

DER EINFLUSS DES TRÄGERMATERIALS AUF DIE QUANTITATIVE, GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE HÖHERER FETTSÄUREMETHYLESTER*

HENNING BÜHRING

*Physiologisch-Chemisches Institut** der Universität,
Hamburg (Deutschland)*

(Eingegangen am 19. Dezember 1962)

Die rasche Entwicklung der Gaschromatographie in den letzten Jahren hat in vielen Laboratorien zu ihrer Anwendung als quantitativer Bestimmungsmethode höherer Fettsäuren geführt. Ihre Zuverlässigkeit ist jedoch noch fragwürdig. Eine kürzlich von KAUFMANN und Mitarb. beschriebene Ringanalyse verschiedener Institute ergab für das gleiche Fettsäuregemisch eine Fehlerbreite von $\pm 25\%$; dies zeigt, mit welchen Unsicherheitsfaktoren die quantitative Aussage noch belastet ist¹.

Zur quantitativen Auswertung des Chromatogrammes wird im allgemeinen bei höheren Fettsäuren die Bandenfläche gemessen, da diese bei Stoffen mit grösserer Retentionszeit von Schwankungen der Flussgeschwindigkeit und Temperatur unabhängiger ist als die Gipfelhöhe. Um die Bandenfläche auf die Gewichtsmenge beziehen zu können, muss der Untersucher in den meisten Fällen eine Eichung des Gaschromatographen für die gegebenen Arbeitsbedingungen vornehmen. Die verschiedenen Möglichkeiten dieser Eichung sind folgende: Es wird entweder der Probe ein interner Standard bekannter Gewichtsmenge zugesetzt oder die Probe in einem bekannten Volumen aufgenommen und mit einem Eichchromatogramm ähnlicher Zusammensetzung und bekannter Konzentration verglichen. Eine Eichung wird nicht als erforderlich angesehen, wenn die Gesamtfettsäuremenge vorher gewogen wird und dann, unter der Voraussetzung, dass alle Komponenten flüchtig sind und im Chromatogramm erscheinen, der prozentuale Anteil jeder Komponente aus den unterschiedlichen Flächengrößen ermittelt wird^{2,3}.

Um die Fehlergrenze bei der quantitativen Fettsäurebestimmung in biologischem Material so niedrig wie möglich zu halten, haben wir vor und nach jedem Testchromatogramm ein Eichchromatogramm bekannter Konzentration an Methylaurinat, Methylmyristinat, Methylpalmitat, Methylstearat, Methyloleat und Methylinolat aufgegeben. Dabei lässt sich nach mehrstündigem Chromatographieren eine Zunahme der Bandenfläche für die gleiche Fettsäuremenge in Abhängigkeit von der Kettenlänge und der Durchgasungsdauer zwischen zwei Chromatogrammen beobachten, obwohl die Gipfel symmetrisch und gut getrennt sind. Aus 80 Tagesschreibungen über jeweils 7 Stunden errechnet sich zum Beispiel eine mittlere Zunahme für Methylmyristinat von 7% und für Methylstearat von 18% gegenüber der Ausgangsfläche zu Beginn des Tages. Die ungesättigten Fettsäuren zeigen eine Flächenzunahme in der

* Für eine Sachbeihilfe danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Direktor: Prof. Dr. J. KUHNAU.

gleichen Grössenordnung wie Methylstearat. Diese Erscheinung ist unabhängig vom Detektor, da immer die gleiche absolute Konzentration aufgetragen wird und ebenfalls unabhängig von der Art und Konzentration der flüssigen Phase (Apiezon und verschiedene Polyester, 10 oder 20 %). Lediglich der Wechsel des Trägermaterials von Sterchamol zu Kieselgur führte zu einer deutlich verbesserten Reproduzierbarkeit.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass es sich bei der Zunahme der Flächengrösse offenbar um einen entscheidenden Einfluss des Trägermaterials handelt, und dass die äusserlichen Kriterien für ein inertes Verhalten der Trägerstoffe — Symmetrie der Banden und Trennbarkeit von zwei benachbarten Komponenten — nicht ausreichen, um ihre Brauchbarkeit für die quantitative Analyse zu beurteilen. Viele Arbeitskreise haben sich in den letzten Jahren mit den Adsorptionskräften der Trägerstoffe und der Ausschaltung durch Vorbehandlung beschäftigt, aber es wurde fast ausschliesslich auf eine Verbesserung der Eigenschaften des Chromatogrammes nach den oben genannten Kriterien geachtet⁴⁻¹⁶. Es erschien uns daher gerechtfertigt, in einer speziellen Versuchsanordnung die beiden hauptsächlich gebräuchlichen Trägerstoffe Sterchamol und Kieselgur auf ihre Verwendbarkeit bei der quantitativen Analyse höherer Fettsäuremethylester zu untersuchen.

METHODISCHES

Die Trägerstoffe werden entweder unbehandelt, wie sie käuflich zu beziehen sind*, oder nach vorheriger Behandlung, wie in Tabelle I angegeben, untersucht. Als flüssige Phase wird in allen Fällen 10 % Reoplex** aufgetragen. Die fertig gepackte Säule (Länge 240 cm) wird 24 Stunden vor Gebrauch konditioniert. Die beiden Standardsubstanzen, Methyllaurinat und Methylstearat, sind hochgereinigte Präparate

TABELLE I

UNTERSUCHTES TRÄGERMATERIAL

Sterchamol	unbehandelt
Sterchamol	HCl und KOH gewaschen
Sterchamol	mit Hexamethyldisilazan vorbehandelt
Sterchamol	mit 2 % Na-Laurinat vorbehandelt
Kieselgur	unbehandelt
Kieselgur	HCl und KOH gewaschen

der California Corporation for Biochemical Research. Die $1-^{14}\text{C}$ -Palmitinsäure wurde aus dem Radiochemical Center, Amersham, bezogen und zusammen mit Trägerpalmitinsäure nach der Methode von METCALFE UND SCHMITZ in Methylpalmitat überführt¹⁷. Alle Untersuchungen werden in einem Barber-Colman-Gaschromatographen ausgeführt.

Auf der fertig konditionierten Säule werden 75 μg einer der oben angegebenen Methylester in Abständen von 5 Min. über einen Zeitraum von 20 Min. chromatographiert und die prozentualen Flächenveränderungen gegenüber der ersten Bandenfläche errechnet. Die Säulentemperatur beträgt 186° , die Flussgeschwindigkeit des Argonträgergases 75 ml/Min.

* Sterchamol und Kieselgur 0.2–0.3 mm, Fa. E. Merck, Darmstadt.

** Reoplex (Diäthylenglykoladipat), Fa. E. Merck, Darmstadt.

Die in Heptan gelöste Probe wird mit einer Hamilton-Mikrospritze ohne Unterbrechung des Gasstromes durch eine Siliconkautschukmembran direkt auf die Säule aufgegeben. Der Nachweis erfolgt durch eine Argonionisationskammer, die Bandenflächen werden automatisch mit einem DISC-Integrator registriert. Alle Bedingungen werden über den Zeitraum der Untersuchung sorgfältig konstant gehalten. Vor jeder neuen Serie wird die Säule mindestens 3 Stunden mit Trägergas (75 ml/Min.) gespült, damit retinierte Reste von Fettsäuremethylestern eluiert werden. Bei den Versuchen mit radioaktivem Methylpalmitat wird, entsprechend einer Methode von KARMEN UND TRITCH, das Palmitat nach Verlassen der Ionisationskammer in getrennten Fraktionen an Anthracenkristalle aus dem Trägergasstrom kondensiert und die Impulse im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gemessen¹⁸.

Vorbehandlung der Trägerstoffe

1. Waschen mit konz. HCl und 0.5 N methanolischer KOH wie von FARQUHAR und Mitarb. angegeben¹².

2. Vorbehandlung mit Hexamethyldisilazan* nach dem Verfahren von BOHEMEN und Mitarb.¹³.

3. Vorbehandlung mit Na-Laurinat: 400 mg Na-Laurinat werden in wenig Wasser und 50 ml heissem Aceton gelöst und zu dieser Lösung 20 g Sterchamol hinzugegeben. Das Gemisch wird auf einem Wasserbad (70°) solange gerührt, bis der Rückstand fast trocken ist und anschliessend 14 Std. im Vakuumtrockenschrank bei 95° vollständig getrocknet.

ERGEBNISSE

Die Fig. 1 und 2 zeigen das Verhalten von unbehandeltem Sterchamol und Kieselgur unter den vorher beschriebenen Versuchsbedingungen. Wenn auf diesen Säulen in Abständen von 5 Min. Fettsäuremethylester chromatographiert werden, nimmt die

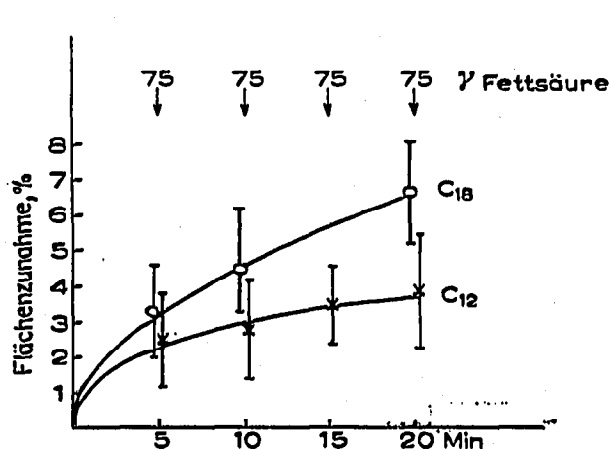


Fig. 1. Sterchamol unbehandelt.

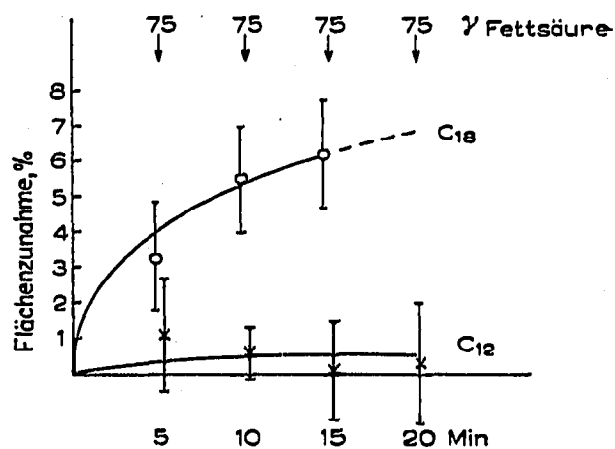


Fig. 2. Kieselgur unbehandelt.

Bandenfläche gegenüber der Ausgangsfläche beim Sterchamol für Methylstearat um nahezu 7% und für Methylaurinat um etwa 4% zu. Beim Kieselgur beträgt die Zunahme für Methylstearat 6%, während für Methylaurinat praktisch keine Zu-

* Firma Fluka, Buchs (Schweiz).

nahme zu beobachten ist. Jeder Punkt in diesen und den nachfolgenden Abbildungen repräsentiert den Mittelwert aus 6-10 Einzelmesserien, die getrennt für die beiden Fettsäureester durchgeführt wurden. Die vertikalen Linien veranschaulichen die errechneten Standardabweichungen.

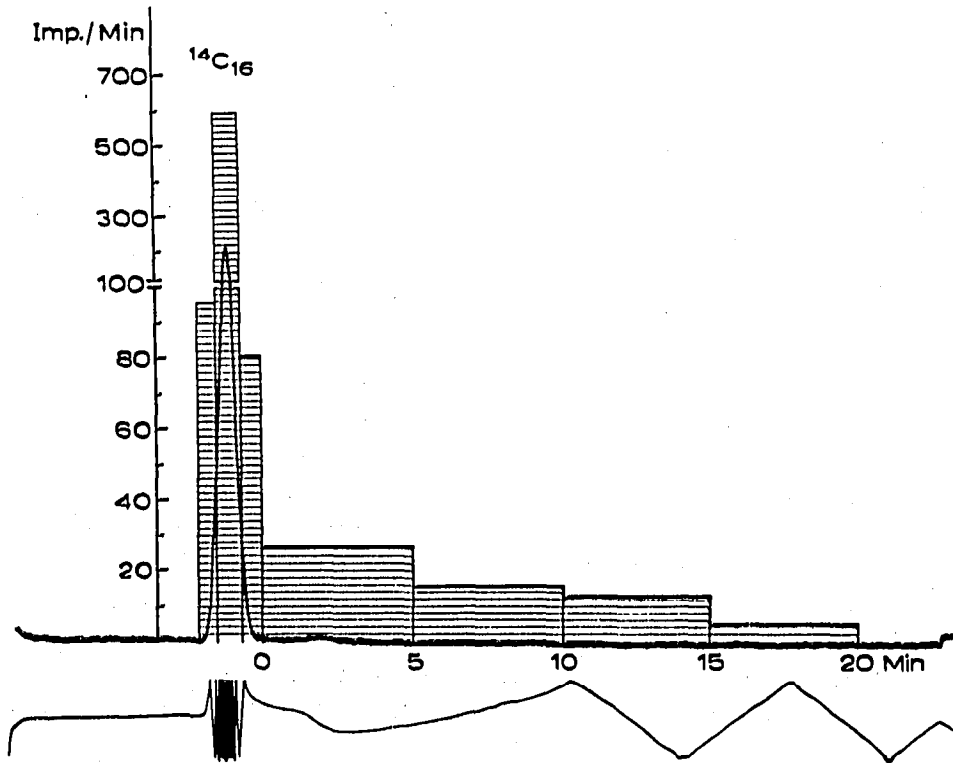


Fig. 3. Sterchamol unbehandelt.

Die Fig. 3 zeigt ein Chromatogramm von $1-^{14}\text{C}$ -Methylpalmitat auf einer Säule mit unbehandeltem Sterchamol. Die schraffierten Kästchen stellen Impulse/Minute in der auf der Abszisse angegebenen Zeit dar. Im Anschluss an den Gipfel lassen sich noch 8% der Gesamtfettsäuremenge nachweisen, die bei der quantitativen Bestimmung aus der Bandenfläche nicht mit erfasst werden. Dieses Ergebnis lässt darauf

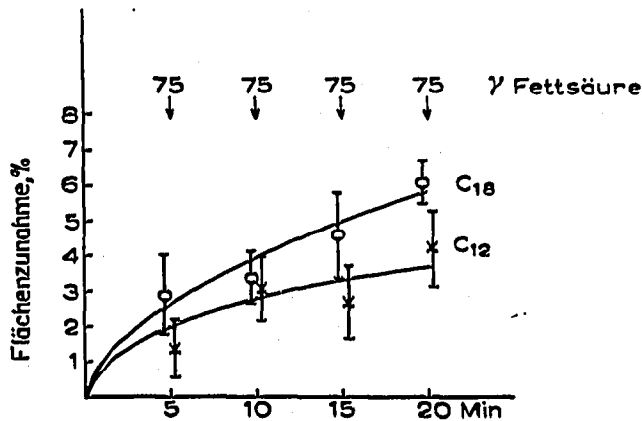


Fig. 4. Sterchamol HCl und KOH behandelt.

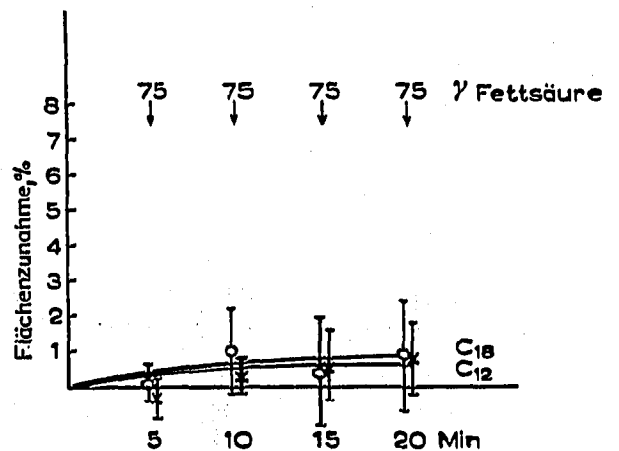


Fig. 5. Kieselgur HCl und KOH behandelt.

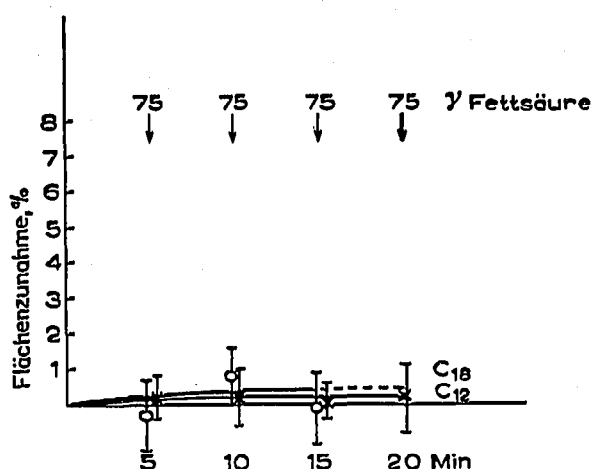


Fig. 6. Sterchamol Hexamethyldisilazan behandelt.

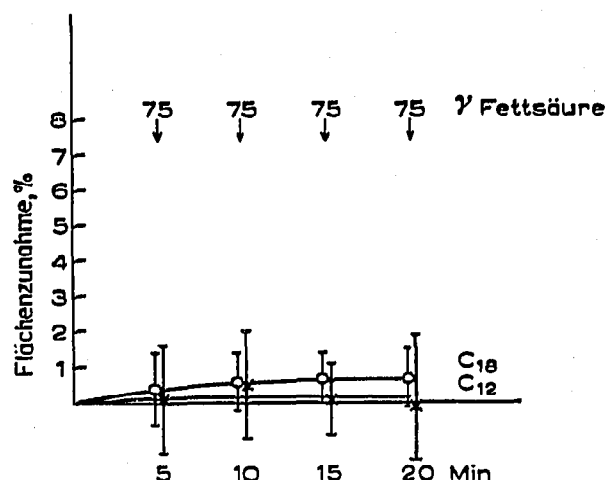


Fig. 7. Sterchamol 2% Na-Laurinat behandelt.

schliessen, dass die zunächst adsorbierte Fettsäuremenge wieder kontinuierlich vom Trägergas eluiert wird.

Eine Vorbehandlung des Trägermaterials mit HCl und methanolischer KOH führt beim Sterchamol nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Wie Fig. 4 zeigt, ist keine Änderung gegenüber dem unbehandelten Sterchamol eingetreten (Vergleich mit Fig. 1). Beim Kieselgur ist diese Vorbehandlung ausreichend, um praktisch alle Adsorptionskräfte auszuschalten. Aus Fig. 5 geht hervor, dass keine Flächenzunahme für Methylstearat gegenüber der Ausgangsfläche mehr zu beobachten ist. Erst die Behandlung des Sterchamols mit Hexamethyldisilazan oder mit Na-Laurinat ergibt

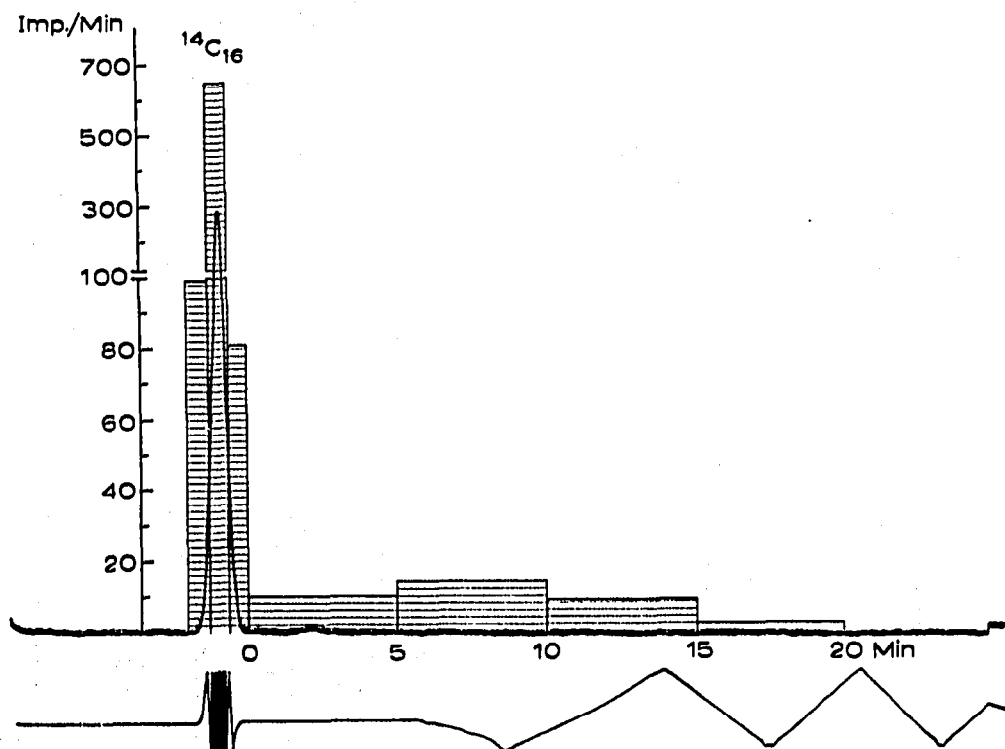


Fig. 8. Sterchamol 2% Na-Laurinat behandelt.

ein gutes Resultat (Fig. 6 und 7) und macht auch diesen Trägerstoff für die quantitative Gaschromatographie höherer Fettsäuremethylester brauchbar. Fig. 8 zeigt ein der Fig. 3 entsprechendes Chromatogramm von $1-^{14}\text{C}$ -markiertem Methylpalmitat auf einer mit Na-Laurinat vorbehandelten Säule. Im Anschluss an den Gipfel lassen sich nur noch 4 % seiner Gesamtaktivität nachweisen.

DISKUSSION

Die Versuchsanordnung gestattet unabhängig vom Detektor das Verhalten der Trägerstoffe im Hinblick auf die Adsorption höherer Fettsäuremethylester zu untersuchen. Die vorgelegten Befunde zeigen, dass beim käuflichen Sterchamol und Kieselgur ein Teil der Fettsäuremethylester adsorbiert wird, obwohl diese Trägerstoffe äusserlich symmetrische Gipfel im Chromatogramm liefern. Die Adsorption ist umso umfangreicher, je grösser die Retentionszeit ist, und bedeutet eine erhebliche Fehlerquelle bei der Eichung mit nur einem internen Standard. Der Verlauf der Kurven in den Fig. 1, 2 und 4 lässt eine allmähliche Absättigung aktiver Zentren am Trägerstoff vermuten und nicht, wie ORR UND CALLEN¹⁹ für ihren Fall annehmen, einen Umesterungsprozess mit der Polyesterphase der Säule. Dagegen spricht auch die Beobachtung der gleichen Phänomene an Apiezon-Säulen mit einem unpräparierten Trägerstoff. Die Radioaktivitätsmessung zeigt, dass der Fettsäuremethylester offenbar reversibel adsorbiert und mit dem Trägergasstrom wieder eluiert wird. Für die Adsorption werden übereinstimmend von vielen Autoren Reste an Kieselgel im Trägermaterial verantwortlich gemacht, deren Ausschaltung durch eine chemische Umsetzung mit methanolischer KOH^{3,12}, Dimethyldichlorsilan^{7,10,16} oder Hexamethyldisilazan¹³ mit Erfolg versucht worden ist. Eine zweite Möglichkeit ist die physikalische Abdeckung der aktiven Zentren durch einen Metallüberzug⁹ oder durch Zusatz von Stearat⁴ oder Capronat^{5,6,11} zur flüssigen Phase.

Einige dieser Möglichkeiten sind in der vorliegenden Arbeit erprobt worden. Die Behandlung mit methanolischer KOH reicht aus, um Kieselgur zu einem brauchbaren Trägerstoff für die quantitative Gaschromatographie zu machen. Die gleiche Behandlung führt beim Sterchamol zu keinem Erfolg, wahrscheinlich aufgrund der anderen chemischen Zusammensetzung. In diesem Fall aber ergibt eine Vorbehandlung mit Hexamethyldisilazan oder Na-Laurinat eine nahezu vollständige Ausschaltung der Adsorptionskräfte. Die Chromatographie einer markierten Fettsäure lässt kaum noch ein Austreten von Radioaktivität im Anschluss an den Gipfel erkennen und widerlegt damit den Einwand, dass es sich in Fig. 3 um den Nachweis von Bruchstücken der markierten Fettsäure handeln könnte. Dieses Ergebnis hat darüber hinaus eine Bedeutung für die fraktionierte Radioaktivitätsmessung in biologischem Material, wenn z.B. auf eine hochmarkierte Fettsäure unmittelbar eine Fettsäure mit geringer spezifischer Aktivität folgt, muss der Blindwert möglichst niedrig sein.

Die Forderung nach einem inerten Trägermaterial wird immer wieder gestellt. Wie notwendig eine sorgfältige Vorbehandlung für eine zuverlässige quantitative Aussage und eine fraktionierte Radioaktivitätsmessung ist, haben die vorgelegten Untersuchungen gezeigt; darüberhinaus lassen sich die sonst häufigen Eichungen einschränken und führen damit in der Routineanalyse zu einer erheblichen Zeiteinsparung.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine vom Detektor unabhängige Versuchsanordnung beschrieben, die den Einfluss des Trägermaterials bei der quantitativen gaschromatographischen Bestimmung höherer Fettsäuren zu prüfen gestattet. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bei Verwendung von unpräpariertem Trägermaterial eine reversible Adsorption von Fettsäuremethylestern stattfindet, die die quantitative Aussage mit einem erheblichen Fehler belastet. Eine Vorbehandlung des Kieselgurs mit konz. HCl und methanolischer KOH und des Sterchamols mit Hexamethyldisilazan oder Na-Laurinat reduziert diese Adsorption auf ein zu vernachlässigendes Minimum und beseitigt so die Fehlerquellen, die die Brauchbarkeit der beiden Trägerstoffe beeinträchtigen.

SUMMARY

A procedure is described to test the influence of solid supports on quantitative gaschromatographic analysis of fatty acid methyl esters. The results show that considerable adsorption takes place when untreated kieselguhr or firebrick is used, despite the fact that symmetrical peaks are obtained in the chromatogram. For the preparation of a suitable support with low adsorptive properties treatment with acid and alkali is an adequate procedure for kieselguhr, while firebrick has to be pretreated with hexamethyldisilazane or sodium laurate to obtain reproducible results in quantitative analysis.

LITERATUR

- ¹ H. P. KAUFMANN, A. SEHER UND G. MANKEL, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 64 (1962) 501.
- ² H. P. BURCHFIELD UND E. E. STORRS, *Biochemical Applications of Gas Chromatography*, Academic Press, New York, 1962, S. 113.
- ³ A. T. JAMES, in *Methods of Biochemical Analysis* (herausgegeben von D. GLICK), Vol. 8, Interscience, New York, 1960, S. 38.
- ⁴ A. T. JAMES UND J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 50 (1952) 679.
- ⁵ E. BAYER, *Angew. Chem.*, 69 (1957) 732.
- ⁶ E. BAYER, in *Gas Chromatography* (herausgegeben von D. H. DESTY), Butterworths, London, 1958, S. 333.
- ⁷ A. KWANTES UND G. W. A. RIJNDERS, in *Gas Chromatography* (herausgegeben von D. H. DESTY), Butterworths, London, 1958, S. 63.
- ⁸ TH. JOHNS, in *Gas Chromatography* (herausgegeben von V. J. COATES, H. J. NOEBELS UND J. S. FAGERSON), Academic Press, New York, 1958, S. 31.
- ⁹ E. C. ORMEROD UND R. P. W. SCOTT, *J. Chromatog.*, 2 (1959) 65.
- ¹⁰ E. C. HORNING, E. A. MOSCATELLI UND C. C. SWEeley, *Chem. Ind. (London)*, (1959) 751.
- ¹¹ E. BAYER, *Angew. Chem.*, 71 (1959) 299.
- ¹² J. W. FARQUHAR, W. INSULL, JR., P. ROSEN, W. STOFFEL UND E. H. AHRENS, JR., *Nutr. Rev.*, 17 (1959) No. 8, Suppl. S 1.
- ¹³ J. BOHEMEN, S. H. LANGER, B. H. PERRETT UND J. H. PURNELL, *J. Chem. Soc.*, (1960) 2444.
- ¹⁴ A. WEINSTEIN, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 18.
- ¹⁵ E. M. BENS, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 178.
- ¹⁶ J. HORNSTEIN UND P. F. CORWE, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 310.
- ¹⁷ L. D. METCALFE UND A. A. SCHMITZ, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 363.
- ¹⁸ A. KARMEN UND H. R. TRITCH, *Nature*, 186 (1960) 150.
- ¹⁹ C. H. ORR UND J. E. CALLEN, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 72, Art. 13 (1959) 649.