

- Press, New York. — 70. RIDDLE, M. C., J. Clin. Invest. 8, 69 (1930). — 71. OPSAHL, R., Acta med. Scand. 102, 611 (1939). — 72. PATRIDGE, R. E. H. und J. J. R. DUTHIE, Brit. Med. J. 1, 89 (1963). — 73. TAYLOR, K. B., Lancet 2, 106 (1959). — 74. FREIREICH, E. J., J. F. ROSS, T. B. BAYLES, C. P. EMERSON und S. C. FINCH, J. Clin. Invest. 36, 1043 (1957). — 75. LEWIS, S. M. und I. H. PORTER, Ann. Rheumat. Dis. 19, 54 (1960). — 76. PABENBERG, K., Klin. Wschr. 39, 522 (1961). — 77. MANDEL, P. und P. CHAMBON, Bull. Soc. Chim. biol. 41, 989 (1959). — 78. SCHWEIGER, H. G., S. RAPAPORT und E. SCHÖLZEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 313, 97 (1958). — 79. SCHWEIGER, H. G., Int. Rev. Cytol. 13, 135 (1962). — 80. SCHWEIGER, H. G., H. J. BREMER und E. SCHWEIGER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 332, 17 (1963). — 81. CARLSTRÖM, B., O. LÖVGREN und B. SJÖRGEN, Ann. Rheumat. Dis. 8, 293 (1949). — 82. CARLSTRÖM, B., O. LÖVGREN und B. SJÖRGEN, Acta Med. Scand. 110, 230 (1942). — 83. CARLSTRÖM, B., O. LÖVGREN und B. SJÖRGEN, Acta Med. Scand. 115, 568 (1943). — 84. CARLSTRÖM, B., O. LÖVGREN und B. SJÖRGEN, Klin. Wschr. 20, 793 (1941). — 85. LEHNINGER, A. L., J. biol. Chemistry 54, 309 (1944). — 86. SCHMID, J., Med. klin. Wschr. f. Klinik u. Praxis 48 (1953) Nr. 36. — 87. VOGT, M., J. Physiol. 108, 45 (1949). — 88. STONER, H. B. und H. N. GREEN, Brit. Exper. Path. 31, 603 (1950). — 89. RUSKIN, S. L., Amer. J. Digest. Dis. 13, 311 (1946). — 90. NETTELBLADT, E. und B. M. SANDELL, Ann. rheum. Dis. London, 22, 269 (1963). — 91. ELLIOT, W. H. und B. M. SANDELL, J. biol. Chemistry 201, 661 (1953). — 92. GYÖRKI, J. und B. M. SANDELL, Nord. med. 62, 1788 (1959). — 93. RAPAPORT, S., G. M. GUEST und M. WING, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 57, 344 (1944). — 94. HOFMANN, E. G. G. und S. RAPAPORT, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 304, 157 (1956). — 95. LÖHR, G. W., H. D. WALLER, O. KARGES, B. SCHLEGEL und A. A. MÜLLER, Klin. Wschr. 36, 1008 (1958). — 96. RAPAPORT, S., J. Clin. Invest. 26, 591 (1947). — 97. GABRIO, B. W., D. M. DONOHUE und C. A. FINCH, J. Clin. Invest. 34, 1509 (1955). — 98. JORGENSEN, S., Acta pharmac. tox., K'hrn 13, 102 (1957). — 99. KÖLLE, G., Zschr. Rheumaforsch. 21, 185 (1962). — 100. FEIGELSON, P. H. und M. FEIGELSON, J. biol. Chemistry 238, 1073 (1963). — 101. GERLACH, E., A. FLECKENSTEIN und K. J. FREUNDT, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen, Tiere, 263, 682 (1957). — 102. BISHOP, C., J. biol. Chemistry 236, 1778 (1961). — 103. ZIMMERMANN, E. E. und B. MAGASANIK, J. biol. Chemistry 239, 293 (1964). — 104. MAGER, J. und B. MAGASANIK, J. biol. Chemistry 235, 1474 (1960). — 105. GUARINO, A. J. und G. YÜREGIER, Biochim. biophysics Acta (Amsterdam) 36, 157 (1959). — 106. BIWAS, B. B. und R. ABRAMS, Arch. Biochem. Biophysics 92, 507 (1961). — 107. LOWY, B. A. und E. R. JAFFE, G. A. VANDERHOFF und I. M. LONDON, J. biol. Chemistry 230, 409 (1958). — 108. CONWAY, E. J. und R. COOKE, Biochem. J. 33, 479 (1939). — 109. MILLIS, G. C. und L. B. SUMMERS, Arch. Biochem. Biophysics 84, 7 (1959). — 110. HUENNEKENS, F. M., E. NURK und B. W. GABRIO, J. biol. Chemistry 227, 971 (1956). — 111. SANDBERG, A., und G. R. LEE, CARTWRIGHT, G. E. und M. M. WINTROBE, J. Clin. Invest. 34, 1823 (1955). — 112. RUBENSTEIN, D. und O. F. DENSTADT, Canad. J. Biochem. Physiol. 34, 927 (1956). — 113. LIEBERMANN, I., J. Amer. chem. Soc. 78, 251 (1956). — 114. BRAUNSTEIN, A. E. und G. I. VILENKINA, Biochimica 23, 887 (1958). — 115. HENDERSON, J. F. und G. A. LE PAGE, J. biol. Chemistry 234, 3219 (1959). — 116. LAJTHA, L. G. und J. R. VANE, Nature (London) 182, 191 (1958). — 117. THEIL, E. C. und ST. ZANNENHOF, J. biol. Chemistry 238, 3058 (1963). — 118. DUNN, D. B. und J. D. SMITH, Biochem. J. 68, 627 (1958). — 119. DUNN, D. B., J. D. SMITH und P. F. SPAHR, J. molecular Biol. 2, 113 (1960). — 120. LITTLEFIELD, J. W. und D. B. DUNN, Biochem. J. 70, 642 (1958). — 121. HADDOX, C. H. jr. und M. S. SASLAW, J. Clin. Invest. 42, 435 (1963). — 122. BETT, J. M., Ann. rheumat. Dis., London 21, 63 (1962). — 123. SPIERA, H., Arthr. Rheum. 6, 364 (1963). — 124. DION, H. W., D. G. CALKINS und J. J. PFIFFNER, J. Amer. chem. Soc. 76, 948 (1954). — 125. BROWN, F. B., J. C. CAIN, D. E. GANT, L. F. J. PARKER und E. L. SMITH, Biochem. J. 59, 82 (1955).

Dozent Dr. med. J. Schmid
Wien XIX, Österreich
Scheibengasse 13

Schnellmethode zur Darstellung von Fettsäuremethylestern für die gaschromatographische Analyse

Von M. DOSS und K. OETTE

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. Klenk)

(Eingegangen am 13. August 1964)

Für die gaschromatographische Analyse wird eine quantitative Mikromethode beschrieben, die die Herstellung von Methylestern aus Glyceriden, Glycerinphosphatiden und Cholesterinestern durch Umesterung mit Natrium-methylat innerhalb von fünf Minuten gewährleistet.

Micro quantities of methyl esters for gas chromatography can be prepared quantitatively in five minutes from glycerides, glycerophosphatides and cholesterol esters by transesterification with sodium methylate.

Fettsäuren werden im allgemeinen als Methylester gaschromatographisch analysiert, zu deren Darstellung Veresterungs- und Umesterungsmethoden zur Verfügung stehen. Zur Veresterung von freien Fettsäuren sind folgende Verfahren beschrieben worden:

1. Die säure-katalysierte Veresterung mit Methanol-HCl für langkettige (1) und mit 2-Chloräthanol-HCl für kurzkettige Fettsäuren (2).

2. Die Veresterung mit Diazomethan (3).

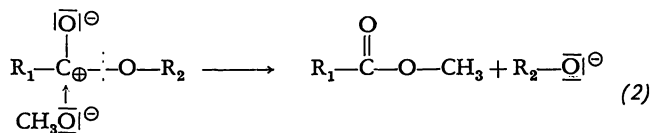
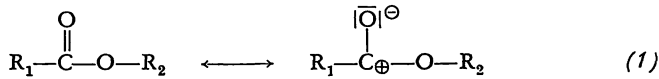
3. Die Veresterung mit Methanol-Bortrifluorid (4).

Für die Umesterung verwendet man vorwiegend Methanol-HCl (H_2SO_4). Daneben sind alkali-katalysierte Methoden geübt worden (5—9).

Im Rahmen von Untersuchungen an Spingolipoiden (10) zeigte sich, daß esterartig verknüpfte Fettsäuren rasch mit 0,1 n methanolischer NaOH als Methylester

abgespalten wurden. Die Schnelligkeit der Reaktion veranlaßte uns, die alkali-katalysierte Umesterung auf ihre Brauchbarkeit als Routinemethode für die Gaschromatographie zu prüfen. Man erwartet von einer derartigen Methode eine schnelle und quantitative Umsetzung mit möglichst geringem apparativen Aufwand.

Die alkali-katalysierte Umesterung mit Na-Methylat oder methanolischer NaOH ist eine bekannte Reaktion. Der Ester existiert in zwei mesomeren Grenzformen, deren labilere sich durch Aufrichtung der C=O-Doppelbindung bei gleichzeitigem Auftreten einer Elektronenlücke am zugehörigen C-Atom auszeichnet (Formel 1). Vermutlich wird die Ausbildung der labileren Form des Esters durch Alkali begünstigt, wenn auch nicht in dem Ausmaß wie bei der säure-katalytischen Umesterung. Das Alkali katalysiert durch Förderung der Bildung der nucleophilen CH_3O^- -Gruppe deren Anlagerung an das positiv geladene C-Atom des Esters. Der entstandene Komplex setzt sich infolge des großen Überschusses an Methylierungen schnell im Sinne der Reaktion (2) um.



Die alkali-katalysierte Umesterung wurde bereits von KLENK und RENNKAMP (5) im Jahre 1945 zur Abtrennung einer der Rohsphingomyelinfraktion beigemischten Glycerinphosphatid-Verunreinigung benutzt, wobei sich esterartig gebundene Fettsäuren als Äthylester abspalteten. KUEMMEL (6) beschrieb 1958 die Umesterung von Fetten und Ölen durch methanolische NaOH. Die Anwendung von Natriummethylat zur Gewinnung von Methylestern für die gaschromatographische Analyse wurde von LUDDY und Mitarbeitern (7) 1960 mitgeteilt. In fast unveränderter Weise fand dieses Verfahren weitere Verbreitung (8, 9). Jedoch bietet die von LUDDY beschriebene Art der Anwendung gegenüber der Umesterung mit Methanol-HCl keinen entscheidenden Vorteil mit Ausnahme der Umesterung von Triglyceriden. Unsere Versuche ergaben, daß sich die Reaktionszeit der Umesterung für alle in Frage kommenden Lipide erheblich verkürzen läßt, was eine Vereinfachung des apparativen Aufwandes mit sich bringt. Deshalb eignet sich das neue Verfahren speziell für die Gaschromatographie.

Methodik

Reagenzien:

0,5 n Na-Methylat (Stammlösung von 1,15 g metallischen Natriums in 100 ml Methanol p. a. unter Kühlung); 0,5 n wäßrige Salzsäure; Petroläther (Kp. 30–60°)/Diäthyläther 9 : 1 (V/V); Chloroform; Benzol; Natriumsulfat.

Apparatur¹⁾:

Ein Reaktionsgefäß (Normalschliff 19/26) mit Kühlfingereinsatz; Maße und Ausführung siehe Abbildung 1. Das Reaktionsgefäß wird nach der Umesterung mit Stopfen als Extraktionsgefäß verwendet.

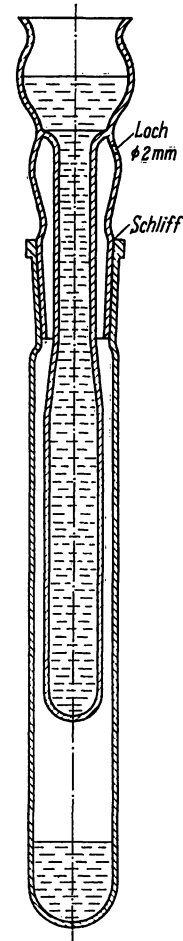


Abb. 1

Umesterungs-Apparatur¹⁾: Reaktions- und Extraktionsgefäß mit Kühlfingereinsatz; Maßstab 1:2

Ausführung

A) Umesterung von Gemischen aus Glyceriden, Glycerinphosphatiden und Cholesterinestern oder reinen Cholesterinestern

5–10 mg Substanz, bei kleineren Mengen von Cholesterinestern im Gemisch bis 15 mg, werden in das Reaktionsgefäß der Abbildung 1 eingeführt; falls in Lösung einpipettiert wurde, wird das Lösungsmittel durch N_2 -Strom abgeblasen; Substanz wird in 0,4 ml Chloroform oder Benzol sorgfältig am Boden gelöst und mit 4 ml 0,5 n Na-Methylat versetzt. Eine eventuelle Ausfällung von Lipoid geht in der Hitze wieder in Lösung. Nach Zugabe eines Siedesteines und Einsetzen des mit kaltem Wasser gefüllten Kühlfingers läßt man die Probe 5 Min. im Ölbad von 100° sieden. Eine Nebenreaktion mit Chloroform, die zur Ausfällung von NaCl führt, stört die Umesterung nicht. Man kühlt das Gefäß ab, gibt 4 ml 0,5 n wäßrige HCl und 12 ml Aqua dest. hinzu und schüttelt die Methylester mit 10 ml Petroläther/Diäthyläther 9 : 1 kräftig aus. Die untere wäßrige Phase wird mit einer Saughütchen-Pipette (ausgezogenes Glasrohr) abgezogen und verworfen. Die petrolätherische obere Phase wird in demselben Gefäß zweimal mit 5 ml

¹⁾ Ernst Zimmermann, Glastechnische Werkstätten, 5 Köln-Lindenthal, Joseph-Stelzmann-Str. 52.

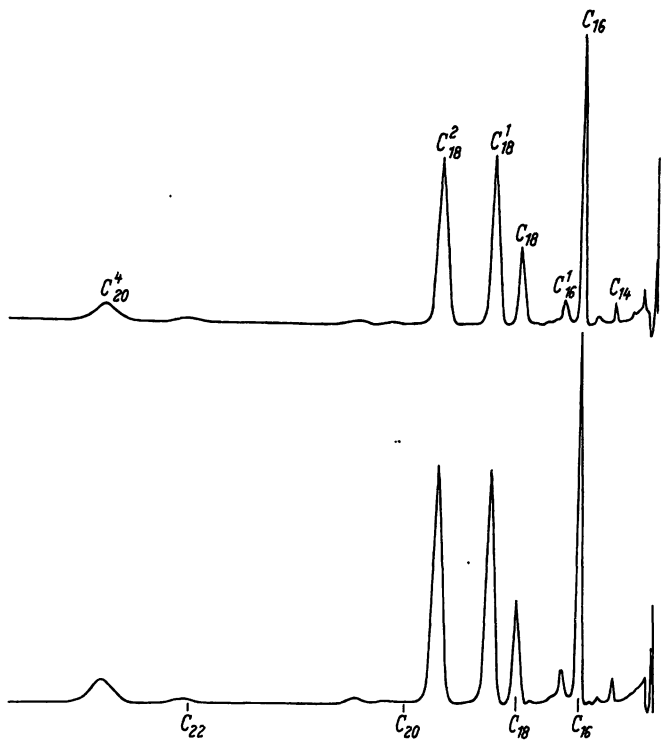


Abb. 2

Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus Serumlipoiden. Obere Kurve: Umgeestert mit Methanol-6% HCl. Untere Kurve: Umgeestert mit Na-Methylat. Gaschromatograph der Fa. Pye, Cambridge, England. Säule $134 \times 0,4$ cm; Säulenfüllung 20% EGS auf Kieselgur 0,16–0,20 mm (80–100 mesh); Temperatur 175° ; Trägergas Argon; Durchflußgeschwindigkeit 60 ml/Min.; Zellspannung 480 V

Aqua dest. gewaschen und anschließend mit einer kleinen Menge Natriumsulfat getrocknet. Der Methylesterextrakt wird in ein spitz auslaufendes Reagenzglas überführt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgedampft. Die Probe ist fertig zur gaschromatographischen Analyse.

B) Umesterung von Glyceriden und/oder Glycerinphosphatiden:

5–20 mg werden in das Reaktionsgefäß eingeführt, in 0,4 ml Chloroform oder Benzol gelöst und mit 4 ml 0,25 n Na-Methylat (Stammlösung 1 : 1 mit Methanol verdünnt) versetzt. Das Gemisch wird im Reaktionsgefäß mit Schliffstopfen bei Zimmertemperatur 1–2 Min. kräftig geschüttelt. Dadurch wird das bei Eintragen des Na-Methylats teilweise ausfallende Lipoid unter Umesterung gelöst. Nach Zugabe von 4 ml 0,5 n wäßriger HCl und 12 ml Aqua dest. werden die Methylester wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Falls größere Mengen freies Cholesterin im Methylestergemisch vorliegen und die Gaschromatographie für Methylester und Steroide mit den gleichen Säulen ausgeführt werden, sollte das Cholesterin durch Mikrosublimation (1) oder Chromatographie an kurzen Kieselsäuresäulen abgetrennt werden (7). Als eine sehr saubere und schnelle Methode hat sich auch die präparative Dünnschichtchromatographie erwiesen. Die Auftrennung wird an Kieselgel-H¹-Platten, 0,5 mm Schichtdicke mit Petroläther/Diäthyläther (9 : 1) (Abb. 3) vorgenommen. Zur weiteren Aufarbeitung hat sich das Schichtabsaug- und Elutionsgerät²⁾ von GOLDRICK und HIRSCH (11) bewährt.

¹⁾ Fa. E. Merck, Darmstadt.

²⁾ Ernst Zimmermann, Glastechnische Werkstätten, 5 Köln-Lindenthal, Joseph-Stelzmann-Str. 52.

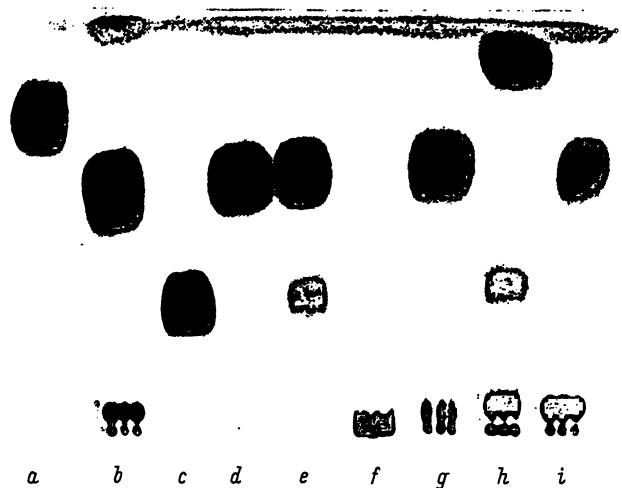


Abb. 3

Dünnschichtchromatogramm der mit Na-Methylat zu Methylestern (ME) umgeesterten Lipide.

Als Test diente ein mit Methanol-HCl umgeestertes Erdnuß-Triglycerid (TG).

a) Cholesterinester (CE); b) CE-ME; c) TG; d) TG-ME; e) Test-ME; f) Leberglycerinphosphatid (GP); g) GP-ME; h) Serumlipide (SL): am Start GP, darüber Cholesterin, TG und CE; i) SL-ME, in der Nähe des Startpunktes Cholesterin (vgl. b)

Die gaschromatographische Analyse wird in der üblichen Weise durchgeführt, worüber Tschöpe in dieser Zeitschrift referierte (12).

Dünnschichtchromatographie (13)

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der einzelnen Stoffklassen wurden in vier verschiedenen Lösungsmittelsystemen auf Kieselgel-H-Platten ausgeführt:

1. Petroläther (Kp. $30-60^\circ$)/Äthyläther 9 : 1 (V/V) für Cholesterinester, Triglyceride und Methylester (Abb. 3).
2. 1,2-Dichloräthan/Petroläther/Äthyläther 60 : 35 : 5 für die Trennung von Dimethylacetalen und Methylestern.
3. Petroläther/Äthyläther/Eisessig 70 : 28 : 2 zum Nachweis von freien Fettsäuren.
4. Chloroform/Methanol/Wasser 65 : 25 : 4 zum Nachweis von Glycerinphosphatiden, Cerebrosiden und Sulfatiden.

Es liefen jeweils Testsubstanzen mit. Als Sprühreagenz wurde ausschließlich 50-proz. wäßrige Schwefelsäure verwendet. Organische, nicht flüchtige Substanzen stellten sich durch anschließendes Erhitzen der Platten auf 200° als schwarze Flecke dar (Abb. 3). Die Empfindlichkeit der Sichtbarmachung wurde mit einer Mischung von Cholesterinpalmitat/Stearinsäuremethylester (1 : 100) geprüft. Bei $50 \mu\text{g}$ aufgetragener Mischung konnten noch $0,5 \mu\text{g}$ Cholesterinester erkannt werden. Diese Empfindlichkeit ist die Grundlage der in Tabelle 2 angegebenen Werte.

Ergebnisse und Diskussion

Vergleich der Standardmethoden mit der säure-katalysierten Umesterung

Aus Tabelle 1 und Abbildung 2 geht hervor, daß die quantitativen Daten beider Methoden innerhalb der in der Literatur (14) diskutierten Fehlergrenze liegen. Wir haben, um die Beeinträchtigung einer Methylester-Analyse durch die Anwesenheit freien Cholesterins zu eruieren, eine Mischung von Triglycerid-Methylestern und Cholesterin im Verhältnis 1 : 1 chromatographiert.

Tab. 1.

Vergleich der alkali- mit der säure-katalysierten Umesterung in Flächenprozenten des Gaschromatogramms

ME ¹⁾	Serumlipoid-Methylester		Triglycerid-Methylester			ME + Cholesterin ²⁾ (1 : 1)
	Methanol-6% HCl	Na-Methylat Methode A	Methanol-6% HCl	Na-Methylat Methode A	Na-Methylat Methode B	
14 : 0	0,85	0,75	—	—	—	—
16 : 0	22,85	21,07	10,71	10,43	9,98	10,51
16 : 1	1,91	2,07	—	—	—	—
18 : 0	9,37	9,37	3,42	4,50	3,21	3,89
18 : 1	25,72	25,97	54,22	54,01	52,44	53,98
18 : 2	31,71	32,85	27,22	25,05	29,06	25,19
18 : 3	—	—	1,42	1,55	1,71	1,96
20 : 0	—	—	1,52	1,45	1,22	1,57
20 : 4	7,60	7,81	—	—	—	—
22 : 0	—	—	1,49	3,01	2,37	2,90

¹⁾ Anzahl der C-Atome der Fettsäure; Anzahl der Doppelbindungen.²⁾ Die Beimischung von Cholesterin zum ME zeigte keinen signifikanten Einfluß auf die Analyse (s. Text).

Abkürzung: ME = Methylester.

Die Proben wurden in Chloroform gelöst injiziert. Das Ergebnis (Tab. 1) zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber cholesterinfreiem Methylester.

Während durch die säure-katalysierte Überführung in Methylester auch die amidartig gebundenen Säuren (5 Stunden kochen) und die freien Fettsäuren (2 Stunden kochen) verestert und die Acetale in Dimethylacetale umgesetzt werden, zeigte sich in unseren Versuchen mit Na-Methylat unter den beschriebenen Bedingungen an Cerebrosiden, Acetalen und freien Fettsäuren, daß sowohl die Säureamidgruppe als auch die Acetalbindung intakt bleiben und freie Fettsäuren *nicht* verestert werden. Ferner ließen sich Sulfatide mit Na-Methylat nicht spalten. Diese Befunde ergaben sich aus dünnschichtchromatographischen Untersuchungen. Die glatte Umsetzung der mit den beschriebenen Methoden erfaßten Lipoidklassen ist in Abbildung 3 wiedergegeben. Als Testsubstanz dienten Methylester, die aus Triglyceriden durch zweistündiges Kochen mit Methanol-6% HCl dargestellt wurden.

Kritische Aspekte der Umesterungstechnik

Das Na-Methylat wurde mit nicht nachgetrocknetem Methanol p. a. hergestellt. Der Einfluß kleiner Mengen Wassers auf die Umesterung mit NaMethylat wurde nicht näher untersucht, da die Umsetzung auch in einer methanolischen NaOH abläuft (6, 10). Da die Alkalikonzentration für die Umesterungsgeschwindigkeit eine Rolle spielt und die Löslichkeit des Na-Methylats in Methanol höher ist als die von NaOH, wurden die Standardmethoden mit Na-Methylat entwickelt.

Voraussetzung für die quantitative Umesterung war die völlige Lösung des eingesetzten Lipoids am Boden des Reaktionsgefäßes vor Zugabe des Alkoholats mittels 0,4 ml/ Chloroform oder Benzol. Dies war besonders zu beachten für die Umsetzung von Cholesterinestern. Bei der Umesterung größerer Lipoidmengen (Tab. 2) kam es zur teilweisen Ausfällung des Lipoids bei Zugabe des Methylats. Die Fällung löste sich durch Erhitzen oder Schütteln infolge Umsetzung wieder auf.

Es wurden Umesterungen mit 0,1 n, 0,25 n, 0,5 n und 1,0 n Na-Methylat vorgenommen. Dabei ergab sich, daß sowohl hinsichtlich der Alkoholatkonzentration als auch in bezug auf die umzusetzende Substanzmenge die Cholesterinester die kritische Lipoidklasse sind. Um auch für die Cholesterinester eine vollständige Umesterung in kürzester Zeit zu erreichen, haben wir für diese Lipoidklasse das Verhältnis von Alkoholat und Substanz auf 5—10 mg/4 ml/ 0,5 n Na-Methylat bzw. 10—20 mg/4 ml/ 1 n Na-Methylat (Tab. 2) festgelegt. Die Umesterung wurde allerdings getestet bis zu 40 mg Triglycerid/4 ml/ 0,5 n Na-Methylat. Mit Triglyceriden und Glycerinphosphatiden konnte die Umesterung genauso gut bei Zimmertemperatur mit 0,25 n und 0,5 n Na-Methylat vorgenommen werden (Tab. 2). Dabei vollzog sich die Umesterung durch intensives Schütteln des Reaktionsgefäßes innerhalb von 1—2 Minuten. Bei den Glycerinphosphatiden in Mengen von über 15 mg blieb nach dem Schütteln trotz vollständiger Umesterung eine leichte Trübung bestehen. Die Umesterung von Cholesterinpalmitat gelang nur durch kochen. Es war aber möglich, kleinere Mengen Cholesterinesters, z. B. im Serumlipoidgemisch, schon bei Zimmertemperatur umzuestern.

Mit Chloroform als Lösungsmittel an Stelle von Benzol ging die Umesterung in der Hitze mit einer Nebenreaktion einher: Nach etwa 2 Min. kam es zur Ausfällung von NaCl, wahrscheinlich durch Bildung eines Äthers (Dichlormethyl-methyläther?). Die Reaktion trat ebenfalls im gleichbehandelten Leerwert auf. Da das in Lösung befindliche Na-Methylat noch weitgehend überwog, wurde unter den angegebenen Bedingungen die Umesterung nicht beeinflusst. Trotz dieser Nebenreaktion hat sich Chloroform bewährt, besonders für die Cholesterinesterumesterung. Andere Lösungsmittel, z. B. Petroläther und Diäthyläther, erwiesen sich als ungünstig. Die Methode wurde ausschließlich zur Umesterung langkettiger Fettsäuren von C₁₄ bis C₂₂ angewendet. Deshalb soll darauf hingewiesen werden, daß ein Dichlormethyl-methyläther die gaschromatographische

Tab. 2

Abhängigkeit der Umesterung der einzelnen Lipoidklassen von Alkoholatkonzentration, Substanzmenge, Zeit und Temperatur

Na-Methylat- konzentration	Stoffklasse	Substanz- menge mg	Zeit der vollständigen Umesterung der Substanz nach ihrer Lösung in 0,4 ml Chloro- form und Zugabe von 4 ml Na-Methylat	
			Zimmertemperatur Min.	Kochen Min.
0,25 n	TG	10	1	1
		20	1	1
	GP	10	2	1
		20	2	1
0,5 n	TG	10	1	1
		40	2	1
	GP	10	2	1
		40	2	1
	CE	10	∅	5 (B)
		20	∅	∅
SL	10	∅	5	
1,0 n	TG	50	2 (B)	2 (B)
		10	5	2
	GP	40	2 (B)	2 (B)
		10	∅	2
	CE	20	∅	5 (B)
		40	∅	∅

Abkürzungen: TG = Erdnußöl-Triglyceride, GP = Glycerinphosphatide (Leber), CE = Cholesterinester (Cholesterinpalmitat), SL = Serumlipide. ∅ = keine vollständige Umsetzung nach 5 Minuten. B = in zusätzlichen Parallelversuchen wurde anstatt Chloroform Benzol verwendet.

Anmerkung: Bei der Umesterung von 20 mg CE, gelöst in Benzol, wurden geringe Mengen (unter 5%) nicht umgesetzt.

Analyse kurzkettiger Fettsäuren stören könnte, ähnlich dem β, β -Dichloräthyläther bei der Analyse kurzkettiger Fettsäuren als 2-Chloräthanoester (2).

Die Methylesterextrakte wurden dünn-schichtchromatographisch auf die Anwesenheit von freien Fettsäuren untersucht. Es zeigte sich, daß die Bildung von Seifen während der alkali-katalysierten Umesterung von Alkoholatkonzentration und Temperatur abhängig ist. Die Umsetzung mit 0,25 n und 0,5 n Na-Methylat gingen bei Zimmertemperatur praktisch ohne Bildung von Seifen vor sich (unter 1%). In der Hitze traten mit 0,5 n Na-Methylat 1—3%, mit 1 n Na-Methylat 5—10%

Seifen auf. Aus diesem Grunde wurde die Methylat-Konzentration in der ersten Methode nicht über 0,5 n erhöht.

Die Extraktion der beschriebenen Methoden wurde überprüft: Nach Umesterung von 60,1 mg Erdnuß-Triglycerid wurden 60,8 mg Methylester zurückerhalten. Bei der komplexen Zusammensetzung der Fettsäuren ist das Triglycerid-Methylesterverhältnis 1:1. Somit ergab sich eine Rückgewinnung von 100%.

Herrn Dipl.-Chem. Dr. H. BETZING, Firma A. Nattermann & Cie., Köln-Braunsfeld, der die zweite Methode an seinem Untersuchungsmaterial testete, danken wir für wertvolle Hinweise.

Literatur

1. STOFFEL, W., F. CHU und E. H. AHRENS, Jr., *Analytic. Chem.* **31**, 307 (1959). — 2. OETTE, K. und E. H. AHRENS, Jr., *Analytic. Chem.* **33**, 1847 (1961). — 3. SCHLENK, H. und J. L. GELLERMANN, *Analytic. Chem.* **32**, 1412 (1960). — 4. METCALFE, L. D. und A. A. SCHMITZ, *Analytic. Chem.* **33**, 363 (1961). — 5. KLENK, E. und F. RENNKAMP, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **267**, 145 (1940). — 6. KUERMEL, D. F., *J. Amer. Oil Chemists' Soc.* **35**, 41 (1958). — 7. LUDDY, F. E., R. A. BARFORD und R. W. RIEMENSCHNEIDER, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.* **37**, 447 (1960). — 8.

- KAUFMANN, H. P. und G. MANKEL, *Fette Seifen einschl. Anstrichmittel* **65**, 179 (1963). — 9. CHEVALLIER, F. und D. MATHE, *Bull. Soc. Chim. biol.* **46**, 509 (1964). — 10. KLENK, E. und M. DOSS, in Vorbereitung. — 11. GOLDRICK, B. und J. HIRSCH, *J. Lipid Res.* **4**, 482 (1963). — 12. TSCHÖPE, G., *diese Z.* **1**, 167 (1963). — 13. STAHL, E., *Dünn-schicht-Chromatographie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962). — 14. HORNING, E. C., E. H. AHRENS, Jr., S. R. LIPSKY, F. H. MATTON, J. F. MEAD, D. A. TURNER und W. H. GOLDWATER, *J. Lipid Res.* **5**, 20 (1964).

Dr. med. Manfred Doss,
Medizinische Klinik
der Universität Marburg,
Marburg,
Mannkopffstraße 1

Dr. med. Kurt Oette,
Physiologisch-Chemisches Institut
der Universität Köln,
5 Köln-Lindenthal,
Joseph-Stelzmann-Str. 52