

Symposium 4: Advances in lipid analysis

Fortschritte in der Lipidanalytik

Identitätsprüfung und Qualitätskontrolle von Fetten

Artur Seher

Bundesanstalt für Fettforschung, Piusallee, D-4400 Münster, Bundesrepublik Deutschland

Identity test and quality control of fats

1. Identitätsprüfung

Trotz ihres chemisch einfachen Aufbaus aus Triacylglycerinen und geringen Beimengungen natürlicher Begleitstoffe bereitet die Identifizierung individueller Fette oder besonders von Fettgemischen erhebliche Schwierigkeiten. Die heute noch wichtigsten Methoden basieren auf der Analyse der am Aufbau der Fette beteiligten Fettsäuren mittels Gas-Chromatographie.

Zur Gewinnung der Fettsäuremethylester und zur Durchführung der Trennungen gibt es nationale und internationale Standard-Methoden, die bestens erprobt sind [1]. Sowohl in gepackten als auch in Capillar-Säulen haben sich die sehr stabilen, polaren Polysiliconphasen bewährt. Bei Benutzung des Flammen-Ionisations-Detektors sind allerdings für die Umwandlung der durch Integration des Chromatogramms ermittelten Flächen- in Massen-Prozente Eichungen erforderlich. Für die gesättigten Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge sind die quasi theoretischen Faktoren von Ackman und Sipos [2] zur Umrechnung geeignet. Das Verhalten der ungesättigten Fettsäuren ist so unterschiedlich, daß für diese stets Umrechnungsfaktoren durch Eichung zu ermitteln sind [3]. Die Eichgemische sollten dabei in der Zusammensetzung den zu analysierenden Gemischen möglichst ähnlich sein.

Für Speise- und technische Zwecke werden etwa 40 Samen- und 3 Fruchtfleischfette sowie die Körperfette von Schlachttieren und Fischen benutzt. Die Pflanzenfette unterscheiden sich lediglich durch das Mischungsverhältnis von 5–6 Hauptfettsäuren. Hinzu kommen noch 4 nur in einigen Fetten enthaltene Säuren sowie eine unterschiedliche Anzahl von Minorfettsäuren, so daß Pflanzenfette durchschnittlich 26 verschiedene Fettsäuren enthalten.

Als Produkte landwirtschaftlicher Erzeugung unterliegen die individuellen Pflanzenfette in der quantitativen Zusammensetzung noch Schwankungen, die durch Standort, Klima und Reifegrad bei der Ernte bedingt sind.

Für die am meisten benutzten Fette existieren Tabellen über die mittlere Zusammensetzung, mit deren Hilfe die Identität unvermischter Fette überprüft werden kann [4]. Nach Erfahrungen von Spencer u. a. [5] bleibt die Summe aller positiven und negativen Abweichungen bei ca 97% aller authentischen Fette unter 2%.

Zusätzliche Identifizierungshilfen kann man durch Analyse der Sterin- und der Tocopherol-Gemische der Fette erhalten. Für die Trennung der Sterine wird überwiegend die Gas-Chromatographie unter Verwendung polarer Trennphasen benutzt [6]. Da die erforderlichen Temperaturen bei 270–300°C liegen, werden an die Temperaturbeständigkeit der stationären Phasen sehr hohe Ansprüche gestellt. Der Einsatz polarer Phasen ist notwendig, um eine vollständige Trennung der Sterine zu erreichen. Für die neuerdings zur Sterinanalyse eingesetzte HPLC-Technik [7] gibt es noch keine Trennphasen, die diese Forderung erfüllen.

Günstiger sind die Verhältnisse für die Trennung von Tocopherol- und Tocotrienol-Gemischen, wie sie in den Pflanzenölen vorkommen. Hier gelingt es, alle 2×4-Verbindungen in einem

Analysenlauf zu trennen [8]. Die Bestimmung ist mit einem UV-Detektor möglich, erfolgt aber besser mittels Fluoreszenz.

Sterine und Tocopherole sind Bestandteile des Unverseifbaren der Pflanzenfette. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, noch weitere Komponenten dieser Fett-Fraktion zur Identifizierung, Reinheitskontrolle oder Aufklärung von Mischungen heranzuziehen. Die 4-Methylsterine sind geeignet, Kakaobutter von Kakaobutter-Äquivalenten zu unterscheiden, auch wenn die Zusammensetzung der Triacylglycerine sehr ähnlich ist [9].

Die Aufklärung der Zusammensetzung von Gemischen aus zwei und mehr Fetten ist wegen der weitgehenden qualitativen Übereinstimmung der am Aufbau beteiligten Fettsäuren und der unzureichenden quantitativen Unterschiede nur unbefriedigend möglich. Während es durchaus gängig ist, eine gewünschte Mischung aus der bekannten Zusammensetzung individueller Fette zu errechnen, macht die umgekehrte Aufgabe, aus der Zusammensetzung einer Mischung von Fetten deren Bestandteile zu errechnen, noch große Schwierigkeiten. Van Niekerk u. Burger [10] publizierten ein Rechner-Programm mit dem sie die Zusammensetzung binärer und ternärer Fettgemische in 85% der Fälle befriedigend ermitteln konnten, wenn nur 7 verschiedene Fette zur Auswahl standen und außer den Fettsäuren auch die Sterine und Tocopherole analysiert wurden.

2. Qualitätskontrolle

Zur Bestimmung wertgebender Bestandteile der Fette, wie essentielle Fettsäuren oder Vitamine, bedient man sich der bereits behandelten chromatographischen Methoden.

Einen bedeutenden Einfluß auf die Qualität der Fette hat die Autoxidation [11], bei der sowohl stets im Fett verbleibende Produkte als auch durch Desodorisierung entfernbare Geruchs- und Geschmacksstoffe entstehen.

Die Prüfung auf entfernbare Verunreinigungen aus der Umwelt, wie Pesticide, Polycyclen, Schwermetalle, erfordert wegen der geringen Konzentrationen dieser Stoffe subtile Vorbereitungsmaßnahmen, ehe Nachweis und Bestimmung mittels GC/MS-Kopplung, Fluorometrie oder Atomabsorptionsspektrometrie erfolgen können. Die Bedeutung dieser Kontaminanten wird teilweise überschätzt. Bei der Raffination der Fette werden Pesticide und Polycyclen fast vollständig entfernt, Schwermetallgehalte weitgehend vermindert [12].

Andererseits verursacht die Raffination auch geringe Veränderungen im Fett [13], wie Bildung kleiner Mengen trans-isomere, konjugierter sowie dimerer Fettsäuren. Die geringen Mengen trans-Fettsäuren können, besonders nach Anreicherung, gas-chromatographisch in 50 m langen, mit stark polaren Phasen belegten Capillaren befriedigend exakt abgetrennt und bestimmt werden. Zum Nachweis geringer Mengen konjugierter Fettsäuren hat sich die Derivat-Spektrometrie im Ultraviolett bewährt. Mittels Gelpermeations-Chromatographie lassen sich die dimeren Fettsäuren erfassen und quantifizieren [14].

Literatur

1. Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten und verwandten Stoffen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1950–1985, Methoden C–VI 10–11 c
2. Ackman RG, Sipos JC (1964) *J Chromatogr* 16:298
3. Seher A (1966) *Fette Seifen Anstrichm* 68:255
4. Pardun H (1976) *Analyse der Nahrungsfette*. Parey, Berlin, S 330f

5. Spencer GF, Herb SF, Gormisky PF (1976) J Am Oil Chem Soc 53:94
6. Homberg E, Bielefeld B (1985) Fette Seifen Anstrichm 87:61
7. Holen B (1985) J Am Oil Chem Soc 62:1344
8. Arens M, Kroll S, Müller-Mulot W (1984) Fette Seifen Anstrichm 86:148
9. Homberg E, Bielefeld B (1982) Dtsch Lebensm-Rundsch 78:73
10. Van Niekerk PF, Burger AEC (1985) J Am Oil Chem Soc 62:531
11. Grosch W (1986) Fresenius Z Anal Chem 324:217
12. Thomas A (1982) Fette Seifen Anstrichm 84:133
13. Eder SR (1982) Fette Seifen Anstrichm 84:136
14. Umbehend M, Scharmann H, Strauss HJ, Billek G (1973) Fette Seifen Anstrichm 75:689

Fresenius Z Anal Chem (1986) 324:215–216
© Springer-Verlag 1986

Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie von Triglyceriden

H.-J. Fiebig

Bundesanstalt für Fettforschung, Piusallee 68–76,
D-4400 Münster, Bundesrepublik Deutschland

High-performance liquid-chromatography of triglycerides

Fette und Öle pflanzlicher und tierischer Herkunft sind komplexe Mischungen von verschiedenen Triglyceriden. Durch qualitative und quantitative Analyse dieser Triglyceride kann also die Identität eines Fettes oder Öles bestimmt werden. Weiterhin läßt sich so auch der Zusatz von Fremd- bzw. Ersatzfetten zu hochwertigen Fetten (z.B. Beimischung von Kokos- oder Kakaobutterersatzfetten zu Kakaobutter) ermitteln. Die hierbei erhaltenen Triglyceridmuster sind nämlich viel charakteristischer als die entsprechenden Fettsäuremuster und liefern eine genauere Information über die Zusammensetzung des analysierten Fettes oder Öles; zudem ist eine Derivatisierung nicht erforderlich. Die Aufklärung der Triglyceridmuster natürlicher Fette und Öle konnte jedoch erst mit Einführung chromatographischer Trennverfahren erfolgreich angegangen werden.

Zur Analyse der Triglyceride wurden bis vor einigen Jahren fast ausschließlich die Dünnschicht- und Gas-Chromatographie eingesetzt. Bei diesen beiden Verfahren werden die Triglyceride entweder nach der Kettenlänge oder der Anzahl der Doppelbindungen, also nur in bestimmte Klassen, getrennt.

Die Kombination verschiedener Methoden, z. B. Silbernitrat-DC mit anschließender gas-chromatographischer Bestimmung der einzelnen Fraktionen, ergab zwar schon recht gute Ergebnisse bei der Triglyceridbestimmung pflanzlicher Fette und Öle, jedoch erforderte diese Methodik erheblichen Zeitaufwand.

In den letzten Jahren ist für die qualitative und mit Einschränkungen auch quantitative Analyse von Triglyceriden besonders die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie an Umkehrphasen (RP-HPLC) mit wachsendem Erfolg eingesetzt worden. Die Reserved-Phase-HPLC auf mit C_{18} -Ketten modifiziertem Kieselgel trennt die Triglyceride sowohl nach der Anzahl der Kohlenstoffatome (n) als auch nach der Zahl der Doppelbindungen (m). Die Trennung erfolgt hier also nach der Verteilungszahl C_w ($C_w = n - 2m$), bzw. geht noch darüber hinaus. Mit zunehmender Anzahl der Doppelbindungen werden die Triglyceride schneller von der Säule eluiert. Hierbei treten allerdings unter Umständen noch sogenannte „kritische Partner“, d. h. Triglyceride mit gleicher C_w -Zahl, auf. Diese werden auf der Säule nicht ausreichend voneinander getrennt und ergeben somit einen gemeinsamen Peak im Chromatogramm.

Durch die Wahl geeigneterer Eluenten (z. B. Propionitril) konnte die HPLC der Triglyceride inzwischen soweit optimiert werden, daß auch kritische Triglyceride voneinander getrennt werden. In einigen Fällen gelingt sogar die Fraktionierung von Triglyceriden mit isomeren Fettsäuren (z. B. Öl- und Petroselin-säure). Diese weitergehenden Trennungen erforderten den Ersatz der Verteilungszahl C_w durch ein differenzierteres Identifizierungssystem. In der Gas-Chromatographie der Fettsäuremethylester wird schon seit langer Zeit das Prinzip der ECL-Werte (Equivalent Chain Length) angewandt. Dieses ECL-System ersetzt nun seit einiger Zeit den C_w -Wert bei der HPLC der Triglyceride und gestattet eine genauere Zuordnung der Triglyceride zu den einzelnen Peaks. So liegt beispielsweise ein Triglycerid mit dem ECL-Wert 45,5 im Chromatogramm zwischen den gesättigten Triglyceriden C_{45} und C_{46} . Das ECL-System ist bei der Identifizierung von Triglyceriden den logarithmierten Retentionszeiten völlig analog und gleichwertig.

Mit Hilfe der HPLC lassen sich also die Triglyceride eines Fettes oder Öles nahezu vollständig qualitativ voneinander trennen und es werden für die einzelnen Fette typische Triglyceridmuster erhalten. Im Vergleich zur Capillar-Gas-Chromatographie sind neben der besseren Auftrennung besonders die schonenden Trenntemperaturen (20–40°C) als Vorteil zu nennen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit nach der Detektion die einzelnen Fraktionen unverändert aufzufangen und weiter zu untersuchen.

Anhand von Trennbeispielen wird der heutige Stand der HPLC von Triglyceriden dargestellt und diskutiert. Kriterien für den Fortschritt und eine Optimierung der Trennbedingungen werden unter den folgenden Gesichtspunkten aufgezeigt:

Trennmechanismen und Elutionsregeln, hier vor allem C_w - und ECL-Werte; Detektion und Detektortypen: UV-, IR- und RI-Detektor; Einfluß der Eluenten und Elutionsgeschwindigkeit auf die Trennung „kritischer Partner“; Trennmaterialien, hier besonders der Einfluß von 5 und 3 μ m bzw. irregulärem und sphärischem Packungsmaterial; Trenntemperaturen: Möglichkeit zur Trennung von Fetten mit hohem Anteil an gesättigten Triglyceriden durch temperaturprogrammierte HPLC; quantitative Aspekte.

Für die HPLC der Triglyceride hat sich die Trennung auf RP-18-Material mit Propionitril als Fließmittel und RI-Detektion als leistungsstarke und überlegene Methode erwiesen. Neben einer nahezu 100%igen Information über die qualitative Triglycerid-Zusammensetzung eines Fettes oder Öles liefert diese Methode auch quantitativ bessere Ergebnisse als die Gas-Chromatographie.

Fresenius Z Anal Chem (1986) 324:216
© Springer-Verlag 1986