

MIKROMETHODE ZUR SCHNELLEN UMESTERUNG VON LIPOIDEN AUF DÜNNESCHICHTPLATTEN MIT NATRIUMMETHYLAT FÜR DIE GAS-CHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE DER FETTSÄUREMETHYLESTER

KURT OETTE*

Medizinische Universitätsklinik Köln** (Deutschland)

UND

MANFRED DOSS***

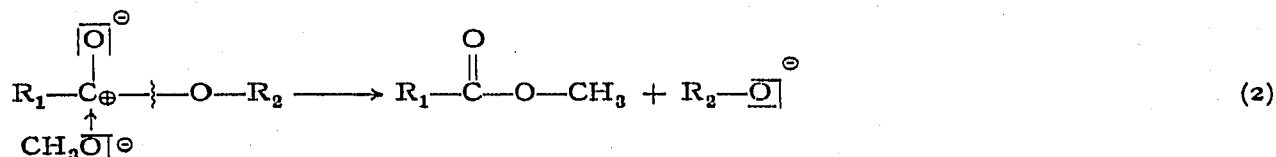
Hygiene-Institut der Universität Marburg§ (Deutschland)

(Eingegangen den 29. August 1967)

EINLEITUNG

Fettsäuremethylester können durch säure- oder alkali-katalysierte Umesterung unter Verwendung von Methanol-HCl (H_2SO_4) oder Natriummethylat in Methanol aus komplexen Lipoiden hergestellt werden.

Die Ausbildung der labileren mesomeren Grenzform des Esters durch Aufrichtung der C=O-Doppelbindung bei gleichzeitigem Auftreten einer Elektronenlücke am zugehörigen C-Atom (Reaktion 1) entsteht wahrscheinlich durch Alkali in Methanol (Na-Methylat oder methanolische NaOH), wenn auch nicht in dem Ausmass wie bei der säure-katalysierten Umesterung. Alkali fördert die Bildung der nucleophilen CH_3O^- -Gruppe und katalysiert damit deren Anlagerung an das positivierte C-Atom des Esters. Infolge des Überschusses an Methylationen findet eine schnelle Umsetzung im Sinne der Reaktion 2 statt.



Die alkali-katalysierte Umesterung wurde bereits von KLENK UND RENNKAMP¹ zur Abspaltung von Glycerinphosphatidfettsäuren als Äthylester benutzt. Bei der Isolierung und Strukturaufklärung einer unbekannt Klasse von Glykolipoiden^{2,3} fanden wir, dass Fettsäuren in Esterbindung durch kurzzeitiges Erhitzen mit 0.1 N

* 5000 Köln-Lindenthal, Joseph Stelzmann Strasse 9.

** Direktor: Prof. Dr. R. GROSS.

*** 3550 Marburg (Lahn), Pilgrimstein 2.

§ Direktor: Prof. Dr. R. SIEBERT.

methanolischer NaOH als Methylester abgespalten werden. Wir konnten zeigen, dass sich die alkali-katalysierte Umesterung zur Darstellung von Fettsäuremethylestern aus Glyceriden, Glycerinphosphatiden und Cholesterinestern als Schnellmethode für die gaschromatographische Analyse eignet³. LUDDY und Mitarbeiter⁴ haben bereits die Anwendung von Na-Methylat zur Gewinnung von Methylestern für die gaschromatographische Analyse mitgeteilt. In mehreren Variationen fand das Verfahren weitere Verbreitung, ohne jedoch gegenüber der Umesterung mit Methanol-HCl den entscheidenden Vorteil hinsichtlich der schnelleren Umesterungszeit und vereinfachten Durchführung zu bieten. Nach unseren früheren Versuchen³ ist die Umesterung der geprüften Substanzen (Mengenbereich 5–10 mg) innerhalb von fünf Minuten gewährleistet. Die Umesterung läuft praktisch ohne Bildung von Seifen ab.

Die komplette Umesterung von Triglyceriden in fünf Minuten bei Zimmertemperatur wurde inzwischen von MARINETTI⁵ bestätigt. Einen Mikroreaktor, für die gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von pflanzlichen Ölen, der die Umesterung mit 2.7 M Natriummethylat bei 50° in 20–30 Sek. vollzieht, haben DAVISON UND DUTTON⁶ beschrieben. Die Apparatur ist für bestimmte industrielle Zwecke geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Lipoidklassen in die Methodik einbezogen. Ferner wurde die Durchführung in wesentlichen Schritten, insbesondere für Serienbestimmungen, vereinfacht und für den Mikro- sowie Submikrobereich präzisiert.

MATERIAL UND METHODEN

Substanzen

Triglyceride (Erdnussöl), Glycerinphosphatide und Cholesterinester (Serum und Leber), Acetalphosphatide im Gemisch mit anderen Phosphatiden (Gehirn), Ceramide, Estercerebroside, Cerebroside, Sulfatide und Sphingomyelin (Gehirn), Wachse (*Achromobacter metalcaligenes*) wurden nach Extraktion mit Chloroform-

TABELLE I

UMESTERUNG DER VERSCHIEDENEN LIPOIDKLASSEN IN ABHÄNGIGKEIT VON ZEIT UND TEMPERATUR

Stoffklasse ca. 1 mg	Zeit der vollständigen Umesterung der Substanz nach ihrer Lösung in 0.1 ml Benzol und Zugabe von 0.5 ml 0.5 N Na-Methylat (Methode A)	
	Raumtemperatur (Min.)	Kochen (Min.)
Glyceride	1	0.3
Glycerinphosphatide	2	1
Cholesterinester	Ø	2
Wachse	Ø	2
Estercerebroside	1	1
Serumlipoide*	2**	2
Leberlipoide*	2**	2

* Gesamtextrakt.

** Geringe Mengen von Cholesterinestern (unter 5%) wurden nicht mit umgeestert.

Methanol säulen- und dünnschichtchromatographisch unter Verwendung von Kieselsäure isoliert.

Als Referenzsubstanzen für Umesterungsprodukte dienten Stearinsäure, Methylstearat (Serva, Heidelberg), Stearylalkohol, Cholesterinpalmitat und -oleat (Fluka AG, Schweiz).

Reagenzien

2.0 N Na-Methylat (Stammlösung von 4.60 g metallischen Natriums in 100 ml Methanol p.a. unter Kühlung), 0.5 N methanolische HCl, Benzol, Chloroform p.a., Kieselgel-H nach STAHL (E. Merck), 2',7'-Dichlorfluorescein und H₂SO₄.

Methodik

A. Standardverfahren zur Umesterung der Lipide

Glyceride, Glycerinphosphatide und Estercerebroside werden bei Raumtemperatur, Cholesterinester und Wachse durch Erhitzen quantitativ umgestert. Die Zeiten bis zur vollständigen Umesterung (1 bis 2 Min.) sind in Tabelle I zusammengestellt.

Die Substanz wird in einer Menge von etwa 0.4 bis 1.0 mg in ein spitz auslaufendes Reagenzgefäß (Höhe ca. 120 mm, Durchmesser 16 mm, Normalschliff 14.5/23) eingeführt oder in Lösung einpipettiert, wobei das Lösungsmittel unter Stickstoff abgeblasen wird. Zur sorgfältig mit 0.1 ml Benzol in der Spitze des Gefäßes gelösten Substanz fügt man 0.5 ml 0.5 N Na-Methylat hinzu. Das Gefäß wird mit einem Schliffstopfen verschlossen. Nach leichtem Schütteln bei Raumtemperatur oder Erhitzen bis zum Sieden (Zugabe eines Siedesteines; evtl. Einsatz eines mit kaltem Wasser gefüllten Kühlfingers) von 1 bis 2 Min. wird mit 0.5 ml 0.5 N methanolischer HCl neutralisiert. Das Lösungsmittelgemisch wird im N₂-Strom abgeblasen oder im Rotationsverdampfer (Siedestein vorher entfernt) abgedampft. Man löst die Fettsäuremethylester in Aceton, Chloroform oder Hexan (Minimum: 200 µg Fettsäuremethylester in 50 µl) und injiziert 5 µl in den Gaschromatographen. Das bei der Neutralisation entstandene NaCl haftet nach Abdampfen des Lösungsmittels und Lösung der Fettsäuremethylester mit Chloroform an der Glaswand. Wenige mit der Nadel angesogene und mitinjizierte NaCl-Kristalle stören die gaschromatographische Analyse nicht.

B. Umesterung von Triglyceriden und Glycerinphosphatiden auf der Kieselgel-H-Platte

Die Umesterung auf der Kieselgel-H-Platte ist für drei verschiedene Arbeitswege anwendbar:

(1) Umesterung von an der Startlinie aufgetragenen Substanzen und Entwicklung des Chromatogramms nach der Umesterung (Fig. 1).

(2) Umesterung nach Entwicklung des Chromatogramms und Elution der Methylester aus der Reaktionszone.

(3) Serien-Umesterungen auf der Kieselgel-H-Platte.

Diese Mikrotechnik erfordert sauberste Dünnschichtplatten. Deshalb lässt man die Platten in Chloroform-Methanol (2:1, v/v) bis zum oberen Plattenrand vorlaufen. Nach Reaktivierung bei 110° werden die Platten staubfrei und trocken aufbewahrt.

Substanzmengen von ca. 20-400 µg werden in Lösung auf die 0.5 mm dick

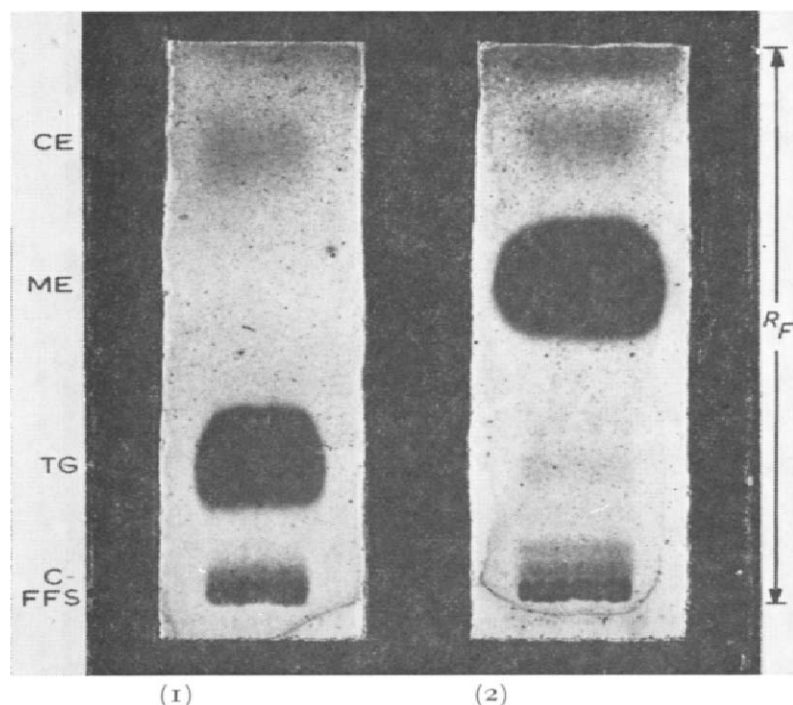


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm zur Methode B. (1) Erdnussöl (Triglyceride = TG) mit geringen Beimischungen von freien Fettsäuren (FFS), Cholesterin (C) und Cholesterinestern (CE). (2) An der Startzone durch Einsprühen mit 2 *N* Na-Methylat zu Fettsäuremethylestern (ME) umgeestertes Olivenöl (ca. 300 μg). Man erkennt, dass CE nicht umgeestert wurden. Lösungsmittelsystem: Petroläther-Diäthyläther (9:1, v/v). Darstellung durch Besprühen mit 50 % wässriger Schwefelsäure und Erhitzen auf 180°.

beschichtete Platte appliziert (optimale Flächengröße für 200 μg : 5 × 20 mm) und durch Einsprühen unter dem Abzug mit 2 *N* Na-Methylat innerhalb von 2 bis 5 Min. umgeestert. Unter dem Abzug ist das Chromatogramm in fünf Minuten weitgehend abgetrocknet. Gewichtsmessungen der Kieselgelplatte vor und nach der Besprühung haben ergeben, dass etwa 10 mg 2 *N* Na-Methylat pro cm^2 benötigt werden und nach fünf Minuten über die Hälfte des Methanols abgedampft ist. Ohne weitere Trocknung des Chromatogramms wird jetzt die Kieselgelschicht mit einem Schichtabsaug- und Elutionsgerät⁷ abgenommen. Die Methylester werden mit dreimal 2 ml über KOH destilliertem Äther (im Kühlschrank aufbewahrt) in ein Spezialgefäß (Fig. 2) eluiert. Anschließend wird das Lösungsmittel unter Stickstoff abgeblasen. Die Fettsäuremethylester müssen nun auf die folgende Weise in die Spitze des Gefäßes gebracht werden: Nach Zugabe von 3 Tropfen Äther wird das Gefäß fest verschlossen und der Äther im Warmwasserbad verdampft. Unmittelbar danach hält man das gesamte Gefäß in kaltes Wasser, wobei der an den Wänden kondensierende Äther die Methylester in die Spitze des Gefäßes spült.

Nach Entfernung des Stopfens und Verdampfung des Äthers löst man die Fettsäuremethylester zur gaschromatographischen Analyse in einer definierten Menge Hexan oder Aceton (10 μl /20–40 μg).

Für Serienbestimmungen ist es möglich, auf einer 10 × 20 cm grossen Platte mindestens 10 Umesterungen durchzuführen, deren Aufarbeitung bei rationeller Verdampfungstechnik eine Stunde bis zur injektionsfertigen Probe beansprucht.

Lokalisation der Lipoide. Nach Auftrennung im Dünnschichtchromatogramm

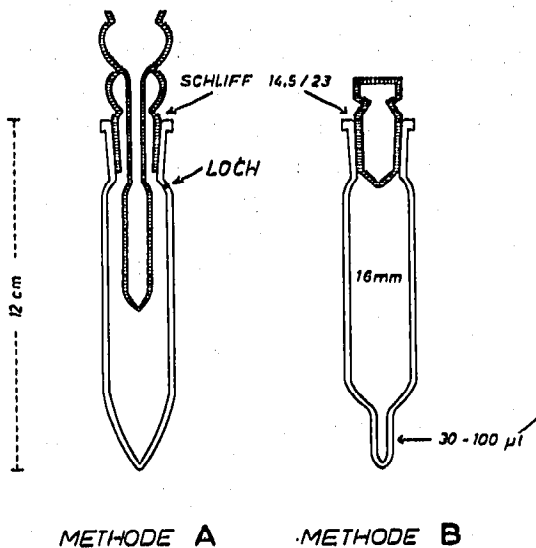


Fig. 2. Reaktionsgefäße der Umesterungsmethoden A und B. (Herstellung: E. Zimmermann, Glastechnische Werkstätten, 5000 Köln-Lindenthal, Joseph Stelzmann Strasse 52.) In der Spitze des Gefäßes für Methode B werden kleinste Mengen von Fettsäuremethylestern ohne wesentliche Verluste gesammelt und in die Mikroliterspritze für den Gaschromatographen aufgenommen.

werden die einzelnen Lipide mit 0.1 % 2',7'-Dichlorfluoreszein in Äthanol lokalisiert. 2',7'-Dichlorfluoreszein ist ein Indikator, der weder die ungesättigten Fettsäuren angreift noch bei der verwendeten Technik die gaschromatographische Analyse stört, obwohl er ebenfalls mit Äther aus dem Kieselgel eluiert wird.

Eine andere Möglichkeit der Sichtbarmachung besteht darin, dünne Glasplatten (< 2 mm) zu verwenden und auf deren Rückseite vor dem Beschichten mit einem Diamantstift oder Glasschneider vier cm vom Plattenrand entfernt eine Linie über die ganze Höhe der Platte einzuritzen. Auf dem vier cm breiten Randstreifen wird die Mischung der Referenzsubstanzen aufgetragen. Nach Entwicklung des Chromatogramms bricht man den Streifen ab. Die Substanzen dieses "Indikatorchromatogramms" werden mit Schwefelsäure sichtbar gemacht (s.u.), und im Vergleich dazu werden die Zonen des für die gaschromatographische Analyse bestimmten Chromatogramms markiert.

Gaschromatographischer Leerwert. Es erwies sich für die quantitative Auswertung kleinster Mengen (um 20 µg) unumgänglich, den gaschromatographischen Leerwert aus 9 cm² Kieselgelfläche bei gleicher Aufarbeitung zu überprüfen. Unter den angegebenen Bedingungen (hochgereinigte Platten und Lösungsmittel) waren im gaschromatographischen Leerwert Verunreinigungen nicht nachweisbar.

C. Abtrennung von Cholesterin, Alkohol und Cerebrosiden

Nach der Umesterung von Cholesterinestern, Wachsen und Estercerebrosiden lösen sich sowohl Fettsäuremethylester als auch Cholesterin, langkettiger Alkohol und Cerebrosid in Chloroform, Cholesterin und langkettiger Alkohol auch in Petroläther. Wie unsere Untersuchungen zeigten³, wird die quantitative gaschromatographische Analyse von Fettsäuremethylestern bei einem Cholesterinzusatz von 1:1 (w/w) nicht beeinträchtigt, vorausgesetzt, dass die Gaschromatographie für Steroide und Methylester nicht mit denselben Säulen durchgeführt wird.

Fettsäuremethylester und langkettiger Alkohol zeigen ähnliche Retentionszeiten bei der gaschromatographischen Analyse. Deshalb ist nach der Umesterung von Wachsen eine Abtrennung der Methylester von den freigesetzten Alkoholen vor der Gaschromatographie erforderlich. Die Methylester können an kurzen Kieselgel-Säulen oder durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-H-Platten im Lösungsmittelsystem Petroläther-Diäthyläther (85:15, v/v) (Fig. 3) abgetrennt werden. Alkohole und Cerebroside² können ebenfalls quantitativ zurückerhalten werden. Alkohole werden direkt gaschromatographisch analysiert, Cerebroside müssen durch Kochen mit Methanol-HCl umgeestert werden.

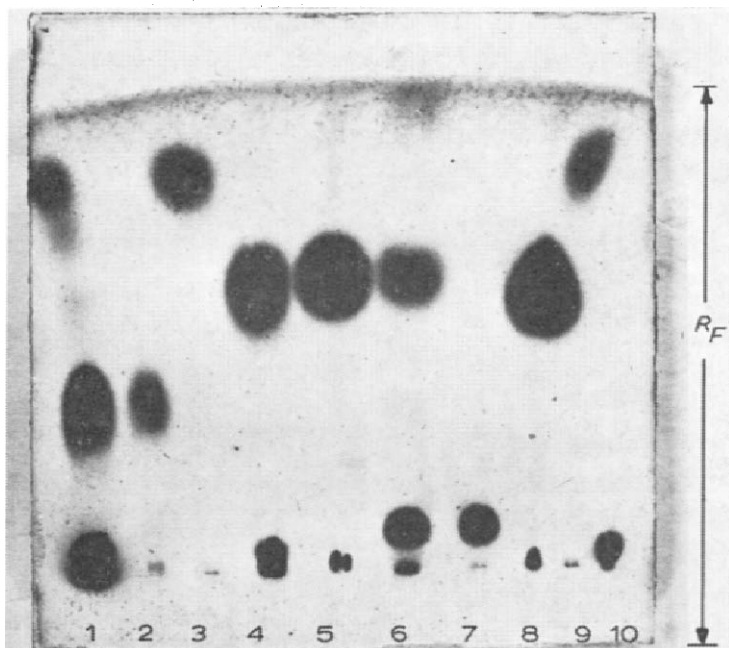


Fig. 3. Dünnschichtchromatogramm der mit 0,5 N Na-Methylat zu Methylestern (ME) umgeesterten Lipide (Methode A). 1 = Leberlipide (am Start Glycerinphosphatide und Cholesterin, darüber Triglyceride und Cholesterinester); 2 = Triglyceride (Erdnussöl); 3 = Wachs; 4 = ME aus Leberlipiden (über dem Startpunkt Cholesterin); 5 = ME aus Triglyceriden (am Startpunkt freie Fettsäuren); 6 = ME und Alkohol aus Wachs; 7 = Test 1-Octadecanol; 8 = Test Stearinsäure-ME; 9 = Cholesterinester; 10 = Cholesterin. Lösungsmittelsystem: Petroläther-Diäthyläther (85:15, v/v). Darstellung durch Besprühen mit 50 proz. wässriger Schwefelsäure und Erhitzen der Platte auf 180°.

Dünnschichtchromatographie

Die einzelnen Lipoidklassen wurden dünnschichtchromatographisch in verschiedenen Lösungsmitteln auf Kieselgel-H-Platten mit Testsubstanzen untersucht. Die Kontrolle auf Vollständigkeit der Reaktion, Bildung freier Säuren und Seifen erfolgte ebenfalls dünnschichtchromatographisch:

(1) Petroläther (Kp. 40-60°)-Diäthyläther (85:15, v/v) für Cholesterinester, Triglyceride, Methylester, Alkohole und Seifen (Fig. 3).

(2) Petroläther-Diäthyläther-Eisessig (70:28:2, v/v) zum Nachweis von freien Säuren.

(3) 1,2-Dichloräthan-Petroläther-Diäthyläther (60:35:5, v/v) für die Trennung von Dimethylacetalen und Methylestern.

(4) Hexan-Diäthyläther (96:4, v/v) für die Trennung von Cholesterinestern und Wachsen.

(5) Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4, v/v) zum Nachweis von Glycerinphosphatiden, Cerebrosiden, Sulfatiden und Sphingomyelin.

(6) Chloroform-Methanol-Wasser (70:19:5, v/v) untere Phase zur Trennung von Ceramiden, Estercerebrosiden und Cerebrosiden.

(7) Eindimensionales Zweistufensystem zur vollständigen Trennung der Lipoidklassen (Cholesterinester, Triglyceride, Diglyceride, Cholesterin, Fettsäuren, Monoglyceride, Glycerinphosphatide)⁸:

(a) Diäthyläther-Benzol-Äthanol-Eisessig (40:50:2:0.2, v/v). Laufstrecke bis etwa zwei Drittel der Plattenhöhe. Lösungsmittel sorgfältig abdampfen.

(b) Diäthyläther-Hexan (6:94, v/v). Entwicklung bis zum Plattenrand.

(8) Zweidimensionales System zur Trennung von Phosphatiden*:

(a) Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser (50:25:7:3, v/v).

(b) Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser (25:50:7:3, v/v).

Als Sprühreagenz wurde 50 % wässrige Schwefelsäure verwendet. Organische, nicht flüchtige Substanzen stellten sich durch anschliessendes Erhitzen der Platte auf 180° als schwarze Flecke dar (Fig. 1, 3 und 5). Die Empfindlichkeit der Sichtbarmachung wurde mit einer Mischung Cholesterinpalmitat-Stearinsäuremethylester (1:100, w/w) geprüft. Bei 50 µg aufgetragener Mischung konnten noch 0.5 µg Cholesterinester erkannt werden. Diese Empfindlichkeit ist die Grundlage der in Tabelle I angegebenen Werte.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Umesterung mit Na-Methylat wurde an Triglyceriden, Glycerinphosphatiden, Cholesterinestern, Wachsen und Estercerebrosiden durchgeführt, die langkettige Fettsäuren von C₁₄ bis C₂₂ enthielten. Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse einer mit den Methoden A und B zu Fettsäuremethylestern umgeesterten Triglyceridprobe mit den für die Verfahren geeigneten Mengen zeigen Fig. 4 und Tabelle II. Vergleichsuntersuchungen⁹ mit der säure-katalysierten Umesterungstechnik ergaben, dass die Daten beider Methoden innerhalb der von HORNING und

TABELLE II

VERGLEICH DER ALKALI-KATALYSIERTEN UMESTERUNGSMETHODEN IN FLÄCHENPROZENTEN DES GASCHROMATOGRAMMS

Umesterungsmethoden	Fettsäuremethylester aus Olivenöl				
	C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}
DOSS UND OETTE ⁹	15.04	1.05	1.68	70.05	11.78
A	15.20	1.08	1.63	70.54	11.55
B	14.60	1.04	1.58	70.88	11.90

Mitarbeitern⁹ angegebenen Fehlergrenzen liegen. Bei der alkali-katalysierten Umesterung werden ausschliesslich esterartig verknüpfte Fettsäuren erfasst (Fig. 5). In unseren Versuchen an Estercerebrosiden² und Cerebrosiden, Ceramiden und Sphingomyelin sowie an Acetalen zeigte sich, dass sowohl die Säureamidgruppe als auch die Acetalbindung intakt bleiben³. Estercerebroside werden mit Na-Methylat in Methyl-

* Das System wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. E. WAMSIEDLER entwickelt.

ester und Cerebrosid überführt (Fig. 5). Sulfatide lassen sich mit Na-Methylat nicht spalten und freie Fettsäuren nicht verestern. Im Gegensatz dazu werden bei der säure-katalysierten Überführung in Methylester amidartig gebundene Säuren (5 Std. kochen) und freie Fettsäuren (2 Std. kochen) verestert und die Acetale in Dimethylacetale umgesetzt.

Das Na-Methylat wurde mit nicht nachgetrocknetem Methanol p.a. hergestellt. Ein Einfluss kleiner Mengen Wassers auf die Umesterung mit Na-Methylat wurde nicht näher untersucht, da die Umsetzung auch in einer methanolischen NaOH abläuft^{1, 2, 10}. Da die Alkalikonzentration für die Umesterungsgeschwindigkeit eine Rolle spielt und die Löslichkeit des Na-Methylats in Methanol höher ist als die von NaOH, wurde die Methodik mit Na-Methylat entwickelt.

Bei der Methode A ist die vollständige Lösung des eingesetzten Lipoids mit

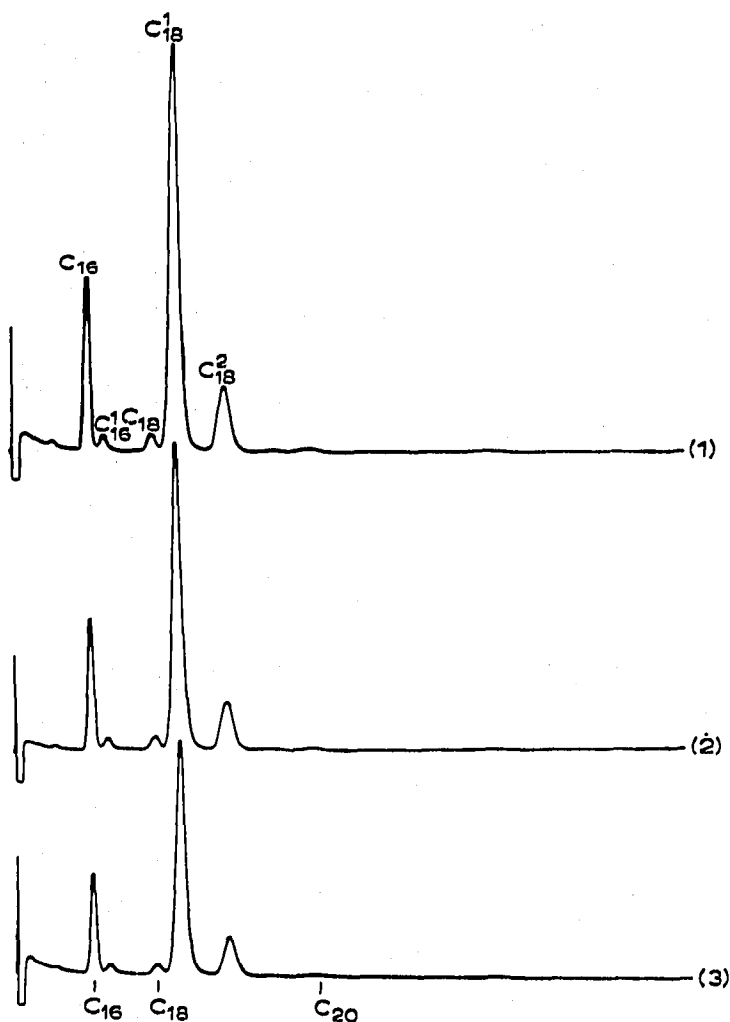


Fig. 4. Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus Olivenöl. (1) Umesterung³ (5 mg) mit 0.5 *N* Na-Methylat und Extraktion mit Petroläther-Diäthyläther (9:1, v/v). (2) Umesterung von 500 μ g mit Methode A. (3) Umesterung von 50 μ g mit 2 *N* Na-Methylat auf Kieselsäure nach Methode B. Gaschromatograph der Fa. Packard Model 802; Säulenfüllung Äthylenglykolsuccinat (EGS) 2.5 % auf Chromosorb G 80-100 mesh; Trägergas Argon, Durchfluss 60 ml/min.; Temperatur der Säule 150°, des Detektors 200°; Detektorspannung 500 V, Empfindlichkeit 3×10^{-8} . Abkürzungsbeispiel: C₁₈¹; die untere Zahl entspricht der Anzahl der C-Atome, die hochgesetzte Zahl der Anzahl der Doppelbindungen.

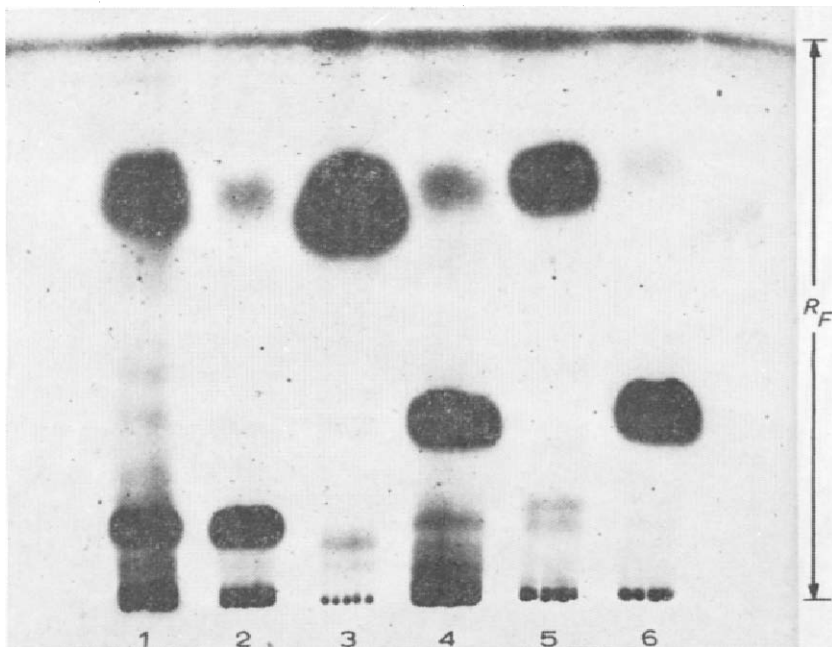


Fig. 5. Dünnschichtchromatogramm der mit alkali- und säurekatalysierten Umesterung entstehenden Fettsäuremethylester (ME) aus Estercerebrosiden und Cerebrosiden. 1 = ME aus Estercerebrosid mit Methanol-HCl; 2 = Test Cerebronsäuremethylester; 3 = ME aus Estercerebrosid mit Na-Methylat; 4 = Acetylierte ME des Cerebrosids, das aus dem Estercerebrosid abgespalten wurde; 5 = Test Lignocerinsäuremethylester; 6 = Test Cerebronsäuremethylester acetyliert. Lösungsmittelsystem Petroläther-Diäthyläther (9:1, v/v). Darstellung durch Besprühen mit 50 % wässriger H_2SO_4 und Erhitzen auf 180° .

0.1 ml Benzol in der Spitze des Reaktionsgefäßes (Fig. 2) vor Zugabe des Na-Methylats die Voraussetzung zur quantitativen Umesterung. Studien³ mit verschiedenen Alkoholatkonzentrationen zeigten, dass die Cholesterinester in Bezug auf die umzusetzende Substanzmenge die kritische Lipoidklasse sind, während Triglyceride und Glycerinphosphatide noch in einer vielfachen Menge der angegebenen Versuchsbedingungen quantitativ umgeestert werden. Triglyceride und Glycerinphosphatide liessen sich ebenfalls mit 0.25 N Na-Methylat schon bei Raumtemperatur umestern. Eine quantitative Umsetzung von Cholesterinestern, insbesondere solcher mit gesättigten Fettsäuren wie Cholesterinpalmitat und -stearat, gelingt nur durch Erhitzen. Es ist aber möglich, kleine Mengen von Cholesterinestern verschiedener Fettsäurezusammensetzung, wie sie im Serum- oder Leberlipoidgemisch vorliegen, schon bei Raumtemperatur nahezu quantitativ umzuestern (Tabelle I). Bei Anwesenheit von Triglyceriden ist die Löslichkeit von Cholesterinestern, vor allem von Cholesterinestergemischen mit Anteilen ungesättigter Fettsäuren wesentlich günstiger, da sich die verschiedenen Lipide, wenn sie in komplexen Lipoidgemischen vorliegen, in ihrer Löslichkeit gegenseitig beeinflussen. Offensichtlich ist die Reaktionsgeschwindigkeit weitgehend von der Löslichkeit des Lipoids abhängig. So kommt es nach Zugabe des Na-Methylats zum in Benzol gelösten reinen Cholesterinester bei Raumtemperatur zu einer teilweisen Ausfällung des Lipoids. Durch Erhitzen gehen Cholesterinester wieder vollständig in Lösung und können nunmehr umgeestert werden. Glycerinphosphatide und Estercerebroside lösen sich, wenn sie in Substanz eingesetzt werden, erst nach geringer Erwärmung in Benzol.

Die Vollständigkeit der Umesterung auf der Kieselgel-H-Platte ist einerseits

von der Schichtdicke der Kieselsäure, der Konzentration des Na-Methylats und der Durchtränkung des Kieselgels, andererseits von der Lipoidkonzentration pro Fläche abhängig. Das Chromatogramm muss gleichmässig nass mit Methylat eingesprüht werden, wobei die Kieselgelschicht intakt bleiben soll und eine Wanderung der Lipoidzone nicht eintreten darf. Auf 0.2 mm dick beschichteten Platten kann auch mit 1 N Na-Methylat eine Umesterung in einer Minute erzielt werden. Für eine quantitative Umsetzung unter den Standardbedingungen hat sich 2 N Na-Methylat als optimale Konzentration erwiesen. Die kleinste Substanzmenge, die mit der Methode B noch gaschromatographisch analysiert werden konnte, lag bei 10 μg Triglycerid. Cholesterinester konnten auf dem Dünnschichtchromatogramm mit 2 N Na-Methylat auch nach kurzem Erhitzen auf 70° nicht umgeestert werden.

Als Indikator für die Lipoidzonen des gelaufenen Chromatogramms bewährte sich 2',7'-Dichlorfluoreszein genauso wie das angegebene "Indikatorchromatogramm". MALINS¹¹ findet bei Exposition des Chromatogramms für 15 Sek. in Jod-Atmosphäre keinen signifikant grösseren Verlust an hochungesättigten Fettsäuren als bei Verwendung von 2,7-Dichlorfluoreszein. Es wurde nicht untersucht, ob dieses Verfahren für den Submikrobereich anwendbar ist. Die Bildung von Seifen während der alkalkatalysierten Umesterung ist von der Alkoholatkonzentration und Reaktionstemperatur abhängig. Bei Raumtemperatur entstehen praktisch keine Seifen (< 1%). In der Hitze treten jedoch mit 0.5 N Na-Methylat 1 bis 3 % Seifen auf. Bei der Methode B konnten Seifen dünnschichtchromatographisch nicht nachgewiesen werden.

Die Überprüfung des gaschromatographischen Leerwertes ist für die Analysen im Submikrobereich unerlässlich und sollte von jeder neuen Kieselgel- und Lösungsmittelcharge mindestens einmal durchgeführt werden. Bei der Methode B wird hierzu eine 9 cm² grosse Kieselgel-H-Fläche ohne Substanz gleichermassen getestet. Ausserdem bleibt das Gaschromatogramm nur dann von Verunreinigungen frei, wenn die Kieselgel-H-Platten systematisch in Chloroform-Methanol (2:1, v/v) vorgelaufen und die Trägerplatten absolut fettfrei sind. Die Reinigung des Sammelgefässes mit ausgezogener Spitze kann Schwierigkeiten bereiten, gelingt aber stets durch vorsichtiges Ausglühen in der Flamme. Na-Methylat und Diäthyläther bewahrten wir im Kühlschrank auf. Na-Methylat wurde nicht länger als einen Monat verwendet. Mit diesen Massnahmen ist eine leerwertfreie gaschromatographische Analyse zu erzielen.

DANK

Die Autoren danken Fräulein HANNELORE BARTELT und Fräulein RENATE OELLINGRATH für ihre zuverlässige technische Assistenz.

ZUSAMMENFASSUNG

(1) Für die gaschromatographische Analyse wird eine quantitative Submikromethode beschrieben, die eine schnelle Darstellung von Fettsäuremethylestern aus Gewebslipoiden durch Umesterung mit Natriummethylat gewährleistet. Wie an den Ester cerebrosiden, einer Klasse von Glykolipoiden, gezeigt wird, spaltet Natriummethylat nur die Ester-, aber nicht die Säureamidbindung.

(2) Ein Standardverfahren (Methode A) ermöglicht die Umesterung sämtlicher Lipide, die estergebundene Fettsäuren enthalten (Glyceride, Glycerinphosphatide,

Cholesterinester, Wachse und Estercerebroside). Die Methode wird besonders zur Umesterung von Cholesterinestern empfohlen. Nach Lösung des Lipoids in Benzol werden die Fettsäuremethylester mit 0.5 N Natriummethylat innerhalb von ein bis zwei Minuten hergestellt.

(3) Auf der Kieselgel-H-Platte werden Glyceride und Glycerinphosphatide durch Besprühen mit 2 N Natriummethylat innerhalb von fünf Minuten umgeestert (Methode B). Diese Methode wird in Verbindung mit der dünnenschichtchromatographischen Trennung von Lipoiden und zur serienmässigen Darstellung von Fettsäuremethylestern angewendet. Nach der Umesterung erfolgt die Elution der Methylester in ein Spezialgefäss, das die quantitative gaschromatographische Analyse kleinster Mengen gestattet.

(4) Fettsäuremethylester und langkettiger Alkohol werden nach der Umesterung von Wachsen durch präparative Dünnschichtchromatographie getrennt, da beide Substanzen bei der gaschromatographischen Analyse ähnliche Retentionszeiten aufweisen.

SUMMARY

(1) Submicro quantities of methyl esters for gas-liquid chromatography (GLC) can be prepared quantitatively and rapidly by alkali-catalyzed transesterification with sodium methylate. Under the conditions described, sodium methylate splits only the ester and not the acid-amide linkage. This was demonstrated on ester cerebroside, a group of glycolipids.

(2) A general method (Method A) is described for all lipids with ester bound fatty acids (glycerides, glycerophosphatides, cholesterol esters, waxes and ester cerebroside). This method is recommended especially for the transesterification of cholesterol esters. The lipids are dissolved in a small quantity of benzene. After the addition of 0.5 N sodium methylate the mixture is heated to boiling point. Within two minutes the transesterification is complete. Glycerides and glycerophosphatides react already at room temperature within the same time. The reaction mixture is neutralized, the solvent evaporated, and the methyl esters in the residue are extracted for GLC analysis.

(3) With the second method (Method B) glycerides and glycerophosphatides can be directly transesterified within 5 min after their application on silicic acid plates by spraying with 2 N sodium methylate. The method is very convenient for the GLC analysis of lipids separated by thin-layer chromatography. After transesterification, the methyl esters are eluted with ether into a special tube, which is suitable for the collection of very small quantities. The silicic acid plate can also be used for the parallel preparation of many samples.

(4) Because of the interference of fatty acid methyl esters and long-chain alcohols in GLC analysis, the alcohols were separated from the methyl esters by preparative thin-layer chromatography after the transesterification of waxes.

LITERATUR

- 1 E. KLENK UND F. RENNKAMP, *Z. Physiol. Chem.*, 267 (1940) 145.
- 2 E. KLENK UND M. DOSS, *Z. Physiol. Chem.*, 346 (1966) 296.
- 3 M. DOSS UND K. OETTE, *Z. Klin. Chem.*, 3 (1965) 125.

- 4 F. E. LUDDY, R. A. BARFORD UND R. W. RIEMENSCHNEIDER, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 37 (1960) 447.
- 5 G. V. MARINETTI, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 786.
- 6 V. L. DAVISON UND H. J. DUTTON, *J. Lipid Res.*, 8 (1967) 147.
- 7 B. GOLDRICK UND J. HIRSCH, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 482.
- 8 C. P. FREEMAN UND D. WEST, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 324.
- 9 E. C. HORNING, E. H. AHRENS, Jr., S. R. LIPSKY, F. H. MATTSON, J. F. MEAD, D. A. TURNER UND W. H. GOLDWATER, *J. Lipid Res.*, 5 (1964) 20.
- 10 D. F. KUEMMEL, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 35 (1958) 41.
- 11 D. C. MALINS, in R. T. HOLMAN (Herausgeber), *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, Vol. 8, Pergamon, Oxford, 1966, S. 338.

J. Chromatog., 32 (1968) 439-450