

CHROM. 4224

## Quantitative gaschromatographische Bestimmung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren als Trimethylsilylester

Längerkettige Fettsäuren werden in der Regel als Methylester gaschromatographisch bestimmt, obwohl in einigen Fällen der Einsatz von unveresterten Säuren auf speziellen Phasen beschrieben wird. Hinweise auf die Gaschromatographie von Trimethylsilylestern finden sich in der Literatur nur sporadisch<sup>1-4</sup>, eine quantitative Analyse gesättigter und ungesättigter Fettsäuren gleicher Kohlenstoffzahl überhaupt nicht.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über das Verhalten von Stoffwechselmetaboliten bemühten wir uns um Methoden, die die gleichzeitige Erfassung von Fettsäuren, Hydroxy- und Ketocarbonsäuren sowie deren Nachweis neben Lipiden ohne langwierige Ausschüttelprozedur ermöglichen sollten. Die Aufgabe der nicht derivatisierten Säuren im Gemisch mit Lipiden ergab auf mit Phosphorsäuren modifiziertem Trägermaterial kein befriedigendes Ergebnis. Eine sauer oder basisch katalysierte Veresterung scheidet aus, da aus den vorhandenen Lipiden ebenfalls Methylester freigesetzt werden. Mit Diazomethan erhielten wir auch nach Vorbehandlung der Reaktionsgefäße stets Polymethinbildung, die hauptsächlich die quantitative Auswertung der Fettsäuren mittlerer Kettenlänge störte. Der negative Ausgang dieser Versuche veranlasste uns, die gaschromatographischen Eigenschaften der Trimethylsilylester zu prüfen.

Zur Darstellung der Trimethylsilylester verwendeten wir N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA)<sup>5</sup> (Macherey-Nagel, Düren), ein starkes Silylierungsmittel, das Carboxylfunktionen quantitativ silyliert und im Gemisch mit Trimethylchlorosilan (TMSCl) (90:10, V/V) auch die Alkalisalze der Carbonsäuren in Trimethylsilylester umwandelt. Die ersten, orientierenden Versuche zeigten, dass auf apolaren Phasen, wie z.B. Apiezon L und SE-30 erwartungsgemäss die homologen Säuren gut getrennte, symmetrische Peaks ergeben, eine Trennung von gesättigten und ungesättigten Säuren der gleichen Kettenlänge jedoch nicht möglich ist.

Polare Phase vom Typ der Polyester erwiesen sich erst nach Aufgabe von viel Silylierungsmittel (z.B. 500  $\mu$ l eines Gemisches von MSTFA und TMSCl (95:5, V/V) in Portionen von jeweils 50  $\mu$ l als geeignet (Fig. 1).

Unsere eigenen schlechten Erfahrungen mit diesen Trennphasen — ähnliche Beobachtungen werden auch von anderen Autoren berichtet<sup>3,4</sup> — beruhten offensichtlich auf einer nicht ausreichenden Vorbehandlung der Säule mit Silylierungsmittel. Von den zur Verfügung stehenden Polyestern wählten wir nach den Ergebnissen der Vorversuche, über die später berichtet werden soll, Diäthylenglykolsuccinat (DEGS) aus.

Das Silylierungsmittel überführt die endständigen Hydroxylgruppen des Polyesters in Trimethylsilyläther. Hierdurch wird eine Entsilylierung der Carbonsäuren verhindert, gleichzeitig aber auch die Polarität der flüssigen Phase vermindert, wie ein Vergleich der Retentionszeiten von Fettsäuremethylestern auf unbehandeltem und silyliertem DEGS zeigt. Ohne Veränderung der anderen Parameter steigen die Retentionszeiten nach Silylierung des Polyesters um durchschnittlich 72 % (Tabelle I) an. Die Selektivität wird jedoch nur wenig beeinflusst: Die Auflösung des kritischen Paares Ölsäure-, Stearinsäure-methylester vermindert sich nur um 7 % (Tabelle I).



Fig. 1. Trennung der Fettsäuren aus Leinöl als Trimethylsilylester, 2  $\mu$ l einer 3% Lösung in MSTFA. Gaschromatograph, Model 402 der Firma Hewlett-Packard; Ofen, 180°; Einspritzblock, 270°; FID, 280°; Trägergas, 45 ml/min; Glassäule, 3,5 m  $\times$  3 mm I.D., 10% DEGS auf Diatoport S, 60–80 mesh (Hewlett-Packard); Potentiometer,  $10^2 \times 32$ . Zuordnung: 1 = Palmitinsäure (16:0), 2 = Stearinsäure (18:0), 3 = Ölsäure (18:1), 4 = Linolsäure (18:2), 5 = Linolensäure (18:3). Auflösung:  $R_{s18:0/18:1} = 1.13$ .

TABELLE I

	Retentionszeiten (min) <sup>a</sup>			Gehalt an C <sub>18</sub> -Fettsäuren in Leinöl <sup>b</sup> (%)	
	Methylester, n.sil. <sup>c</sup>	Methylester, sil. <sup>c</sup>	TMS-Ester, sil. <sup>c</sup>	Methylester <sup>d</sup> , sil. <sup>c</sup>	TMS-Ester, sil. <sup>c</sup>
18:0	7.26	13.24	10.42	6.1 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.5
18:1	8.66	15.10	11.82	22.1 $\pm$ 0.5	23.0 $\pm$ 0.7
18:2	11.19	18.89	14.63	16.6 $\pm$ 1.0	16.6 $\pm$ 0.3
18:3	15.28	25.06	19.55	55.5 $\pm$ 0.9	54.7 $\pm$ 0.3
$n_{18:3}^e$	2090	1985	1730	$s = \pm 0.585$	$s = \pm 0.581^f$
$R_{s18:0/18:1}^h$	1.42	1.33	1.04		

<sup>a</sup> Glassäule 1,8 mm  $\times$  3 mm I.D., 10% DEGS auf Diatoport S, 60–80 mesh (Hewlett-Packard); die weiteren Parameter siehe Fig. 1.

<sup>b</sup> Die Summe der C<sub>18</sub>-Fettsäuren wurde = 100% gesetzt.

<sup>c</sup> n.sil. = nicht silylierte, sil. = silylierte DEGS Säule.

<sup>d</sup> Dargestellt nach Lit. 6.

<sup>e</sup>  $n = 5.54(t_s/b_{0.5})^2$ .

<sup>f</sup> Die Näherungsstandardabweichungen des Verfahrens wurden mit Hilfe der Beziehung  $s = \pm \sqrt{(\sum x_{ij} - \bar{x}_j)/(N - M)}$  (Lit. 7), der Vertrauensbereich nach Lit. 8 bestimmt.

$$^h R_s = \frac{t_{R'} - t_{R''}}{b_{0.5'} + b_{0.5''}}$$

Die endständigen Hydroxylgruppen leisten somit nur einen geringen Beitrag zur Auftrennung.

Die Trimethylsilylester werden erheblich schneller eluiert als die Methylester. Die Trennfähigkeit der Säule ist bei diesen Verbindungen etwas geringer, gleichfalls der Trennfaktor (s. Tabelle I). Dies gilt auch noch, wenn durch Temperaturerniedrigung die Retentionsvolumina der Trimethylsilylester den der Methylester angeglichen werden.

In den letzten Spalten von Tabelle I ist ein Vergleich der quantitativen Bestimmungen von Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure, aus Leinöl gewonnen, nach Methylierung und nach Silylierung zusammengestellt. Hieraus geht hervor, dass die gaschromatographische Bestimmung als Trimethylsilylester, was Reproduzierbarkeit und Richtigkeit angeht, durchaus mit den bisher beschriebenen Verfahren konkurrieren kann.

Diese Arbeit wurde unterstützt vom Kuratorium für die sportmedizinische Forschung.

*Institut für Biochemie der Universität Köln,  
An der Bottmühle 2, 5 Köln (B.R.D.)*

M. DONIKE

*Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin  
an der Deutschen Sporthochschule Köln,  
Carl-Diem-Weg, 5 Köln-Müngersdorf (B.R.D.)*

W. HOLLMANN  
D. STRATMANN

- 1 C. E. DALGLIESH, E. C. HORNING, M. G. HORNING, K. L. KNOX UND K. YARGER, *Biochem. J.*, 101 (1966) 792.
- 2 L. BIRKOFER UND M. DONIKE, *J. Chromatog.*, 26 (1967) 270.
- 3 G. E. MARTIN UND J. S. SWINEHART, *J. Gas Chromatog.*, 6 (1968) 533.
- 4 D. F. ZINKEL, M. B. LATHROP UND L. C. ZANK, *J. Gas Chromatog.*, 6 (1968) 158.
- 5 M. DONIKE, *J. Chromatog.*, 42 (1969) 103.
- 6 H. SCHLENK UND J. L. GELLERMANN, *Anal. Chem.*, 32 (1960) 540.
- 7 K. DOERFFEL, *Z. Anal. Chem.*, 185 (1962) 1.
- 8 R. B. DEAN UND W. J. NIXON, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 636.

Eingegangen am 18. Juni 1969

*J. Chromatog.*, 43 (1969) 490-492

CHROM. 4226

### **Gas chromatographic separation and determination of saturated and unsaturated fatty aldehydes**

Long-chain fatty aldehydes occur in living tissues in both free and combined forms<sup>1,2</sup>. They are frequently analyzed by gas-liquid chromatography (GLC) after being converted to dimethyl acetals<sup>3-5</sup>.

Recently it has been shown that the dimethyl acetals are decomposed to the corresponding alk-1-enyl methyl ethers during GLC, the decomposition being brought about by aluminum metal and aluminum containing solid supports<sup>6,7</sup>. The alk-1-enyl methyl ethers are further resolved into their *cis* and *trans* isomers during GLC<sup>8</sup>. Other

*J. Chromatog.*, 43 (1969) 492-496