo Scientific™	Universelle Quantifizierung
Autosampler	Vanquish™ Autosampler	Thermo Scientific™	Automatisierte Probeninjektion
Säulenthermostat	Vanquish™ Column Compartment	Thermo Scientific™	Thermostatisierung der Säulen
Pumpe	Vanquish™ Pump	Thermo Scientific™	Flusserzeugung für mobile Phase
Einkanalkolbenhubpipetten	Transferpipette® S, diverse Volumina	Brand	Dosierung von Substanzen
pH-Meter	pH-Meter Typ 763 Multi-Calimatic	Knick	pH-Messung
Software	Chromeleon 7.3.2	Dionex Softron GmbH	UHPLC-Steuerung & Datenauswertung

pH Elektrode	InLab® Routine Pt1000	Mettler Toledo	pH-Messung mit Temperaturkompensation
Heizplatte	MR Hei-Standard	Heidolph Instruments	Heizen & Rühren
Vakuumpumpe	DIVAC 2.4 L	Leybold AG	Unterdruck für Filtration oder SPE
Filtrationseinheit	Glas-Trichter mit Klemmenhalterung	diverse	Filtration unter Vakuum
Vortex-Schüttler	444-1372 (EU)	VWR International	Probenmischung
Inkubator	Brutschrank I	Memmert	Probenerwärmung
Magnetrührer-stäbchen	-	BRAND	Rühren von Flüssigkeiten
Magnetstabentferner	-	BOLENDER	Entfernen von Rührstäbchen
Oberschalenwaage	Acculab Sartorius	Sartorius Group	Gewichtsmessungen
LiChrolut Säulenkammer	LiChrolut	Merck	SPE mit Unterdruck

Die folgende Tabelle 3-3 gibt eine Übersicht über die eingesetzten Einwegartikel, die während der Versuche verwendet wurden.

Tabelle 3-3: Einwegartikel

Produkt	Typ	Hersteller
Nitrocellulose Membranfilter	0,45 µm	Labsolute (Th. Geyer)
Entsorgungsbeutel	-	Roth
Pasteurpipette	Kunststoff, steril	Roth
Pipettenspitzen	10 - 1000 µL	Brand
Schraubkappen (Screw Caps N9)	Blau mit Loch, Silikon beige, PTFE 1,3 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Autosampler Fläschchen (Vials N9)	Flach, Gewinde, 1.5 mL, 11.6x32 mm, braun	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
pH-Indikatorstäbchen (pH 7.5 - 14)	Alkalit®, nicht blutend	Merck KGaA
pH-Indikatorstäbchen (pH 0 - 6)	mColorpHast™, nicht blutend	Merck KGaA
HR-XA-Kartusche	Stark basischer quat. Ammonium-Anionenaustauscher, 3 mL / 500 mg	Macherey-Nagel GmbH & Co.
SB-Kartusche	Ammonium-Anionenaustauscher auf Kieselgelbasis, 3 mL / 500 mg	Macherey-Nagel GmbH & Co.

### 3.2 Reagenzien und Standardlösungen

Die folgende Tabelle 3-4 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Standards und Lösungen. Für jede Substanz ist die Bezeichnung, Katalognummer, CAS-Nummer, der Hersteller sowie der spezifische Verwendungszweck aufgeführt. Die Substanzen wurden für verschiedene Anwendungen, wie die Herstellung von Puffern, Probenaufbereitung oder als Bestandteile von Elutionsmitteln, eingesetzt.

Tabelle 3-4: Verwendete Chemikalien, Standards und Lösungen

Bezeichnung	Katalog-Nr.	CAS-Nr.	Hersteller	Verwendung
Ölsäure (Ph. Eur. <sup>5</sup> )	-	112-80-1	-	Standardlösung
Linolsäure (65,9 % <sup>6</sup> )	-	60-33-3	-	Standardlösung
Acetonitril	34851	75-05-8	Sigma- Aldrich	Bestandteil des Elutionsmittels
Reinstwasser	-	-	-	Eluentenherstellung
Aceton	1.00012	67-64-1	Supelco	Lösungsmittel Probenaufarbeitung
Methanol	1.06018	67-56-1	Merck	Lösungsmittel Probenaufarbeitung
2-Propanol	AE73.1	67-63-0	Roth	Lösungsmittel Probenaufarbeitung
Ameisensäure	15657520	64-18-6	Honeywell Fluka™	Probenaufarbeitung, Eluentenherstellung
Kaliumhydroxid Plätzchen	221473	1310-58-3	Merck	Probenaufarbeitung
Polyethylen- glykol- Dodecylether (Brij® 35)	8.01962.0250	9002-92-0	Merck	Tensid, verbesserte Löslichkeit von Ölen, Fetten
Triethanolamin	6300.1	102-71-6	Carl Roth	Emulgator, verbesserte Löslich- keit von Ölen, Fetten
Tetrahydro- furan	401757	109-99-9	Sigma- Aldrich	Lösungsmittel Probenaufarbeitung
Cetyltrimethyl- ammonium- bromid	22610.180	57-09-0	VWR Chemicals	Tensid, verbesserte Löslichkeit von Ölen, Fetten

<sup>5</sup> Laut Herstellerangaben

<sup>6</sup> Produktetikett

### 3.3 Angesetzte Lösungen und Standards

Für die Durchführung der Experimente wurden verschiedene Lösungen und Stammlösungen sowie Kalibrierlösungen speziell vorbereitet. Die Stammlösungen dienten als Ausgangslösungen für die Kalibrierlösungen, die zur Kalibrierung der Fettsäure-Analyse verwendet wurden, sowie für die Hydrolyseansätze. Zudem wurden Elutionsmittel für die mobilen Phasen sowie Reagenzien für die Hydrolyse und Neutralisation der Proben vorbereitet. Tabelle 3-5 gibt eine Übersicht über die angesetzten Lösungen, einschließlich ihrer Zusammensetzung, Konzentration und spezifischen Verwendungszwecke.

Tabelle 3-5: Angesetzte Lösungen für Probenvorbereitung und Analyse

Bezeichnung	Konzentration	Zusammensetzung	Verwendung
Stammlösung: Ölsäure	10 mg/mL	Ölsäure in Aceton	Ausgangslösung für Kalibrier- und Arbeitslösungen
Stammlösung: Linolsäure	10 mg/mL	Linolsäure in Aceton	Ausgangslösung für Kalibrier- und Arbeitslösungen
Kalibrierlösung: Ölsäure	0,1 – 5 mg/mL	Ölsäure in Aceton	Kalibrierung der Fettsäure-Analyse
Kalibrierlösung: Linolsäure	0,1 - 5 mg/mL	Linolsäure in Aceton	Kalibrierung der Fettsäure-Analyse
Elutionsmittel	0,10 % (v/v)	Ameisensäure in Reinstwasser	Elutionsmittel (mobile Phase)
Kaliumhydroxid	2 M, 4 M	KOH in Reinstwasser	Hydrolyse von Ölen (Verseifung)
Neutralisations- lösung	10 % (v/v) 20 % (v/v)	Ameisensäure in Aceton	Neutralisation nach Hydrolyse
Elutionslösung	5 % (v/v)	Ameisensäure in MeOH	Elution SPE
Elutionslösung	5 % (v/v)	Ameisensäure in Aceton	Elution SPE

#### 3.3.1 Herstellung der Stammlösungen und Verdünnungen

Die Stammlösungen für Ölsäure und Linolsäure wurden aus den jeweiligen Reinstoffen hergestellt. Zu diesem Zweck wurden 100 mg der jeweiligen Substanz abgewogen und in 10 mL Aceton gelöst, um eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mg/mL zu erhalten.

Aus diesen Stammlösungen wurden die Kalibrierlösungen in den Konzentrationen 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 und 5,0 mg/mL durch Verdünnung hergestellt. Die Verdünnungen wurden nach dem folgenden Pipettierschema (Tabelle 3-6) durchgeführt, um die gewünschten Konzentrationen zu erreichen. Die Stammlösungen wurden jeweils mit Aceton auf das gewünschte Volumen verdünnt.

Tabelle 3-6 zeigt das Pipettierschema für die Herstellung der Kalibrierlösungen. Dort sind die entsprechenden Volumina der Stammlösungen sowie das Volumen von Aceton angegeben, das benötigt wird, um die verschiedenen Zielkonzentrationen zu erreichen. Nach der Verdünnung wurde jede Lösung für 30 Sekunden mit einem Vortex gemischt, um eine vollständige Homogenisierung zu gewährleisten.

Die hergestellten Kalibrierlösungen wurden direkt gemessen und zur Kalibrierung verwendet.

Tabelle 3-6: Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierlösungen

Zielkonzentration (mg/mL)	Volumen Stammlösung (mL)	Volumen Aceton (mL)
5,0	5,0	5,0
2,0	2,0	8,0
1,0	1,0	9,0
0,5	0,5	9,5
0,2	0,2	9,8
0,1	0,1	9,9

### 3.4 Entwicklung und Optimierung der UHPLC-Methode

Im Rahmen der UHPLC-Methodenentwicklung wurden spezifische Gradientenprogramme für die Trennung der Analyten auf verschiedenen Säulen eingesetzt. Die Programme wurden so gestaltet, dass sie die Trennleistung auf die jeweilige stationäre Phase optimieren. Die nachfolgenden Tabellen (Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8) zeigen die Parameter der Gradientenprogramme, die im Experiment angewendet wurden. Die technischen Spezifikationen der Säulen sind in Kapitel 3.1 in der Tabelle 3-1 zusammengefasst.

In beiden Gradientenprogrammen wurden zwei mobile Phasen verwendet: A1 bestand aus 0,1 % Ameisensäure (v/v) in destilliertem Wasser, während B3 reines Acetonitril repräsentierte. Der Verlauf des Gradienten wurde in beiden Fällen linear ausgeführt.

Das erste Gradientenprogramm wurde auf einer Accucore™ RP-MS-Säule im RP-Modus durchgeführt. Darüber hinaus wurde dasselbe Gradientenprogramm auch auf der Accucore™ aQ C18-Säule verwendet, wobei die Äquilibrierungszeit dort 15 Minuten betrug. Es wurde ein Injektionsvolumen von 5 µL verwendet. Tabelle 3-7 dokumentiert die Details des Programms.

Tabelle 3-7: Parameter des Gradientenprogramms für die Accucore™ RP-MS und Accucore™ aQ C18 Säulen (RP-Modus)

Nr.	Zeit (min)	Flussrate (mL/min)	A1 (%)	B3 (%)	Phase
1	-6,00	0,4	35,0	65,0	Äquilibrierung
2	0,00	0,4	35,0	65,0	Start Gradient

3	11,25	0,4	61,5	38,5	Gradient
4	15,00	0,4	85,0	15,0	Gradient
5	22,50	0,4	95,0	5,0	Gradient Ende
6	25,00	0,4	95,0	5,0	Lauf beenden

Das zweite Gradientenprogramm wurde ebenfalls im RP-Modus durchgeführt, jedoch auf einer Luna® Omega C18-Säule. Hier wurde ein Injektionsvolumen von 5 µL verwendet. Tabelle 3-8 zeigt die Parameter des Programms.

Tabelle 3-8: Parameter des Gradientenprogramms für die Luna® Omega C18 Säule (RP-Modus)

Nr.	Zeit (min)	Flussrate (mL/min)	A1 (%)	B3 (%)	Phase
1	-15,00	0,2	35,0	65,0	Äquilibrierung
2	-7,50	0,2	35,0	65,0	Äquilibrierung
3	0,00	0,2	35,0	65,0	Start Gradient
4	15,00	0,2	61,5	38,5	Gradient
5	20,00	0,2	85,0	15,0	Gradient
6	30,00	0,2	95,0	5,0	Gradient Ende
7	32,50	0,2	95,0	5,0	Lauf beenden

Abschließend wurde für die Hauptversuche die Accucore™ RP-MS-Säule mit dem zugehörigen Gradientenprogramm (Tabelle 3-7) ausgewählt. Diese Methode wurde als finale Trennmethode im Software-System (Chromeleon) gespeichert und für alle Folgeanalysen verwendet. Die UHPLC wurde über automatisierte Sequenzen gesteuert, sodass eine kontinuierliche Abarbeitung der Messungen erfolgen konnte.

Vor jedem Messtag wurde das System gemäß Laborstandard zunächst mit einem Acetonitril-Wasser-Gemisch gespült und mit der Startmischung des Gradienten äquilibriert. So wurde eine stabile Ausgangsbedingung sichergestellt und mögliche Kontaminationen durch vorherige Proben ausgeschlossen. Nach Messende erfolgte ebenfalls eine Spülung, um die Säule zu regenerieren und die Lebensdauer zu verlängern.

### 3.5 Verwendete Proben für die Analyse

Für die Experimente wurden verschiedene Proben von Ölen, Fetten und Standards verwendet, die unterschiedlichen Quellen entstammen. Einige der Proben stammen aus Laborabfüllungen mit unbekannter Herkunft, während andere aus eigener Produktion oder kommerziellen Quellen bezogen wurden. Tabelle 3-9 gibt eine Übersicht der eingesetzten Proben, einschließlich ihrer Bezeichnung und Herkunft. Diese Proben bildeten die Grundlage für die Untersuchung der Fettsäurezusammensetzung und die Kalibrierung der Analysemethoden.

Tabelle 3-9: Übersicht der eingesetzten Proben im Rahmen der Methodenentwicklung und finalen der Analyse

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ölsäure (gemäß Ph. Eur., lt. Hersteller)	Laborprobe, Herkunft unbekannt
Linolsäure (65,9 %, lt. Etikett)	Laborprobe, Herkunft unbekannt
Leinöl (alte Laborprobe)	Laborprobe, Herkunft unbekannt
Leinöl (neu)	Kunella Feinkost
Olivenöl, nativ	Eigenproduktion (Griechenland)
Erdnussöl	Laborprobe, Herkunft unbekannt
Rapskernöl	Rewe Bio
Sonnenblumenöl	Alnatura
Walnussöl	Laborprobe, Herkunft unbekannt
Kokosfett	Laborprobe, Herkunft unbekannt
Sesamöl	Laborprobe, Herkunft unbekannt
FAME37 MIX	Sigma Aldrich
Mandalextrakt	Laborprobe, Herkunft unbekannt

Von den in Tabelle 3-9 gelisteten Proben wurden im Rahmen der finalen Methode nur ausgewählte Proben erfolgreich analysiert. Die abschließende Auswertung konzentrierte sich auf Walnussöl, Erdnussöl, Leinöl (neu), Linolsäure und Ölsäure. Alle übrigen Proben wurden nicht oder nur in früheren methodischen Entwicklungsschritten untersucht und daher nicht weiter betrachtet.

### **3.6 Quantifizierung mittels externer Kalibrierung**

Die Quantifizierung der Fettsäuren in Proben unbekannter Zusammensetzung erfolgte mittels externer Kalibrierung auf Basis der in Kapitel 3.3 beschriebenen Kalibrierlösungen.

#### **3.6.1 Erstellung der Kalibrierkurve und Peak-Identifizierung**

Die zur Kalibrierung verwendete Linolsäurelösung enthielt neben Linolsäure auch weitere Fettsäuren. Da es sich nicht um einen Reinstoffstandard handelte (angegebener Linolsäuregehalt: 65,9 %), wurden die Konzentrationen aller in der Lösung enthaltenen Fettsäuren entsprechend angepasst. Die tatsächlichen Gehalte der einzelnen Komponenten wurden durch den betreuenden Professor ermittelt und in der Auswertesoftware hinterlegt. Die Kalibrierfunktionen basieren somit auf den korrigierten, realen Konzentrationen der jeweiligen Fettsäuren.

Die Kalibrierkurven wurden anhand von Kalibrierlösungen mit Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 5,0 mg/mL erstellt. Hierzu wurden die gemessenen Signalintensitäten (Peakflächen) gegen die bekannten Konzentrationen aufgetragen (Gey, 2021, pp. 218-219). Für Ölsäure ergab sich eine lineare Beziehung, weshalb eine lineare Regression verwendet wurde. Bei der Linolsäure hingegen wurde eine quadratische Anpassung erforderlich, da die Daten eine nicht-lineare Abhängigkeit aufwiesen.

Neben der Quantifizierung diente die Kalibrierung auch der Peak-Identifizierung der Fettsäuren in den nachfolgenden Proben. Die Retentionszeiten der Kalibrierlösungen wurden genutzt, um die detektierten Peaks in den Proben korrekt den jeweiligen Fettsäuren zuzuordnen. Es wurden folgende Fettsäuren identifiziert: Linolensäure, Linolsäure, Palmitinsäure, Ölsäure und Stearinsäure. Zur Absicherung der Peak-Identifikation wurde zusätzlich eine GC-Messung einer basischen Leinöl-Veresterung durchgeführt (Anhang A: GC-Referenzmessung zur Peak-Identifikation).

Die Kalibrierkurven für Ölsäure und Linolsäure sind in Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2 dargestellt.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden sowohl eine Ölsäure- als auch eine Linolsäurekalibrierung verwendet. Für erste Konzentrationsbestimmungen kam die Ölsäurekalibrierung zum Einsatz. Im weiteren Verlauf wurde jedoch ausschließlich die Kalibrierung auf Basis des Linolsäurestandards für die Berechnung der Konzentrationen in den final ausgewerteten Proben verwendet.

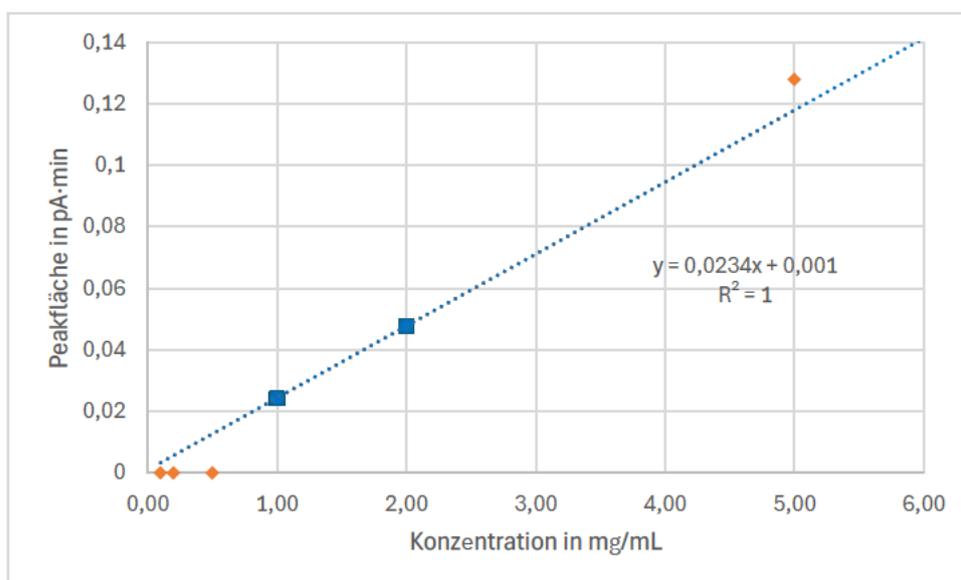


Abbildung 3-1: Ölsäure-Kalibrierung mit linearer Regressionsanpassung<sup>7</sup>

---

<sup>7</sup> Zur Berechnung der Trendlinie wurden ausschließlich die Messpunkte bei 1,0 mg/mL und 2,0 mg/mL (blau markierte Raute) verwendet. Die übrigen Punkte (orange dargestelltes Viereck) wurden aufgrund abweichender Werteverläufe nicht in die Regression einbezogen.

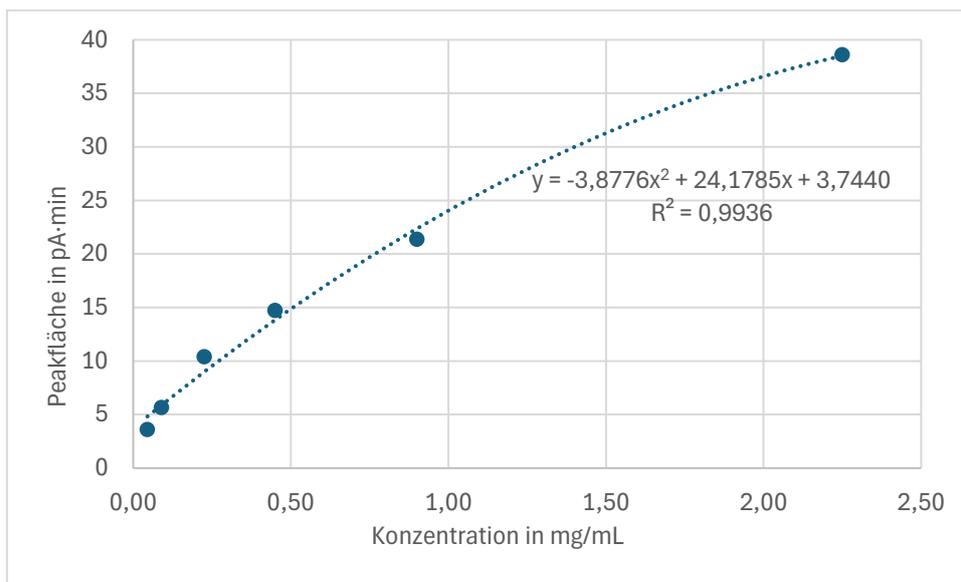


Abbildung 3-2: Linolsäure-Kalibrierung mit quadratischer Regressionsanpassung

### 3.6.2 Anwendung der Kalibrierkurve

Die Konzentrationen der Fettsäuren in den Proben wurden durch Einsetzen der gemessenen Peakflächen in die jeweilige Kalibrierfunktion berechnet:

Ölsäure:  $f(x) = mx + b$

Linolsäure:  $f(x) = ax^2 + bx + c$

Dabei entspricht  $f(x)$  der berechneten Peakfläche in  $\text{pA} \cdot \text{min}$  und  $x$  der Konzentration der jeweiligen Fettsäure in  $\text{mg/mL}$ . Zur Berechnung aus einem gemessenen Signalwert wird die Gleichung in die Form  $f(x) = ax^2 + bx + c$  überführt, wobei  $y$  die gemessene Peakfläche darstellt. Die Kalibrierkurven wiesen in allen Fällen ein hohes Bestimmtheitsmaß ( $R^2 > 0,99$ ) auf.

### 3.6.3 Exemplarisches Berechnungsbeispiel

Zur Veranschaulichung der Auswertung wurde exemplarisch die Berechnung der Konzentration einer Linolsäurekomponente aus einer gemessenen Peakfläche durchgeführt.

Die gemessene Peakfläche betrug:

$$y = 24,0813 \text{ pA} \cdot \text{min}$$

Die Kalibrierfunktion ergibt sich aus folgender quadratischer Gleichung:

$$f(x) = -3,8776 \cdot x^2 + 24,1785 \cdot x + 3,7440$$

Umformen und einsetzen der Peakfläche:

$$-3,8776 \cdot x^2 + 24,1785 \cdot x + 3,7440 - 24,0813 = 0$$

$$\Rightarrow -3,8776 \cdot x^2 + 24,1785 \cdot x - 20,3373 = 0$$

Umformung zur Normalform und mithilfe der pq-Formel lösen:

$$x^2 - 6,237 \cdot x + 5,245 = 0$$

$$x_{1|2} = -\frac{p}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{p}{2}\right)^2 - q}$$

$$x_1 = 1,002, x_2 = 5,236$$

Da  $x_2$  oberhalb des definierten Kalibrierbereichs von 0,1 bis 5,0 mg/mL liegt, wurde ausschließlich  $x_1$  als gültiger Wert berücksichtigt. Die Konzentration der Linolsäure in der Probe beträgt somit  $x_1 = \beta_i = 1,002$  mg/mL. Dieser Wert wurde exemplarisch manuell berechnet. In der Praxis erfolgt die Berechnung automatisiert durch die Auswertesoftware (hier: Chromeleon).

Bei linearer Kalibrierung, wie sie beispielsweise bei Ölsäure verwendet wurde, erfolgt die Berechnung der Konzentration entsprechend durch Umstellen der linearen Gleichung  $f(x) = mx + b$ . Die Vorgehensweise ist dabei analog zur quadratischen Berechnung, jedoch ohne Anwendung der pq-Formel.

### 3.6.4 Berechnung der Masse und Wiederfindungsrate

Berechnung der absoluten Masse Linolsäure in der Lösung:

$$m_i = \beta_i \cdot V_{Ges} \text{ (Ritgen, 2019, p. 27)}$$

$$x_1 = \beta_i = 1,002 \frac{mg}{mL}$$

$$V_{Ges} = \text{Gesamtvolumen der angesetzten Probenlösung} = 5 \text{ mL}$$

$$m_i = 1,002 \frac{mg}{mL} \cdot 5 \text{ mL} = 5,010 \text{ mg}$$

Berechnung der Wiederfindungsrate WFR:

$$WFR = \frac{m_{\text{gefunden}}}{m_{\text{gesamt, eingewogen}}} \cdot 100 \% \text{ (Ritgen, 2019, p. 28)}$$

$$WFR = \frac{5,010 \text{ mg}}{11,5 \text{ mg}} \cdot 100 \% = 43,57 \%$$

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Optimierung und Entwicklung der Probenvorbereitung mittels basischer Hydrolyse

Die Entwicklung einer geeigneten Hydrolyseaufarbeitungsmethode war ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit. Ziel war es, eine zuverlässige und reproduzierbare Probenvorbereitung zu etablieren, um Fettsäuren aus komplexen Matrices wie Ölen oder Fetten effizient zu isolieren und für die Analyse bereitzustellen.

Dazu wurden die chemischen und physikalischen Bedingungen systematisch angepasst, um Phasentrennungen zu vermeiden und stabile Lösungen zu erzeugen.

Im Laufe der Optimierung wurden verschiedene Parameter getestet, darunter die Wahl der Lösungsmittel, die Konzentration der zur Neutralisation eingesetzten Ameisensäure sowie die Einstellung des pH-Werts zur Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen (z. B. Alkoholesterbildung, siehe Anhang B1: GC-Analysen zur Methylesterbildung (Ansätze 4–6)). Auch die Verwendung von Tensiden und Emulgatoren sowie die Reihenfolge der Reagenzzugabe wurden gezielt variiert, um eine vollständige Homogenität zu erreichen.

#### 4.1.1 Vorversuche

Zunächst wurden geeignete Reagenzien und pH-Bereiche identifiziert, die eine effiziente Hydrolyse und eine möglichst homogene Lösung gewährleisten sollten. In den ersten Versuchen wurden die Reinsubstanzen Linolsäure (65,9 %), Ölsäure (gemäß Ph. Eur.) sowie ein älteres Leinöl getestet. Jeweils 10 mg der Probe (Konzentration: 5 mg/mL) wurden in einem 2-mL-Messkolben mit 1,5 mL Aceton gemischt, für 30 Sekunden vortexiert und anschließend mit 200 µL 2 M KOH-Lösung (in dest. Wasser) ergänzt.

Für die anschließende Neutralisationen wurde zunächst 0,1 % Ameisensäure (FA) in Wasser schrittweise zugegeben. Eine gezielte pH-Absenkung ließ sich auf diesem Weg jedoch nicht zuverlässig erreichen. Daher wurde im weiteren Verlauf 10 % Ameisensäure in Aceton eingesetzt, was eine kontrolliertere Neutralisation ermöglichte. Die erzielten pH-Werte lagen zunächst bei etwa 3 bis 5, in späteren Versuchsansätzen zwischen 2 und 3,5. Ein exemplarischer Versuch mit 0,1 % Ameisensäure in Wasser ist in Tabelle 4-1 dargestellt.

Tabelle 4-1: Ergebnis eines exemplarischen Frühversuchs zur pH-Absenkung mit 0,1 % Ameisensäure in Wasser

Nr.	Probe	Zusammensetzung	pH	Beobachtung
1	Linol-säure	1,5 mL Aceton 200 $\mu$ L 2 M KOH 0,1 % FA	~9,8–10	nicht gelöste Bestandteile, Phasentrennung
2	Ölsäure	1,5 mL Aceton 200 $\mu$ L 2 M KOH 0,1 % FA	~9,8–10	Phasentrennung, milchig-trüb
3	Leinöl	1,5 mL Aceton 200 $\mu$ L 2 M KOH 0,1 % FA	~9,8–10	Trüb, nicht gelöste Bestandteile

Trotz der verbesserten pH-Steuerung zeigte sich in mehreren Ansätzen eine anhaltend milchig-trübe Probenlösung mit sichtbaren ungelösten Anteilen. Zudem kam es zu Phaseneffekten, was auf eine eingeschränkte Löslichkeit oder Inkompatibilität einzelner Komponenten hindeuten könnte.

Abschließend wurden kleinere Anpassungen der Ameisensäurezugabe vorgenommen, um die pH-Werte feiner abzustimmen und die Homogenität weiter zu verbessern. Die Fettsäurepeaks zeigten im Chromatogramm eine klare Abgrenzung. In vielen Fällen war die Signalintensität jedoch gering. Zur weiteren Einordnung der Signalstärken wurden Kalibrierreihen erstellt (siehe Kapitel 3.6). Die Ergebnisse deuteten auf niedrige Fettsäurekonzentrationen in den untersuchten Proben hin. Diese Beobachtungen bildeten die Grundlage für die im folgenden Abschnitt beschriebenen systematischen Anpassungen.

#### 4.1.2 Systematische Optimierungen

Um die Hydrolyseaufarbeitung weiter zu verbessern, wurden in nachfolgenden Versuchen systematische Anpassungen der Reaktionsbedingungen vorgenommen. Ziel war es, eine möglichst homogene Verteilung der Substanzen zu erreichen und Phasentrennungen zu minimieren. Für die Optimierungen wurden jeweils 2,5 mL einer 10 - mg/mL- Linolsäure-Stammlösung verwendet (Endkonzentration: 5 mg/mL). Die Proben wurden zunächst für 10 Minuten in einem Ultraschallbad (US) behandelt. Anschließend wurden jeweils 500  $\mu$ L 2 M KOH oder 250  $\mu$ L 4 M KOH hinzugegeben. Nach einem kurzen Vortexen und einer weiteren Ultraschallbehandlung für 2 Minuten erfolgte die Neutralisation mit 400 bis 600  $\mu$ L einer 10 % Ameisensäurelösung. Die Beobachtungen und Ergebnisse dieser systematischen Optimierungen sind in Tabelle 4-2 dargestellt.

Tabelle 4-2: Optimierte Bedingungen und Ergebnisse der Hydrolyseaufarbeitung

Nr.	Probe	Zusammensetzung	pH	Besonderheit	Beobachtung
1	Linol-säure	2,5 mL Stammlösung 500 µL 2 M KOH 525 µL 10 % FA Aceton	~4,5–5	10 min US-Bad 10 s vortexen 2 min US-Bad	nicht gelöste/ kugelförmige Bestandteile, Phasentrennung
2	Linol-säure	2,5 mL Stammlösung 250 µL 4 M KOH 500 µL 10 % FA Aceton	~3–3,5	10 min US-Bad 10 s vortexen 2 min US-Bad	Phasentrennung weiterhin vorhanden
3	Linol-säure	2,5 mL 250 µL 4 M KOH 600 µL 10 % FA Aceton	~3	10 min US-Bad 10 s vortexen 2 min US-Bad	Keine Homogenität, Phasentrennung verstärkt

Trotz dieser optimierten Bedingungen blieben die Lösungen nach der Behandlung teilweise weiterhin trübe oder milchig, und es kam zu erneuten Phasentrennungen, bei denen sich nicht gelöste Bestandteile am Kolbenboden absetzten. Die Beobachtungen verdeutlichen, dass selbst durch Anpassungen der KOH-Konzentrationen, der Ameisensäurezugabe sowie der Ultraschallbehandlung keine vollständige Homogenität erzielt werden konnte. Diese Erkenntnisse bildeten jedoch die Grundlage für die nachfolgenden Optimierungen.

#### 4.1.3 Vergleich der Lösungsmittel

Nach den ersten Optimierungsversuchen lag der Fokus darauf, die Rolle verschiedener Lösungsmittel in der Hydrolyse zu untersuchen. Ziel war es, die Löslichkeit der Fettsäuren zu verbessern und Phasentrennungen zu minimieren. Dazu wurden Ethanol (Ansätze 1–3) und Methanol (Ansätze 4–6) als Lösungsmittel getestet.

Für alle Ansätze wurden 2,5 mL einer 10 mg/mL-Linolsäure-Stammlösung mit 500 µL 2 M KOH versetzt und für 30 Sekunden vortexiert. Anschließend erfolgte die Neutralisation mit 200–400 µL einer 10 % Ameisensäurelösung und es wurde kurz vortexiert. Das Endvolumen wurde jeweils mit dem entsprechenden Lösungsmittel auf 5 mL aufgefüllt. Die Endkonzentration betrug 5 mg/mL.

Die Ergebnisse zeigten pH-abhängige Unterschiede in der Löslichkeit. Im Bereich von pH 4,5–5 waren die Proben in beiden Lösungsmitteln klar und vollständig gelöst, was diesen Bereich als besonders geeignet erscheinen ließ. Im Bereich von pH 3,5–4 zeigten die Methanol-Proben eine klare und vollständige Lösung. Bei Ethanol trat hingegen eine leichte Trübung auf, was auf eine geringere Löslichkeit hindeutet. Bei höheren pH-Werten (5,5–6 bei Ethanol bzw. 6–7,5 bei Methanol) waren die Lösungen größtenteils klar, wobei sich bei Methanol eine leichte Trübung zeigte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-3 dargestellt.

Tabelle 4-3: Vergleich von Lösungsmitteln für Hydrolyseansätze

Nr.	Probe	Zusammensetzung	pH	Beobachtung/Ergebnis
1	Linol-säure	2,5 mL Stammlösung 500 µL 2 M KOH 400 µL 10 % FA Ethanol	3,5–4	Lösung leicht milchig und trübe
2	Linol-säure	2,5 mL Stammlösung 500 µL 2 M KOH 300 µL 10 % FA Ethanol	4,5–5	Lösung klar und vollständig gelöst
3	Linol-säure	2,5 mL Stammlösung 500 µL 2 M KOH 250 µL 10 % FA Ethanol	5,5-6	Lösung klar und vollständig gelöst
4	Linol-säure	2,5 mL Stammlösung 500 µL 2 M KOH 400 µL 10 % FA Methanol	3,5–4	Lösung klar und vollständig gelöst
5	Linol-säure	2,5 mL Stammlösung (10 mg/mL) 500 µL 2 M KOH 300 µL 10 % FA Methanol	4,5–5	Lösung klar und vollständig gelöst
6	Linol-säure	2,5 mL Stammlösung 500 µL 2 M KOH 200 µL 10 % FA Methanol	6–7,5	Lösung leicht trüb

Nachdem die Entwicklung der Hydrolyseaufarbeitungsmethode mit der Linolsäure-Reinsubstanz abgeschlossen war und die Sichtbarkeit einer größtenteils vollständigen Löslichkeit der Probenbestandteile auf einen erfolgreichen Hydrolyseprozess hinwies, wurde die Methode exemplarisch einer UHPLC-Analyse unterzogen, um ihre quantitative Zuverlässigkeit zu überprüfen.

Hierfür wurde Ansatz Nr. 2 (Tabelle 4-3) analysiert (siehe Anhang B2: UHPLC-Analyse von Ansatz Nr. 2 (Messung #20)). Die Ergebnisse zeigten eine gute Trennung der Fettsäuren sowie klar identifizierbare Peaks für Linol-, Ölsäure, Palmitin- und Stearinsäure. Die Konzentrationen wurden über die Regressionsfunktion der zuvor erstellten Kalibrierkurve berechnet und lagen in etwa im erwarteten Bereich. Dies bestätigt, dass die Hydrolyseaufarbeitung unter den gewählten Bedingungen zu einer zuverlässigen Freisetzung und quantitativen Erfassung der Fettsäuren führte. Es traten weder signifikante Verluste noch unerwünschte Nebenreaktionen auf.

Zusätzlich wurden die Methanol-Ansätze 4 bis 6 mittels GC analysiert, um die potentielle Bildung von unerwünschten Methylestern (ME) zu überprüfen (Anhang B1: GC-Analysen zur Methylesterbildung (Ansätze 4–6)). Die Ergebnisse zeigten, dass im höheren pH-Bereich (Ansatz 6) viele Methylester gebildet wurden. Im pH-Bereich von 4,5–5 (Ansatz 5) war die Bildung von Methylestern geringer als bei

Ansatz 6. Der pH-Bereich von 3,5–4 (Ansatz 4) lieferte nahezu keine Methylester und erzielte die besten Ergebnisse für die Fettsäureanalytik. Dieser wurde somit für die UHPLC-Analytik als optimal ausgewählt.

#### 4.1.4 Anwendung auf reale Proben

Die optimierte Hydrolysemethode wurde anschließend auf reale Proben angewendet, darunter Leinöl, Olivenöl, Sonnenblumenöl, Rapskernöl, Sesamöl, Walnussöl, Erdnussöl und Kokosfett. Ziel war es, die Methode unter realen Bedingungen zu validieren.

Für die Experimente wurden jeweils 25 mg der Proben in 2,5 mL Aceton gelöst und für 30 Sekunden vortexiert. Anschließend wurden 500  $\mu$ L 2 M KOH hinzugefügt, und die Mischung wurde erneut für 30 Sekunden vortexiert. Zur Neutralisation wurden 400  $\mu$ L einer 10 % Ameisensäurelösung hinzugegeben, wodurch alle Ansätze einen pH-Wert von ca. 3,5 bis 4 erreichten. Abschließend wurde das Endvolumen mit Ethanol auf 5 mL (bzw. 10 mL für Walnussöl und Erdnussöl) aufgefüllt, und die Lösung kurz vortexiert (Endkonzentration: 5 mg/mL).

Nach der Hydrolyseaufarbeitung wurden die Proben auf ihre Homogenität und Löslichkeit überprüft. Die meisten Proben zeigten nach der Aufarbeitung eine leichte Trübung und die Bildung zweier Phasen, wobei nicht gelöste Bestandteile am Kolbenboden sedimentierten. Kokosfett wies zunächst eine klare und vollständig gelöste Lösung ohne sichtbare Phasentrennung auf. Allerdings waren die späteren Messergebnisse auch hier nicht zufriedenstellend. Eine Überprüfung des im Kühlschrank gelagerten Ansatzes zeigte, dass sich ungelöste Bestandteile am Boden abgesetzt hatten, obwohl die Lösung optisch weiterhin klar erschien. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass optische Homogenität nicht zwangsläufig ein Garant für eine erfolgreiche Hydrolyse ist.

Diese Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen, die aus der Hydrolyse mit Linolsäure als Reinsubstanz abgeleitet worden waren, bei der eine vollständige Löslichkeit und Homogenität erzielt werden konnte. Die Unterschiede wurden auf die erhöhte Komplexität der Probenmatrix bei realen Proben zurückgeführt.

Um die Löslichkeit weiter zu verbessern, wurden zusätzliche Maßnahmen wie eine Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:1 mit Ethanol und eine anschließende Wärmebehandlung im Inkubator bei 40 °C für 30 Minuten getestet. Diese beiden Ansätze wurden auf alle Proben angewendet, mit Ausnahme von Kokosfett, das bereits direkt nach der Hydrolyse eine klare und vermeintlich vollständig gelöste Lösung zeigte. Die Verdünnung reduzierte die Probenkonzentration von 5 mg/mL auf 2,5 mg/mL. Dennoch blieben die Proben auch nach diesen Behandlungen trübe bzw. milchig und es kam zu erneuten Phasentrennungen, bei denen sich nicht gelöste Bestandteile am Kolbenboden absetzten. Die Zusammensetzung der Ansätze, sowie die Beobachtungen und Ergebnisse dieser zusätzlichen Behandlungen sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst.

Tabelle 4-4: Auswirkungen der Hydrolyse auf reale Proben

Nr.	Probe	Zusammen-setzung	Behandlung nach Hydrolyse	Beobachtung und Endergebnis nach Behandlung
1	Leinöl, Olivenöl, Sonnenblumenöl, Rapskernöl, Sesamöl, Walnussöl, Erdnussöl,	500 µL 2 M KOH 400 µL 10 % FA Ethanol (Endvolumen Auffüllung)	Verdünnung 1:1 mit Ethanol, Wärmebehandlung 40 °C	Trübe Lösung, nicht gelöste Bestandteile sedimentieren Keine vollständige Homogenität erreicht
2	Kokosfett	500 µL 2 M KOH 400 µL 10 % FA Ethanol (Endvolumen Auffüllung)	Keine Behandlung	Lösung klar und vollständig homogen Vollständig gelöste Lösung

#### 4.1.5 Weiterführende Optimierungen: Lösungsmittelkombinationen

Um die Hydrolysemethode weiter zu verbessern, wurden zusätzliche Maßnahmen erprobt, die darauf abzielten, Phasentrennungen zu minimieren und die Löslichkeit der Probenbestandteile zu maximieren. Dabei wurden unterschiedliche Kombinationen von Reagenzien, Lösungsmitteln und Behandlungszeiten getestet. In diesen Versuchen kam ausschließlich Leinöl als komplexe Matrix zum Einsatz. Insbesondere kamen Aceton und 2-Propanol als Lösungsmittelkombinationen zum Einsatz.

Für die Ansätze 1 bis 5 wurden jeweils 25 mg der Probe in 2,5 mL Aceton und 500 µL 2 M KOH gelöst, mit 400 µL einer 10 % Ameisensäure-Lösung auf einen pH-Wert von ca. 3,5 bis 4 neutralisiert und anschließend mit einem weiteren Lösungsmittel (Methanol oder 2-Propanol) auf ein Endvolumen von 5 mL aufgefüllt. Bei den Ansätzen 6 und 7 wurden hingegen 50 mg der Probe in 5 mL Aceton gelöst, mit 500 µL 2 M KOH und 400 µL 10 % Ameisensäure neutralisiert und mit dem jeweiligen Lösungsmittel auf ein Endvolumen von 10 mL aufgefüllt. Alle Ansätze hatten eine Endkonzentration: 5 mg/mL.

Die Ansätze 2 und 7 wurden aufgrund ihrer vergleichsweise besseren Homogenität ausgewählt und einer UHPLC-Analyse unterzogen, um ihre Eignung für die Fettsäureanalytik zu überprüfen. Die Zusammensetzung der Ansätze sowie die Beobachtungen sind in Tabelle 4-5 dargestellt.

Tabelle 4-5: Untersuchung der Lösungsmittelkombinationen bei der Hydrolyse-aufarbeitung

Nr.	Probe	Zusammensetzung	Beobachtung/Ergebnis
1	Leinöl	2,5 mL Aceton 500 µL 2 M KOH 400 µL 10 % FA Methanol (Endvolumen)	Keine vollständige Homogenität erreicht
2	Leinöl	2,5 mL Aceton 500 µL 2 M KOH 400 µL 10 % FA 2-Propanol	Vielversprechend, UHPLC analysiert
3	Leinöl	1 mL Aceton 500 µL 2 M KOH 400 µL 10 % FA Methanol (Endvolumen)	Keine vollständige Homogenität erreicht
4	Leinöl	1 mL Aceton 500 µL 2 M KOH 400 µL 10 % FA 2-Propanol (Endvolumen)	Keine vollständige Homogenität erreicht
5	Leinöl	2,5 mL Aceton 250 µL 4 M KOH 400 µL 10 % FA 2-Propanol (Endvolumen)	Keine vollständige Homogenität erreicht
6	Leinöl	5 mL Aceton 500 µL 2 M KOH 400 µL 10 % FA Aceton (Endvolumen)	Keine vollständige Homogenität erreicht
7	Leinöl	5 mL Aceton 250 µL 4 M KOH 400 µL 10 % FA Methanol (Endvolumen)	Vielversprechend, UHPLC analysiert

Trotz der Anpassungen der Reagenzien und Lösungsmittelkombinationen zeigten die meisten Proben weiterhin ungelöste Bestandteile oder Phasentrennungen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Herausforderungen, die durch die komplexe Zusammensetzung der Probenmatrix entstehen. Zwar konnten die Fettsäuren chromatographisch gut getrennt werden, jedoch lagen die Peakflächen unterhalb der zuverlässigen Auswertbarkeit, was auf zu geringe Konzentrationen in den analysierten Proben hinweist.

#### 4.1.6 Hydrolyse mit Tensiden und Emulgatoren

Nachdem die Kombination von Lösungsmitteln in den vorangegangenen Versuchen keine vollständige Homogenität und Löslichkeit der Proben erreichen konnte, wurden weitere Optimierungsversuche mit Tensiden und Emulgatoren durchgeführt. Ziel dieser Ansätze war es, die Löslichkeit von Ölen und Fetten zu verbessern und unerwünschte Phasentrennungen zu minimieren.

Im ersten Versuch wurde das Tensid Polyethylenglycoldodecylether (Brij® 35) eingesetzt. 25 mg Leinöl wurden in 2,5 mL Aceton gelöst und für 30 Sekunden vortexiert. Anschließend wurden 500 µL 2 M KOH zugegeben, und die Mischung wurde erneut für 30 Sekunden vortexiert. Danach wurden 6 Tropfen des Tensids tropfenweise zugegeben, um die Löslichkeit zu verbessern. Trotz der Zugabe des Tensids war keine sichtbare Verbesserung der Homogenität oder Löslichkeit festzustellen. Die Hydrolyse wurde nicht fortgeführt, da weiterhin ungelöste Bestandteile sichtbar waren. Die Beobachtungen dieses Versuchs sind in Tabelle 4-6 zusammengefasst.

Tabelle 4-6: Hydrolyse mit Tensid (Brij® 35, Polyethylenglycoldodecylether)

Nr.	Probe	Zusammensetzung	Konzentration	Besonderheit
1	Leinöl	2,5 mL Aceton 500 µL 2M KOH 6 Tropfen Tensid 1200 µL 10 % FA Abbruch der Aufarbeitung	2,5 mg/mL	Keine sichtbare Verbesserung der Löslichkeit

Parallel dazu wurde ein weiterer Ansatz getestet, bei dem ein Emulgator (Triethanolamin) eingesetzt wurde, um die Homogenität der Probenlösung zu verbessern und unerwünschte Phasentrennungen zu vermeiden. Dieser Ansatz wurde mit unterschiedlichen Proben und Konzentrationen durchgeführt, um die Auswirkungen des Emulgators auf die Löslichkeit und Homogenität zu analysieren.

Für die Durchführung der Ansätze 1 bis 3 wurden jeweils 25 mg Probe in einen 10 mL Kolben eingewogen. Anschließend wurden 2,5 mL 1-Propanol hinzugefügt, und die Probe wurde auf einer Rührplatte mit Rührfisch kontinuierlich bei 450 rpm gerührt. Die Rührplatte war dabei wärmer als handwarm. Danach wurden 500 µL 2 M KOH zugegeben, und das Rühren wurde fortgesetzt. Nach der Zugabe von 20 Tropfen Triethanolamin wurde die Probe für weitere 3 Minuten gerührt. Vor der Neutralisation mit 1200 µL einer 10 % Ameisensäurelösung wurde die Probe nochmals für 3 Minuten gerührt. Abschließend wurde das Endvolumen mit 1-Propanol auf 10 mL (Konzentration: 2,5 mg/mL) aufgefüllt.

Für Ansatz 4 wurde die Vorgehensweise leicht angepasst: Hier wurden 100 mg Leinöl in den Kolben eingewogen, und 2,5 mL 1-Propanol hinzugefügt. Nach den gleichen Rühr- und Reaktionsschritten wie bei den Ansätzen 1 bis 3 wurden 50 Tropfen Triethanolamin verwendet, bevor das Endvolumen mit 1-Propanol auf 10 mL (Konzentration: 10 mg/mL) aufgefüllt wurde.

Die Zielsetzung war, die Herausforderungen der bisherigen Hydrolyseversuche zu überwinden und eine zuverlässige Methode zu etablieren. Details zur Hydrolyseaufarbeitungsdurchführung sowie die Ergebnisse sind in Tabelle 4-7 zusammengefasst.

Tabelle 4-7: Hydrolyse mit Emulgator (Triethanolamin)

Nr.	Probe	Zusammensetzung	Beobachtung/Ergebnis
1 - 3	Leinöl, Linolsäure, Ölsäure	2,5 mL 1-Propanol (zum lösen) 500 µL 2 M KOH 20 Tropfen Emulgator 1200 µL 10 % AF 1-Propanol (10 mL Endvolumen Auffüllung)	Vollständige Homogenität und Löslichkeit erreicht
4	Leinöl	2,5 mL 1-Propanol (zum lösen) 500 µL 2 M KOH 20 Tropfen Emulgator 1200 µL 10 % AF 1-Propanol (Endvolumen Auffüllung)	Vollständige Homogenität und Löslichkeit erreicht

Die vier Ansätze wurden bereits mittels UHPLC analysiert. Dabei zeigten sich zusätzliche, zunächst unbeachtete Peaks, die retrospektiv betrachtet vermutlich auf die Bildung von Propylestern zurückzuführen sind. Diese unerwünschten Nebenprodukte entstanden vermutlich durch die bereits in der Lösungsphase eingesetzte Zugabe von 1-Propanol. Eine entsprechende Anpassung der Probenaufarbeitung erfolgte daher erst zu einem späteren Zeitpunkt.

#### 4.1.7 Optimierung der Hydrolyseaufarbeitungsmethode mittels Emulgators

Nachdem die Ansätze mit Triethanolamin als Emulgator (Tabelle 4-7) durchgehend klare und vollständig gelöste Probenlösungen zeigten, wurde die Methodenaufarbeitung weiter angepasst, um den Arbeitsaufwand zu reduzieren. Neben der Eliminierung des Rührfisches und der Rührplatte sollte auch das zusätzliche Umfüllen der Proben entfallen, wodurch eine mögliche Reduzierung des Probenvolumens oder gar ein Verlust von Analyten vermieden werden konnte.

Für die Modifikation wurden zwei Varianten getestet. In Ansatz V1 wurden 100 mg Leinöl (Endkonzentration: 10 mg/mL) verwendet, während in Ansatz V2 25 mg Leinöl (Endkonzentration: 2,5 mg/mL) eingesetzt wurden. Für beide Varianten wurde zunächst die entsprechende Menge Leinöl in einen 10-mL-Kolben eingewogen und anschließend mit 2,5 mL 1-Propanol versetzt. Nach einer einminütigen Vortex-Behandlung wurde 500 µL 2 M KOH zugegeben, gefolgt von der Zugabe des Emulgators. In Ansatz V1 wurden 50 Tropfen Triethanolamin, in Ansatz V2 20 Tropfen zugegeben. Nach jedem Schritt wurde jeweils erneut für eine Minute vortexiert. Die Neutralisation erfolgte durch die Zugabe von 1200 µL einer 10 % Ameisensäure-Lösung, wobei der pH-Wert direkt im Kolben mit Teststreifen überprüft wurde und im Bereich von ca. pH 6 bis 7 lag. Die Proben wurden

schließlich auf 10 mL mit 1-Propanol aufgefüllt und nochmals kurz vortexiert. Anschließend wurde jeweils ca. 1 mL der Lösung in ein GC-Vial überführt.

Die Ergebnisse der Modifikationen zeigten, dass beide Varianten homogen und vollständig gelöste Probenlösungen lieferten, was die Effektivität der Modifikation bestätigte. Die Zusammensetzung der Ansätze sowie die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 4-8 dargestellt.

Tabelle 4-8: Ergebnisse und Zusammensetzung der modifizierten Emulgator-Hydrolyse

Nr.	Probe	Zusammensetzung	Beobachtung/Ergebnis
V1	Leinöl	2,5 mL 1-Propanol (lösen) 500 µL 2 M KOH 50 Tropfen Emulgator 1200 µL 10 % AF 1-Propanol (Endvolumen Auffüllung)	Lösung klar und vollständig homogen
V2	Leinöl	2,5 mL 1-Propanol 500 µL 2 M KOH 20 Tropfen Emulgator 1200 µL 10 % AF 1-Propanol (Endvolumen Auffüllung)	Lösung klar und vollständig homogen

Da beide Ansätze optisch eine vollständige Homogenität zeigten, wurden sie mittels UHPLC analysiert. In den Chromatogrammen traten dabei zusätzliche Peaks auf, die in vorherigen Messungen nicht genügend Beachtung fanden. Diese Beobachtung legte nahe, dass während der Hydrolyse Nebenreaktionen aufgetreten sein könnten. Basierend auf früheren GC-Messungen (siehe Anhang B1: GC-Analysen zur Methylesterbildung (Ansätze 4–6)) war bereits bekannt, dass sich Alkoholester, wie Propylester, pH-abhängig bilden können. Die zusätzlichen UHPLC-Peaks deuteten darauf hin, dass es möglicherweise zu einer pH-bedingten Propylesterbildung durch den eingesetzten 1-Propanol gekommen war.

Zusätzlich stellte sich heraus, dass die Probenkonzentration in Ansatz V1 oberhalb des Kalibrierbereichs (0,1–5,0 mg/mL) lag, dadurch war eine zuverlässige Quantifizierung erschwert. Auch V2 lag im oberen Grenzbereich. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde die Methode weiter optimiert, um Nebenreaktionen zu minimieren. Dazu wurde die pH-Einstellung gezielt angepasst, um die Hydrolyse in einem Bereich von pH 3,5 bis 4 durchzuführen, in dem nachweislich weniger Ester gebildet wurden.

Um diese pH-Anpassung gezielt umzusetzen, wurden Tests zur pH-Einstellung an Ansatz V1 (100 mg Linolsäure, pH ~7) durchgeführt. Der ursprüngliche Ansatz hatte ein Volumen von ca. 9 mL, und die Zugabe der 10 % Ameisensäurelösung erfolgte schrittweise. In mehreren Stufen wurde eine Gesamtmenge von ca. 11 mL Ameisensäure hinzugegeben, um die pH-Absenkung systematisch zu testen. Die Messungen wurden mit einer pH-Elektrode durchgeführt, um verlässliche Werte zu erhalten. Trotz der hohen Säurezugabe blieb der pH-Wert nahezu unverändert und der angestrebte pH-Bereich wurde nicht erreicht.

#### 4.1.8 pH senkende Anpassungen

Im Zuge der Optimierung der Hydrolysemethode wurde der pH- Wert angepasst, um Nebenreaktionen zu minimieren und eine bessere Stabilität der Proben zu erreichen. Die KOH-Menge wurde dabei von 500  $\mu$ L auf 250  $\mu$ L 2 M KOH halbiert, um eine präzisere Kontrolle der pH-Regulierung zu ermöglichen. Zudem wurde eine 20 % Ameisensäurelösung anstelle der zuvor verwendeten 10 % Lösung eingesetzt, um eine effizientere Absenkung des pH- Werts in den gewünschten Bereich von 3,5 bis 4 zu erreichen.

Untersucht wurden verschiedene Proben, darunter Leinöl, Linolsäure, Ölsäure und Olivenöl (GR) (Ansätze 1 bis 4). Die Hydrolyse erfolgte durch das Einwiegen von 25 mg Probe in einen 10- mL- Kolben, gefolgt von der Zugabe von 2,5 mL 1- Propanol. Nach einer 1- minütigen Vortex-Behandlung wurde 250  $\mu$ L 2 M KOH zugegeben und die Probe erneut für 1 Minute vortexiert. Anschließend wurden 20 Tropfen Triethanolamin hinzugefügt und nochmals 1 Minute vortexiert. Die Neutralisation wurde mit 2000  $\mu$ L einer 20 % Ameisensäurelösung durchgeführt, wodurch ein pH- Wert im Bereich von 3,5 bis 4 erreicht wurde. Das Endvolumen wurde mit 1- Propanol auf 10 mL aufgefüllt und die Lösung abschließend kurz vortexiert. Die Endkonzentration betrug somit 2,5 mg/mL.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Methode durch die angepasste Neutralisation und die reduzierte KOH-Menge homogen und vollständig gelöste Proben für alle getesteten Probenarten lieferte, basierend auf der visuellen Inspektion der Ansätze 1 bis 4. Die Ergebnisse dieser Ansätze, einschließlich der Zusammensetzung und der erzielten Beobachtungen, sind in der folgenden Tabelle 4-9 zusammengefasst.

Tabelle 4-9: Übersicht der Hydrolyseansätze einschließlich der Zusammensetzung, pH-Werten und Beobachtungen

Nr.	Probe	Zusammensetzung	Beobachtung/Ergebnis
1 - 4	Leinöl (neu) Linolsäure Ölsäure Olivenöl (GR)	2,5 mL 1-Propanol (lösen) 250 $\mu$ L 2 M KOH (Verseifung) 20 Tropfen Emulgator 2000 $\mu$ L 20 % AF 1-Propanol (auf 10 mL Endvolumen)	Lösung klar und vollständig homogen
5	Leinöl (neu)	2,5 mL Aceton (lösen) 250 $\mu$ L 2 M KOH 20 Tropfen Emulgator 2000 $\mu$ L 20 % Ameisensäure 1-Propanol (auf 10 mL Endvolumen)	Lösung klar und vollständig homogen
6	Leinöl (neu)	2,5 mL THF (lösen) 500 $\mu$ L 2 M KOH 200 $\mu$ L 10 % AF Aceton (auf 5 mL Endvolumen)	Lösung trübe, viele nicht gelöste Bestandteile sedimentieren keine vollständige Homogenität erreicht
7	Leinöl (neu)	2,5 mL THF (lösen) 500 $\mu$ L 2 M KOH	2 Phasen und Lösung trübe

		500 $\mu$ L 10 % AF 1-Propanol (auf 5 mL Endvolumen)	
6 A.	Leinöl (neu)	4 mL von Ansatz 6 25 Tropfen Triethanolamin 3 mL 20 % AF 3 mL 1-Propanol	Lösung klar und vollständig homogen
7 B.	Leinöl (neu)	4 mL von Ansatz 7 16 Tropfen Triethanolamin 2 mL 20 % AF 1 mL 1-Propanol	Lösung klar und vollständig homogen

In den darauffolgenden UHPLC-Messungen zeigte sich, dass eine große Anzahl zusätzlicher Peaks im Chromatogramm vorhanden war. Um mögliche Einflüsse des Lösungsmittels auf die Analytik zu überprüfen, wurde in Ansatz 5 Aceton anstelle von 1-Propanol als Lösungsmittel getestet und der pH auf ~3-4 eingestellt (siehe Tabelle 4-9).

Um die Signalstärke zu erhöhen, wurde die Probenkonzentration in den nachfolgenden Versuchen gezielt angepasst. In Ansatz 6 wurde das Endvolumen auf 5 mL reduziert, während gleichzeitig THF (Tetrahydrofuran) als Lösungsmittel getestet wurde. THF ist ein polar-aprotisches Lösungsmittel, das häufig zur Lösung organischer Verbindungen eingesetzt wird. als Lösungsmittel getestet wurde. Zudem wurde die KOH-Konzentration auf 500  $\mu$ L 2 M KOH erhöht und die Zugabe von 200  $\mu$ L 10 % Ameisensäure vorgenommen (pH ~ 4,5). Die Lösung zeigte jedoch Trübungen und eine unvollständige Homogenität, mit Sedimentbildung (siehe Tabelle 4-9).

Um die Löslichkeit weiter zu verbessern, wurde in Ansatz 7 die Menge der zugesetzten Ameisensäure auf 500  $\mu$ L erhöht (pH Absenkung auf ~ 3,5-4), während die übrigen Parameter unverändert blieben. Auch in diesem Fall zeigte die Lösung jedoch eine Phasentrennung und blieb trübe (siehe Tabelle 4-9).

In einem weiteren Modifikationsschritt wurde in Ansatz 6 A die Zusammensetzung erneut angepasst. Dabei wurde der verbliebende Rest von Ansatz 6 (4 mL) mit 25 Tropfen Triethanolamin, 3 mL 20 % Ameisensäure und 3 mL 1-Propanol versetzt. Diese Kombination führte zu einer klaren und vollständig homogenen Lösung und einem pH von ~3,5 (siehe Tabelle 4-9).

In Ansatz 7 B wurde der verbliebende Rest von Ansatz 7 mit einer reduzierten Menge von 16 Tropfen THF, 2 mL 20% Ameisensäure und 1 mL 1-Propanol versetzt. Auch hier zeigte sich eine klare und vollständig homogene Lösung. Der pH lag bei ~3-3-5 (siehe Tabelle 4-9).

Der pH-Wert wurde in allen Ansätzen mit Teststreifen bestimmt, indem 3 Tropfen der jeweiligen Ansatzlösung mit etwas destilliertem Wasser gemischt wurden.

#### 4.1.9 Rückkehr zur ursprünglichen Anfangsmethode

Die Hydrolyse mit Emulgator wurde aufgrund der bisherigen Ergebnisse endgültig verworfen. Die getesteten Ansätze mit Triethanolamin zeigten trotz Modifikationen keine ausreichende Verbesserung der Löslichkeit oder Homogenität, und die Messungen offenbarten weiterhin Einschränkungen, wie unerwünschte Störpeaks und geringere gemessene Fettsäurekonzentrationen. Diese Nebenwirkungen sowie die erschwerte pH-Regulierung unterstreichen, dass der Einsatz von Emulgatoren in diesem Kontext keine praktikable Lösung darstellt.

Im Zuge der weiteren Optimierung wurde ein älterer Ansatz (02.12.24) identifiziert, der ein gutes Chromatogramm lieferte. Dieser Ansatz wurde aus einer alten Leinölprobe gewonnen, deren genaue Herkunft im Labor nicht mehr nachvollziehbar war. Da nicht sicher bekannt war, ob bei der ursprünglichen Hydrolyse eine Neutralisation mit Ameisensäure durchgeführt wurde, wurde darauf bei der Reproduktion bewusst verzichtet.

Der Hydrolyseansatz wurde zur Validierung sowohl mit altem Leinöl, des damaligen Ansatzes, als auch mit neuem Leinöl reproduziert. Dazu wurden jeweils 10 mg Probe eingewogen und mit 1,5 mL Aceton versetzt. Nach 30 Sekunden Vortexen wurden 200 µL 2 M KOH zugegeben und das Volumen mit Aceton auf 2 mL Endvolumen aufgefüllt (Endkonzentration: 5 mg/mL). Nach erneutem 30-sekündigen Vortexen wurden die Proben in GC-Vials abgefüllt.

Die obere Hälfte des Ansatzes wurde nach vollständigem Absetzen der Bestandteile mit einer Pasteurpipette entnommen, während die untere Hälfte nach kurzem Vortexen des Kolbens direkt in ein GC-Vial überführt wurde. Dabei wurde untersucht, ob sich in der unteren Hälfte eine separate Phase gebildet hatte oder ob lediglich abgesetzte Bestandteile enthalten waren. Anschließend wurden jeweils beide Hälften getrennt mittels UHPLC analysiert, um zu überprüfen, ob sich Unterschiede in den Chromatogrammen zeigen. Die Zusammensetzung und Beobachtungen dieser Reproduktionsansätze sind in Tabelle 4-10 zusammengefasst.

Tabelle 4-10: Zusammensetzung und Beobachtungen der Hydrolyse-Reproduktionsaufarbeitungsansätze mit altem und neuem Leinöl

Nr.	Probe	Zusammensetzung	Beobachtung
1	Leinöl (alt)	1,5 mL Aceton 200 µL 2 M KOH Aceton (auf 2 mL Endvolumen)	Phasentrennung
2	Leinöl (neu)	1,5 mL Aceton 200 µL 2 M KOH Aceton (auf 2 mL Endvolumen)	Phasentrennung

Die Ansätze zur Reproduzierbarkeit der Hydrolyseaufarbeitung mit altem und neuem Leinöl konnten nicht ausgewertet werden. Aufgrund eines Fehlers beim Schreiben der Sequenz wurden versehentlich andere Proben injiziert, sodass für diese Versuche keine UHPLC-Ergebnisse vorliegen.

#### 4.1.10 Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Vergleich zweier SPE-Kartuschen

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurde die Hydrolyse mit der alten Leinölprobe dreimal durchgeführt und anschließend mittels UHPLC analysiert. Ziel war es, die Peakflächen und Fettsäurekonzentrationen zu vergleichen und zu überprüfen, ob die Ergebnisse mit denen die ursprüngliche Leinöl (alt) Probe vom 02.12.2024 übereinstimmen.

Aufgrund eines Fehlers beim Schreiben der Sequenz wurden versehentlich andere Proben injiziert, sodass für diese Versuche keine UHPLC-Ergebnisse vorliegen.

Am selben Tag wurden die verbleibenden ~1 mL-Reste der drei Hydrolyseansätze einer Festphasenextraktion (SPE) unterzogen, um mögliche Störsubstanzen zu entfernen und die Proben für eine spätere UHPLC-Analyse vorzubereiten. Es wurden zwei unterschiedliche SPE-Kartuschen verwendet: die Chromabond SB und die Chromabond HR-XA, beide mit einem Volumen von 3 mL.

Die Kartuschen wurden mit zwei Säulenvolumina Methanol konditioniert und anschließend mit zwei Säulenvolumina Wasser äquilibriert. Die jeweiligen Proben-Hydrolyseansätze wurden aufgetragen, und die Kartuschen jeweils mit zwei Säulenvolumina Wasser gewaschen, bevor sie trockengelassen wurden. Für die Elution wurde eine 5 % Ameisensäurelösung verwendet, wobei diese entweder Methanol oder Aceton gelöst zum Einsatz kamen. Aceton wurde gewählt, um mögliche Esterbildungen zu vermeiden.

In Ansatz 1 erfolgte die Elution bei beiden SPE-Kartuschen (SB und HR-XA) mit 5 mL 5 % Ameisensäure in Methanol, wobei jeweils 450 µL der Probe aufgetragen wurden.

In Ansatz 2 wurde bei der HR-XA-Kartusche ebenfalls 5 mL 5 % Ameisensäure in Aceton verwendet, und 450 µL der Probe wurden aufgetragen. Bei der SB-Kartusche wurde aufgrund der begrenzten Menge an Probe etwas weniger als 450 µL aufgetragen, wobei ebenfalls 5 mL 5 % Ameisensäurelösung in Methanol verwendet wurden.

Ansatz 3 verwendete sowohl für die SB- als auch die HR-XA-Kartusche eine 5 % Ameisensäurelösung in Aceton für die Elution. Auch hier wurden 450 µL der Probe aufgetragen, wobei bei der SB-Kartusche etwas weniger als 450 µL verwendet wurde.

Die drei Ansätze hatten vor der Elution eine Konzentration von 5 mg/mL. Nach der Elution mit einem vom Volumen von 5 mL betrug die Endkonzentration der Proben nach der SPE 0,45 mg/mL, wobei sie in den Ansätzen mit weniger als 450 µL aufgetragener Probe leicht geringer ausfiel und nicht exakt bestimmt werden konnte.

Die extrahierten Proben wurden im nächsten Schritt mittels UHPLC analysiert, um die Effizienz der Reinigung und den Einfluss der verwendeten Kartuschen und Lösungsmittel auf die Probenqualität zu bewerten.

Aufgrund eines Fehlers beim Schreiben der Sequenz wurden versehentlich andere Proben injiziert, sodass für diese Versuche keine UHPLC-Ergebnisse vorliegen. Die fälschlich gemessenen Proben zeigten zudem unzureichende Ergebnisse, weshalb der ursprüngliche Ansatz nicht weiterverfolgt wurde.

#### 4.1.11 Hydrolyseaufarbeitungsansatz mit CTAB

Es wurde eine alternative Hydrolysemethode getestet, bei der das kationische Tensid Cetylmethylammoniumbromid (CTAB) eingesetzt wurde. Ziel war es, durch dessen amphiphile Eigenschaften die Löslichkeit der Fettsäuren zu verbessern. Die Hydrolyse wurde unter kontinuierlichem Rühren in einem Becherglas mit einem Rührfisch durchgeführt, wobei die Temperatur der Rührplatte auf etwa 30 bis 40 °C eingestellt wurde. Zunächst wurden 0,02 g CTAB mit 1,5 mL Aceton und 25 mg Leinöl (neu) in einem Becherglas vermischt. Dies führte zu einer sichtbaren Trübung, die auf eine unzureichende Homogenität der Mischung hindeutete. Nach Zugabe von 200 µL 2 M KOH zeigte sich eine teilweise Klärung der Lösung. Die Gesamtmenge der Lösung betrug 1,7 mL (1,5 mL Aceton + 200 µL KOH), woraus sich eine berechnete Konzentration von ca. 14,7 mg/mL ergab. Die Lösung wurde in ein GC-Vial überführt und für drei Minuten vortexiert. Nach der Vortexbehandlung war eine vollständige Klärung der Lösung zu beobachten. Dabei blieben jedoch Rückstände an der Glaswand sichtbar, die möglicherweise durch Adsorption hydrophober Bestandteile an der Gefäßoberfläche entstanden.

Dieser Ansatz führte bei Leinöl (neu) zu einer klaren, homogenen Lösung und wurde somit als zufriedenstellend bewertet (optische Beurteilung). Für Linolsäure und Ölsäure hingegen war die Löslichkeit nicht gegeben. Es traten erneut sichtbare Phasentrennungen auf.

#### 4.1.12 Anpassungen der vorherigen Methode (Linolsäure und Ölsäure)

Da die vorherige Methode zu einer klaren, homogenen Lösung führte, aber nicht für Linolsäure und Ölsäure funktionierte, wurde sie erneut getestet und auf ein größeres Endvolumen von 5 mL übertragen. Zunächst wurde Linolsäure untersucht, wobei die Hydrolysemethode einmal mit KOH (Ansatz V1) und einmal ohne KOH (Ansatz V2) durchgeführt wurde.

Für Ansatz V1 wurden 0,05 g CTAB in einem Becherglas eingewogen und mit 1,5 mL Aceton versetzt. Die Lösung wurde unter kontinuierlichem Rühren bei 450 rpm mit einem Rührfisch vermischt. Anschließend wurden 2,5 mL einer 10 mg/mL Linolsäure-Stammlösung in Aceton hinzugegeben, anstelle der Fettsäure direkt als Feststoff einzuwiegen. Nach drei Minuten Rühren zeigte sich die Lösung trüb und weißlich, zudem waren nicht gelöste CTAB-Partikel sichtbar. Nach Zugabe von 500 µL KOH löste sich das zuvor unlösliche CTAB vollständig, wodurch die anfängliche Trübung verschwand und die Lösung sofort klar wurde. Gleichzeitig bildeten sich jedoch zwei Phasen. Der Rührfisch wurde entfernt, und die Lösung wurde vollständig in einen 5-mL-Kolben überführt. Die verbleibenden Reste im Becherglas wurden mit Aceton ausgespült, bevor das Endvolumen auf 5 mL aufgefüllt wurde (Endkonzentration 5 mg/mL). Nach dreiminütigem Vortexen setzte

sich eine Phase am Kolbenboden ab. Aufgrund dieser Beobachtung wurde der Ansatz verworfen und nicht mittels UHPLC analysiert.

In Ansatz V2 wurde keine 2 M KOH-Lösung zugegeben, alle weiteren Schritte blieben zunächst identisch. Die Lösung zeigte sich jedoch bereits nach den ersten drei Minuten Rühren sehr trüb und weißlich, mit sichtbaren unlöslichen CTAB-Partikeln. Auch nach weiteren zehn Minuten Rühren bei erhöhter Temperatur änderte sich der Zustand der Lösung nicht. Da ohne KOH keine ausreichende Löslichkeit erreicht wurde, wurde der Ansatz verworfen, und die Hydrolyse wurde nicht fortgesetzt.

Da sich in Ansatz V1 zwei Phasen gebildet hatten und CTAB nur in Anwesenheit von KOH vollständig gelöst werden konnte, wurde die Methode weiter angepasst. In Ansatz V3 wurde die CTAB-Menge reduziert und gleichzeitig die KOH-Zugabe verändert, um zu untersuchen, ob dies die Phasenbildung beeinflusst.

Zunächst wurden 2,5 mL einer 10 mg/mL Linolsäure-Stammlösung in Aceton in ein Becherglas gegeben. Nach der Zugabe von 500  $\mu$ L 20 % Ameisensäure in Aceton blieb die Lösung unverändert klar und homogen. Anschließend wurden 0,02 g CTAB abgewogen und mit einer kleinen Menge Aceton in das Becherglas überführt. Die Lösung wurde mit einem Rührfisch drei Minuten lang bei etwa 450 rpm gerührt, während der Heater eingeschaltet war und die Temperatur auf über Handwärme anstieg. Die Lösung blieb dabei vollständig klar.

Nach der Zugabe von 200  $\mu$ L 2M KOH wurde das Rühren fortgesetzt. Die Lösung blieb weiterhin klar und vollständig gelöst. Anschließend wurde sie vollständig in einen 5-mL-Kolben überführt, wobei verbleibende Reste im Becherglas mit Aceton ausgespült wurden. Das Endvolumen wurde mit Aceton auf 5 mL aufgefüllt, bevor die Lösung für 30 Sekunden vortexiert wurde. Anschließend wurde 1 mL der Lösung in ein GC-Vial überführt und mittels UHPLC analysiert.

Da Ansatz V3 mit Linolsäure erfolgreich getestet wurde, wurde die Methode nun auf Ölsäure übertragen. Die Versuchsbedingungen blieben weitgehend identisch, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

In Ansatz V4 wurden zunächst 0,02 g CTAB in ein Becherglas eingewogen, gefolgt von der Zugabe von 2,5 mL einer 10 mg/mL Ölsäure-Stammlösung in Aceton. Die Lösung wurde unter kontinuierlichem Rühren mit einem Rührfisch bei etwa 450 rpm für drei Minuten vermischt, wobei der Heater ausgeschaltet blieb. Die Lösung zeigte sich trüb und weißlich, mit sichtbaren unlöslichen CTAB-Partikeln.

Nach der Zugabe von 500  $\mu$ L 20 % Ameisensäure in Aceton wurde das Rühren fortgesetzt, woraufhin sich die Lösung klärte und das CTAB vollständig gelöst wurde. Anschließend wurden 200  $\mu$ L KOH-Lösung hinzugegeben, wobei die Lösung weiterhin klar blieb und das CTAB vollständig gelöst war. Der Rührfisch wurde entfernt, und die Lösung wurde vollständig in einen 5-mL-Kolben überführt. Die verbleibenden Reste im Becherglas wurden mit Aceton ausgespült, bevor das Endvolumen mit Aceton auf 5 mL aufgefüllt wurde.

Nach einer 30-sekündigen Vortexbehandlung wurde die Lösung für eine gewisse Zeit stehen gelassen, um zu überprüfen, ob eine Phasenbildung auftrat, was nicht

der Fall war. Anschließend wurde der pH-Wert gemessen, die Lösung nochmals kurz vortexiert und 1 mL in ein GC-Vial überführt, bevor die Analyse mittels UHPLC erfolgte.

Da die Methode mit Ölsäure erfolgreich umgesetzt wurde, wurde sie im nächsten Schritt auf Leinöl übertragen. In Ansatz V5 blieb die Durchführung identisch zu Ansatz V4, jedoch wurde anstelle der Ölsäure-Stammlösung eine Leinöl-Stammlösung verwendet. Das Verhalten der Lösung während der Aufarbeitung war unverändert, sodass die Methode zunächst als übertragbar angesehen wurde.

Basierend auf der UHPLC-Analyse von Ansatz V5 wurde in Ansatz V6 die Konzentration der Leinöl-Stammlösung auf 50 mg/mL erhöht, um die Nachweisgrenze zu verbessern, während alle weiteren Verfahrensschritte unverändert blieben.

Bis zur Zugabe von KOH zeigte die Lösung eine leichte Gelbfärbung. Nach der KOH-Zugabe war die Lösung jedoch nicht mehr vollständig gelöst, und es bildeten sich zwei Phasen. Aufgrund der fehlenden Homogenität wurde die Aufarbeitung an dieser Stelle abgebrochen und der Ansatz verworfen.

Die Endkonzentration der Probenlösungen betrug in den Ansätzen V1 bis V5 jeweils 5 mg/mL, während in Ansatz V6 aufgrund der höheren Ausgangskonzentration eine Endkonzentration von 50 mg/mL erreicht wurde. Eine Übersicht über die Zusammensetzung, die beobachteten Reaktionen und die pH-Werte der einzelnen Ansätze ist in Tabelle 4-11 zusammengefasst.

Tabelle 4-11: Übersicht der modifizierten Hydrolyseansätze

Nr.	Probe	Zusammensetzung	Beobachtung	pH-Wert
V1	Linol-säure	0,05 g CTAB 1,5 mL Aceton 2,5 mL 10 mg/mL Linolsäure-Stammlösung 500 µL 2 M KOH Aceton (5 mL Endvolumen)	Lösung klar, jedoch Phasenbildung	6,4
V2	Linol-säure	0,05 g CTAB 1,5 mL Aceton 2,5 mL 10 mg/mL Linolsäure-Stammlösung Aceton (5 mL Endvolumen)	Lösung trüb, unlösliche CTAB-Partikel	-
V3	Linol-säure	2,5 mL 10 mg/mL Linolsäure-Stammlösung 500 µL 20% FA 0,02 g CTAB 200 µL 2M KOH Aceton (5 mL Endvolumen)	Lösung klar und vollständig homogen	5,6
V4	Öl-säure	2,5 mL 10 mg/mL Ölsäure- Stammlösung 0,02 g CTAB 500 µL 20% FA	Lösung klar und vollständig homogen	5,8

		200 µL 2 M KOH Aceton (5 mL Endvolumen)		
V5	Leinöl (neu)	2,5 mL 10 mg/mL Leinöl- Stammlösung 0,02 g CTAB 500 µL 20% FA 200 µL 2 M KOH Aceton (5 mL Endvolumen)	Lösung klar und vollständig homogen	5,1
V6	Leinöl (neu)	2,5 mL 50 mg/mL Leinöl- Stammlösung 0,02 g CTAB 500 µL 20% FA 200 µL 2 M KOH Aceton (5 mL Endvolumen)	Lösung nicht vollständig gelöst, Phasenbildung,	-

Nach Abschluss der Versuche wurde der pH-Wert aller analysierten Ansätze bestimmt. Dazu wurden vier bis fünf Tropfen der jeweiligen Lösung in ein 10-mL-Becherglas gegeben und mit destilliertem Wasser bis zu etwa zwei Dritteln aufgefüllt. Die Messung erfolgte mittels pH-Sonde.

Die Messungen ergaben für Ansatz V1 einen pH-Wert von etwa 6,4, während für Ansatz V3 ein Wert von 5,6 bestimmt wurde. Ansatz V4 zeigte einen pH von 5,8, während Ansatz V5 mit einem pH-Wert von 5,1 die niedrigste gemessene pH-Stufe aufwies. Die Ansätze V2 und V6 wurden verworfen und daher nicht vermessen.

#### 4.1.13 Optimierung der Hydrolyse Aufarbeitung (für Leinöl)

Die vorherigen Versuche zeigten, dass die Reihenfolge der Reagenzzugabe in den vorangegangenen Ansätzen V3 bis V6 (Tabelle 4-11) nicht optimal war, da die basische Hydrolyse nicht effektiv stattfinden konnte, wenn die Ameisensäure vor der Verseifung mit KOH zugegeben wurde. Zudem wurde festgestellt, dass in den ersten getesteten Varianten (V1 und V2) wahrscheinlich der falsche pH-Bereich vorlag, da keine Neutralisation mit Ameisensäure erfolgte (siehe Tabelle 4-11). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die Ansätze optimiert, sodass die Hydrolyse nun vollständig in einem Kolben durchgeführt werden konnte, wodurch die Handhabung vereinfacht und potenzielle Verluste durch Umfüllung minimiert wurden.

In den folgenden Versuchen wurde Leinöl (neu) als Probe verwendet. Die Zusammensetzung der Ansätze war in allen Fällen identisch, mit Ausnahme der Probenmenge und der Zugabe von Ameisensäure, die sich auf die Endkonzentration und die Neutralisation auswirkten. Für Ansatz V1 wurden 20 mg Leinöl direkt in den Kolben eingewogen, wodurch eine Endkonzentration von 4 mg/mL erzielt wurde. In Ansatz V2 wurde 2,5 mL einer Leinöl-Stammlösung (SL) mit einer Konzentration von 20 mg/mL eingesetzt, sodass sich eine Endkonzentration von 10 mg/mL ergab. In Ansatz V3 wurde ebenfalls 2,5 mL einer Stammlösung verwendet, jedoch mit einer Konzentration von 50 mg/mL, wodurch die Endkonzentration bei 25 mg/mL lag. In Ansatz V4 blieb die Probenmenge identisch zu V2, allerdings wurde die Menge der Ameisensäure auf 300 µL

reduziert, um den Einfluss der Säuremenge auf die Homogenität der Lösung zu untersuchen.

In V1 wurden 20 mg Leinöl in den Kolben eingewogen und mit 2,5 mL Aceton versetzt, gefolgt von 30 Sekunden Vortexen. In V2, V3 und V4 wurde jeweils 2,5 mL der entsprechenden Leinöl-Stammlösung in den Kolben pipettiert. Anschließend wurden 200 µL 2 M KOH zugegeben und die Mischung für 30 Sekunden vortexiert. Die Lösung trübte sich, und es bildeten sich zwei Phasen. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde 0,02 g CTAB hinzugegeben. Nach der Zugabe waren zunächst unlösliche CTAB-Partikel sichtbar, doch nach kurzem Vortexen wurde die Lösung klar, wobei die Phasentrennung weiterhin bestehen blieb. Nach einer weiteren einminütigen Vortexbehandlung verschwanden die nicht gelösten CTAB-Partikel vollständig, die Lösung blieb klar, jedoch waren weiterhin zwei Phasen vorhanden.

In V1 bis V3 wurden anschließend 500 µL 20 % Ameisensäure zugegeben, gefolgt von 30 Sekunden Vortexen. In Ansatz V4 wurde stattdessen nur 300 µL 20% Ameisensäure eingesetzt, um den Einfluss der reduzierten Säuremenge zu testen. In allen Fällen erschien die Lösung danach klar und homogen. Zur Erreichung des Endvolumens wurde mit Aceton auf 5 mL aufgefüllt, erneut für 30 Sekunden vortexiert, und die jeweiligen Lösungen blieben weiterhin klar und homogen. Dennoch wurden Rückstände an der Kolbeninnenwand beobachtet.

Für die UHPLC-Analyse wurde jeweils 1 mL der Lösung in ein GC-Vial überführt und gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass alle vier Messungen geringe Peakflächen aufwiesen und zusätzliche Störpeaks im Chromatogramm sichtbar waren. Die angesetzten Probenkonzentrationen in den Varianten V2, V3 und V4 lagen oberhalb des definierten Kalibrierbereichs von 0,1 bis 5,0 mg/mL. Daher konnten die entsprechenden UHPLC-Messwerte nicht zuverlässig quantitativ ausgewertet werden. Die Zusammensetzung der Ansätze und die beobachteten Ergebnisse sind in Tabelle 4-12 zusammengefasst.

Tabelle 4-12: Übersicht der modifizierten Hydrolyseansätze

Nr.	Probe	Zusammensetzung	Endkonz. (mg/mL)	Beobachtung
V1	Leinöl	20 mg Leinöl 2,5 mL Aceton 200 µL 2 M KOH 0,02 g CTAB 500 µL 20 % AF Aceton (5 mL Endvolumen)	4	Lösung klar und homogen, jedoch Rückstände an Kolbeninnenwand
V2	Leinöl	2,5 mL 20 mg/mL Leinöl-SL 200 µL 2 M KOH 0,02 g CTAB 500 µL 20 % AF Aceton (5 mL Endvolumen)	10	Lösung klar und homogen, jedoch Rückstände an Kolbeninnenwand
V3	Leinöl	2,5 mL 50 mg/mL Leinöl-SL 200 µL 2 M KOH 0,02 g CTAB 500 µL 20 % AF	25	Lösung klar und homogen, jedoch Rückstände an

		Aceton (5 mL Endvolumen)		Kolbeninnenwand
V4	Leinöl	2,5 mL 20 mg/mL Leinöl-SL 200 µL 2 M KOH 0,02 g CTAB 300 µL 20 % AF Aceton (5 mL Endvolumen)	10	Lösung klar und homogen, jedoch Rückstände an Kolbeninnenwand

#### 4.1.14 Finale Hydrolyseaufarbeitungsmethoden

Nach den vorherigen Optimierungsschritten wurde eine finale Hydrolysemethode entwickelt, die erfolgreich für Erdnussöl und Walnussöl angewendet wurde. Die Methode wurde dabei so angepasst, dass die Neutralisation mit Ameisensäure nach der basischen Hydrolyse erfolgte, um eine klare Lösung ohne Phasentrennung zu erhalten.

Zur Probenaufarbeitung wurden jeweils 10 mg Öl mit 1,5 mL Aceton in ein Becherglas gegeben und unter Rühren mit einem Magnetrührfisch mit 200 µL 2 M KOH-Lösung sowie 0,1 g CTAB versetzt. Nach vollständiger Lösung der Reagenzien wurde die Mischung in einen 5-mL-Messkolben überführt (Endkonzentration 5 mg/mL), wobei das Becherglas mit einer kleinen Menge Aceton gespült wurde. Die Neutralisation erfolgte durch die Zugabe von 20 % Ameisensäure, wobei für Walnussöl 400 µL und für Erdnussöl 600 µL verwendet wurden. Anschließend wurde mit Aceton auf 5 mL aufgefüllt, die Lösung 30 Sekunden vortexiert und 1,5 mL für die UHPLC-Analyse in ein GC-Vial überführt. Der pH-Wert lag zwischen 3,0 und 3,3.

Die Methode kann möglicherweise auch für weitere Öle angewendet werden, wenn die Ameisensäuremenge entsprechend angepasst wird. Eine experimentelle Überprüfung für andere Öle wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

Die Methode wurde auch für Leinöl optimiert. Zur Probenaufarbeitung wurden 15 mg Leinöl mit 0,02 g CTAB und 2,5 mL Aceton in ein Becherglas gegeben und unter Rühren mit einem Magnetrührer mit 200 µL einer 2 M KOH-Lösung versetzt. Das Rühren wurde so lange fortgesetzt, bis sich alle Bestandteile vollständig gelöst hatten. Anschließend wurde die Lösung in einen 5-mL-Messkolben überführt, wobei das Becherglas mit einer kleinen Menge Aceton ausgespült wurde. Nach einer kurzen Vortexbehandlung wurde das Endvolumen mit Aceton auf 5 mL aufgefüllt und noch einmal kurz vortexiert. Die Lösung hat eine Endkonzentration von 3 mg/mL. Im Gegensatz zu den vorherigen Ansätzen wurde hier keine Neutralisation mit Ameisensäure durchgeführt. Der pH-Wert der Lösung lag bei etwa 5,5.

Für Linolsäure und Ölsäure wurde eine leicht veränderte Vorgehensweise im Vergleich zu den anderen finalen Methoden angewendet. Zur Probenaufarbeitung wurden 0,02 g CTAB mit 15 mg der jeweiligen Fettsäure (Linolsäure oder Ölsäure) und 1,5 mL Aceton in ein Becherglas gegeben. Die Mischung wurde unter Rühren mit einem Magnetrührer mit 200 µL 2 M KOH-Lösung versetzt und so lange gerührt, bis sich alle Bestandteile vollständig lösten. Anschließend wurde die Lösung in

einen 5-mL-Messkolben überführt, wobei das Becherglas mit einer kleinen Menge Aceton ausgespült wurde.

Die Neutralisation erfolgte durch die Zugabe von 400  $\mu\text{L}$  20 % Ameisensäure. Nach der Neutralisation wurde mit Aceton auf 5 mL aufgefüllt und die Lösung für zwei Minuten vortexiert. Anschließend wurden ca. 1 mL der Lösung in ein GC-Vial überführt und mittels UHPLC analysiert. Die Endkonzentration betrug 3 mg/mL. Der pH-Wert lag bei etwa 2,9 für Linolsäure und 2,8 für Ölsäure.

Die Zusammensetzung aller finalen Hydrolyseansätze ist in Tabelle 4-13 zusammengefasst.

Tabelle 4-13: Übersicht der finalen Hydrolyseansätze für Erdnussöl, Walnussöl, Leinöl, Linolsäure und Ölsäure

Nr.	Probe	Zusammensetzung	Beobachtung	Endkonz.	pH-Wert
1	Walnussöl	10 mg Walnussöl 1,5 mL Aceton 200 $\mu\text{L}$ 2 M KOH 0,1 g CTAB 400 $\mu\text{L}$ 20 % FA Aceton (Endvolumen)	Lösung klar und homogen	5 mg/mL	3-3,3
2	Erdnussöl	10 mg Erdnussöl 1,5 mL Aceton 200 $\mu\text{L}$ 2 M KOH 0,1 g CTAB 600 $\mu\text{L}$ 20 % FA Aceton (Endvolumen)	Lösung klar und homogen	5 mg/mL	3-3,3
3	Leinöl	0,02 g CTAB 1,5 mL Aceton 15 mg Leinöl 200 $\mu\text{L}$ 2 M KOH Aceton (Endvolumen)	Lösung klar und homogen	3 mg/mL	~5,5
4, 5	Linolsäure, Ölsäure	0,02 g CTAB 15 mg Probe 1,5 mL Aceton 200 $\mu\text{L}$ 2 M KOH-Lösung 400 $\mu\text{L}$ 20 % FA Aceton (Endvolumen)	Lösung klar und homogen	3 mg/mL	~2,9, ~2,8

## 4.2 Finale Hydrolyseaufarbeitungsmethode

Die folgenden Abbildungen (Abbildung 4-1 bis Abbildung 4-5) zeigen die chromatographische Trennung ausgewählter Fettsäuren in den jeweiligen Proben. Analysiert wurden dabei fünf Zielverbindungen: Linolsäure, Linolensäure, Ölsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure.

Zu jedem Chromatogramm ist eine Tabelle (Tabelle 4-14 bis Tabelle 4-18) mit Retentionszeiten, Peakflächen und sofern möglich, den berechneten Konzentrationen und Symmetrie-Faktoren angegeben. Der Symmetrie-Faktor (auch Tailing-Faktor) wurde bei 10 % der Peakhöhe bestimmt. Ein ideal symmetrischer Peak weist einen Wert von 1,0 auf. Werte  $> 1,0$  deuten auf Tailing, Werte  $< 1,0$  auf Fronting hin (Stauffer, 2008, pp. 7-9). Ein Bereich von 0,8 bis 1,8 gilt als akzeptabel zur Beurteilung der Peakform (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2023).

Werte, die aufgrund geringer Peakfläche nicht quantifiziert werden konnten, sind mit *n.a.* („not applicable“) gekennzeichnet. Die y-Achsen zeigen die Signalintensität in Pikoampere (pA), die x-Achsen die Retentionszeit in Minuten.

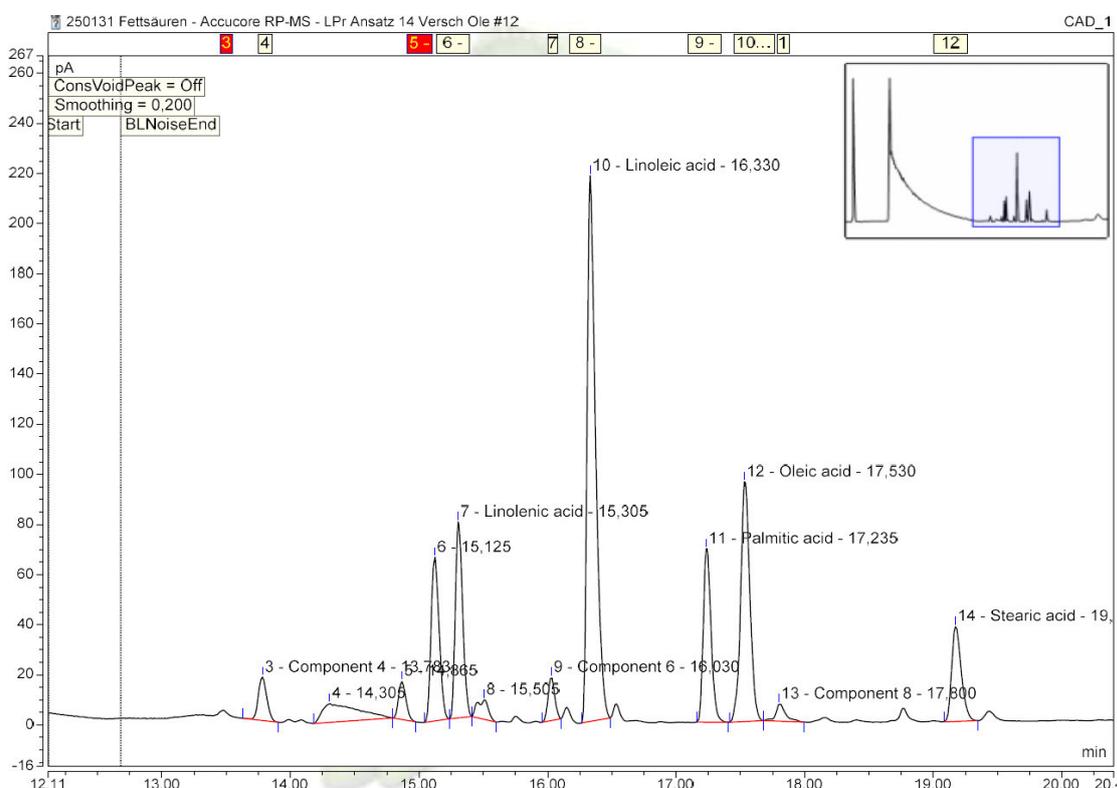


Abbildung 4-1: Chromatogramm der Fettsäureverteilung in Walnussöl

Tabelle 4-14: Retentionszeiten, Peakflächen, Konzentrationen und Symmetrie-Faktoren identifizierter Fettsäuren in einer Walnussöl-Probe

Fettsäure	Retentionszeit (min)	Peakfläche (pA*min)	Konzentration (mg/mL)	Symmetrie-Faktor
Linolensäure	15,305	5,1533	n.a.	1,32
Linolsäure	16,330	16,4057	0,5771	1,65
Palmitinsäure	17,235	4,8549	0,1897	1,32
Ölsäure	17,530	7,9190	0,2142	1,11
Stearinsäure	19,172	7,5173	0,1249	1,40

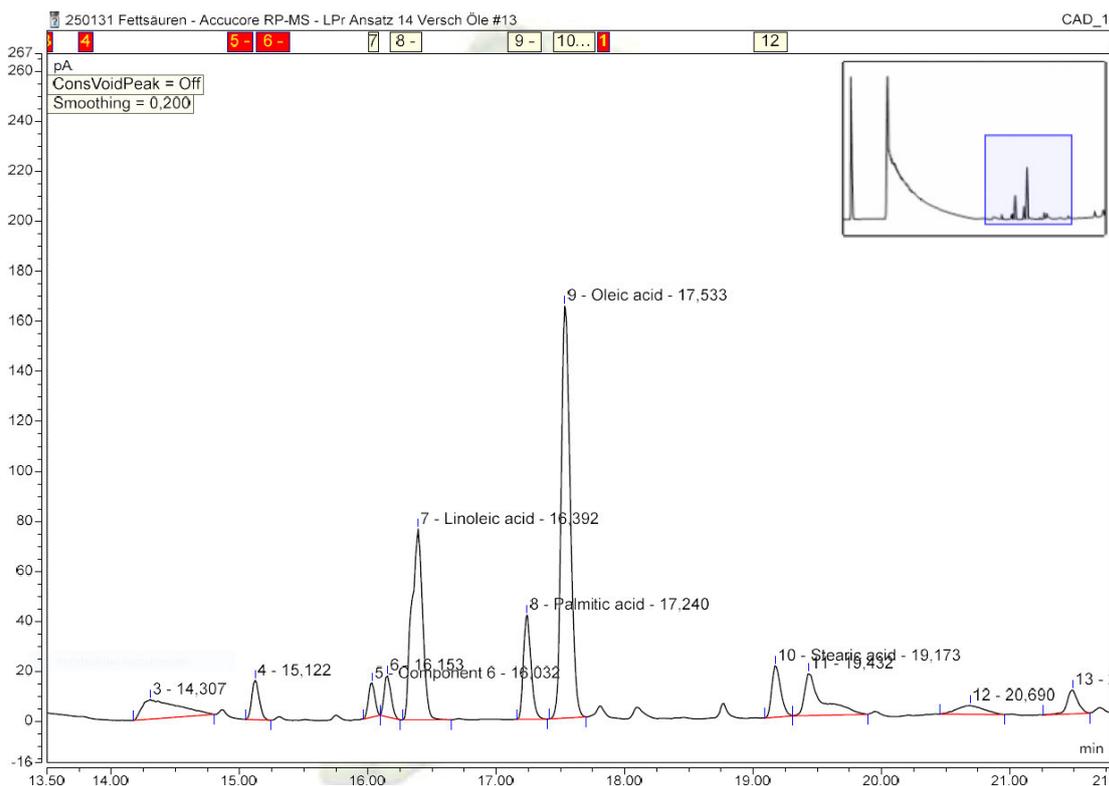


Abbildung 4-2: Chromatogramm der Fettsäureverteilung in Erdnussöl

Tabelle 4-15: Retentionszeiten, Peakflächen, Konzentrationen und Symmetrie-Faktoren identifizierter Fettsäuren in einer Erdnussöl-Probe

Fettsäure	Retentionszeit (min)	Peakfläche (pA*min)	Konzentration (mg/mL)	Symmetrie-Faktor
Linolsäure	16,932	7,4802	0,1586	0,95
Palmitinsäure	17,240	2,8670	0,0930	1,21
Ölsäure	17,533	13,4946	0,4539	1,28
Stearinsäure	19,173	1,6612	0,0517	1,34

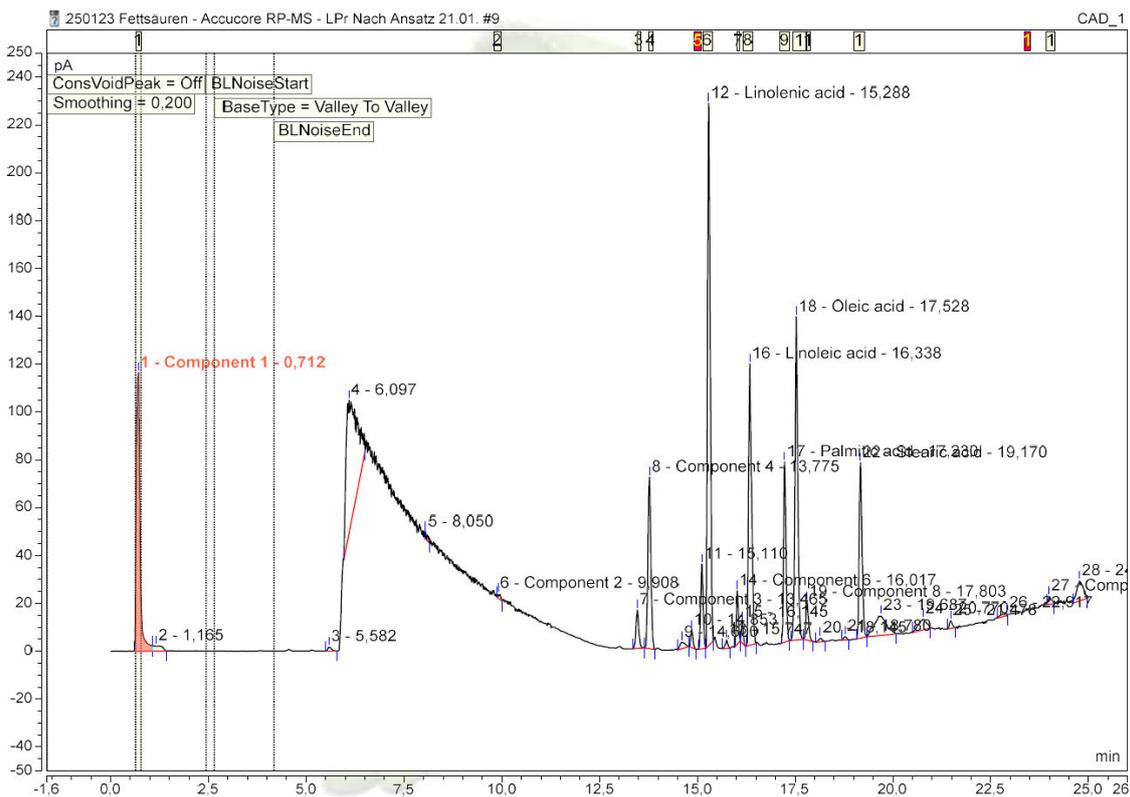


Abbildung 4-3: Chromatogramm der Fettsäureverteilung in Leinöl (ohne Zoom)

Tabelle 4-16: Retentionszeiten, Peakflächen, Konzentrationen und Symmetrie-Faktoren identifizierter Fettsäuren in einer Leinöl-Probe

Fettsäure	Retentionszeit (min)	Peakfläche (pA*min)	Konzentration (mg/mL)	Symmetrie-Faktor
Linolensäure	15,288	17,4052	n.a.	1,33
Linolsäure	16,338	10,1844	0,2788	1,52
Palmitinsäure	17,230	5,19960	0,2083	1,27
Ölsäure	17,528	10,8667	0,3358	1,06
Stearinsäure	19,170	1,2077	0,3469	1,27

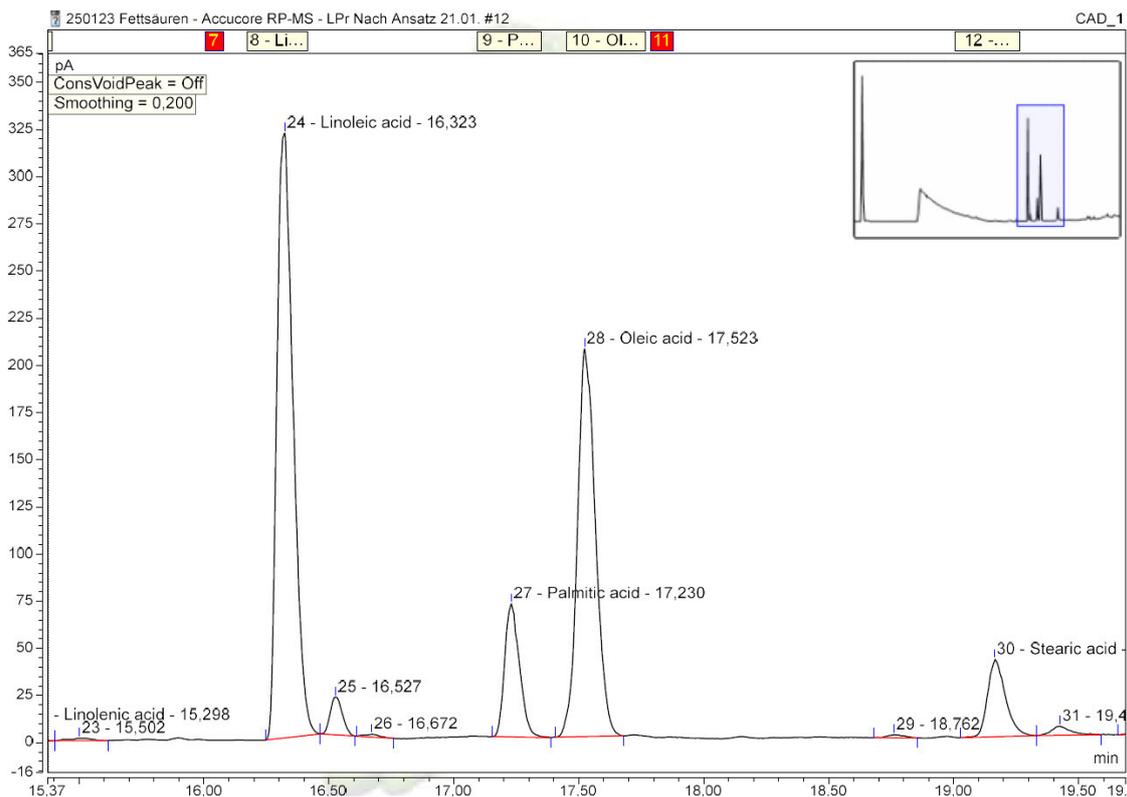


Abbildung 4-4: Chromatogramm der Fettsäureverteilung in Linolsäure

Tabelle 4-17: Retentionszeiten, Peakflächen, Konzentrationen und Symmetrie-Faktoren identifizierter Fettsäuren in einer Linolsäure-Probe

Fettsäure	Retentionszeit (min)	Peakfläche (pA*min)	Konzentration (mg/mL)	Symmetrie-Faktor
Linolensäure	15,298	0,4787	n.a.	1,26
Linolsäure	16,323	24,0813	1,0022	1,28
Palmitinsäure	17,230	4,8754	0,1908	1,24
Ölsäure	17,253	17,1070	0,6368	1,16
Stearinsäure	19,165	3,4031	0,1314	1,35

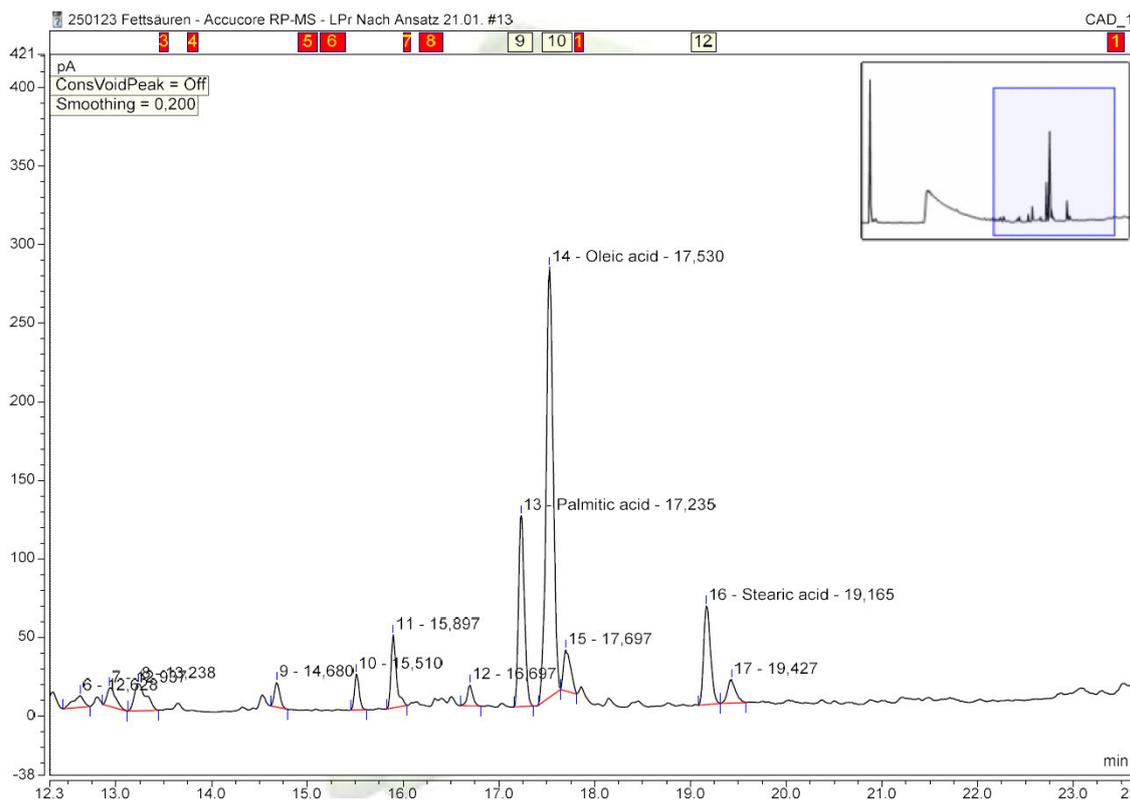


Abbildung 4-5: Chromatogramm der Fettsäureverteilung in Ölsäure

Tabelle 4-18: Retentionszeiten, Peakflächen, Konzentrationen und Symmetriefaktoren identifizierter Fettsäuren in einer Ölsäure-Probe

Fettsäure	Retentionszeit (min)	Peakfläche (pA*min)	Konzentration (mg/mL)	Symmetriefaktor
Palmitinsäure	17,235	8,7915	0,4733	1,16
Ölsäure	17,530	23,3062	1,0564	0,98
Stearinsäure	19,165	5,2160	0,2476	1,35

### 4.2.1 Fettsäureverteilung und Konzentrationen

Die Ölsäureprobe (Tabelle 4-18) zeigte einen dominierenden Peak für Ölsäure mit einer Konzentration von 1,0564 mg/mL. Dies entspricht der Hauptkomponente in dieser Probe, was mit den Herstellerangaben zur Fettsäureverteilung (65–88 % Ölsäure) qualitativ übereinstimmt. Weitere Fettsäuren wie Palmitinsäure (0,4733 mg/mL) und Stearinsäure (0,2476 mg/mL) traten in deutlich geringeren Konzentrationen auf, was die erwartete Verteilung widerspiegelt.

In der Linolsäureprobe (Tabelle 4-17) war Linolsäure mit 1,0022 mg/mL die dominante Komponente. Diese Konzentration stimmt qualitativ mit der Reinheitsangabe (lt. Etikett) von 65,9 % überein. Weitere Fettsäuren wie bspw. Ölsäure (0,6368mg/mL) und Palmitinsäure (0,1908 mg/mL) wurden ebenfalls detektiert, was auf eine nicht vollständige Reinheit der Linolsäure hinweist. Diese

Verteilung entspricht der typischen Zusammensetzung eines nicht vollständig reinen Linolsäurestandards.

In den Ölproben: Walnuss-, Erdnuss- und Leinöl (Tabelle 4-14 bis Tabelle 4-16) zeigte Walnussöl eine hohe Konzentration von Linolsäure (0,5771 mg/mL), was mit den Literaturangaben von 61–62 % übereinstimmt. Ölsäure trat ebenfalls in hoher Konzentration (0,2142 mg/mL) auf, was oberhalb der in der Literatur angegebenen Werte liegt. Für Walnussöl wird in der Regel ein geringerer Ölsäuregehalt erwartet.

Leinöl wies einen hohen Anteil an Linolensäure auf, erkennbar an der größten Peakfläche. Eine Konzentrationsberechnung lag hier jedoch nicht vor. Allerdings war der Anteil an Ölsäure (0,3358 mg/mL) deutlich höher als die Literaturangabe von 10–22 %.

Im Erdnussöl (Tabelle 4-15) dominierten Ölsäure (0,4539 mg/mL) und Linolsäure (0,1586 mg/mL). Die Konzentration von Ölsäure entspricht den Literaturangaben von 35–69 %, während der Linolsäureanteil etwas niedriger war als in der Literatur zu erwarten.

Die Konzentrationen in mg/mL beziehen sich auf die jeweiligen Probenlösungen nach Aufarbeitung und ermöglichen einen qualitativen Vergleich der Fettsäureverteilungen innerhalb der Proben. Sie sind jedoch nicht direkt mit Literaturwerten in Prozent vergleichbar. Die qualitative Bewertung der Fettsäureverteilung zeigt, dass die dominierenden Fettsäuren in den Proben den typischen Mustern entsprechen, obwohl Abweichungen in den genauen Konzentrationen auftreten können.

#### 4.2.2 Symmetrie der Peaks

Die Bewertung der Peakformen anhand der Symmetriefaktoren ( $A_s$ ) bezog sich ausschließlich auf die identifizierten Fettsäuren in den jeweiligen Proben. Die Werte wurden den Tabellen (Tabelle 4-14 bis Tabelle 4-18) entnommen. Alle  $A_s$ -Werte lagen innerhalb des akzeptablen Bereichs. Einzelne Peaks zeigten Abweichungen von der idealen Symmetrie, die jedoch die qualitative und quantitative Auswertung nicht beeinträchtigten.

In der Ölsäureprobe (Tabelle 4-18) lag der  $A_s$ -Wert für den Ölsäurepeak bei 0,98 was einem nahezu ideal symmetrischen Peak entspricht. Der Ölsäurepeak im Erdnussöl zeigte mit 1,28 (Tabelle 4-15) eine Peakform innerhalb des akzeptierten Bereichs. In der Linolsäureprobe lag der Wert für Ölsäure bei 1,16 (Tabelle 4-17), ebenfalls ohne Auffälligkeiten.

Für Linolsäure zeigten sich zwischen den Proben Unterschiede. In der Walnussölprobe (Tabelle 4-14) lag der  $A_s$ -Wert bei 1,65 und war damit der höchste unter allen betrachteten Fettsäuren. Dieser Wert weist auf deutliches Tailing hin, liegt jedoch noch im akzeptablen Bereich. Auch in der Leinölprobe (Tabelle 4-16) zeigte Linolsäure einen hohen  $A_s$  von 1,52, während in der Linolsäureprobe (Tabelle 4-16) selbst ein Wert von 1,28 gemessen wurde. In der Erdnussölprobe (Tabelle 4-15) fiel der Linolsäurepeak mit einem  $A_s$ -Wert von 0,95 (Tabelle 4-16) auf, der auf ein leichtes Fronting hinweist.

Die Bewertung der Linolensäure in Walnussöl (Tabelle 4-14) ergab einen As-Wert von 1,32, in Leinöl (Tabelle 4-16) lag dieser bei 1,33. Beide Werte deuten auf eine erkennbare, aber noch akzeptable Asymmetrie mit leichter Tailing-Tendenz hin. Auch diese Peaks wiesen akzeptable Formen auf und ließen keine Hinweise auf Trennprobleme erkennen.

Die Peaks von Palmitinsäure und Stearinsäure lagen in allen Proben innerhalb eines Bereichs von etwa 1,16 bis 1,40. Obwohl einige dieser Fettsäuren in niedriger Konzentration vorlagen, war die Peakform in allen Fällen auswertbar. Ein Zusammenhang zwischen Konzentration und Symmetrie war anhand der vorliegenden Daten nicht erkennbar.

Insgesamt bestätigten die As-Werte eine gute Trennung und auswertbare Peakformen für alle untersuchten Fettsäuren. Einzelne Tailing- oder Fronting-Effekte traten auf, überschritten jedoch nicht die akzeptierten Grenzwerte und beeinträchtigten die Trennleistung nicht.

#### 4.2.3 Retentionszeiten

Die Retentionszeiten (Tabelle 4-14 bis Tabelle 4-19) der identifizierten Fettsäuren lagen über alle Proben hinweg in einem engen Bereich und zeigten eine gute Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung. Trotz kleiner Unterschiede in der Probenaufarbeitung, insbesondere bei den eingesetzten Reagenzien und dem pH-Wert, wurden alle Proben unter identischen UHPLC-Bedingungen analysiert, wodurch ein direkter Vergleich der Retentionszeiten möglich war.

Die Linolensäure wurde konstant im Bereich von 15,29–15,31 Minuten detektiert. Die Linolsäure eluierte in allen Proben zwischen 16,32 und 16,93 Minuten, wobei die höchste Abweichung in der Erdnussölprobe beobachtet wurde. Palmitinsäure zeigte sehr stabile Retentionszeiten zwischen 17,23 und 17,24 Minuten, ebenso wie Ölsäure, die in allen Proben bei 17,25 bis 17,53 Minuten auftrat. Stearinsäure eluierte regelmäßig als letzter Peak bei 19,16 bis 19,17 Minuten.

Diese geringen Schwankungen der Retentionszeiten belegen die methodische Konstanz und ermöglichen eine sichere Zuordnung der Fettsäuren über alle fünf Proben hinweg. Die relative Standardabweichung (RSD) der Retentionszeiten lag für die untersuchten Fettsäuren zwischen 0,06 % und 2,07 %. Auch die am höchsten streuende Fettsäure (Linolsäure) zeigte damit noch eine akzeptable Wiederholbarkeit der Elution, was die methodische Stabilität der Trennung zusätzlich bestätigt.

#### 4.2.4 Trennschärfe

Die visuelle Beurteilung der Chromatogramme ergab, dass die identifizierten Fettsäuren in allen Proben klar voneinander getrennt vorlagen. Überlappungen zwischen benachbarten Peaks traten nicht auf, auch bei stärkeren oder asymmetrischen Signalen war eine eindeutige Zuordnung möglich. Die erzielte Trennschärfe war damit für die qualitative und semiquantitative Auswertung ausreichend.

#### 4.2.5 Bewertung der Fettsäure-Wiederfindung im Kontext literaturbekannter Zusammensetzungen

Zur methodischen Einordnung der experimentell bestimmten Fettsäureanteile wurden die berechneten Wiederfindungsraten (WFR) der finalen fünf untersuchten Proben mit Literaturangaben zur typischen Fettsäurezusammensetzung der jeweils analysierten Öl-Art verglichen. Die WFR-Werte wurden als prozentuales Verhältnis der experimentell bestimmten Masse einer Fettsäure zur jeweiligen eingewogenen Gesamtmasse der Probe berechnet (siehe Kapitel 3.6.4). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-19 dargestellt. Die Literaturbereiche basieren auf den Angaben in Tabelle 2-2 (Kapitel 2.1.1 Theoretische Grundlagen der Fettsäuren) und dienen ausschließlich einer groben Plausibilitätsprüfung.

Tabelle 4-19: Prozentuale Wiederfindungsraten (WFR) der einzelnen Fettsäuren in den untersuchten Proben (Walnussöl, Erdnussöl, Leinöl, Linolsäure, Ölsäure)

Fettsäure	Walnussöl	Erdnussöl	Leinöl	Linolsäure	Ölsäure
Linolensäure	-	-	-	-	-
Linolsäure	30,1	7,1	9,3	43,6	-
Palmitinsäure	9,9	4,2	6,9	8,3	15,4
Ölsäure	11,2	20,3	11,2	27,7	34,3
Stearinsäure	6,5	2,3	11,6	5,7	8,0

Die WFR der einzelnen Fettsäuren zeigten je nach Probe teils deutliche Unterschiede. Für die Ölsäure-Probe lagen herstellerseitige Angaben zur Zusammensetzung vor: 16 % Palmitinsäure, 6 % Stearinsäure, 18 % Linolsäure, 4 % Linolensäure und 65–88 % Ölsäure (Honeywell / Fluka, 2024). Die Wiederfindung der Ölsäure lag mit 34,3 % unterhalb des deklarierten Bereichs, da Ölsäure erwartungsgemäß die Hauptkomponente der Probe war. Auch die übrigen Fettsäuren lagen unterhalb der erwarteten Werte. Dies könnte auf mögliche Verluste während der Probenaufarbeitung hinweisen.

Für die Linolsäureprobe lagen keine herstellerseitigen Angaben zur Zusammensetzung vor, laut Etikett hatte diese jedoch eine Reinheit von 65,9 %. Die in der Kalibrierung berücksichtigten Konzentrationen der einzelnen Komponenten wurden durch den betreuenden Professor definiert und direkt in der Auswertesoftware hinterlegt. Ein Vergleich mit Literaturwerten war daher nicht möglich.

In den übrigen Öl-Proben (Walnuss-, Erdnuss- und Leinöl) zeigten sich teils deutliche Abweichungen von den in Tabelle 2-2 dargestellten Literaturbereichen. So lag der gemessene Linolsäurewert in Walnussöl mit 30,1 % deutlich unterhalb des Literaturbereichs von 61–62 %. Stearinsäure lag in der Erdnussöl-Probe mit 2,3 % im erwarteten Bereich (1–4,5 %), während sie in der Leinöl-Probe mit 11,6 % deutlich über dem Literaturwert (2–3 %) lag.

Die insgesamt niedrigen Wiederfindungsraten könnten verschiedene Ursachen haben, lassen sich auf Basis der vorliegenden Daten jedoch nicht eindeutig klären. Mögliche Einflussfaktoren wären beispielweise Verluste während der

Probenaufarbeitung, Matrixeffekte durch die Ölkomponenten oder unvollständige Hydrolyseprozesse.

### 4.3 Präzisionsbestimmung

#### 4.3.1 Quantitative Messergebnisse

Die nachfolgende Tabelle 4-20 enthält die Einzelwerte der sechs aufeinanderfolgenden Injektionen einer vorbereiteten Leinöl-Probe zur Bewertung der Wiederholpräzision. Erfasst wurden die Retentionszeit, die Peakfläche sowie die Konzentration der identifizierten Fettsäuren. Nur quantifizierbare Konzentrationen wurden angegeben, alle anderen mit n.a. („not applicable“) gekennzeichnet.

Die dargestellten Werte bilden die Grundlage für die Berechnung der statistischen Kennzahlen in Tabelle 4-21.

Tabelle 4-20: Einzelwerte der sechs Wiederholmessungen für Retentionszeit, Konzentration und Peakfläche

Messung	Fettsäure	Retentionszeit (min)	Konzentration (mg/mL)	Peakfläche (pA · min)
1	Linolensäure	15,242	n.a.	39,9695
1	Linolsäure	16,317	0,5387	15,6443
1	Palmitinsäure	17,223	n.a.	11,6411
1	Ölsäure	17,525	0,863	20,8111
1	Stearinsäure	19,160	n.a.	11,7143
2	Linolensäure	15,245	n.a.	40,2893
2	Linolsäure	16,322	0,5552	15,9734
2	Palmitinsäure	17,215	n.a.	12,0800
2	Ölsäure	17,513	0,9008	21,3475
2	Stearinsäure	19,155	n.a.	12,3252
3	Linolensäure	15,247	n.a.	26,0500
3	Linolsäure	16,317	0,5601	10,3500
3	Palmitinsäure	17,225	n.a.	7,9000
3	Ölsäure	17,520	0,9275	13,9900
3	Stearinsäure	19,157	n.a.	8,1700
4	Linolensäure	15,252	n.a.	39,8078
4	Linolsäure	16,327	0,5751	16,3660
4	Palmitinsäure	17,227	n.a.	12,0016
4	Ölsäure	17,530	0,8601	20,7697
4	Stearinsäure	19,167	n.a.	11,6453
5	Linolensäure	15,258	n.a.	40,8320
5	Linolsäure	16,332	0,5713	16,2925
5	Palmitinsäure	17,237	n.a.	11,9254
5	Ölsäure	17,532	0,8689	20,8968

5	Stearinsäure	19,173	n.a.	11,8858
6	Linolensäure	15,257	n.a.	42,2527
6	Linolsäure	16,330	0,5871	16,6018
6	Palmitinsäure	17,228	n.a.	12,2891
6	Ölsäure	17,523	0,9363	21,8300
6	Stearinsäure	19,167	n.a.	12,4630

### 4.3.2 Bewertung der Wiederholpräzision

Zur Bewertung der Wiederholpräzision wurde eine aufgearbeitete Probe verwendet, aus der sechs aufeinanderfolgende Injektionen aus demselben Vial durchgeführt wurden. Ausgewertet wurden fünf identifizierte Fettsäuren, die in der Probe enthalten waren. Tabelle 4-21 zeigt Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (s) und relative Standardabweichung (RSD) für Retentionszeit und Konzentration. Die Berechnung der RSD-Werte erfolgte in Anlehnung an die Vorgaben der ICH Q2(R2) (International Council for Harmonisation, 2023) zur Validierung analytischer Verfahren unter Wiederholbedingungen. Die Formeln zur Berechnung stammen von (Ritgen, 2019, pp. 44-46).

Tabelle 4-21: Statistische Kenngrößen ( $\bar{x}$ , s und RSD) zur Bewertung der Wiederholpräzision

Fettsäure	$\bar{x}$ RT (min)	s RT (min)	RSD RT (%)	$\bar{x}$ Konz. (mg/mL)	s Konz. (mg/mL)	RSD Konz. (%)
Linolensäure	15,250	0,0066	0,043	n.a.	n.a.	n.a.
Linolsäure	16,324	0,0065	0,040	0,5646	0,0170	7,5
Palmitinsäure	17,226	0,0072	0,042	n.a.	n.a.	n.a.
Ölsäure	17,524	0,0069	0,039	0,8928	0,0337	3,8
Stearinsäure	19,163	0,0069	0,036	n.a.	n.a.	n.a.

Die Retentionszeiten zeigten mit RSD-Werten unter 0,05 % eine sehr gute Reproduzierbarkeit und belegen die hohe Stabilität des Elutionsverhaltens. Die beobachteten RSD-Werte für die quantifizierbaren Konzentrationen betragen 7,5 % (Linolsäure) bzw. 3,8 % (Ölsäure) und zeigen eine akzeptable Wiederholbarkeit der quantitativen Bestimmung.

In einer vergleichbaren HPLC-CAD-Methode wurden RSD-Werte der Peakflächen bis zu 8,7 % im Rahmen der tagesinternen Präzision als akzeptabel beschrieben (Yu, et al., 2023). Da in dieser Arbeit eine quadratische Kalibrierfunktion verwendet wurde, sind Peakfläche und berechnete Konzentration nicht linear verknüpft, sodass ein direkter Vergleich der RSD-Werte methodisch nicht zulässig ist. Dennoch kann der Literaturwert als orientierender Rahmen für die Beurteilung der Präzision herangezogen werden. Insgesamt weisen die Ergebnisse auf eine gute Wiederholpräzision der neu entwickelten UHPLC-CAD-Methode hin.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Proben – darunter pflanzliche Öle sowie Reinsubstanzen – mittels UHPLC-CAD analysiert, um ausgewählte Fettsäuren qualitativ und semiquantitativ zu bewerten. Die Zielverbindungen umfassten Linolsäure, Linolensäure, Ölsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure. Die Auswertung basierte auf extern kalibrierten Konzentrationen in mg/mL, die auf die jeweiligen Probenlösungen nach Aufarbeitung bezogen waren.

Die qualitative Verteilung der Fettsäuren entsprach in weiten Teilen den Literaturangaben bzw. den herstellerseitig deklarierten Zusammensetzungen. In den Ölproben traten die jeweils typischen Hauptkomponenten deutlich hervor, wobei einzelne Abweichungen – insbesondere bei Linolsäure und Ölsäure – beobachtet wurden. Diese ließen sich nicht eindeutig interpretieren, deuten jedoch auf Matrixeffekte, Alterungsprozesse der Substanzen oder Unterschiede in der Probenzusammensetzung hin.

Die quantitativen Aussagen wurden ergänzend durch die Berechnung der Wiederfindungsraten (WFR) unterstützt. Diese lagen für viele Fettsäuren unterhalb der literaturbekannten Werte. Mögliche Ursachen könnten in der Probenaufarbeitung liegen, etwa durch nicht vollständig standardisierte Einwaagen, Umfüllverluste, Adsorptionseffekte oder Unterschiede im pH-Wert der Ansätze. Auch mögliche Veränderungen der Substanzen durch Alter, Lagerung oder Oxidation könnten die Resultate beeinflusst haben. Aufgrund fehlender externer Referenzwerte ist jedoch keine vollständige Bewertung möglich; die Ergebnisse dienen vor allem einer qualitativen Plausibilitätsprüfung.

Die Kalibrierung basierte auf einem Linolsäurestandard mit bekannter, aber nicht vollständiger Reinheit. Die tatsächlichen Gehalte der in der Lösung enthaltenen Fettsäuren wurden manuell korrigiert und in der Auswertesoftware berücksichtigt. Eine verbesserte Kalibrierung durch zusätzliche Referenzmaterialien könnte künftig zur Absicherung der Ergebnisse beitragen.

Zusätzlich wurden chromatographische Parameter hinsichtlich Retentionszeit, Symmetrie und Trennschärfe betrachtet. Die Retentionszeiten zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit, die Symmetriefaktoren lagen im akzeptablen Bereich und ermöglichten eine zuverlässige Auswertung der Peaks. Eine eindeutige Trennung aller untersuchten Verbindungen war visuell nachvollziehbar.

Die Wiederholpräzision der quantitativen Auswertung wurde anhand mehrfacher Injektionen geprüft. Die ermittelten RSD-Werte für die Konzentrationen lagen mit 3,8 % und 7,5 % im akzeptablen Bereich und bestätigten die Eignung der Methode im Hinblick auf ihre Reproduzierbarkeit.

Insgesamt zeigt die durchgeführte Untersuchung, dass die verwendete UHPLC-CAD-Methode geeignet ist, um die Zielverbindungen in komplexen Proben qualitativ sicher zu identifizieren und semiquantitativ zu vergleichen. Einschränkungen bestehen hinsichtlich der Übertragbarkeit der Konzentrationsdaten auf den absoluten Fettsäuregehalt der Ursprungssubstanzen. Zukünftige Arbeiten könnten darauf abzielen, die Probenaufarbeitung weiter zu standardisieren, zusätzliche

Reinsubstanzen für die Kalibrierung zu verwenden, sowie methodische Parameter wie Wartezeiten vor der Messung systematisch zu untersuchen.

## Literaturverzeichnis

Ali, A. H., 2022. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry*, Band 6, pp. 010-020.

aprentas Hrsg., 2017. *Laborpraxis Band 3: Trennungsmethoden*. 6 Hrsg. Basel: Springer International Publishing.

Barnhart, W. W., Farooq, M. Q. & Haidar Ahmad, I. A., 2024. A simplified tutorial on charged aerosol detection: Understanding the basics, optimization, and troubleshooting. *Journal of Chromatography Open*, Band 6.

Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P., 2008. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6 Hrsg. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J. j. & Stryer, L., 2018. *Stryer Biochemie*. 8 Hrsg. Berlin: Springer Spektrum.

Calder, P. C., 2015. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 15 Juli, 39(1S), p. 18S–32S.

Christen, P., Jaussi, R. & Benoit, R., 2016. *Biochemie und Molekularbiologie*. 1 Hrsg. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V., 2025. *Trivialnamen der Fettsäuren*. [Online]  
Available at: <https://dggfett.de/material/fsnam.php>  
[Zugriff am 17 März 2025].

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2023. *European Pharmacopoeia – General Chapter 2.2.46*. [Online]  
Available at: <https://www.edqm.eu/en/-/general-chapter-2.2.46.-chromatographic-separation-techniques-now-published-in-ph.-eur.-11th-edition?>  
[Zugriff am 3 April 2025].

Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, o.J.. *Fettsäuremuster – Chemische Analytik*. [Online]  
Available at: <https://www.igb.fraunhofer.de/de/analytik-und-pruefleistungen/chemische-analytik/projekte/festtsaeuremuster.html>  
[Zugriff am 15 April 2025].

Gey, M., 2021. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik : Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. 4 Hrsg. Berlin: Springer.

Görs, P. E., 2024. *Entwicklung und Optimierung einer auf Massenspektrometrie basierten Fettsäureanalytik für die Systembiologie, Medizin und Ernährung*, Duisburg: Universität Duisburg-Essen.

Honeywell / Fluka, 2024. *TDS Ölsäure (Ph. Eur.) reinst, Pharma-Qualität*. [Online]  
Available at:

[https://www.itwreagents.com/download\\_file/tds/142659/en/tds\\_142659\\_en.pdf](https://www.itwreagents.com/download_file/tds/142659/en/tds_142659_en.pdf)  
[Zugriff am 2 April 2025].

International Council for Harmonisation, 2023. *ICH Guideline Q2(R2): Validation of Analytical Procedures*. [Online]

Available at:

[https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q2%28R2%29\\_Guideline\\_2023\\_11\\_30.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_11_30.pdf)

[Zugriff am 3 April 2025].

Krist, S., 2013. *Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle*. 2 Hrsg. Wien: Springer-Verlag.

Kurreck, J., Engels, J. W. & Lottspeich, F., 2022. *Bioanalytik*. 4 Hrsg. Berlin: Springer-Verlag GmbH Deutschland.

Latscha, H. P., Kazmaier, U. & Klein, H., 2023. *Organische Chemie Chemie-Basiswissen II*. 8 Hrsg. Berlin: Springer-Verlag GmbH.

Madhuri, V., Pandreka, M. K., Gayatri, G. B. & Yamini, M., 2024. Advances in High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC). *Journal of Pharma Insights and Research*, 2(6), pp. 39-46.

Malviya, R., Bansal, V., Prakash Pal, O. & Sharma, P., 2010. High Performance Liquid Chromatography: A Short Review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2(5), pp. 22-26.

Mladek, C. & Kromidas, S., 2019. *HPLC für Neueinsteiger*. [Online]

Available at:

<https://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/HPLCfuerNeueinsteiger.pdf>

[Zugriff am 24 Februar 2025].

Phenomenex, 2025. *Biozen Glycan*. [Online]

Available at: <https://www.phenomenex.com/products/biozenlc-hplc-column/biozen-glycan>

[Zugriff am 3 Januar 2025].

phenomenex, 2025. *Luna Omega C18 HPLC Columns*. [Online]

Available at: <https://www.phenomenex.com/products/luna-omega-hplc-column/luna-omega-c18>

[Zugriff am 3 Januar 2025].

Rathod, R. H., Chaudhari, S. R., Patil, A. S. & Shirkhedkar, A. A., 2019. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31 Oktober, 5(6).

Ritgen, U., 2019. *Analytische Chemie I*. Berlin: Springer Spektrum.

Seppänen-Laakso, T., Laakso, I. & Hiltunen, R., 2002. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, Band 465, p. 39–62.

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 2024. *Sicherheitsdatenblatt Linolsäure*. [Online] Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/sds/sigma/l1376?userType=anonymous> [Zugriff am 15 März 2025].

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 2024. *Sicherheitsdatenblatt  $\alpha$ -Linolensäure*. [Online] Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/sds/sigma/l2376?userType=anonymous> [Zugriff am 16 März 2025].

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 2024. *Sicherheitsdatenblatt  $\gamma$ -Linolensäure*. [Online] Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/sds/sigma/l2378?userType=anonymous> [Zugriff am 15 März 2025].

Stauffer, D., 2008. Das Chromatogramm. In: S. Kromidas & H. Kuss, Hrsg. *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Tang, B. & Row, K. H., 2013. Development of Gas Chromatography Analysis of Fatty Acids in Marine Organisms. *Journal of Chromatographic Science*, 31 Juli, 51(7), p. 599–607.

Thermo Fisher Scientific, 2018. *HPLC-CAD Learning Center*. [Online] Available at: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/BR-70735-LC-Corona-Veo-CAD-BR70735-EN.pdf> [Zugriff am 22 Februar 2025].

Thermo Fisher Scientific, 2025. *AccuCORE™ aQ C18 Polar Endcapped HPLC-Säulen*. [Online] Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/17326-152130?SID=srch-hj-17326-152130> [Zugriff am 2 Januar 2025].

Thermo Fisher Scientific, 2025. *Accucore™ C8 HPLC-Säulen*. [Online] Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/17226-152130> [Zugriff am 2 Januar 2025].

Thermo Fisher Scientific, 2025. *Accucore™ RP-MS*. [Online] Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/17626-152130> [Zugriff am 2 Januar 2025].

U.S. Department of Agriculture, 2025. *USDA FoodData Central*. [Online] Available at: <https://fdc.nal.usda.gov/> [Zugriff am 25 3 2025].

U.S. Department of Agriculture, 2025. *USDA FoodData Central-Olive Oil (extra virgin)*. [Online]

Available at: <https://fdc.nal.usda.gov/food-details/748608/nutrients>

[Zugriff am 25.3.2025].

U.S. Department of Agriculture, 2025. *USDA FoodData Central-Peanut Oil*.

[Online]

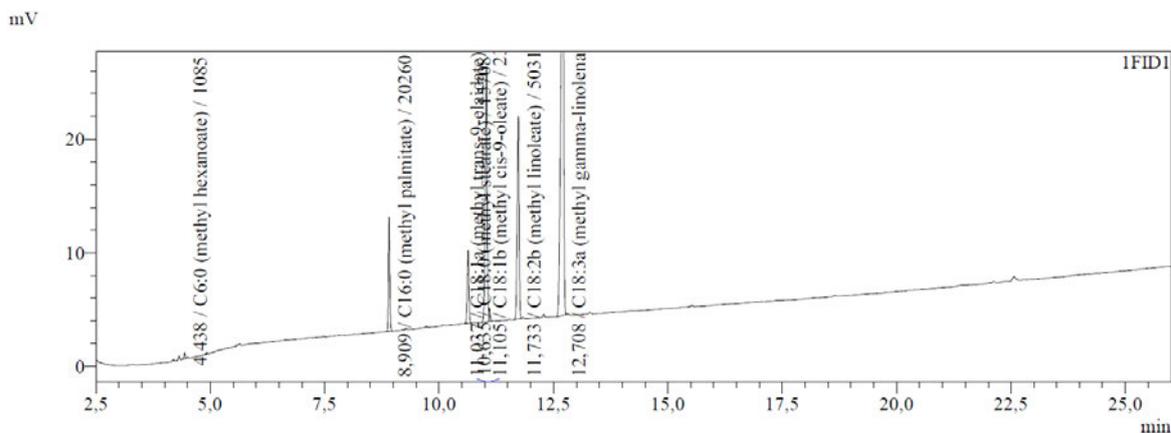
Available at: <https://fdc.nal.usda.gov/food-details/1750348/nutrients>

[Zugriff am 25.3.2025].

Vehovec, T. & Obreza, A., 2010. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A*, 1217(10), pp. 1549-1556.

Yu, X. et al., 2023. Validation of an HPLC-CAD Method for Determination of Lipid Content in LNP-Encapsulated COVID-19 mRNA Vaccines. *Vaccines*, 11(5), p. 937.

# Anhang A: GC-Referenzmessung zur Peak-Identifikation



Peak Table

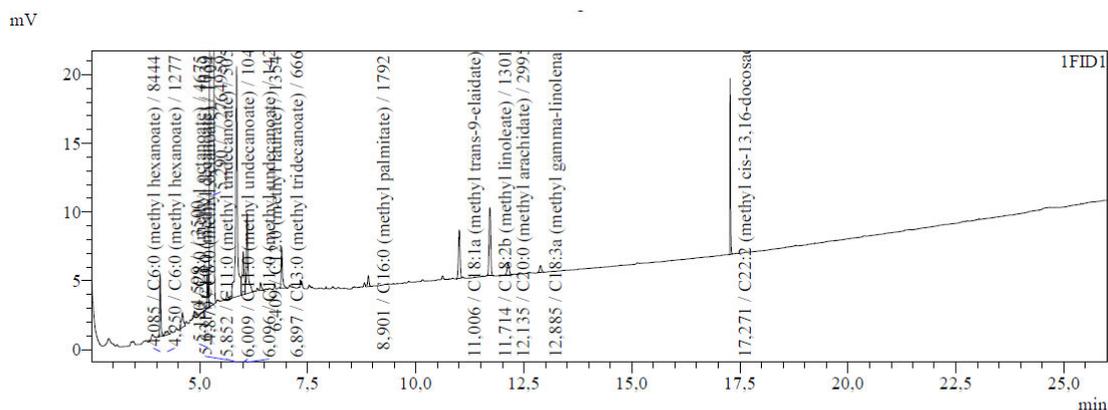
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	4.438	1085	552	0.336	mg/mL	V	C6:0 (methyl hexanoate)
2	8.909	20260	9956	6.278	mg/mL		C16:0 (methyl palmitate)
3	10.635	15708	6380	4.867	mg/mL		C18:0 (methyl stearate)
4	11.037	65018	22225	20.147	mg/mL		C18:1a (methyl trans-9-elaidate)
5	11.105	2378	1179	0.737	mg/mL	V	C18:1b (methyl cis-9-oleate)
6	11.733	50318	17785	15.592	mg/mL		C18:2b (methyl linoleate)
7	12.708	167953	41951	52.043	mg/mL		C18:3a (methyl gamma-linolenate)
Total		322720	100028				

Abbildung A-1: Basische Veresterung von Leinöl

## Anhang B: Methodische Entwicklung und Messergebnisse

### Anhang B1: GC-Analysen zur Methylesterbildung (Ansätze 4–6)

Die folgenden Abbildungen dokumentieren die Ergebnisse der GC-Analysen zur Methylesterbildung bei drei Hydrolyseansätzen mit Methanol. Die Proben wurden nach der Neutralisation bei unterschiedlichen pH-Werten analysiert.

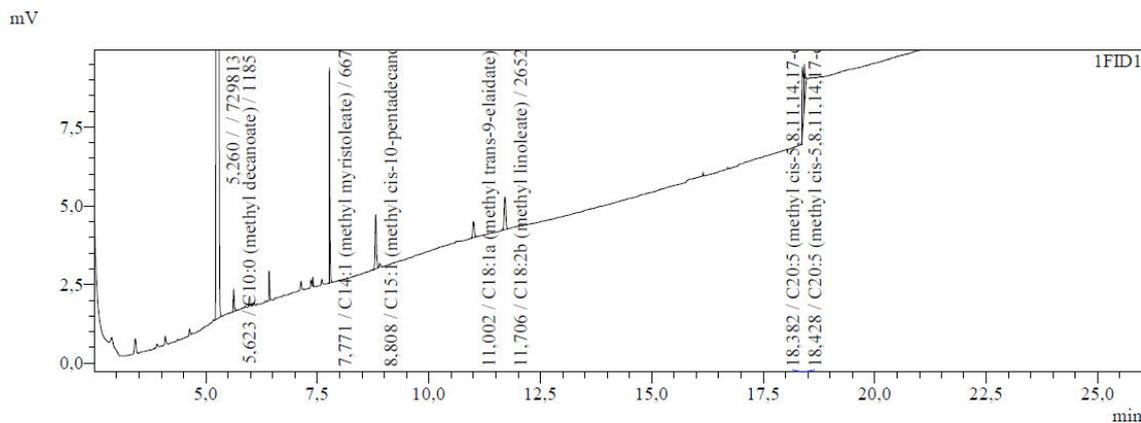


FID1

Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	4,085	8444	4489	0,290	mg/mL		C6:0 (methyl hexanoate)
2	4,250	1277	264	0,044	mg/mL	V	C6:0 (methyl hexanoate)
3	4,599	3500	1089	0,120	mg/mL		C8:0 (methyl octanoate)
4	4,879	1104	402	0,038	mg/mL		C8:0 (methyl octanoate)
5	5,180	4675	2907	0,161	mg/mL		C8:0 (methyl octanoate)
6	5,290	2764959	1025061	95,057	mg/mL	V	C10:0 (methyl decanoate)
7	5,631	1039	562	0,036	mg/mL		C11:0 (methyl undecanoate)
8	5,852	50570	16459	1,739	mg/mL	V	C11:0 (methyl undecanoate)
9	6,009	10441	3087	0,359	mg/mL	V	C11:0 (methyl undecanoate)
10	6,096	14202	5776	0,488	mg/mL	V	C11:0 (methyl undecanoate)
11	6,409	1354	585	0,047	mg/mL	V	C12:0 (methyl laurate)
12	6,897	6662	2913	0,229	mg/mL		C13:0 (methyl tridecanoate)
13	8,901	1792	779	0,062	mg/mL	V	C16:0 (methyl palmitate)
14	11,006	8908	3505	0,306	mg/mL		C18:1a (methyl trans-9-elaidate)
15	11,714	13017	4936	0,448	mg/mL		C18:2b (methyl linoleate)
16	12,135	2995	895	0,103	mg/mL		C20:0 (methyl arachidate)
17	12,885	1553	499	0,053	mg/mL		C18:3a (methyl gamma-linolenate)
18	17,271	12237	11639	0,421	mg/mL		C22:2 (methyl cis-13,16-docosadien)
Total		2908726	1085848				

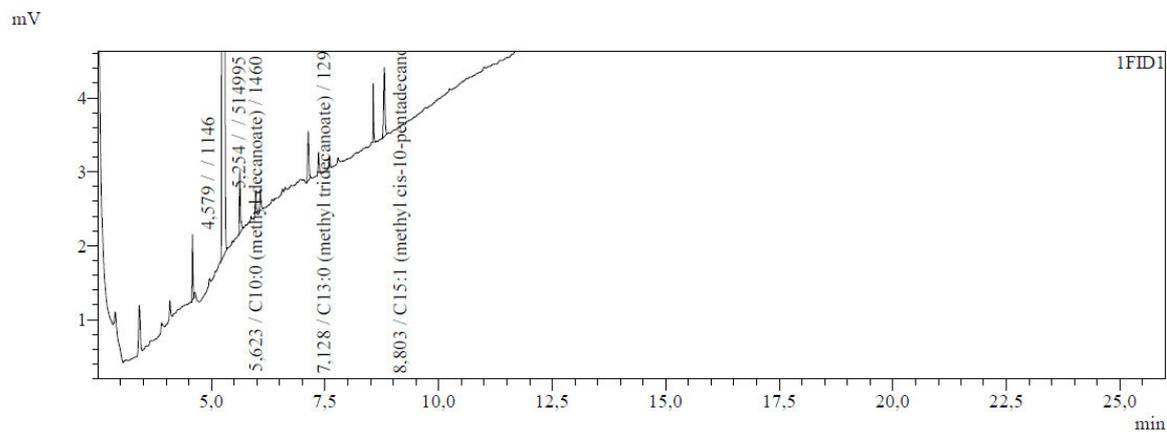
Abbildung B-1: GC-Chromatogramm von Ansatz 4 (pH 6–7,5), Methanol-Probe nach basischer Hydrolyse



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	5.260	729813	383471	97.029			
2	5.623	1185	710	0.158	mg/mL		C10:0 (methyl decanoate)
3	7.771	6671	6518	0.887	mg/mL		C14:1 (methyl myristoleate)
4	8.808	3784	1700	0.503	mg/mL		C15:1 (methyl cis-10-pentadecanoate)
5	11.002	1230	509	0.164	mg/mL		C18:1a (methyl trans-9-elaidate)
6	11.706	2652	1040	0.353	mg/mL		C18:2b (methyl linoleate)
7	18.382	4569	2059	0.607	mg/mL		C20:5 (methyl cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoate)
8	18.428	2258	1211	0.300	mg/mL	V	C20:5 (methyl cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoate)
Total		752161	397219				

Abbildung B-2: GC-Chromatogramm von Ansatz 5 (pH 4,5–5), Methanol-Probe nach basischer Hydrolyse



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	4.579	1146	875	0.220			
2	5.254	514995	290392	98.853			
3	5.623	1460	824	0.280	mg/mL		C10:0 (methyl decanoate)
4	7.128	1293	671	0.248	mg/mL		C13:0 (methyl tridecanoate)
5	8.803	2076	930	0.399	mg/mL		C15:1 (methyl cis-10-pentadecanoate)
Total		520970	293692				

Abbildung B-3: GC-Chromatogramm von Ansatz 6 (pH 3,5–4), Methanol-Probe nach basischer Hydrolyse

## Anhang B2: UHPLC-Analyse von Ansatz Nr. 2 (Messung #20)

Die folgende Messung zeigt das UHPLC-Chromatogramm und die Integrationsdaten für Ansatz Nr. 2 (pH 4,5–5, Lösungsmittel: Ethanol), analysiert mit einem CAD-Detektor. Die Konzentrationen wurden über eine zuvor erstellte Kalibrierkurve berechnet.

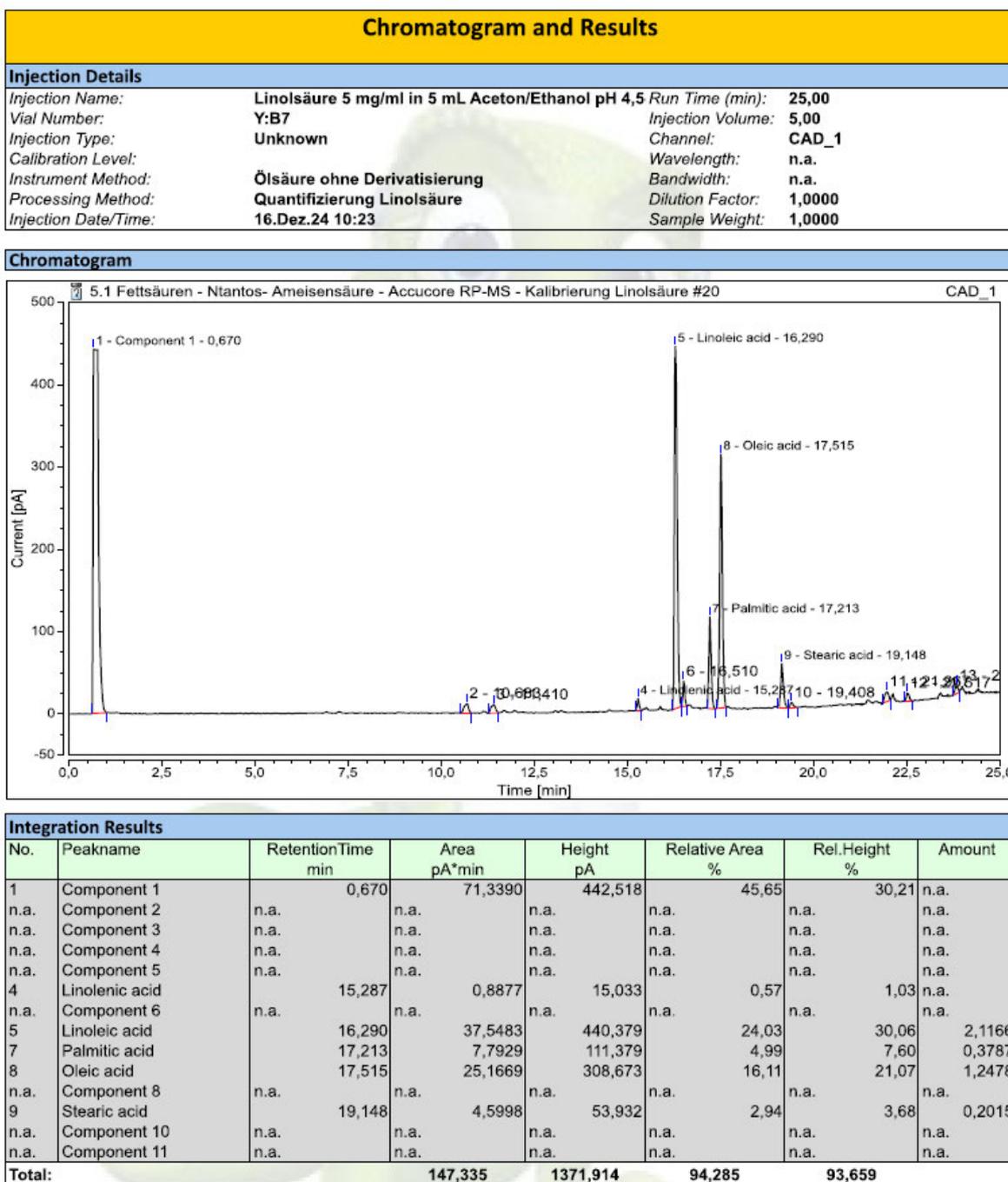


Abbildung B-4: UHPLC-Chromatogramm und Auswertung der Linolsäure-Probe (Ansatz 2, Messung #20)

## **Anhang C: Hinweis zur Nutzung von KI-gestützten Schreibwerkzeugen**

Im Rahmen der Erstellung dieser Bachelorarbeit wurde das KI-Tool ChatGPT (Modell: GPT-4) von OpenAI als unterstützendes Hilfsmittel verwendet.

Die Nutzung beschränkte sich ausschließlich auf sprachliche Formulierungen und stilistische Umformulierungen.

Die inhaltliche Erarbeitung, Recherche, Auswertung sowie die Integration und Interpretation der Fachliteratur erfolgten vollständig eigenständig. Alle verwendeten Quellen wurden sorgfältig geprüft und korrekt zitiert.

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 20.04.2025

---

Patrick Athanasios Ntantos