

Chromatographische Qualitätsuntersuchungen natürlicher Öle und Fette

Dr. Christian Dauwe, Dr. Guenter Reinhold, Polymer Standards Service, Mainz, Dr. Christian Gertz, Chemisches Untersuchungsamt, Hagen

Warum sich die Gelpermeationschromatographie (GPC) für die Analytik von Fetten im Hinblick auf Hydrolyse, Oxidation und thermische Behandlung hervorragend eignet, zeigt der hier vorliegende Artikel.



Pflanzliche und tierische Öle und Fette sind essenzielle Bestandteile der menschlichen Ernährung und unterliegen deshalb strengen Kontrollen. Abhängig von der Vorbehandlung oder Lagerung der Öle und Fette ändert sich deren Qualität und Zusammensetzung. Hierzu gehören beispielsweise die Hydrolyse der Fette (Triglyceride) zu freien Fettsäuren und Diglyceriden. Die Einwirkung von Sauerstoff auf ungesättigte Doppelbindungen führt zur Bildung von Peroxiden, die weiter zu Aldehyden und anderen Oxidationsprodukten reagieren können. Thermische Behandlungen von Ölen und Fetten bei erhöhten Temperaturen während der Raffination [1] oder in der Friteuse führen zur Bildung von Oligo- und Polymeren [2].

Die Untersuchung des Hydrolysezustandes erfolgt häufig über die Bestimmung des Gehaltes der freien Säuren bzw. Säurezahl (KOH-Titration der Fettsäure im Öl). Primärprodukte der Autoxidation werden u. a. über den Peroxidgehalt iodometrisch erfasst (Oxidation von Iodid durch Peroxide und Titration des gebildeten Iods). Der Anteil der polymerisierten Triglyceride im Fett oder Öl lässt sich mit der Größenausschlusschromatographie – GPC (auch als size exclusion chromatography, SEC, bezeichnet) erfassen (chromatographische Trennung der einzelnen Fettbestandteile nach molekularer Größe). Die GPC liefert darüber hinaus auch Informationen über den Gehalt freier Fettsäuren und – bei ausreichend hoher chromatographischer Auflö-

sung – auch den Gehalt an Mono- und Diglyceriden.

■ Experimentelles

Datenaufnahme: Die Software PSS WinGPC 6.20 steuert ein isokratisches HP 1100-HPLC-System. Detektoren: UV 230 nm, UV 280 nm, Shodex RI 71. Eluent: THF, 1,00 ml/min, Probenkonzentration: 35 mg/ml Eluent, Injektionsmenge: 20 µl, T: 20 °C, verwendete GPC-Säulen: PSS SDV 50 Å, 5 µm, 2 × 8 × 300 mm, verwendete Molmassenstandards: PSS Polystyrol ReadyCals, nie-

dermolekular, $M_p = 162\text{--}67\,500$ D. Porosimetrie: Die Berechnung erfolgte mit der Software PSS Inv.GPC aus der gemessenen Polystyrol-Kalibrationskurve in THF.

■ GPC – Das Phasensystem

GPC-Trennungen sind chromatographische Trennungen, die nach dem reinen Größenausschluss-Prinzip ablaufen. Um dies zu erreichen, benötigt man ein poröses chromatographisches Material, in dem der Analyt nicht adsorbiert wird, so dass die Trennung ausschließlich nach

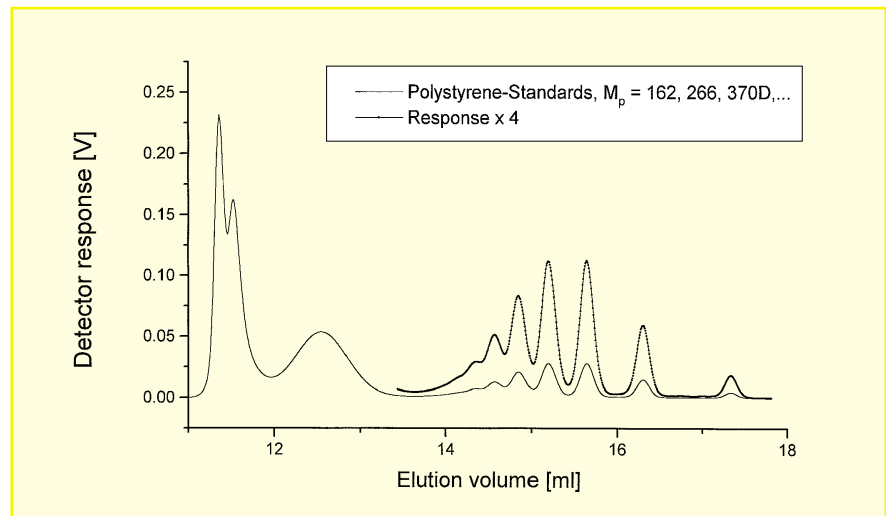
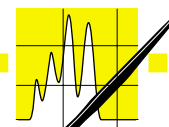


Abb. 1: Elutionsprofil eines PSS Polystyrol ReadyCal small, gemessen auf zwei GPC-Säulen: PSS SDV 50 Å, 5 µm, 2 × 8 × 300 mm, Eluent: THF 1,00 ml/min, Polystyrol-Standards (gezählt von hohen zu geringen Elutionsvolumina): 162, 266, 370, 474, 578, 682, 786, 2950, 10 400, 14 800 D.

Tab. 1:

Molmasseninformationen aus der GPC-Untersuchung von Ölen, basierend auf Molmassenkalibration mit Polystyrol-Kalibrationsstandards PSS RadyCal's und basierend auf Fettsäurederivat-Kalibration.

Elutionsvolumen [ml]	M [D] Polystyrolkalibration	M [D] Fettsäurederivatkalibration	M [D] Theorie (Referenzmolekül)
12,7	2640	1660	1783 (Glycerintristearat-Dimer)
13,5	1340	888	891,5 (Glycerintristearat)
14,0	940	644	625,0 (Glycerindistearat)
15,5	410	277	284,5 (Stearin)



AUFSÄTZE

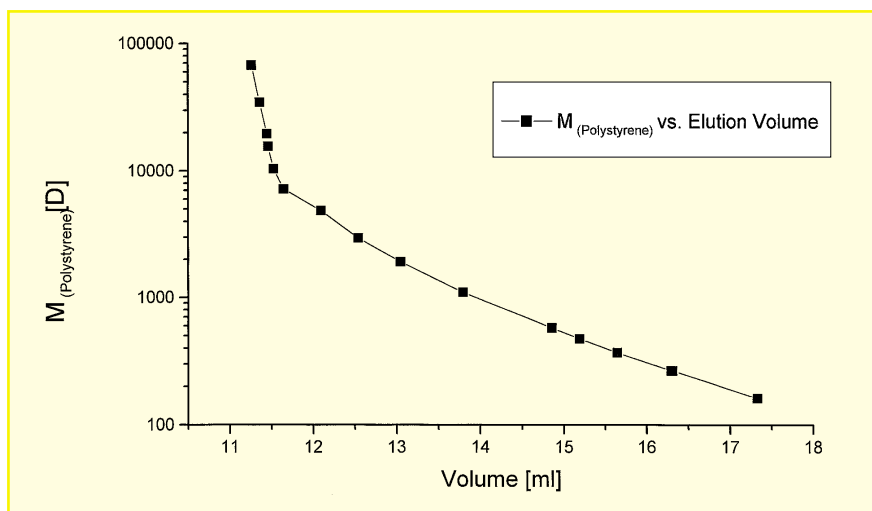


Abb. 2: Polystyrol-Kalibrationskurve von PSS SDV 50 Å, 5 µm, 2 × 8×300 mm-Säulen, Eluent: THF 1,00 ml/min. Datenpunkte: 18 molekular eng verteilte Polystyrol-Kalibrationsstandards, $M_p = 162$ bis 67 500 D.

molekularer Größe erfolgt. Für Analysen von Fetten und Ölen erreicht man dies mit porösen Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymeren-Phasen und THF (Tetrahydrofuran) (Eluent). Zur Erzielung einer hohen chromatographischen Auflösung sollte die Porengröße des Separationsgels an die Größe der Analyte angepasst sein. Hauptbestandteil der Fette/Öle sind Triglyceride. Oligomere von Triglyceriden und Spaltprodukte von Triglyceriden treten in geringeren Mengen auf.

Für typische GPC-Trennungen handelt es sich bei Fetten/Ölen um relativ kleine Analyte, so dass hier kleinporige GPC-Säulen optimale Trennergebnisse liefern sollten. Getestet wurden PSS SDV 50 Å, 5 µm, 2 × 8×300 mm Säulen,

deren theoretische Bodenzahl mittels BHT auf 90 000/m bestimmt wurde.

Der GPC-Separationsbereich – Kalibrationskurve

Zur Beschreibung der Abhängigkeit des Elutionsvolumens von Molmassen bzw. der molekularen Größen wurden entsprechende Kalibrationskurven aufgenommen. Hierfür wurden drei unterschiedliche Mischungen eng verteilter Polystyrolstandards (PSS Polystyrol ReadyCal small) auf dem GPC-System vermessen. Anschließend wurden die Elutionsvolumina gegen die molekulare Masse aufgetragen (Abb. 1).

Die Auftragung der molekularen Masse gegen das Elutionsvolumen liefert

die GPC-Kalibrationskurve. Diese gibt den Zusammenhang zwischen der Molmasse eines Kalibrationsstandards beziehungsweise seiner molekularen Größe vom Elutionsvolumen wieder. Das Ergebnis für das verwendete GPC-System ist in Abb. 2 dargestellt.

Die Porengrößenverteilung des GPC-Materials wurde mittels inverser GPC aus dieser Kalibrationskurve berechnet (PSS Inv.GPC) und ist in Abb. 3 dargestellt. Der so ermittelte Porendurchmesser beträgt 3,5 nm. Diese Größe entspricht derjenigen von Triglyceriden in Lösung, weshalb wir erwarten durften, dass sich dieses Material gut für Triglyceridanalysen eignet.

Ergebnisse

Als repräsentative Beispiele von GPC-Untersuchungen zur Unterscheidung und Bewertung verschiedener Öle wurden die folgenden fünf Öle und Fette herangezogen.

(Öl, Herstellerangaben zum Öl):

1. Distelöl, kalt gepresst
2. Sonnenblumenöl, etwa 60 % Linolsäure, Ölmühle
3. Olivenöl, kalt gepresst
4. Fritierfett alt (20 Fritierzyklen)
5. Fritierfett neu, pflanzliche Fette und z. T. gehärtete pflanzliche Öle.

Die Ergebnisse dieser Trennung sind in Abb. 4 dargestellt. Deutlich sind die von uns untersuchten Öle und Fette unterscheidbar. Als Hauptbestandteil erscheinen die Triglyceride mit dem Elutionsvolumen 13,5 ml. Mehr als 90 % der Gesamtfläche aller Peaks der untersuchten Öle entfallen hierauf. Ein grosser Teil der Fettsäuren im Triglyceridverbund sind Fettsäuren mit C_{18} -Ketten. Dementsprechend kalkulieren wir hier als Modellmolekül Glycerintristearat ($M = 891,5$ D). Die Molmassenkalibration auf Polystyrolbasis führt allerdings zu einer Molmasse von 1340 D. Der Peak bei 12,7 ml entspricht einer Polystyrol-Molmasse von 2640 D, also der doppelten Molmasse des Hauptbestandteils. Hier handelt es

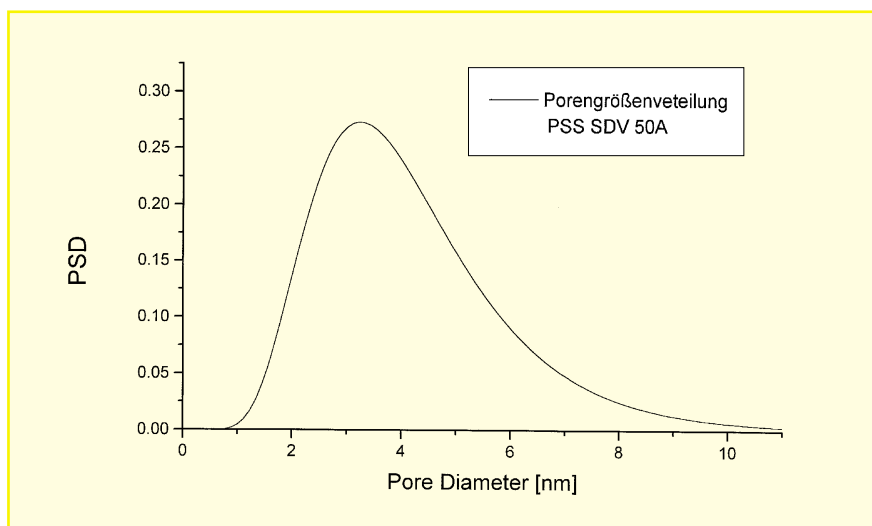


Abb. 3: Porengrößenverteilung der PSS SDV-50Å-GPC-Säule, berechnet aus der Kalibrationskurve (Abb. 2) mit der Software PSS Inv.GPC: mittlerer Porendurchmesser: 3,5 nm.

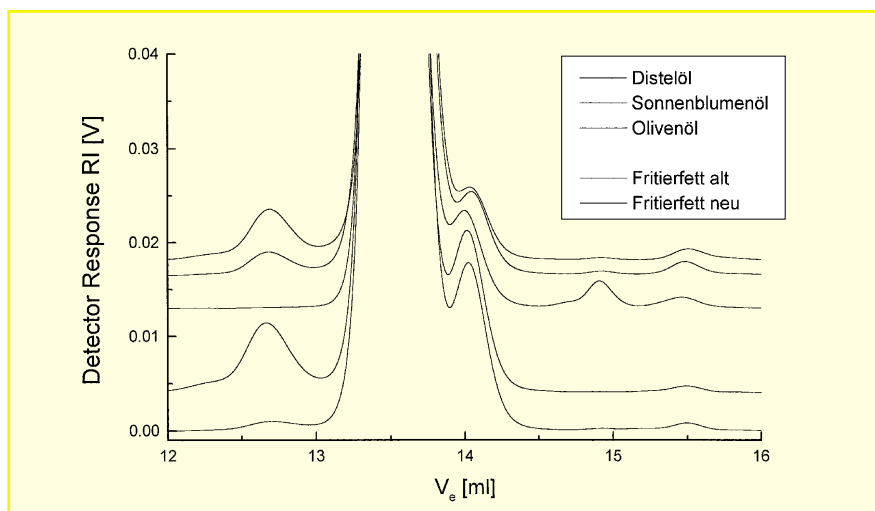


Abb. 4: GPC-Trennung unterschiedlicher Öle. PSS SDV 50 Å, 5 µm, 2 × 8 × 300 mm; THF, 1,00 ml/min, Detektion: RI, 20 µl Injektionsvolumen, Probenkonzentration: 35 mg/ml, Detector Response: intensitätsstärkstes Signal × 10. Die oberste Kurve entspricht Distelöl, die unterste Fritierfett neu.

sich dementsprechend um das Dimer, dessen „wahre“ Molmasse allerdings 1783 D beträgt. Die Anwendung der Polystyrol-Kalibrationskurve auf die niedermolekularen Bestandteile führt zur Zuordnung des 14,0-ml-Peaks zum Diglycerid und zur Zuordnung des 15,5-ml-Peaks zur freien C₁₈-Carbonsäure.

Diese Abweichung der Polystyrol referenzierten Molmassen mit den erwarteten Molmassen beruht auf geringen Unterschieden in der molekularen Größe von Triglyceriden und Polystyrolen – bei identischen Molmassen. Trotz dieser Fehler eignet sich die durchgeführte Polystyrolkalibration zur Peakzuordnung. Als Molmassenreferenzierungsmethode

hat sich die Polystyrolkalibration deshalb für nahezu sämtliche GPC-Messungen in THF etabliert. Zur Verfeinerung der Molmassenbestimmung wurde darüber hinaus eine Kalibrationskurve auf Basis der Fettsäurederivat-Molmassen aufgenommen. Tab. 1 zeigt die Gegenüberstellung der erhaltenen Molmassen aus Fettsäurederivat und Polystyrolkalibration. Die hieraus ermittelten Molmassen sind ebenfalls in Tab. 1 dargestellt und zeigen naturgemäß eine sehr gute Übereinstimmung mit den erwarteten Molmassen.

Aus der Molmassenkalibration des GPC-Systems, beispielsweise mit den eng verteilten Polystyrolstandards PSS ReadyCals und dem Elugramm des un-

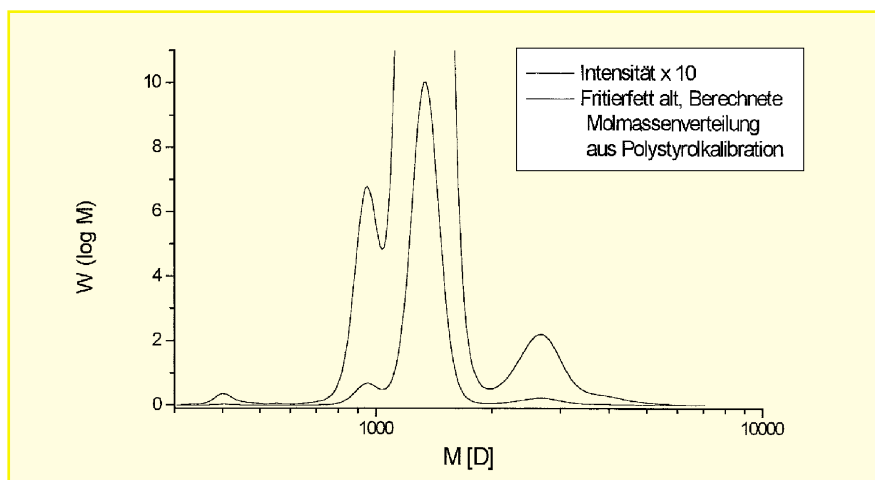


Abb. 5: Molmassenverteilung des untersuchten gebrauchten Fritierfettes (Molmasse referenziert auf Polystyrol, andere Kalibrationsstandards können geringfügig unterschiedliche Ergebnisse liefern). Grundlage der Kalkulation ist die Polystyrol-Kalibrationskurve aus Abb. 2 und das Elugramm (Intensitätsverteilung RI) des gebrauchten Fritierfettes aus Abb. 4. Software: PSS WinGPC 6.20.

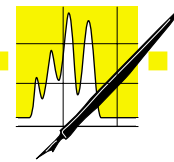
tersuchten Öls (RI-Detektion), lässt sich mittels geeigneter GPC-Software die Molmassenverteilung berechnen und graphisch darstellen. Andere Kalibrationsstandards können geringfügig abweichende Molmassen liefern. Das Ergebnis dieser Untersuchung, beruhend auf Polystyrolkalibration und RI-Detektion am Beispiel des gebrauchten Fritierfettes, ist in Abb. 5 dargestellt.

In Ölen und Fetten finden wir neben gesättigten Fettsäuren auch eine Vielzahl einfach und mehrfach ungesättigter Fettsäuren als Triglyceride, die intra- bzw. intermolekular durch Autoxidation bei niederen Temperaturen bzw. säurekatalytisch bei höheren Temperaturen Polymerisationsprodukte bilden. Werden hierbei konjugierte Doppelbindungssysteme gebildet, so sollte sich dies durch starke längerwellige Absorption bemerkbar machen. Eine häufig genutzte Detektion sind hier 280 nm für dreifach konjugierte Doppelbindungen. Bei der GPC-Untersuchung des mehrfach genutzten Fritierfettes zeigte sich deutlich, dass der hochmolekulare Fettbestandteil (13,5 ml, dimeres Triglycerid) und der Hauptbestandteil (13,4 ml, monomeres Triglycerid) deutliche Unterschiede in der UV-Absorption bei den beiden untersuchten Wellenlängen aufweisen. Der Vergleich der 280-nm-UV-Absorption (Abb. 6) mit der entsprechenden RI-Signal-Intensität (Abb. 4) ergibt einen erhöhten Anteil konjugierter Doppelbindungen für das dimere Produkt.

Aus den gezeigten GPC-Untersuchungen können beispielsweise molekulare Strukturinformationen (z. B. Doppelbindungscharakter) und molekulare Größenverteilung mit nur einer Messung ermittelt werden. Deshalb eignet sich diese Methode insbesondere für Öl-Originalitätsprüfungen.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Artikel zeigt deutlich, welche Möglichkeiten die größenausschlusschromatographische Analytik von Ölen und Fetten bietet. Diese Methode liefert mit nur einer Messung eine Vielzahl von Informationen über die Zusammensetzung und strukturelle Veränderung von Fetten und Ölen. Die Molmassenverteilung wird über die GPC in THF mit RI-Detektion erhalten, die Molmassenzuordnung erfolgt anhand des Hauptpeaks (Triglycerid) und kann



AUFsätze

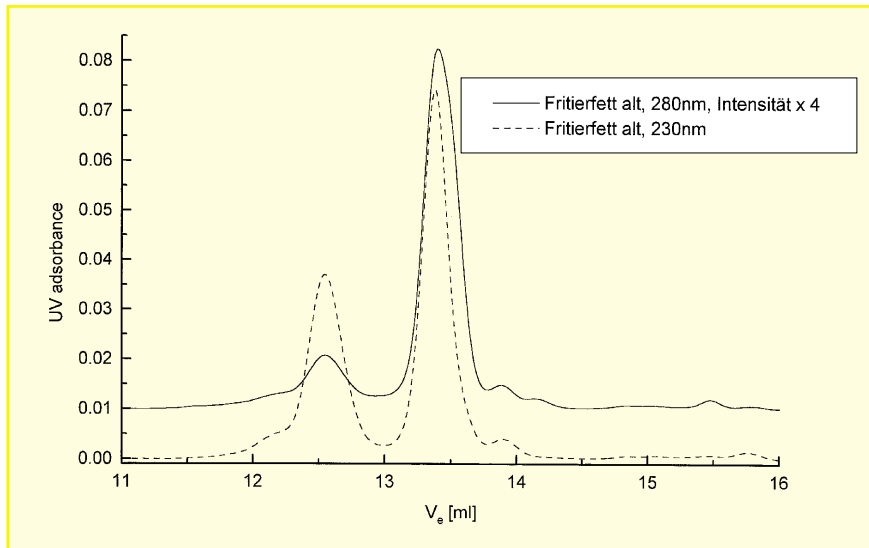


Abb. 6:
GPC-Untersuchung am gebrauchten Fritierfett (vgl. Abb. 4): PSS SDV 50 Å, 5 µm, 2 × 8×300 mm; THF 1,00 ml/min, Injektionsvolumen: 2 µl, UV 230 und 280 nm.

mit geeigneten Kalibrationsstandards für weitere Bestandteile verfeinert werden.

Strukturelle Informationen über Mehrfachbindungen als Folge thermischer Belastung erhält man durch Einsatz eines UV-Detektors, der bei unterschiedlichen Wellenlängen eingesetzt wird.

Wegen des hohen Informationsgehaltes der GPC bei Öl- und Fettuntersuchungen wurde diese Methode fester Bestandteil der DGF-Methodensammlung (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V.) [3] und hat sich als wichtiger Be-

standteil von Speiseöl- und -fettuntersuchungen etabliert. Dabei verwendet die DGF-Methode die RI-Detektion, um Differenzen in der Absorption durch einfach- und mehrfach-ungesättigte Systeme auszuschließen und nach Normalisation der Flächen eine Auswertung vorzunehmen [4].

Zur Unterdrückung des Triglyceridhauptsignals ist es bei Ölen, die wie Raffinate nur geringe Mengen an dimeren Triglyceriden enthalten, erforderlich, die monomeren Triglyceride säulenchroma-

tographisch an Silica von den polaren Komponenten, zu denen auch die di- und oligomeren Triglyceride gehören, vorher abzutrennen [5].

Literatur

- [1] Ch. Gertz, S. Klostermann; A new analytical procedure to differentiate virgin or non-refined from refined vegetable fats and oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2000, 329-336.
- [2] M. C. Dobarganes, M. C. Perez-Camino; Non-polar dimer formation during thermooxidation of edible fats, *Fat Science Technology* 89 (1987) 216-220.
- [3] Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. 2. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2000.
- [4] DFG-Einheitsmethode C-III 3c (Entwurf 2000).
- [5] DFG-Einheitsmethode C-III 3d (Entwurf 2000).

Kontakt

Christian Dauwe: E-mail: cdauwe@polymer.de
Christian Gertz: E-mail: gertz@cua.stadt-hagen.de