

CHROM. 15,471

SELEKTIVE GASCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER FREIEN FETTSÄUREN AUS LIPIDGEMISCHEN

I. CIUCANU und F. KEREK*

Central de Chimie Timișoara Blv. Mihai Viteazul 24, R-1900 Timișoara (Rumänien)
(Eingegangen am 11. September 1982)

SUMMARY

Method for the selective gas chromatographic determination of the free fatty acids from lipid mixtures

The use of strong anion-exchange resins as heterogenous basic catalysts allows the selective methylation of free fatty acids from different lipid mixtures. The complete methylation of the free acids is achieved in a few minutes without any transesterification of the glycerides and other lipid components.

EINLEITUNG

Die gaschromatographische Bestimmung von freien Fettsäuren (FF) verläuft üblicherweise durch ihre Methylierung¹⁻⁵ oder andersartige Derivatisierung⁶. Bei der Anwendung dieser Methode direkt für verschiedene Lipidgemische sind die Analyseergebnisse wegen verschiedenen Transesterifikationsreaktionen sehr wenig oder überhaupt nicht reproduzierbar. Bei einigen Methoden (z.B. mit Methyljodid im Beisein von starken organischen Basen, wie Trimethylphenylammoniumhydroxid) findet sogar eine praktisch totale Transesterifikation der Glyceride statt.

Zuerst haben wir die in der Literatur beschriebenen wichtigsten Methylierungsverfahren an verschiedenen Lipidgemischen, mit genau bekannter Zusammensetzung getestet. Es wurde in jedem Fall versucht die Reaktionsbedingungen so zu optimieren, um eine vollständige Methylierung der FF nebst einer möglichst geringen Umwandlung der anderen Komponenten zu erreichen. Trotz grosser Variationen der Reaktionsbedingungen konnte man mit diesen Verfahren die Transmethylierungsreaktionen nicht verhindern.

Wegen der Nachteile der üblichen Methylierungsverfahren haben wir versucht einen nur für die selektive Methylierung der FF aktiven Katalysator zu finden. Diese Bedingungen wurden von stark basischen Ionenaustauscherharzen am besten erfüllt.

Solche Harze wurden schon von Hornstein *et al.*¹ für eine selektive Zurückhaltung der FF aus Lipidgemischen benützt. Gemäss ihrer Arbeit wurden die FF aus ihrer Petrolether-Lösung mit Hilfe von Amberlite IRA-400 zurückgehalten, filtriert

und mit Petrolether fettfrei gewaschen. Die Methylierung wurde durch eine 80 minütelange Behandlung mit wasserfreiem Methanol-HCl durchgeführt, gefolgt von Wasserzugabe, Extraktion der Methylester mit Petrolether und GC-Analyse.

Der Nachteil dieser Methode liegt in nicht quantitativer Ausbeute der Zurückhaltungs- bzw. Waschprozesse und grosse Zeitdauer.

Die Grundidee unserer Arbeit war, den selektiven Harzbinder auch als basischen Katalysator des Methylierungsprozesses zu gebrauchen und somit eine wesentliche Vereinfachung des ganzen Verfahrens zu verwirklichen.

EXPERIMENTELLES

Der von uns benützte stark basische Ionenaustauscher Dowex 1.X2 (200–400 mesh) wurde zuerst mit 2 N NaOH behandelt (30 ml NaOH für 10 g Harz), dann mit Wasser bis zu neutral und anschliessend mit Methanol und Diethylether gewaschen. Analytisch reines Dimethylformamid (DMF) und Pyridin (Py) (Fluka) wurden ohne jeweilige Vorreinigung oder Anhydrierung benützt. Als weitere Reagenzien wurden Bortrifluorid, Dimethylformamiddimethylacetal (DMFDMA) und N,N'-Carbonyldiimidazol (CDI) (Merck), Methyliodid and 40%iges Trimethylphenylammoniumhydroxid (Riedel-de Häen) benützt.

Die Reinheit der von Merck und Supelco erhaltenen Fettsäuren, Mono-, Di-, Triglyceride und Lecithin Standarde wurden durch Dünnschichtchromatographie (Hexan-Diethylether, 8:2; Kieselgelplatten; besprüht mit Ammoniummolybdat) geprüft. Nur im Falle von Lecithin war eine Entfernung von Spuren freier Fettsäuren notwendig.

Die Reaktionstemperaturen wurden in geschlossenen 4 ml Glasgefässen mit Hilfe eines Pierce Reacti-therm Heizungsthermostaten kontrolliert.

Die gaschromatographischen Analysen wurden mit Hilfe eines Chromatron GCHF-18.3 Gerätes mit Flammenionisationsdetektor durchgeführt.

Es wurde eine mit 10% Silar 10C auf Gas-Chrom R 100–200 mesh gefüllte, 2.8 m × 3 mm I.D., silanierte Glassäule benützt. Temperaturgradient: 4°C/min von 140°C bis 240°C, Einspritzthermostat bei 250°C und Detektor bei 260°C. Trägergas: Helium mit 30 ml/min, elektronische Integration der Peakoberflächen mit Hilfe von Minigrator (Spectra-Physics). Der Umsetzungsgrad der anderen Lipidkomponenten wurde durch die Bestimmung der durch Transmethylierung entstandenen Methylester berechnet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zuerst wurden die in der Literatur bekannten Fettsäuremethylierungsverfahren (I–IV) an aus Standard-Komponenten synthetisch hergestellten Lipidgemischen reproduziert. Die gaschromatographischen Analysen der Endprodukte zeigten eindeutig wie weit Transmethylierungsreaktionen stattgefunden haben. Die für vollständige Methylierung der FF notwendige Zeit wurde als Reaktionsdauer bezeichnet.

Unter denselben Voraussetzungen wurde das von uns entwickelte Methylierungsverfahren V ausprobt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I dargestellt.

Method I. Die Methylierung der Lipidgemische wurde mit Methyliodid in polaren Lösungsmitteln wie DMF + 20% Methanol im Beisein von Trimethylphenyl-

TABELLE I

UMSETZUNGSGRAD DER LIPIDKOMPONENTEN IN METHYLESTER UNTER VERSCHIEDENEN REAKTIONSBEDINGUNGEN

Methode	Verfahren	Bedingungen		Umsetzungsgrad (%)					
		Temperatur (°C)	Reaktionsdauer (min)	FF	MG	DG	TG	PG	CE
I	CH ₃ I-Base	20	15	100	100	100	100	100	35
II	CH ₃ OH-BF ₃	20	50	100	30	23	15	55	11
III	CH ₃ OH-CDI+(CH ₃) ₃ N	20	10	100	15	4	—	20	—
IV	DMFDMA + Py	100	30	100	10	2	—	12	—
V	CH ₃ I-Py stark basische Ionenaustauscher	35	3	100	—	—	—	—	—

ammoniumhydroxid durchgeführt. Für die vollständige Methylierung der FF genügen 15 min bei 20°C⁷.

Method II. Als Methylierungsagent wurde Methanol mit Bortrifluorid benützt⁸. In Methylenchlorid-Lösung bei 20°C sind die FF nur nach 50 min methyliert.

Methode III. Auch in diesem Fall wurde Methanol als Methylierungsagent verwendet, aber im Beisein von N,N'-Carbonyldiimidazol (CDI) und Trimethylamin, wobei die vollständige Methylierung von FF 10 min bei 20°C benötigte⁹.

Methode IV. Die Methylierung wurde mit Dimethylformamidmethylacetal (DMFDMA) in Pyridin bei 100°C durchgeführt. Die vollständige Methylierung der FF wurde in 10 min erreicht¹⁰.

Methode V. Diese von uns ausgearbeitete Methode benützt stark basische Ionenaustauscher, Methyljodid, in Dimethylformamid und Pyridin. Die vollständige Methylierung der FF wurde bei 30–40°C schon in 3 min erreicht.

Die analytischen Daten aus Tabelle I zeigen, dass bei, für vollständige Methylierung der FF notwendigen Bedingungen, auch Transmethylierungen der Glyceride staatgefunden haben.

Die Komponenten der Standardgemische waren:

Freie Fettsäuren (FF), wie gesättigte C₁₀... C₂₂ und ungesättigte C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}.

Monoglyceride (MG): Glycerin-monomyristat, Glycerin-monopalmitat.

Diglyceride (DG): Glycerin 1,2- oder 1,3-dimyristat, Glycerin 1,2- oder 1,3-dipalmitat.

Triglyceride (TG): Glycerin-trimyristat, Glycerin-tripalmitat, Glycerin-tristearat.

Phosphoglyceride (PG): Lecithin.

Cholesterolestern (CE): Cholesterol-myristat, Cholesterol-palmitat, Cholesterol-stearat.

Methylstearat oder Methylmyristat wurden als innere Standarde für quantitative Bestimmungen benützt. Die Methylierungsverfahren und die entsprechenden Analysen wurden in jedem Fall viermal durchgeführt und statistisch ausgewertet.

Die Ergebnisse aus der Tabelle I zeigen eindeutig, dass die Verwendung von

sauren oder basischen Katalysatoren in homogener Lösung auch die Transesterifikationsreaktionen beschleunigen. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist von der Säure- oder Basestärke abhängig.

Im Verfahren III bildet CDI mit den Fettsäuren ein Zwischenprodukt das mit Methanol in den entsprechenden Methylester übergeht. In Abwesenheit jedwelches basischen oder sauren Katalysators (IV) sind aber relativ hohe Temperaturwerte notwendig.

Im Falle der von uns entwickelten Methode (V) wirkt der stark basische Ionenaustauscher (OH^-) als heterogener Katalysator. Aus leicht verstehbaren Gründen reagiert dieser nur mit den FF und überhaupt nicht mit den anderen Lipidkomponenten. Der wichtigste Vorteil ist die Verhinderung der Transesterifikationen sowie die äusserst kurze Reaktionsdauer.

Ähnlich gute Ergebnisse wie im Falle der Methode V werden erhalten, wenn man Diazomethan in etherischer Lösung mit 10% Methanolgehalt bei 20°C benützt. Der einzige Nachteil von Diazomethan ist, dass im Falle ungesättigter Säuren einige Pyrazolonderivate entstehen können¹¹.

Im Falle der Methode V verläuft die Methylierung nach folgenden Reaktionsgleichungen:

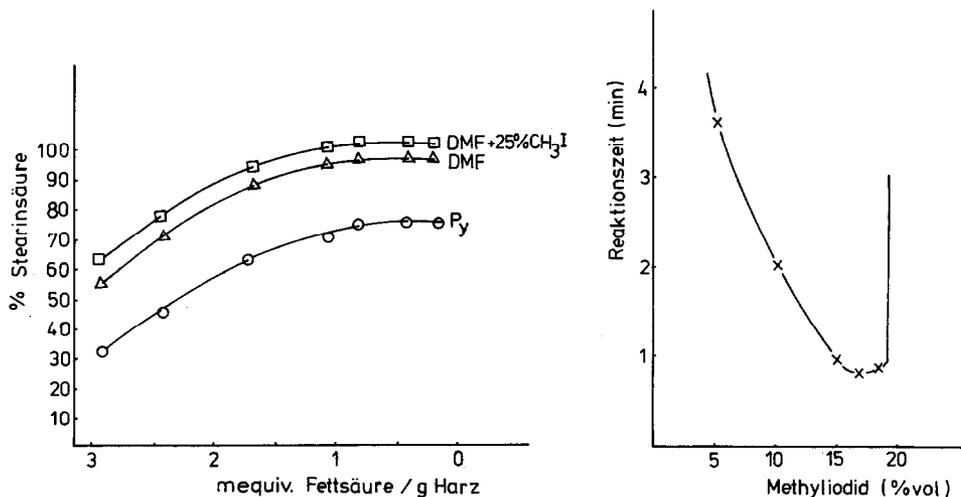
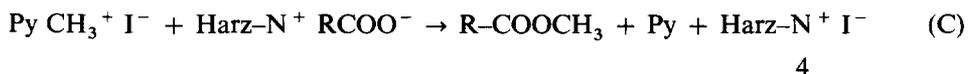
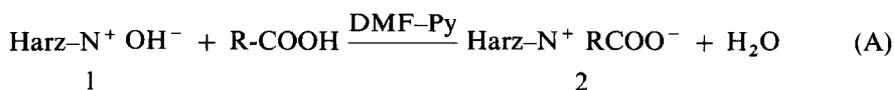


Fig. 1. Die Retention von Stearinsäure an Dowex 1-X2, in Abhängigkeit von Säure/Harz Verhältnis und Lösungsmittel.

Fig. 2. Einfluss der Methyliodidkonzentration auf den Reaktionszeit.

Die Reaktionsstufe (A) findet in polaren Lösungsmitteln, wie DMF-Py sehr rasch statt. Die Bildung des Salzes 2 verläuft praktisch gleichzeitig mit der Auflösung der Fettsäuren. Eine leichte Erwärmung (35–40°C) beschleunigt die Auflösung der Fettsäuren und somit die Bildung des Salzes: Harz-N⁺ RCOO⁻.

Der Zurückhaltungsprozess der FF ist von der Harzmenge und dem Lösungsmittel abhängig. Die Fig. 1 zeigt dieses im Falle der Stearinsäure an Dowex 1-X2 (200–400 mesh). Wie ersichtlich, ist im DMF ein kleiner Überschuss von Harz für die vollständige Zurückhaltung ausreichend.

Die Schlechten Ausbeuten in Pyridin sind durch dessen Salzbildungsfähigkeit mit Fettsäuren zu erklären. Das gebildete Salz wird mit Methyljodid abgespalten, so dass die entstehende FF praktisch quantitativ am Harz zurückgehalten wird. In dieser Stufe kann man die Reaktion mit Methyljodid direkt im Reaktionsgemisch durchführen. Wenn die anderen Lipidkomponenten für nachfolgende Analysen notwendig sind, werden die ganz einfach abfiltriert.

Die Reaktion (B) findet durch Zugabe von Pyridin zum Reaktionsgemisch (A) statt. Um die Reaktion zu starten, ist eine kurze Erwärmung auf 35–40°C ratsam. Eine weitere Erwärmung ist nicht notwendig, da die Bildung des Pyridiniumsalzes selbst exotherm ist. Die Erhöhung der Konzentration von Methyljodid steigert die Reaktionsgeschwindigkeit, aber ein zu grosser Überschuss führt zur Ausscheidung des N-Methylpyridiniumjodids und Verhinderung der Reaktion (C).

Die Reaktion (C) ist die eigentliche Methylierungsstufe die durch die Reaktion zwischen N-Methylpyridiniumjodid und Salz 2 stattfindet. Für ihre Geschwindigkeit ist die N-Methylpyridiniumjodidkonzentration wichtig, welche aber von der zugegebenen Methyljodidmenge abhängig ist.

Die optimale Methyljodidkonzentration wurde experimentell aufgefunden (Fig. 2), wobei mit einem Verhältnis von 0.8 mequiv. Fettsäure/g Harz bei 35°C gearbeitet wurde.

Die erhaltene Kurve (Fig. 2) zeigt, dass bei einem 10–15%igen Methyljodidgehalt des Reaktionsgemisches die Methylierung der Fettsäuren praktisch 1–2 min beansprucht. Bei Methyljodidkonzentrationen grösser als 18% kristallisiert das N-Methylpyridiniumjodid aus, was eine sehr ungünstige Auswirkung auf die Reaktion (C) hat.

Für die Methylierung von Lipidgemischen mit unbekannter Zusammensetzung ist es schwierig stöchiometrische Reaktionsvorschriften zu geben. Aus unseren zahlreichen Testversuchen können wir folgende allgemeine Arbeitsmethode empfehlen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift

Man wiegt in ein kleines, gut verschliessbare Glasgefäss (z.B. Pierce Reacti-therm) 10–50 mg Lipidgemisch ab. Im Falle quantitativer Analyse wiegt man noch 3–5 mg einer nicht im Gemisch vorliegenden FF als inneren Standard dazu. Die Probe wird in 0.6–0.8 ml DMF bei 35–40°C aufgelöst. Diese Temperatur wird auch weiter usw. bis zur Zugabe von Methyljodid beibehalten. Zur DMF-Lösung gibt man 50–200 mg stark basischen Ionenaustauscher (z.B. Dowex 1-X2). Im allgemeinen gibt man zu 1 Teil Probe 3–4 Teile Harz, entsprechend den empirisch festgestellten 1 g Harz zu 0.8–0.9 mequiv. Säure.

Das Reaktionsgemisch wird 2 min lang gerührt, wonach man 0.2 ml Methyljodid dazugibt und 30 sec lang weiterrührt. Anschliessend fügt man 0.5–0.6 ml Pyridin

dazu und rührt noch 2 min lang weiter (Fig. 2). Ein direktes Einspritzen von Proben aus dem Reaktionsgemisch in den Gaschromatographen ist durchaus möglich. Im Falle aber der Ausscheidung einiger Kristalle oder wenn Fettsäuren mit weniger als C_{12} in der Probe vorhanden sind, ist die Entfernung des DMF und Pyridins notwendig. Zu diesem Zweck wurde zu je 1 ml DMF + Py Lösungsmittelgemisch 1 ml 2 N HCl und 0.5 ml Hexan zugegeben und stark gerührt. Die Hexan-Phase wurde nochmals mit 2 N HCl gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und zu einem Standardvolumen (z.B. 1 ml) eingengt und dann in den Chromatographen eingespritzt.

Die Chromatogramme werden durch Vergleich der Peakoberflächen in üblicher Weise ausgewertet.

Empirisch sind folgende Reagenzien und Lösungsmittelmengen zu empfehlen:

Lipidprobe (mg)	DMF (ml)	Pyridin (ml)	Methyliodid (ml)
1-50	0.8	0.6	0.2
50-150	1.2	0.9	0.3
150-250	1.6	1.1	0.4
250-500	2.0	1.4	0.5

Allerdings sollten die Probemengen nicht grösser als 150 mg sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe von stark basischen Ionenaustauschern als heterogene Katalysatoren war es möglich die selektive Methylierung von freien Fettsäuren aus verschiedenen Lipidgemischen sehr einfach durchzuführen. Eine vollständige Methylierung der freien Säuren ist schon in einigen Minuten erreicht und was sehr wichtig erscheint: ohne jedwelche Transesterifikation der Glyceride oder anderen Lipidkomponenten.

LITERATUR

- 1 I. Hornstein, J. A. Alford, L. E. Elliott und P. F. Crowe, *Anal. Chem.*, 32 (1960) 540.
- 2 L. Gosselin und J. de Graeve, *J. Chromatogr.*, 110 (1975) 117.
- 3 C. Chlouverakis und P. Harris, *Nature (London)*, 118 (1960) 1111.
- 4 L. Hagenfeldt, *Clin. Chim. Acta*, 13 (1966) 266.
- 5 Kou-Yi Tserng, R. M. Kliegman, Eeva-Liisa Miettinen und S. C. Kalhan, *J. Lipid Res.*, 22 (1981) 852.
- 6 D. R. Knapp, *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, Wiley, New York, 1979, p. 176.
- 7 R. H. Greeley, *J. Chromatogr.*, 88 (1974) 229.
- 8 L. D. Metcalfe und A. A. Schmitz, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 363.
- 9 H. Ko und M. E. Royer, *J. Chromatogr.*, 88 (1974) 253.
- 10 J. P. Thenot, E. C. Horning, M. Stafford und M. G. Horning, *Anal. Lett.*, 5 (1972) 217.
- 11 H. Schlenk und J. L. Gellerman, *Anal. Chem.*, 32 (1960) 1412.