

Beitrag zur gaschromatographischen Untersuchung von Fetten und Oelen. 2. Mitteilung, Methoden zur Herstellung der Fettsäure-ester

Autor(en): **Hadorn, H. / Zürcher, K.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und
Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **58 (1967)**

Heft 4

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982948>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Beitrag zur gaschromatographischen Untersuchung von Fetten und Oelen

2. Mitteilung

Methoden zur Herstellung der Fettsäure-ester

H. Hadorn und K. Zürcher

Aus dem Laboratorium des Verbandes Schweiz. Konsumvereine (VSK), Basel

1. Einleitung

Wir haben in einer 1. Mitteilung (1) die apparativen Bedingungen zur gaschromatographischen Trennung der Fettsäureester beschrieben und einige Auswertungsverfahren diskutiert.

Vor der eigentlichen gaschromatographischen Analyse müssen aus den zu untersuchenden Fetten und Oelen zunächst die Methylester hergestellt werden. In der Literatur findet man eine ganze Reihe verschiedenster Methylierungs- und Umesterungs-Methoden. Aus der Vielzahl der Arbeitsvorschriften und Varianten kann man bereits ableiten, daß die meisten Methoden nicht in allen Fällen befriedigende Resultate liefern. Besonders bei Fetten, die niedrige Fettsäuren enthalten, ergeben sich Schwierigkeiten, weil die Methylester leicht flüchtig sind und daher bei jeder Manipulation, wie Ausschütteln im Scheidetrichter, oder beim Abdestillieren des Lösungsmittels, Verluste an Buttersäure-methylester und anderen kurzkettigen Fettsäure-estern entstehen. Jedes der in der Literatur angegebenen Methylierungs- oder Umesterungs-Verfahren hat seine Vor- und Nachteile. Es ist nicht ganz einfach, die beste und zuverlässigste Methode auszuwählen, die zudem noch für jedes beliebige Oel- und Fettgemisch anwendbar sein sollte. *Vorbeck, Mattick, Lee und Pederson* (2) überprüften 4 verschiedene Methoden zur Herstellung der Methylester. Sie gingen bei ihren Versuchen von reinsten Fettsäuren aus, von denen sie Mischungen genau bekannter Zusammensetzung herstellten und diese mit Diazomethan, mit Methanol-Salzsäure, an Ionenaustauschern und schließlich mit Methanol-Bortrifluorid methylierten.

Für unsere Zwecke muß eine Methode gewählt werden, bei der die Triglyceride direkt und möglichst vollständig umgeestert werden, oder ein Verfahren, das die verlustfreie Isolierung der Fettsäuren erlaubt, wobei letztere anschließend durch eine Methylierung quantitativ in ihre Methylester übergeführt werden.

Um uns ein Urteil über einige der gebräuchlichsten Methoden zu bilden, haben wir zunächst 6 der in der Literatur beschriebenen Umesterungs- und Methylierungsverfahren überprüft und miteinander verglichen. Schließlich haben wir einfache Umesterungsmethoden zur Herstellung der Methylester und der Propylester ausgearbeitet, bei denen keine Verluste an niederen Fettsäuren entstehen. Die Propylester erwiesen sich bei der Gaschromatographie vor allem bei Fetten mit niedrigen Fettsäuren (C_6 bis C_{12}) als vorteilhafter, weil sie sich besser trennen und sauberer vom Lösungsmittel abtrennen lassen. Das im umgeesterten Gemisch

enthaltene Glycerin, sowie das Unverseifbare stören bei der gaschromatographischen Trennung der Fettsäure-ester nicht. Durch zahlreiche Analysen an verschiedenen Fetten und Oelen wird die Brauchbarkeit der vereinfachten eigenen Methoden belegt.

2. Ueberprüfung einiger Umesterungs- und Methylierungs-Verfahren der Literatur

Alle Methoden wurden zunächst am gleichen Testgemisch, bestehend aus je $\frac{1}{3}$ Kokosfett, Kakaobutter und Leinöl ausprobiert. Dieses Gemisch enthält die wichtigsten gesättigten und ungesättigten Fettsäuren von C₈ bis C₁₈ in beträchtlichen Mengen.

Die Herstellung der Metylester geschah genau nach den in der Literatur angegebenen Vorschriften. Das Estergemisch trennten wir isotherm unter den in der 1. Mitteilung beschriebenen apparativen Bedingungen (1). Nach jeder Methode wurden jeweils 2 Proben unabhängig voneinander umgeestert oder methyliert. Von jeder dieser Esterlösungen haben wir 2 Chromatogramme aufgenommen und diese nach der Methode Höhe mal Gesamtretentionszeit ausgewertet. Die gefundenen Resultate sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Im Folgenden wird das Prinzip der von uns überprüften Methoden kurz besprochen und die Arbeitsvorschrift, nach der wir unsere Versuche durchführten, mitgeteilt. Die erhaltenen Resultate werden diskutiert, auf Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden wird hingewiesen.

a) Umesterung nach Mason

Mason und Mitarbeiter (3) haben ein Umesterungsverfahren beschrieben, das durch seine Einfachheit bestechend wirkt. Es erfordert keinen apparativen Aufwand und alle Reaktionen erfolgen bei Zimmertemperatur in einem verschlossenen Erlenmeyerkölbchen. Die Umesterung soll nahezu quantitativ verlaufen.

Die untenstehende Arbeitsvorschrift ist bereits eine Modifikation eines früher beschriebenen Umesterungsverfahrens (4). Zunächst wird bei Gegenwart von Dimethoxypropan und Natriummethylat als Katalysator in der Kälte umgeestert. Dann wird die Lösung mit wasserfreier methanolischer Salzsäure angesäuert, und die Reaktion zu Ende geführt. Das Glycerin wird in Isopropylidenglycerin übergeführt. Der Peak dieser Verbindung kann als Bezugssubstanz im Chromatogramm dienen.

Arbeitsvorschrift

200 mg der Fett- oder Oelprobe werden in einem 25 ml-Erlenmeyerkölbchen mit Schliffstopfen der Reihe nach mit folgenden Reagenzien versetzt: 10,0 ml Benzol, 4,0 ml Dimethoxypropan, 5,0 ml Methanol und 1,0 ml 2,0-n Natriummethylat-Lösung (Herstellung der Natriummethylat-Lösung: 5,4 g metallisches Natrium werden unter Küh-

Tabelle 1 Ueberprüfung verschiedener Umesterungs- und Methylierungsver-

Fettsäure	Umesterung nach Mason mit Na-methylat-Dimethoxypropan		Umesterung nach Kaufmann mit Na-methylat		Umesterung nach Woidich mit Methanol-HCl	
	1. Versuch %	2. Versuch %	1. Versuch %	2. Versuch %	1. Versuch %	2. Versuch %
C ₈	— —	— —	nicht auswertbar. C ₁₄ -Peak wird durch Lösungsmittel verdeckt	3,3 3,5	0,3 0,3	Spur Spur
C ₁₀	2,8 2,8	2,7 2,8		2,7 2,6	1,4 1,3	0,6 0,6
C ₁₂	22,9 22,5	21,7 22,6		17,5 18,1	16,4 15,7	13,4 12,5
C ₁₄	5,9 5,7	6,0 6,0		5,9 6,2	6,3 5,8	6,2 6,3
C ₁₆	12,1 12,3	12,4 12,4		12,4 12,7	13,7 13,2	14,0 14,1
C ₁₈	12,2 12,6	12,4 12,4		12,2 12,4	13,4 13,7	14,3 14,5
C _{18:1}	17,5 17,7	17,5 17,4		18,2 17,8	19,5 19,8	20,9 21,1
C _{18:2}	7,0 7,2	7,6 7,5		7,4 7,3	8,0 8,3	8,4 8,5
C _{18:3}	18,8 19,2	19,4 19,1		19,9 19,5	21,0 21,6	22,1 22,6
C ₂₀	Spur	Spur		0,4 —	Spur	Spur

fahren an einem Gemisch von gleichen Teilen Kokosfett, Kakaobutter und Leinöl

Methylierung nach Woidich mit Diazomethan		Methylierungs- Methode Lindt & Sprüngli mit Diazomethan		Umesterung nach Peisker im Einschlußrohr mit Methanol-Chloro- form-Schwefelsäure		Um- esterung nach eigenen Methoden (4 Varian- ten, vgl. Tabelle 4)
1. Versuch ‰	2. Versuch ‰	1. Versuch ‰	2. Versuch ‰	1. Versuch ‰	2. Versuch ‰	Mittel- werte aus 17 Analysen
4,1	3,0 3,0	1,6 1,6	2,4 2,4	3,6 3,6	3,5 3,4	3,3 ± 0,2
2,6	2,9 2,8	2,0 2,0	2,3 2,2	2,7 2,6	3,1 3,0	2,3 ± 0,1
15,6	18,3 18,0	16,2 16,3	17,0 16,8	17,7 17,9	18,8 18,0	16,5 ± 0,4
6,1	6,1 6,3	6,3 6,1	6,2 6,1	5,9 6,1	6,4 5,9	6,0 ± 0,1
13,0	12,7 13,2	13,1 13,2	12,9 12,9	12,6 13,0	12,6 12,0	12,8 ± 0,2
12,4	12,6 11,7	13,3 13,7	13,0 13,0	12,7 12,5	12,7 12,2	12,5 ± 0,4
18,6	18,2 18,6	19,2 19,6	18,5 18,6	19,5 18,5	17,6 18,3	18,5 ± 0,4
7,7	7,4 7,6	7,9 8,0	7,6 7,7	7,1 7,0	7,0 6,7	7,6 ± 0,2
19,4	18,2 18,3	20,3 19,5	20,2 20,4	18,1 18,8	18,2 19,5	20,4 ± 0,4
0,4	0,5 0,5	Spur	Spur	Spur	Spur	—

lung in 50 ml Methanol gelöst). Das Reaktionsgemisch wird gut durchgemischt und während 5 Minuten stehen gelassen. Nun fügt man soviel wasserfreie methanolische Salzsäure zu, daß in der Mischung ein Ueberschuß von 0,3 mmol HCl entsteht. Die erforderliche Salzsäure-Menge wird vorher durch Titration eines Leerversuches ermittelt. Das salzsaure Reaktionsgemisch wird gut umgeschwenkt und während 50 Minuten stehen gelassen. Anschließend fügt man 1,5 g festen Neutralisator zu und schwenkt das Reaktionsgemisch innert 30 Minuten von Zeit zu Zeit um. (Zusammensetzung des Neutralisators: 2 Teile NaHCO_3 , 1 Teil Na_2CO_3 wasserfrei, 2 Teile Na_2SO_4 wasserfrei). Man wartet bis sich der Neutralisator abgesetzt hat und gießt die überstehende klare Lösung in ein 25 ml-Meßkölbchen ab. Der Rückstand wird zweimal mit je 2 ml Methanol nachgewaschen und die Flüssigkeit ebenfalls in das Meßkölbchen abdekantiert. Man füllt schließlich mit Methanol bis zur 25 ml-Marke auf. Die Lösung wird direkt in den Gaschromatographen eingespritzt.

Die Methode ist einfach auszuführen, Verluste an niederen Fettsäuren infolge von Verdunstung sind ausgeschlossen. Der Peak des Isopropyliden-glycerins erschien auf unsern Chromatogrammen (Lac-4-R-886-Säule) zwischen den C_8 - und C_{10} -Methylestern. Nachteilig wirkt der hohe Benzol-Gehalt der Lösung. Benzol stört auf der von uns benutzten Säule die quantitative Auswertung, da der langsam auslaufende Lösungsmittel-Peak die Peaks der niederen Fettsäuren (C_6 und C_8) derart überlagert, daß sie nicht mehr erkennbar sind.

Für die Laurinsäure (C_{12}) fanden wir nach der Methode *Mason* aus nicht abgeklärten Gründen in unserem Testgemisch durchwegs viel höhere Werte als nach allen anderen Methoden (siehe Tabelle 1). Es scheinen während der Umesterung Nebenreaktionen abzulaufen, die Störungen im Chromatogramm verursachen. In der Arbeit von *Mason, Eager* und *Waller* (3) konnten diese Störungen nicht erkannt werden, da kein Fett mit niedrigen Fettsäuren untersucht wurde. Die Autoren haben lediglich die Fettsäuren von C_{14} bis C_{24} ausgewertet. Für Fette, wie Kokos- oder Palmkernfett, die Laurinsäure enthalten, sowie Mischungen derselben mit anderen Fetten, ist die Methode *Mason* nicht brauchbar. Der unrichtige, zu hohe Wert für die Laurinsäure wirkt sich bei der Berechnung der Fettsäuren-Verteilung auch auf die anderen Säuren aus.

b) Umesterung nach Kaufmann und Mankel mit Natrium-methylat

Kaufmann und *Mankel* (5) haben verschiedene Methoden zur Herstellung der Methylester überprüft. Sie empfehlen folgendes Verfahren:

Arbeitsvorschrift

1 g der Oelmischung wird in 10 ml Methanol mit Natriummethylat (1 Spatelspitze) als Katalysator unter peinlichstem Ausschluß von Feuchtigkeit (CaCl_2 -Rohr) 1 Stunde gekocht. Nach ca. 10 Minuten erhält man eine klare Lösung. Nach dem Ueberführen in einen Scheidetrichter wird mit 2 ml gesättigter Kaliumbisulfat-Lösung und 5 ml Wasser versetzt. Die Esterschicht wird mit einer bei Zimmertemperatur an Docosan gesättigten Petrolätherlösung (18 g Docosan in 50 ml) extrahiert, möglichst schnell abgezogen, zur Entfernung geringer Wassermengen filtriert und sofort gaschromatographisch analysiert.

Kaufmann und *Mankel* haben gefunden, daß beim Ausschütteln der kurz-kettigen Methylester mit Pentan aus wasserhaltigen Mischungen große Verluste entstehen. Wird zum Ausschütteln ein Gemisch von Petroläther und Docosan verwendet, so lassen sich die Verluste stark verringern. Das Docosan wirkt hier ähnlich wie die «Fixierungsmittel» oder «Trägersubstanzen» in der Kosmetik bei Parfüms.

Bei eigenen Versuchen hat sich diese Methode wenig bewährt. Sie ist umständlich und beim Zusatz von Kaliumbisulfat-Lösung nach der Umesterung tritt eine starke Fällung ein. Beim Ausschütteln mit Docosan-Petroläther bilden sich leicht Emulsionen, die sich schlecht trennen lassen.

Die Docosan-Petroläther-Lösung eignet sich zur gaschromatographischen Trennung in der von uns benutzten Säule (Lac-4-R-886) nicht. Der Peak des Myristinsäure-methylesters wird vom Docosan-Peak (Lösungsmittel) verdeckt. Die Methode ist somit für unsere Zwecke nicht brauchbar, die Fettsäureverteilung konnte nicht berechnet werden. Versuchsweise haben wir die alkalische, natrium-methylat-haltige Lösung, wie sie nach der Umesterung anfällt, direkt in den Gaschromatographen eingespritzt. Das Chromatogramm war brauchbar, die Resultate stimmten (siehe Tabelle 1).

Für serienmäßige Untersuchungen schien uns ein direktes Einspritzen des natriumhaltigen Reaktionsgemisches wenig günstig, da die Gefahr besteht, daß durch die stark alkalische Lösung die Säule geschädigt wird.

Durch eine Modifikation ließ sich die Umesterungsmethode mit Methanol-Natriummethylat wesentlich verbessern. Wir entfernten das Alkali mit Hilfe eines Ionenaustauschers (siehe eigene Methode Abschnitt 3 c).

c) Umesterung nach *Woidich* mit methanolischer Salzsäure

Woidich (6) beschreibt eine Umesterungs-Methode, bei welcher die Methylester zur Reinigung im Vakuum sublimiert und daher besonders rein erhalten werden.

Arbeitsvorschrift

20—30 mg der filtrierten, wasserfreien Oelprobe werden in einem entsprechend dimensionierten Schliffgrundkolben in 2 ml Benzol gelöst und nach Zugabe von 3 ml 5%iger wasserfreier methanolischer Salzsäure 1 Stunde auf einem siedenden Wasserbad unter Rückfluß mit aufgesetztem Calciumchlorid-Rohr gekocht. Darauf werden Methanol und Benzol im Vakuum entfernt. Herstellen der 5%igen methanolischen Salzsäure: Chlorwasserstoffgas wird getrocknet und in wasserfreies Methanol bis zu einer Säurekonzentration von mindestens 5% eingeleitet. Durch Verdünnen mit Methanol wird die richtige Konzentration eingestellt. Diese Lösung ist 2—3 Wochen verwendbar.

Woidich schreibt anschließend zur weiteren Reinigung der Fettsäuremethylester eine Sublimation im Vakuum bei 0,05—0,01 Torr und 90 ° C vor.

Wir haben auf die Vakuum-Sublimation verzichtet und direkt 0,1 µl des Ester-gemisches, wie es nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum (Rota-

tionsverdampfer) erhalten wurde, in den Chromatographen eingespritzt. Wie aus den Resultaten in Tabelle 1 ersichtlich ist, erhielten wir für die niedrigen Fettsäuren (C_8 bis C_{12}) viel zu niedrige Werte. Da die Methylester dieser Fettsäuren im Vakuum flüchtig sind, entstehen beim Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum erhebliche Verluste. Der Caprylsäuremethylester hatte sich in einem Versuch zu 90 % oder mehr verflüchtigt. Auch für Caprin- und Laurinsäure (C_{10} , C_{12}) fanden wir zu niedrige Werte. Bei der Berechnung der Fettsäuren-Verteilung werden selbstverständlich auch die Werte der anderen Fettsäuren verfälscht. Die Methode ist somit nur für Fette und Öle mit langkettigen Fettsäuren, ab C_{16} brauchbar, worauf bereits *Woidich* hingewiesen hat.

d) Methylierung der Fettsäuren mit Diazomethan nach *Woidich*

Woidich (6) gibt eine präzise Arbeitsvorschrift, wonach zunächst die freien Fettsäuren isoliert und diese mit Diazomethan methyliert werden.

Arbeitsvorschrift

Zur Isolierung der Fettsäuren werden ungefähr 100 mg Fett mit 5 ml alkoholischer 2-n KOH versetzt und 1 Stunde unter Rückfluß auf dem Wasserbad gekocht. Nach der Verseifung wird mit 5 ml Wasser verdünnt und im Scheidetrichter 1mal mit 10 ml Petroläther (40—60 °) ausgeschüttelt. Die Seifenlösung wird nun mit 1-n Schwefelsäure angesäuert und anschließend 3mal mit je 20 ml Petroläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Petrolätherauszüge werden zur Entfernung der Schwefelsäure 2mal mit je 10 ml Wasser ausgewaschen. Die Petrolätherlösung wird mit entwässertem Natriumsulfat einige Stunden getrocknet, filtriert und anschließend bis auf ein Volumen von 5 bis 6 ml eingengt.

Methylierung: Der petrolätherischen Lösung der Fettsäuren wird 1 ml Methanol pro analysi zugesetzt. Das aus N-Nitroso-p-toluolsulfomethylamid und Kaliumhydroxid erhaltene Diazomethan wird in eine trockenen Äther enthaltende Vorlage destilliert. Diese Diazomethanlösung wird tropfenweise der Fettsäurelösung bis zur bleibenden Gelbfärbung zugesetzt. Nach 10 Minuten werden Diazomethan und Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das zurückbleibende Estergemisch wird im Vakuum-Exsiccator über Silicagel 2 Stunden getrocknet.

Wir haben genau nach dieser Methode gearbeitet. Sie sollte sehr reine Methylester liefern. Unverseifbares und Glycerin sind abgetrennt. Die Methode ist jedoch etwas umständlich, weil zuerst die freien Fettsäuren isoliert werden müssen. Bei der Methylierung mit dem giftigen Diazomethan können nach *Kaufmann* (7) auch Nebenprodukte durch Anlagerung an die Doppelbindung entstehen. Wir beobachteten beim Zusatz von Diazomethan-Lösung zu den Fettsäuren unseres Testgemisches das Auftreten einer Trübung. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels und des überschüssigen Diazomethans hinterblieb eine zähflüssige Masse, die sich schlecht einspritzen läßt. Die erhaltenen Methylester waren in Petroläther nicht vollständig löslich, was auf die Entstehung von Nebenprodukten hindeutet. Wir fanden in unserem Testgemisch etwas zu niedrige Werte für die Linolensäure (siehe Tabelle 1). Beim Abdestillieren des Lösungsmittels können

selbstverständlich auch Verluste an Estern der niedrigen Fettsäuren auftreten. Aus diesen Gründen ist auch diese Methode nicht auf beliebige Fett- und Öl-Mischungen anwendbar.

e) *Methylierung der Fettsäuren nach Methode Lindt & Sprüngli (8)*
mit Diazomethan

Wir arbeiteten nach der Methode *Lindt & Sprüngli (8)*, die sich bei der gaschromatographischen Untersuchung von Kakaobutter anscheinend gut bewährt hat.

Arbeitsvorschrift

Zur *Darstellung der Fettsäuren* werden 1 g Fett mit 20 ml 7,5%iger methanolischer KOH versetzt und 15 Minuten lang am Rückflußkühler gekocht. Mit 50 ml dest. Wasser wird die Seifenlösung quantitativ in einen 200 ml-Schütteltrichter übergeführt. Die klare Lösung wird mit 5 ml 25%iger Salzsäure angesäuert und zweimal mit 20 ml Aether kräftig während 1 Minute ausgeschüttelt. Die ätherischen Phasen werden vereinigt und zweimal mit 25 ml 0,5%iger Natriumchlorid-Lösung während 30 Sekunden ausgeschüttelt. Die Aetherlösung wird in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben abgelassen, in welchen ca. 10 g Na_2SO_4 vorgelegt worden sind. Nach kräftigem Schütteln läßt man die Lösung 15 Minuten stehen, anschließend wird durch ein Faltenfilter in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben filtriert, der zugleich als Reaktionsgefäß für die Veresterung verwendet wird. Die freien Fettsäuren liegen nun in wasserfreier und reiner Form gelöst in der ätherischen Phase vor.

Zur *Veresterung der Fettsäuren mit Diazomethan* wird in einer speziellen Apparatur, bestehend aus Rundkolben mit seitlichem Gasableitungsrohr, das in einen absteigenden Kühler mündet, Diazomethan entwickelt und direkt in die Lösung der Fettsäuren destilliert.

2,1 g Diaklin (N-Nitroso-p-toluolsulfomethylamid) werden in ca. 30 ml Aether im 250 ml-Destillierkolben gelöst. Durch einen Tropftrichter läßt man sorgfältig eine Lösung von 0,4 g Kaliumhydroxid in 10 ml 96 Vol.%igem Alkohol, unter leichtem Erwärmen (Wasserbad 40—50 °C) zutropfen. Es entsteht langsam gelbes Diazomethangas, das mit dem entweichenden Aether im Erlenmeyer aufgefangen wird, welcher die Fettsäure-Aetherlösung enthält. Es entwickelt sich anfänglich rege gasförmiger Stickstoff. Allmählich wird die Lösung zitronengelb und die Gasentwicklung läßt nach, was die Beendigung der Reaktion bedeutet. Mit einem Rotationsverdampfer werden überschüssiges Diazomethan und Aether abdestilliert. Die Probe wird im Vakuum bei 50 °C 2 Stunden belassen. Die Fettsäuremethylester werden in der so erhaltenen, reinen Form gaschromatographisch bestimmt.

1 g Diaklin ergeben 0,3—0,35 g Diazomethan was einem ca. 50%igen Ueberschuß des beschriebenen Ansatzes entspricht.

Nach *Kaufmann (7)* entstehen bei dieser Arbeitsweise Verluste an niedrigen Fettsäuren. Je nach Vakuum können sich beim Abdestillieren des Lösungsmittels wechselnde Mengen Methylester der kurzkettigen Fettsäuren verflüchtigen.

Bei eigenen Versuchen an unserem Testgemisch betrug die Verluste an Caprylsäure (C_8) bis zu 50 %. Auch für die Caprinsäure (C_{10}) fanden wir zum Teil zu niedrige Werte.

Während des Einleitens des Diazomethans in die Lösung der Fettsäuren in Aether beobachteten wir eine Trübung. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels hinterblieb eine zähflüssige, trübe Lösung, die sich nur schwierig einspritzen ließ. Vermutlich haben sich infolge von Nebenreaktionen, wie bei der Methode von *Woidich*, störende Stoffe gebildet. Diese Methode, die sich für Kakaobutter gut bewährt hat, ist für Fette und Öle, die niedrige Fettsäuren, oder große Mengen mehrfach ungesättigter Fettsäuren enthalten, weniger geeignet.

f) Umesterung nach *Peisker* im Einschlußrohr

Peisker (9) beschreibt eine Schnellmethode zur Umesterung von Ölen. Das Öl wird mit einem Reaktionsgemisch, bestehend aus Methanol-Chloroform-Schwefelsäure im Einschlußrohr während 5 Minuten auf 170 ° C erhitzt. Nach dem Neutralisieren der Schwefelsäure und Verdünnen mit Pentan oder Petroläther, kann die Lösung direkt in den Gaschromatographen eingespritzt werden.

Wir benutzten die Methode in etwas modifizierter Form, wie sie von der 2. Subkommission der Lebensmittelbuch-Kommission vorgeschlagen wurde. Der Unterschied gegenüber der Originalvorschrift von *Peisker* besteht lediglich im Neutralisieren. *Peisker* entfernt die Schwefelsäure durch metallisches Zink und Ausschüteln mit Wasser. Nach der neuen Vorschrift wird mit Natriumbikarbonat neutralisiert.

Arbeitsvorschrift

3 Tropfen Fett oder Öl und 0,75 ml Umesterungsgemisch bestehend aus 50 ml Chloroform p. a., 50 ml Methanol p. a. und 0,5 ml konz. Schwefelsäure werden möglichst ohne Benetzung des oberen Teils der Wandung in ein dickwandiges, unten zugeschmolzenes Pyrexrohr gefüllt. (Außendurchmesser 10 mm, Wandstärke 1,2—1,4 mm, Länge 200—250 mm). Der untere Teil des Rohres wird gekühlt (z. B. Trockeneis) währenddessen oben mittels einem Sauerstoff-Leuchtgasgebläse zugeschmolzen wird. Nach dem Erkalten wird das Rohr in ein Schutzrohr aus Stahl eingeführt und im Ölbad während 5 Minuten auf 175 ° C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Rohr geöffnet, dann fügt man 0,1 g Natriumbikarbonat und ca. 0,3—0,5 g wasserfreies Natriumsulfat zu, schüttelt und versetzt das Gemisch mit 5 ml n-Pentan und mischt gut durch.

Nach dem Abdekantieren der überstehenden Lösung kann diese direkt zur gaschromatographischen Bestimmung verwendet werden; bei Abwesenheit niederer Fettsäuren kann sie vor dem Einspritzen vorsichtig eingeeengt werden.

Bei der Analyse unseres Testgemisches, bestehend aus Kokosfett, Kakaofett und Leinöl fanden wir für die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Linol- und Linolensäure) um etwa 5—10 % zu niedrige Werte. Die Resultate der kurzkettigen gesättigten Fettsäuren fielen dagegen zu hoch aus. Nach 4 verschiedenen eigenen Umesterungsverfahren erhielten wir für das gleiche Test-Gemisch gut übereinstimmende Werte (siehe Tabelle 4), die sich im Linol- und Linolensäure-Gehalt wesentlich von den Werten nach Methode *Peisker* unterscheiden. Zur Kontrolle, ob unser Testgemisch noch die gleiche Zusammensetzung wie bei den früheren Versuchen aufwies, haben wir eine Probe des Testgemisches noch ein-

mal nach der Natrium-methylat-Methode umgeestert und die Methyl ester unmittelbar im Anschluß an die Versuchsserie nach *Peisker* eingespritzt. Vorher wurde der stark verschmutzte Glaseinsatz im Injektorblock ausgewechselt. Die erhaltenen Werte decken sich mit den 3 Monate früher gefundenen Resultaten in Tabelle 4. Die Methode *Peisker* gibt somit eindeutig zu niedrige Werte für Linol- und Lino- lensäure, aber zu hohe Werte für die Laurinsäure.

Kaufmann (7) weist darauf hin, daß Schwefelsäure als Katalysator bei der Umesterung eine Veränderung ungesättigter Substanzen, insbesondere von Polyen-

Tabelle 2
Umesterung nach Methode Peisker im Einschlußrohr
mit Methanol - Chloroform - Schwefelsäure

Fettsäure	1. Versuch Reaktionszeit 5 Minuten %	2. Versuch Reaktionszeit 5 Minuten %	3. Versuch Reaktionszeit 15 Minuten %	4. Versuch Reaktionszeit 30 Minuten %	Kontrolle Na-methylat- Methode VSK %
C ₈	3,6	3,5	4,2	3,9	3,1
	3,6	3,4	4,0	4,0	3,1
C ₁₀	2,7	3,1	2,7	2,6	2,2
	2,6	3,0	2,7	2,7	2,2
C ₁₂	17,7	18,8	17,7	18,0	16,2
	17,9	18,0	18,3	17,1	15,8
C ₁₄	5,9	6,4	5,8	6,1	6,0
	6,1	5,9	6,1	6,0	5,9
C ₁₆	12,6	12,6	12,7	12,7	13,0
	13,0	12,0	12,6	12,6	12,8
C ₁₈	12,7	12,7	13,3	12,9	12,7
	12,5	12,2	12,9	12,9	12,3
C _{18:1}	19,5	17,6	18,0	18,0	19,5
	18,5	18,3	17,3	17,6	19,0
C _{18:2}	7,1	7,0	7,0	7,1	7,9
	7,0	6,7	7,0	8,1	7,9
C _{18:3}	18,1	18,2	18,5	18,8	20,8
	18,8	19,5	19,2	18,7	21,0
C ₂₀	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur

Fettsäuren bewirken kann. Die von uns beobachteten zu niedrigen Werte für Linol- und Linolensäure nach der Methode *Peisker* lassen auf derartige Nebenreaktionen schließen.

Um zu prüfen, ob bei der Methode *Peisker* die Reaktionszeit einen Einfluß auf die Resultate hat, haben wir die Erhitzungszeit im Einschlußrohr von 5 auf 15 bzw. 30 Minuten erhöht. Von jedem Umesterungsversuch wurden 2 Chromatogramme aufgenommen. Wie aus den Ergebnissen der Tabelle 2 hervorgeht, ist eine Erhitzungszeit zwischen 5 und 30 Minuten ohne Einfluß auf die Fettsäureverteilung.

Wir erhielten nach der Methode *Peisker* ziemlich stark schwankende Werte. Nach 8 Analysen wurde der vorher tadellos gereinigte Glaseinsatz aus dem Injektorblock entfernt. Er war durch verkohlte organische Substanzen stark geschwärzt. Bei dieser Umesterungs-Methode mit Schwefelsäure entstehen anscheinend Nebenprodukte (Sulfurierungsprodukte), die im Injektorblock zersetzt werden und zu Störungen Anlaß geben. Die ziemlich großen Streuungen sind zweifellos auf die verkohlten Nebenprodukte im Injektorblock zurückzuführen. Es besteht auch die Gefahr, daß die Säule verschmutzt und vorzeitig unbrauchbar wird. Aus allen diesen Gründen ist die Methode *Peisker* für Serienuntersuchungen nicht zu empfehlen.

3. Ausarbeitung eigener verbesserter Umesterungsverfahren

Die von uns überprüften Methylierungs- und Umesterungsverfahren besitzen alle gewisse Mängel. Einige sind nicht auf beliebige Fettmischungen anwendbar, weil Verluste an leichtflüchtigen Methylestern der niedrigen Fettsäuren entstehen. Bei anderen Methoden ergeben sich Störungen infolge von Nebenreaktionen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Wir suchten nach einem Veresterungsverfahren, das bei allen Fetten und Ölen und beliebigen Fettgemischen, wie beispielsweise Margarinen, brauchbare Resultate liefert. Um Verluste an leichtflüchtigen Estern zu vermeiden, muß die Veresterung in einem geschlossenen System erfolgen. Operationen, wie Ausschütteln im Scheidetrichter oder Abdestillieren von Lösungsmitteln müssen unbedingt vermieden werden. Am aussichtsreichsten erschien uns die Umesterung mit methanolischer Salzsäure oder mit Natriummethylat-Lösung in Methanol. Nach erfolgter Umesterung müssen Salzsäure bzw. das Alkali mit einem festen Neutralisator, oder durch Ionenaustauscher entfernt werden.

Zur Verbesserung der Umesterungs-Methoden haben wir zahlreiche systematische Versuche angestellt. Die Reaktionsmischungen wurden jeweils in einer kleinen Schliffapparatur mit aufgesetztem Rückflußkühler und Calciumchlorid-Röhrchen auf einem Aluminiumblock in leichtem Sieden erhalten. Nach beendeter Umesterung wurde gut abgekühlt, der Rückflußkühler entfernt, Neutralisator oder Ionenaustauscher ins Kölbchen gegeben und dieses sofort wieder verschlossen. Von der überstehenden Lösung wurden 0,5—1 μ l direkt in den Gaschromatographen eingespritzt.

Die in unserer 1. Mitteilung (1) veröffentlichten Versuche ergaben, daß auf einer Lac-4-R-886-Säule die Trennung der Methylester der höheren Fettsäuren (C_{10} — C_{24}) sauber gelingt. Gesättigte, einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren werden fast zu 100 % voneinander getrennt. Bei den niederen Fettsäuren, wie Buttersäure und Capronsäure ergaben sich unerwartete Schwierigkeiten. Die Methylester dieser beiden Säuren ließen sich auch unter verschiedensten apparativen Bedingungen nicht genügend scharf vom Lösungsmittel abtrennen. Benzol ist als Lösungsmittel völlig ungeeignet, weil es den Buttersäure-methylester-Peak verdeckt. Aber auch von Aceton oder Methanol ließen sich die Methylester der Buttersäure und Capronsäure nicht genügend scharf abtrennen.

Wir haben daher Versuche mit den Propylestern angestellt. Diese sind schwerer flüchtig und lassen sich besser vom Lösungsmittel, in diesem Fall von Propanol, abtrennen. Aus dem gleichen Grund verwendeten bereits *Anselmi* und Mitarbeiter (10) zur Analyse von Butterfett die Aethylester der Fettsäuren, während *Gander* und Mitarbeiter (11) Versuche mit den Propylestern auf verschiedenen Säulen anstellten.

Durch Versuche sollte zunächst abgeklärt werden, ob für ein und dasselbe Oelgemisch die gleichen Resultate für die Fettsäureverteilung erzielt werden, wenn man mit den Methyl- oder mit den Propylestern arbeitet. Ferner wollten wir die Vor- und Nachteile der gaschromatographischen Trennung der verschiedenen Ester kennen lernen. Alle Versuche wurden mit dem gleichen Testgemisch durchgeführt, das wir bereits für die Methylierungs- und Umesterungsversuche nach Methoden der Literatur benutzt hatten. Im Folgenden werden 4 Umesterungs-Verfahren, die sich alle bewährt haben, kurz diskutiert.

a) Umesterung mit Methanol - Salzsäure - Benzol

Wir haben zunächst in ähnlicher Weise wie *Woidich* (6) mit wasserfreier methanolischer Salzsäure bei Gegenwart von Benzol als Lösungsmittel umgeestert. Auf ein Abdestillieren des Lösungsmittels, das zu Verlusten an niedrigen Fettsäuren führt, wurde verzichtet.

Arbeitsvorschrift

0,5 g Oel, 3 ml Benzol und 2 ml wasserfreie methanolische Salzsäure 5 % werden in einem Schliffkölbchen mit Siedesteinchen während 1 Stunde am Rückflußkühler mit aufgesetztem Calciumchlorid-Rohr gekocht. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur werden 0,5 g fester Neutralisator zugesetzt, das Kölbchen sofort verschlossen und kräftig geschüttelt. (Zusammensetzung des Neutralisators: 2 Teile NaHCO_3 , 1 Teil Na_2CO_3 , 2 Teile Na_2SO_4 wasserfrei). Eine Probe der Esterlösung soll nach Zusatz von wenig Wasser und eines Tropfens Methylorange neutral reagieren. Das Gemisch wird scharf zentrifugiert und von der überstehenden klaren Lösung direkt in den Gaschromatographen eingespritzt.

Die Methode liefert gute Resultate. Durch das Benzol wird ein langsam auslaufender Lösungsmittel-Peak verursacht, der den Methylester der Buttersäure,

vollständig, den Ester der Capron- und gelegentlich auch der Caprylsäure je nach Säulentemperatur mehr oder weniger verdeckt. Für Fette mit niedrigen Fettsäuren ist die Methode wenig geeignet.

b) Umesterung mit Propanol-Salzsäure

In analoger Weise haben wir durch Umesterung die Propylester hergestellt. Da sowohl die Oele als auch die Propylester in Propanol löslich sind, braucht man kein weiteres Lösungsmittel mehr hinzuzufügen. Das Reaktionsgemisch, bestehend aus Oel und Propanol-Salzsäure, wird während etwa 1 Stunde am Rückflußkühler gekocht, dann abgekühlt und die Salzsäure mit einem festen Neutralisator entfernt.

Arbeitsvorschrift

0,5 g Oel, 5 ml wasserfreie propanolische Salzsäure werden während 1 Stunde am Rückflußkühler mit aufgesetztem Calciumchlorid-Rohr gekocht, dann auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit 0,5 g Neutralisator 2—3 Minuten kräftig geschüttelt. (Kontrolle einer Probe mit Methylorange). Nach dem Neutralisieren wird zentrifugiert und die überstehende klare Lösung in den Gaschromatographen eingespritzt.

In Analogie zur Vorschrift von *Woidich* (6) haben wir zunächst ein Propanol-Salzsäure-Gemisch verwendet, das 5 % Salzsäure enthielt. Beim Neutralisieren entwickelt sich ziemlich viel Kohlensäure. Durch das entweichende Gas wird der Glasstopfen leicht herausgedrückt und es besteht außerdem die Gefahr, daß mit der Kohlensäure auch leichtflüchtige Ester entweichen. Wir haben daher versucht, mit niedrigerer Salzsäurekonzentration umzuestern. Auch die Einwaage an Oel, sowie die Kochzeit haben wir variiert. Aus den Resultaten in Tabelle 3 geht hervor, daß man die Reaktionsbedingungen innerhalb ziemlich weiter Grenzen variieren darf, ohne daß das Resultat beeinflusst wird. Die Salzsäure-Konzentration darf sich zwischen 0,5 und 5 % bewegen. Eine Kochzeit von 30 Minuten hat bei unserem Fettgemisch genügt. Auch nach 60 oder 120 Minuten erhielten wir praktisch die gleichen Resultate. Bei einem Versuch mit nur 10 Minuten Kochzeit ergaben sich unrichtige Werte, da das Fett anscheinend noch nicht vollständig umgeestert war.

c) Umesterung mit Methanol-Natriummethylat; Dowex

Nach *Kaufmann* und *Mankel* (5) lassen sich Triglyceride in wasserfreiem Methanol bei Gegenwart von Natriummethylat glatt zu den Methylestern umestern. Die von den Autoren angewandte Methode zur Entfernung des Natriummethylates durch Zersetzung mit Natriumbisulfat-Lösung und Ausschütteln im Scheidetrichter hat wenig befriedigt, da sie zu Verlusten an niedrigen Fettsäuren führt. Durch einen kleinen Kunstgriff konnten wir die Methode wesentlich vereinfachen. Nach der Umesterung werden die Natriumionen durch einen sauren Ionenaustauscher entfernt. Da alle Operationen im geschlossenen Kölbchen erfolgen, sind Verluste infolge Verdunstung niedrig siedender Ester ausgeschlossen.

Tabelle 3
Variieren der Versuchsbedingungen bei der Umesterung eines Testgemisches
mit Propanol-Salzsäure

Fettsäure	HCl-Konz. variiert (1 Std. Kochzeit)			Kochzeit variiert (1 ‰ HCl)			Einwaage variiert (1 ‰ HCl, 1 Std. Kochzeit)	
	0,5 ‰ HCl	1 ‰ HCl	5 ‰ HCl	1/2 Std.	1 Std.	2 Std.	0,4 g Oel in 6 ml	1 g Oel in 5 ml
C ₆	Spur	0,2	0,1 0,1	0,2 0,2	0,2 0,2	0,2 0,1 0,1	Spur	Spur
C ₈	3,6 3,2	3,5	3,4 3,4	3,6 3,7	3,4 3,5	3,6 3,8 3,3	3,8 3,7	3,5
C ₁₀	2,4 2,3	2,3	2,3 2,4	2,4 2,5	2,4 2,2	2,4 2,5 2,3	2,4 2,4	2,4
C ₁₂	16,9 16,2	17,0	16,8 16,8	16,8 16,9	17,1 17,0	16,9 16,9 17,0	16,6 17,0	16,8
C ₁₄	6,2 6,1	6,0	6,0 6,1	6,1 6,1	6,0 6,0	6,0 6,1 6,1	5,9 6,2	6,1
C ₁₆	13,2 13,1	12,8	12,6 12,9	12,9 12,8	12,5 13,0	12,8 12,8 13,0	12,9 12,8	12,8
C ₁₈	12,2 12,7	11,8	11,5 11,3	11,8 11,8	12,0 11,7	11,4 11,6 11,2	13,2 13,0	12,2
C _{18:1}	17,8 18,2	18,1	18,6 18,3	18,0 17,8	18,1 18,1	18,1 18,4 18,4	18,1 17,9	18,1
C _{18:2}	7,5 7,8	7,7	7,8 7,7	7,6 7,6	7,7 7,6	7,7 7,6 7,8	7,3 7,4	7,8
C _{18:3}	20,2 20,3	20,8	20,8 21,1	20,7 20,7	20,8 20,7	20,7 20,4 20,9	19,9 19,6	20,0
C ₂₀	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur

Tabelle 4 Eigene Umesterungsmethoden. Fettsäureverteilung in einem Testgemisch (Siehe S. 237)

Säure	Methylester Umesterung mit Methanol-HCl 1 %; Neutralisator		Propylester Umesterung mit Propanol-HCl 1 %; Neutralisator		Methylester Umesterung mit Methanol-Na-methylat; Dowex			Propylester Umesterung mit Propanol, Na-propylat; Dowex		Mittelwert aus 17 Analysen	Standardabweichung	
	1. Versuch %	2. Versuch %	1. Versuch %	2. Versuch %	1. Versuch %	2. Versuch %	3. Versuch %	1. Versuch %	2. Versuch %		\bar{x}	s
C ₆	—	—	Spur	Spur	—	—	—	0,2	Spur	—	—	—
	—	—	Spur	Spur	—	—	—	0,2				
C ₈	3,2	3,2	3,5	3,8	3,3	3,5	3,1	3,4	3,3	3,3	± 0,21	6 %
	3,1	3,1	3,4	3,7		3,2	3,1	3,5	3,2			
C ₁₀	2,3	2,3	2,4	2,4	2,3	2,3	2,2	2,4	2,4	2,3	± 0,08	2,5 %
	2,3	2,4	2,2	2,4		2,3	2,2	2,2	2,3			
C ₁₂	16,7	16,5	16,7	16,6	16,4	16,2	16,2	17,1	16,1	16,5	± 0,39	2,4 %
	16,5	16,9	16,2	17,0		16,3	15,8	17,0	15,9			
C ₁₄	6,0	6,0	6,0	5,9	5,8	6,4	6,0	6,0	6,0	6,0	± 0,15	2,5 %
	6,0	6,2	5,9	6,2		5,9	5,9	6,0	6,1			
C ₁₆	12,7	12,7	12,7	12,9	12,6	12,8	13,0	12,5	13,0	12,8	± 0,18	1,4 %
	12,8	12,8	12,6	12,8		12,9	12,8	13,0	12,9			
C ₁₈	12,7	12,6	12,5	13,2	12,7	12,4	12,7	12,0	12,1	12,5	± 0,37	3,0 %
	12,9	12,8	12,6	13,0		12,6	12,3	11,7	12,4			
C _{18:1}	18,5	18,5	18,3	18,1	18,6	18,3	19,5	18,1	18,8	18,5	± 0,42	2,3 %
	18,9	18,4	18,7	17,9		18,5	19,0	18,1	19,1			
C _{18:2}	7,6	7,5	7,6	7,3	7,6	7,8	7,9	7,7	7,7	7,6	± 0,16	2,1 %
	7,7	7,5	7,8	7,4		7,7	7,9	7,6	7,7			
C _{18:3}	20,2	20,3	20,5	19,9	20,2	20,4	20,8	20,8	20,7	20,4	± 0,39	1,9 %
	19,9	20,1	20,5	19,6		20,8	21,0	20,7	20,6			
C ₂₀	Spur	Spur	Spur	Spur	0,4	Spur	Spur	Spur	Spur			
	Spur	Spur	Spur	Spur		Spur		Spur	Spur			

Arbeitsvorschrift

0,5 g Fett oder Oel werden in einem Schliffkölbchen mit 4,5 ml Methanol puriss. und 0,5 ml 1⁰/oiger Natriummethylat-Lösung (hergestellt durch Auflösen von 1 g metallischem Natrium in 100 ml Methanol unter Kühlung mit Eiswasser) versetzt und während 1 Stunde am Rückflußkühler unter Ausschluß von Feuchtigkeit gekocht. Bei Kakao-Butter, Raps- und Erdnußöl, sowie bei andern Oelen und Fetten, die viel feste Fettsäuren oder Fettsäuren mit über 20 C-Atomen enthalten, empfiehlt sich ein Zusatz von Benzol, weil sonst die Gefahr besteht, daß beim Abkühlen schwerlösliche Ester auskristallisieren.

In diesem Fall werden 0,5 g Oel mit 3,5 ml Methanol, 1 ml Benzol und 0,5 ml Natrium-methylat-Lösung 1 Stunde gekocht.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird ca. 1 g mit Methanol ausgewaschener Ionenaustauscher Dowex* zugegeben und das Kölbchen sofort verschlossen. Nun wird während 1 Minute geschüttelt. Eine Probe der überstehenden Lösung soll nach dem Verdünnen mit Wasser auf Phenolphthalein neutral reagieren. Andernfalls muß noch länger geschüttelt werden. Die überstehende Lösung wird in den Gaschromatographen eingespritzt.

d) Umesterung mit Propanol-Natriumpropylat; Dowex

In analoger Weise wie unter c) beschrieben, haben wir durch Umesterung der Triglyceride mit n-Propanol und Natriumpropylat als Katalysator die Propylester hergestellt. Die Propylester der von uns untersuchten Fette und Oele sind in Propanol gut löslich. Ein Zusatz von Benzol erübrigt sich.

Arbeitsvorschrift

0,5 g Fett oder Oel werden mit 4,5 ml n-Propanol puriss. wasserfrei und 0,5 ml Natriumpropylat-Lösung (hergestellt durch Lösen von 1 g metallischem Natrium in 100 ml Propanol) versetzt und während 1 Stunde am Rückfluß unter Ausschluß von Feuchtigkeit gekocht. Man kühlt ab und entfernt die Natrium-Ionen mit ca. 1 g Dowex, das mit n-Propanol ausgewaschen wurde, indem man während 2—3 Minuten schüttelt. Die neutrale überstehende Lösung wird in den Gaschromatographen eingespritzt.

4. Ueberprüfung der eigenen Umesterungsmethoden

Wir haben nun die vier von uns neu ausgearbeiteten Umesterungsverfahren an dem bereits mehrfach erwähnten Testgemisch aus Kokosfett, Kakaobutter und Leinöl ausprobiert. Nach jeder Vorschrift wurden völlig unabhängig voneinander 2 Ansätze umgeestert. Von jeder der erhaltenen Ester-Lösungen haben wir 2 Proben in den Gaschromatographen eingespritzt und die erhaltenen Chromatogramme von Hand nach der Methode «Höhe mal Retentionszeit» ausgewertet.

* Ionenaustauscher Dowex 50 W X 8 20/50 mesh Ionenform H, erhältlich bei der Fa. Fluka AG, Buchs. Vor Gebrauch werden 20 g Dowex in eine Säule gegeben mit 100 ml wasserfreiem Methanol überschichtet, worauf man das Methanol langsam durchfließen läßt.

Dabei wurden keine Korrektur-Faktoren benutzt. In der Tabelle 3 sind die Resultate der nach 4 verschiedenen Methoden umgeesterten Proben des gleichen Testgemisches zusammengestellt. Sämtliche Werte sind gut reproduzierbar. Es ist gleichgültig, ob man die Methyl- oder die Propylester chromatographiert. Beide Estergemische werden auf der von uns benutzten Säule (Lac-4-R-886) gut getrennt und liefern die gleichen Resultate.

Bei Fetten und Oelen, die nur höhere Fettsäuren (ab C_{14} oder C_{16}) enthalten, sind die Methylester günstiger. Die Trennung ist nach kürzerer Zeit beendet. Bei $170^{\circ}C$ isotherm erscheint die Linolsäure nach 1 Stunde. Bei Fetten mit niedrigen Fettsäuren erwies sich die Herstellung der Propylester als vorteilhafter, weil sie weniger flüchtig sind als die Methylester. Nach *Kaufmann* und *Mankel* (5) sollen bereits beim mehrmaligen Öffnen der Flasche mit dem Estergemisch Verluste an Buttersäure-methylester entstehen. Bei mehreren hintereinander folgenden Einspritzungen nimmt der Gehalt an Buttersäure ständig ab.

Infolge der längeren Retentionszeiten der Propylester werden die niederen Fettsäuren auch besser getrennt. Capronsäure läßt sich bei $160^{\circ}C$ isotherm annähernd quantitativ bestimmen, Buttersäure kann im temperaturprogrammierten Gaschromatogramm als Propylester mit Sicherheit nachgewiesen werden. (Nachweisbarkeitsgrenze 0,2—0,4 % Buttersäure.)

a) Vergleich der Resultate der Methyl- und Propylester

Wir haben von Kokosfett, Kakaobutter und Leinöl, sowie von einer Mischung obiger Komponenten die Methyl- und Propylester nach den Alkoholat-Methoden hergestellt und gaschromatographiert. In der Tabelle 5 sind die nach den beiden Methoden erhaltenen Resultate zusammengestellt. Sie stimmen für die Einzelkomponenten fast durchwegs gut überein. Im Testgemisch, bestehend aus gleichen Teilen der 3 Komponenten, fanden wir nach der Methylester- und der Propylester-Methode praktisch die gleichen Werte. Dieselben stimmen mit den aus den Resultaten die Einzelkomponente theoretisch berechneten Gehalten der Mischung überein.

b) Vorteil der Propylester zum Nachweis der Buttersäure

Um abzuklären, ob eine Fettmischung, etwa das aus einem Gebäck oder einem anderen Lebensmittel isolierte Fett, Butterfett enthält oder nicht, genügt es, die Buttersäure nachzuweisen. Alle übrigen Speisefette enthalten keine Buttersäure. Diese Prüfung sollte nach Möglichkeit im gleichen Arbeitsgang mit der gaschromatographischen Fettsäurenverteilung durchgeführt werden können. Fette, die keine niederen Fettsäuren, etwa C_8 bis C_{12} enthalten, sind von vorn herein frei von Butterfett und brauchen nicht weiter geprüft zu werden. Fette mit niederen Fettsäuren dagegen, können neben Kokosfett und Palmkernfett auch Butterfett enthalten.

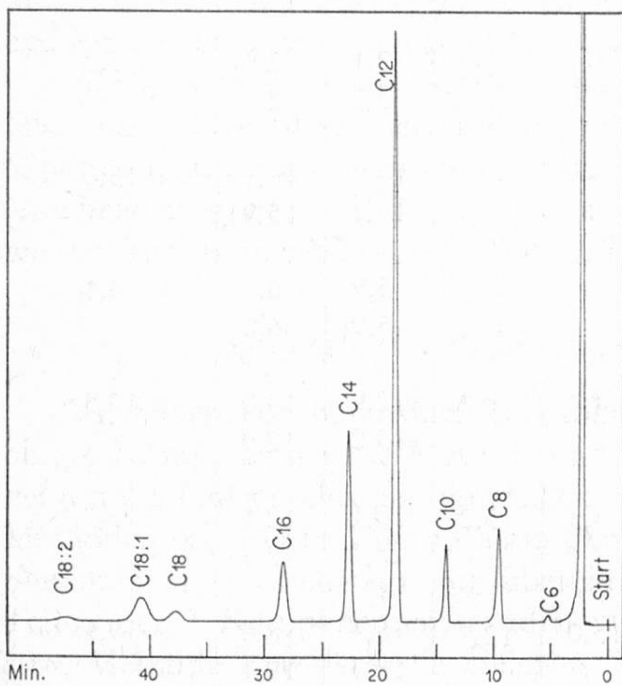
Zum sicheren Nachweis von Milchfett muß der Peak des Buttersäureesters genügend scharf vom Lösungsmittel-Peak getrennt werden. Dazu sind die Propyl-

Tabelle 5 Vergleich der Resultate der Methyl- und Propylester
(Alkoholat-Methode)

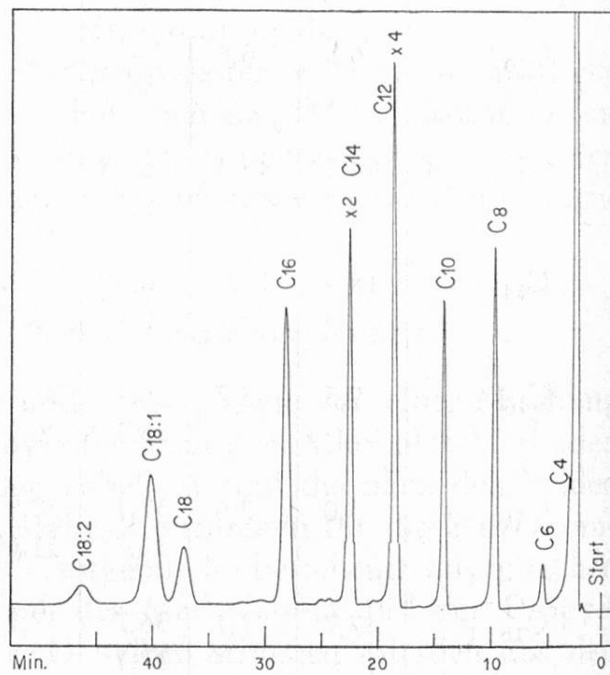
Fettsäure	Kokosfett		Kakaobutter		Leinöl		Mischung aus Kokosfett, Kakaobutter und Leinöl 1 : 1 : 1		
	Methyl- ester %	Propyl- ester %	Methyl- ester %	Propyl- ester %	Methyl- ester %	Propyl- ester %	Methyl- ester %	Propyl- ester %	Sollwert berechnet aus Mittelwerten
C ₆	Spur	0,7	—	—	—	—	—	Spur	0,1
C ₈	8,9	9,5	—	—	—	—	3,8 3,8	3,3 3,2	3,1
C ₁₀	6,8	6,6	—	—	—	—	2,1 2,2	2,4 2,3	2,2
C ₁₂	44,2	45,4	0,05 0,05	0,03 0,05	—	—	14,9 15,1	16,1 15,9	15,0
C ₁₄	18,4	17,9	0,09 0,10	0,1 0,1	—	—	5,9 5,9	6,1 6,0	6,1
C ₁₆	9,5	8,7	26,4 25,3	27,1 26,0	4,7	4,2	12,9 13,0	13,0 12,9	13,5
C ₁₈	3,0	2,6	32,1 32,7	30,9 31,6	3,5	3,2	13,1 13,1	12,1 12,4	12,7
C _{18:1}	7,7	7,1	36,7 37,1	37,2 37,5	13,0	12,7	18,4 18,3	18,8 19,1	19,1
C _{18:2}	1,8	1,5	3,8 3,9	3,9 4,0	17,9	18,0	7,9 7,9	7,7 7,7	7,9
C _{18:3}	—	—	—	—	61,0	62,0	21,0 20,8	20,7 20,6	20,5
C ₂₀	—	—	0,8 0,8	0,8 0,9	—	—	Spur	Spur	0,3

ester wesentlich günstiger als die Methylester. Auf der von uns benützten Lac-4-R-886-Säule ließ sich der Buttersäure-methylester zu wenig scharf vom Lösungsmittel abtrennen. Auch mit den Aethylestern erhielten wir unbefriedigende Resultate, weil das im Handel erhältliche Aethanol meistens zahlreiche Verunreinigung enthält, die störende Peaks verursachen. Um sowohl die niederen

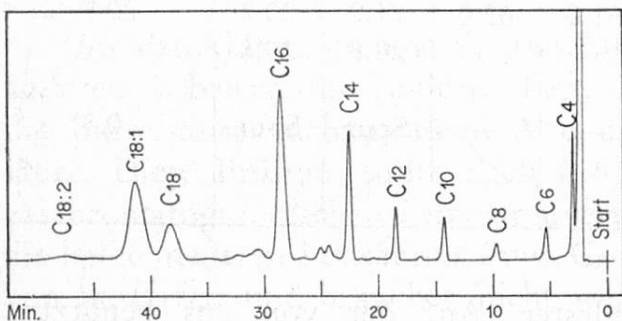
als auch die höheren Fettsäuren als Propylester sauber auf dem gleichen Chromatogramm darzustellen, muß mit einem Temperatur-Programm gearbeitet werden. Die nachstehenden Gaschromatogramme sind mit folgendem Temperaturprogramm aufgenommen worden: 5 Minuten isotherm bei 90 ° C, anschließend mit einer Aufheizrate von 4 ° C pro Minute bis 170 ° C, dann wieder isotherm. Die Figuren 1—3 zeigen temperaturprogrammierte Gaschromatogramme der Propylester, die Figur 4 zeigt zum Vergleich ein analoges Gaschromatogramm der Methylester von reinem Butterfett. Man erkennt, daß sich der Propylester der Buttersäure bedeutend besser vom Lösungsmittel-Peak abtrennen läßt als der Methylester.



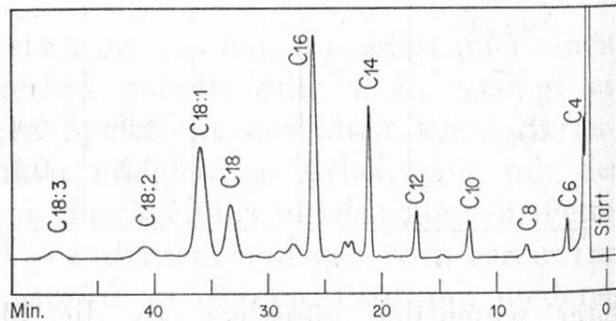
Figur 1. Kokosfett (Propylester)



Figur 2. 91 % Kokosfett + 9 % Butterfett (Propylester)



Figur 3. Butterfett (Propylester)



Figur 4. Butterfett (Methylester)

Temperatur-Programm für die Gaschromatogramme in Figur 1—4
5 Minuten isotherm bei 90 ° C, dann Anstiegsrate von 4 °/min. bis 170 ° C, dann wieder isotherm

In Figur 1 ist ein Gaschromatogramm eines Kokosfettes (Propylester) dargestellt. Von C_6 bis C_{18} sind alle gesättigten Fettsäuren vorhanden. Buttersäure fehlt oder ist höchstens als Spur angedeutet.

Figur 2 zeigt das Gaschromatogramm einer Mischung bestehend aus 91 % Kokosfett und 9 % Butterfett. Der Buttersäure-Peak ist als Aufsetzer eben noch erkennbar. Für eine quantitative Bestimmung der Buttersäure ist dieses Chromatogramm ungeeignet. Butterfett-Gehalte bis hinunter auf 10 % lassen sich aber nach dieser Methode einwandfrei qualitativ nachweisen. Die Peaks aller anderen Fettsäuren sind scharf getrennt und für eine quantitative Auswertung geeignet. Vernachlässigt man bei der Berechnung der Fettsäuren-Verteilung die Buttersäure, so entsteht nur ein unbedeutender Fehler. Nach Literaturangaben enthält Butterfett 3—4,5 % Buttersäure. In obiger Mischung sind somit ca. 0,4 % Buttersäure vorhanden, eine Menge die auf die Verteilung der übrigen Fettsäuren keinen nennenswerten Einfluß hat.

In Figur 3 ist das analoge Gaschromatogramm von Butterfett (Propylester) dargestellt. Der Buttersäure-Peak ist hier deutlich ausgebildet. Mit Hilfe eines Integrators kann die Buttersäure quantitativ bestimmt werden. Bei entsprechendem Papiervorschub gelingt eine annähernde Berechnung der Buttersäure auch nach dem Handauswertungsverfahren $h \cdot b_{1/2}$.

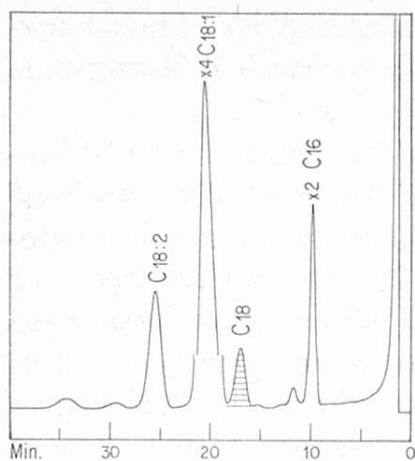
Aus diesen Versuchen folgt, daß für quantitative Bestimmungen der niederen Fettsäuren auf Lac-4-R-886-Säule die Methylester ungeeignet sind. Die Propylester dagegen lassen sich besser vom Lösungsmittel abtrennen.

In isothermen Gaschromatogrammen erhält man ab C_8 genaue Resultate. Für Buttersäure und Capronsäure erhält man Näherungswerte. Legt man Wert auf eine exakte Bestimmung der Buttersäure und Capronsäure, so arbeitet man zweckmäßiger mit den freien Fettsäuren. Ueber derartige Trennungen soll in einem anderen Zusammenhang berichtet werden.

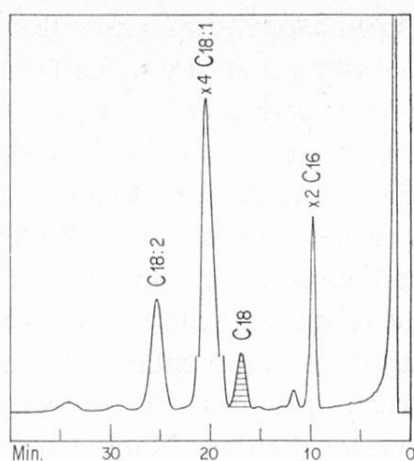
c) Veresterung von freien Fettsäuren

Speisefette und Oele enthalten normalerweise die Fettsäuren zum größten Teil in veresterter Form als Triglyceride. Gewisse Rohöle, z. B. Olivenöle können jedoch merkliche Mengen freie Fettsäuren enthalten. Es mußte noch abgeklärt werden, ob bei unseren Umesterungsverfahren freie Fettsäuren ebenfalls in die Methyl- bzw. die Propylester übergeführt werden.

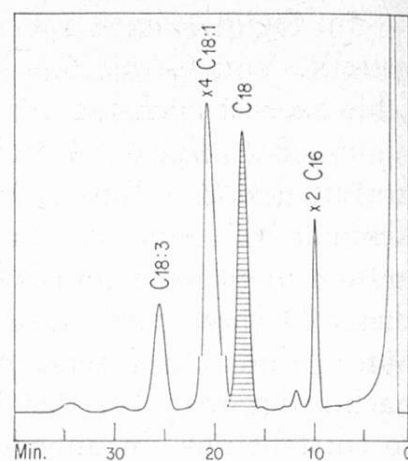
Zu Olivenöl haben wir bekannte Mengen (10 %) reiner Stearinsäure zugesetzt. Dieses Gemisch wurde einmal nach der Methanol-Salzsäure-Methode, ein andermal nach der Methanol-Natriummethylat-Methode umgeestert, und hierauf die Methylester eingespritzt. Aus den Chromatogrammen geht klar hervor, daß nach der Alkoholat-Methode die freien Fettsäuren nicht verestert werden. Sie bleiben als Na-Seifen unverändert in der Lösung. Durch alkoholische Salzsäure dagegen werden auch die freien Fettsäuren verestert und somit gaschromatographisch erfaßt.



Figur 5. 500 mg Olivenöl ohne Zusatz nach Methanol-Salzsäure-Methode umgeestert.



Figur 6. 450 mg Olivenöl + 50 mg Stearinsäure nach Natriummethylat-Methode umgeestert.



Figur 7. 450 mg Olivenöl + 50 mg Stearinsäure nach Methanol-Salzsäure-Methode umgeestert.

Die Chromatogramme (Figur 5—7) wurden isotherm bei 170 ° C aufgenommen

Figur 5 zeigt das Gaschromatogramm der Methyl ester von Olivenöl nach der Umesterung mit Salzsäure-Methanol. Die Umesterung mit Methanol-Natriummethylat gab übrigens genau die gleichen Resultate. Der Peak des Stearinsäure-methylesters (schraffierte Fläche) ist relativ klein. Figur 6 zeigt das Gaschromatogramm einer Mischung von 450 mg Olivenöl und 50 mg Stearinsäure nach der Umesterung mit Natriummethylat. Das Chromatogramm ist identisch mit demjenigen des reinen Olivenöls in Figur 5. Der Stearinsäure-methylester-Peak wurde nicht erhöht, freie Stearinsäure wird durch Natriummethylat-Methanol nicht verestert.

In Figur 7 ist das Gaschromatogramm einer gleichen Mischung von Olivenöl und Stearinsäure nach der Umesterung mit methanolischer Salzsäure wiedergegeben. Der Stearinsäure-methylester-Peak erscheint stark erhöht, da die zugesetzte freie Stearinsäure ebenfalls methyliert wurde.

Aus den Chromatogrammen ließen sich folgende Werte für Stearinsäure berechnen:

- a) Olivenöl ohne Zusatz nach Natriummethylat-Methode = 2,74 %
- b) Olivenöl ohne Zusatz nach Methanol-Salzsäure-Methode = 2,83 %
- c) Olivenöl + 10 % Stearinsäure nach Natriummethylat-Methode = 2,83 %
- d) Olivenöl + 10 % Stearinsäure nach Methanol-Salzsäure-Methode = 12,76 %

Unter der Voraussetzung, daß Olivenöl 95 % Fettsäuren enthält, berechnet sich der theoretische Stearinsäure-Gehalt in Versuch d) zu 13,0 %, was gut mit dem gaschromatographisch gefundenen Wert übereinstimmt.

Aus diesen Versuchen folgt, daß man bei raffinierten Speiseölen und Fetten, die nur Spuren von freien Fettsäuren enthalten, nach der Alkoholat-Methode umestern darf. Bei Rohölen dagegen muß unbedingt die Salzsäure-Methode benutzt werden, weil man sonst die freien Fettsäuren nicht erfaßt.

Zusammenfassung

1. Verschiedene Methylierungs- und Umesterungs-Verfahren zur Herstellung der Methyl-ester aus Fetten und Oelen wurden überprüft. Es wird auf Fehlermöglichkeiten hingewiesen, wie: Verluste an niederen Fettsäure-estern durch Verdampfung, Nebenreaktionen beim Methylieren mit Diazomethan, oder beim Umestern mit Schwefelsäure als Katalysator.
2. 4 eigene Umesterungsverfahren, welche im geschlossenen System und ohne Verluste arbeiten, werden beschrieben. Für Fette mit niederen Fettsäuren, wie Kokosfett, sind die Propylester günstiger. Für Speiseöle benützt man zweckmäßiger die Methyl-ester. Als Katalysator für die Umesterung dient entweder Alkoholat oder wasserfreie, alkoholische Salzsäure. Säure oder Alkali werden durch einen festen Neutralisator oder mit Ionenaustauschern aus der Lösung entfernt. Die Brauchbarkeit unserer modifizierten Vorschriften wird durch zahlreiche Analysen belegt.

Résumé

1. Examen pratique et critique de divers procédés d'estérification pour la préparation d'esters méthyliques obtenus à partir des graisses et des huiles. Diverses causes d'erreur sont relevées, telles que pertes en esters d'acides gras de faible poids moléculaire au cours de l'évaporation et réactions secondaires lors de la méthylation par le diazométhane ou lors de l'estérification en présence d'acide sulfurique comme catalyseur.
2. Quatre procédés d'estérification, en système clos et sans perte, sont décrits. Pour les graisses contenant des acides gras de faible poids moléculaire, comme par exemple la graisse de coco, les esters propyliques sont plus favorables. Pour les huiles comestibles il est préférable d'utiliser les esters méthyliques. Comme catalyseur d'estérification on utilise l'alcoolat ou du gaz chlorhydrique en solution alcoolique anhydre. La solution est ensuite débarrassée de l'acide ou de l'alcali par traitement avec un échangeur d'ions. De nombreuses analyses démontrent que les modes opératoires modifiés donnent des résultats satisfaisants.

Summary

1. Practical and critical examination of various procedures for the esterification of fatty acids (fats and oils). Various possibilities of error are pointed out.
2. Description of 4 procedures of esterification in closed vessel and without loss. For fats containing fatty acids of low molecular weight it is recommended to prepare the propyl esters; for alimentary oils, the methyl esters are preferable. Good results have been obtained with these procedures.

Literatur

1. *Hadorn H. und Zürcher K.*: diese Mitt. **58**, 209 (1967).
2. *Vorbeck M. L., Mattick L. R., Lee F. A. und Pederson C. S.*: *Analyt. Chemistry* **33**, 1512 (1961).
3. *Mason M. E., Eager M. E. und Waller G. R.*: *Analyt. Chemistry* **36**, 587 (1964).
4. *Mason M. E. und Waller G. R.*: *Analyt. Chemistry* **36**, 583 (1964).
5. *Kaufmann H. P. und Mankel G.*: *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **65**, 179 (1963).
6. *Woidich H.*: *ZUL* **129**, 197 (1966).
7. *Kaufmann H. P.*: Die Anwendung der Gaschromatographie auf dem Fettgebiet mit besonderer Berücksichtigung der pharmazeutischen Analyse. Forschungsberichte des Landes Nordrhein-Westfalen. Westdeutscher Verlag Köln und Opladen S. 47 (1965).
8. Private Mitteilung von Dr. *J. Kleinert, Lindt & Sprüngli A. G.*, Kilchberg; siehe auch *J. Kleinert und M. Habegger*, *Revue int. Chocolaterie* **22**, 38 (1967).
9. *Peisker K. V.*: *J. amer. Oil Chem. Soc.* **41**, 87 (1964).
10. *Anselmi S., Boniforti L. und Monacelli R.*: *Riv. ital. Sostanze grasse* **38**, 436 (1961), zitiert nach *Kaufmann und Mankel* (5).
11. *Gander G. W., Jensen R. G. und Sampyigna J.*: *J. Dairy Sci.* **45**, 323 (1962) zitiert nach *Kaufmann und Mankel* (5).

Der Polyphosphatgehalt von Blutplasma und von damit hergestellten Brühwürsten

O. Wyler

Laboratorium des Eidg. Veterinärarnstes, Bern

In der Schweiz und auch in der benachbarten Bundesrepublik Deutschland ist die Verwendung von kondensierten Phosphaten, sog. Polyphosphaten, als Hilfsstoffe für die Fabrikation von Fleischwaren nicht zugelassen. Es bestehen verschiedene Gründe dafür: einmal besitzen die meisten Polyphosphate die Fähigkeit, Fett zu emulgieren und damit dieses der Sicht des Verbrauchers zu entziehen. Dann vermögen sie die Muskelfaser aufzuquellen und damit ein für das Auge glatteres, «schöneres» Brät hervorzurufen, als dies der Natur und Beschaffenheit entsprechen würde. Erscheinungen also, welche Anlaß zur Täuschung der Konsumenten geben können und auch dem unlauteren Wettbewerb dienen.