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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 58 (1967)

Heft: 4

Artikel: Beitrag zur gaschromatographischen Untersuchung von Fetten und Oelen. 1. Mitteilung, Apparatives und quantitative Auswertung der Gaschromatogramme

Autor: Hadorn, H. / Zürcher, K.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982947

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 14.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

MITTEILUNGEN
AUS DEM GEBIETE DER
LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE
VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT IN BERN
Offizielles Organ der Schweizerischen Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie

TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE
ET D'HYGIÈNE
PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE À BERNE
Organe officiel de la Société suisse de chimie analytique et appliquée

ABONNEMENT:
Schweiz Fr. 22.— per Jahrgang (Ausland Fr. 27.—) Preis einzelner Hefte Fr. 4.— (Ausland Fr. 5.—)
Suisse fr. 22.— par année (étranger fr. 27.—) Prix des fascicules fr. 4.— (étranger fr. 5.—)

Band — Vol. 58 1967 Heft — Fasc. 4

Beitrag zur gaschromatographischen Untersuchung von Fetten und Oelen

1. Mitteilung

Apparatives und quantitative Auswertung der Gaschromatogramme

H. Hadorn und *K. Zürcher*

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

1. Einleitung

Ueber die gaschromatographische Trennung der Fettsäuren beziehungsweise ihrer Ester ist in den letzten Jahren sehr viel gearbeitet worden. Für die routinemäßigen Untersuchungen von Fetten und Oelen im lebensmittelchemischen Laboratorium wäre eine Methode erwünscht, die sich praktisch für alle Fette und Oele und beliebige Mischungen eignet. Besonders in butterhaltigen Margarinen und Kochfetten findet man eine große Zahl von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren verschiedenster Kettenlänge (von C_4 bis C_{24}). Auch das Fettgemisch, das man aus Backwaren, oder Caramels isoliert, weist oft eine komplizierte Zusammensetzung auf, da es meistens Butterfett, Kokosfett und andere Fette oder Oele enthält. Die Bestimmung sämtlicher Fettsäuren sollte wenn möglich in einem Arbeitsgang durchführbar sein.

Es ist nicht ganz einfach, aus der verwirrenden Vielfalt von Publikationen die zweckmäßigste Methode herauszufinden. Zunächst gilt es, eine gute Trennsäule und die optimalen Versuchsbedingungen auszuwählen. Dann stellt sich die Frage nach dem günstigsten Auswertungsverfahren. Die einzelnen Peaks sind zunächst zu identifizieren und dann quantitativ auszuwerten. Für genaue Analysen müssen noch stoffspezifische Faktoren bestimmt werden. Für die Untersuchung von Fetten und Oelen müssen vor der gaschromatographischen Trennung der Fettsäuren zunächst die Methylester hergestellt werden. Wie sich zeigte, können bei einigen Veresterungsmethoden grobe Fehler unterlaufen, die zu völlig verfälschten Resultaten führen. Wir haben zahlreiche Vorschriften überprüft und sind schließlich zu einer einfachen, rasch durchführbaren und zuverlässigen Methode für Routine-Untersuchungen gelangt.

In dieser ersten Mitteilung wird über die apparativen Bedingungen zur Trennung der Methyl- und Propylester und die quantitative Auswertung der Gaschromatogramme nach verschiedenen Auswertungsverfahren berichtet. An Modellversuchen mit Testgemischen wurden Korrekturfaktoren bestimmt. Ferner haben wir die Standardabweichung und den Streubereich für verschiedene Auswertungsmethoden berechnet.

In einer 2. Mitteilung werden einige Umesterungsverfahren überprüft und auf Fehlermöglichkeiten hingewiesen. In einer 3. Mitteilung sollen die Analysen zahlreicher pflanzlicher Oele und Fette in Form von Uebersichtschromatogrammen und Tabellen mit der genauen Fettsäuren-Verteilung veröffentlicht werden

2. Methodisches

a) Apparative Bedingungen

Zu unseren Versuchen wurden folgende Geräte benutzt:

Gaschromatograph:
Modell 1520 der Firma Varian Aerograph.

Schreiber:
Hitachi Modell QPD 53, 1 mV.

Integrator:
Low Cost Digital Integrator Modell 477 der Firma Varian Aerograph*.

Trennsäule:
4 m lang 3,2 mm Durchmesser (15′ × 1/8″) aus rostfreiem Stahl.

* Der Integrator wurde uns in freundlicher Weise von der Firma Aerograph A.G., Basel, für unsere Versuche zur Verfügung gestellt, wofür wir an dieser Stelle bestens danken.

Säulenfüllung:

10 % Lac-4-R-886 (Polyaethylenglycol-succinat, EGS, der Fa. Aerograph AG., Basel; max. Temp. 200 ° C, Fp. ca. 90 ° C) auf Chromosorb W, säuregewaschen und mit Dimethyldichlorsilan behandelt.

Detektor:

Wasserstoff-Flammenionisationsdetektor mit —210 Volt Ionisationsspannung.

Gasströmungen:

Trägergas: N_2 am Säulenausgang gemessen = 20 ml/min.
H_2 für Detektor = 25 ml/min.
Luft für Detektor = 500 ml/min.

Temperaturen:

Injektor mit Glaseinsatz 260 ° C.
Detektorofen 250 ° C.
Säulenofen 160 ° C für Analysen von kurzkettigen Fettsäuremethylestern ab C_8 und Propylester ab C_6.
170 ° C für Analysen der Fettsäuremethylester mit 16 und mehr C-Atomen (bis C_{24}).
Programmiert für die Analysen der Methyl- und n-Propylester von C_4 bis C_{24}: 5 Minuten isotherm bei 95 ° C anschließend eine Aufheizrate von 4 °/min. bis 185 ° C nachfolgend wieder isotherm.

Einspritzmenge:

0,5 bis maximum 1 µl entspricht max. 100 µg Ester-Gemisch.

Empfindlichkeit:

10 × 4 bis 10 × 128 entspricht 12 bis 384 · 10^{-10} Amp. Mit dieser Empfindlichkeit konnten beim Auswerten isothermer Gaschromatogramme nach der Methode Höhe mal Retentionszeit noch 0,2—0,5 % C_{20} und C_{22} erfaßt werden.

b) Untersuchungsmaterial

Um die optimalen apparativen Bedingungen auszuprobieren und die verschiedenen Auswertungsverfahren miteinander zu vergleichen, haben wir Kakaobutter raffiniert, Kokosfett raffiniert und Leinöl naturbelassen verwendet. Zahlreiche Versuche wurden mit einem Testgemisch durchgeführt, das je $^1/_3$ der drei genannten Komponenten enthielt. In diesem Gemisch kommen praktisch alle wichtigsten Fettsäuren, mit Ausnahme der Buttersäure und der Capronsäure, in beträchtlichen Mengen vor. Die kurzkettigen Fettsäuren C_8 bis C_{14} stammen aus dem Kokosfett. Kakaobutter enthält viel gesättigte C_{16} und C_{18}-Säuren. Leinöl liefert die ungesättigten C_{18}-Säuren. (Oelsäure, Linol- und Linolensäure). Wie sich herausstellte,

läßt sich Buttersäure auf der Lac-4-R-886-Säule nicht genügend scharf vom Lösungsmittel abtrennen, so daß eine quantitative Bestimmung nicht möglich ist. Ueber die gaschromatographische Bestimmung der niederen Fettsäuren wird in einer späteren Arbeit berichtet.

Für die Bestimmung der Korrekturfaktoren und die Versuche mit dem Integrator haben wir uns Test-Gemische aus reinen Methylestern verschiedener Fettsäuren hergestellt. Wir benutzten folgende Fluka-Präparate: Myristin-, Palmitin-, Stearin-, Oel-, Linol- und Linolensäuremethylester.

3. Registrierung von Gaschromatogrammen

Je nach Elektrometer-Empfindlichkeit, Säulen-Temperatur, Papiervorschubgeschwindigkeit und evtl. Temperaturprogramm erhält man Gaschromatogramme ganz verschiedener Typen. Wir teilten für unsere Zwecke die Gaschromatogramme etwas willkürlich in nachstehende drei Typen ein.

a) Uebersichtschromatogramme

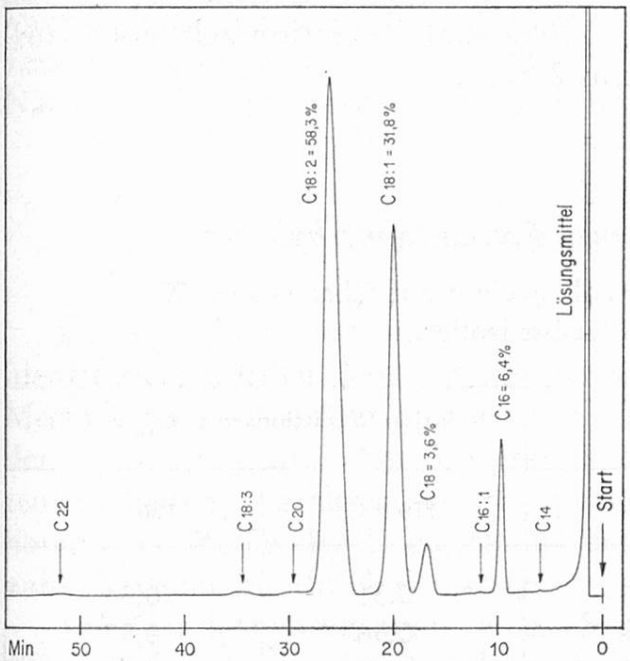
Diese Chromatogramme werden isotherm über den ganzen Bereich mit konstanter Empfindlichkeit aufgenommen. Die Empfindlichkeit wurde so gewählt, daß die als Hauptkomponenten vorkommenden Fettsäuren gut ausgebildete Peaks ergeben und ohne Umschaltung auf der Breite des Papierstreifens Platz haben. Derartige Chromatogramme geben eine allgemeine Uebersicht, und man erkennt auf den ersten Blick, welche Fettsäuren als Hauptkomponenten in einem Oel vorkommen. Fettsäuren, die nur in geringen Mengen (ca. 1 %) vorhanden sind, geben höchstens schwach angedeutete Peaks. Für die quantitative Auswertung sind diese Chromatogramme weniger geeignet, weil sich Fettsäuren, die nur in Spuren vorkommen nicht mit Sicherheit nachweisen lassen und ihre Menge nicht mehr genau berechnet werden kann. Bei Vernachlässigung der in kleinen Anteilen vorhandenen Fettsäuren, erhält man allerdings für die übrigen Fettsäuren brauchbare Werte.

Die für jede Oelsorte einmal aufgenommenen Uebersichtschromatogramme erleichtern das weitere Arbeiten. Man kann daraus entnehmen, bei welchen Peaks man bei Chromatogrammen, die mit höherer Empfindlichkeit aufgenommen werden, auf niedrigere Empfindlichkeit umschalten muß (Abschwächungsfaktor).

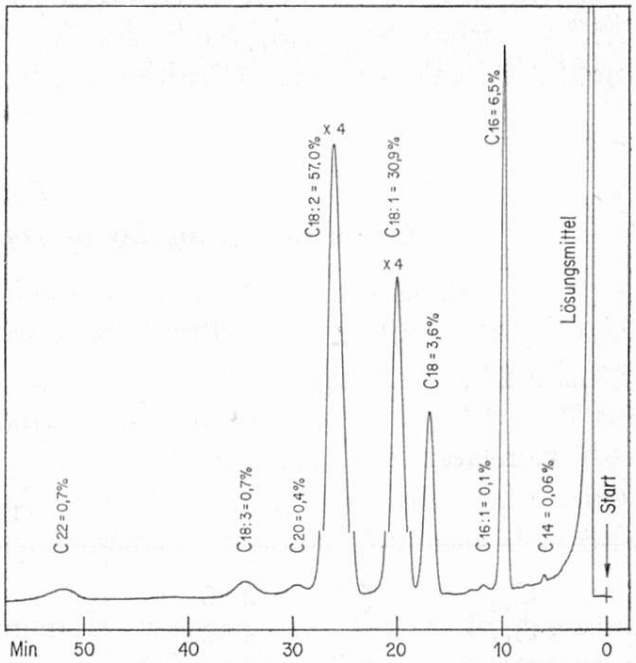
b) Chromatogramme für genaue quantitative Auswertung

Für die quantitative Auswertung ist es zweckmäßiger, Gaschromatogramme mit wesentlich höherer Empfindlichkeit aufzunehmen. Alle Peaks erscheinen nun stark ausgeprägt und überhöht, was eine genauere Handauswertung gestattet. Peaks von Fettsäuren, die in großen Anteilen (10—70 %) im Oel vorkommen, müssen durch Umschaltung der Empfindlichkeit abgeschwächt werden,

damit das Peak-Maximum auf dem Papier aufgezeichnet wird. (Abschwächung in der Regel auf $^1/_2$, $^1/_4$, in einigen Fällen auf $^1/_8$).



Figur 1. Uebersichtschromatogramm eines Sonnenblumenöles



Figur 2. Chromatogramm für die quantitative Auswertung (gleiches Oel)

In Figur 1 und 2 sind zwei Chromatogramm-Typen des gleichen Sonnenblumenöls wiedergegeben. Auf dem Uebersichtschromatogramm in Figur 1 (isotherm) erkennt man die Peaks der Palmitin-, Stearin-, Oel- und Linolsäure. Andere Peaks sind durch kleine Unebenheiten der Grundlinie mehr oder weniger angedeutet. Die betreffenden Stellen sind im Chromatogramm durch Pfeile markiert.

In dem mit größerer Empfindlichkeit unter sonst gleichen Bedingungen aufgenommenen Gaschromatogramm für die quantitative Auswertung erscheinen auch die Peaks der in kleineren Mengen vorhandenen Fettsäuren deutlich. Es sind beispielsweise Mengen von 0,1 % C_{14} und $C_{16:1}$ oder 0,4 % C_{20} noch deutlich nachweisbar und quantitativ bestimmbar. Die Peaks der Oelsäure und Linolsäure sind auf $^1/_4$ abgeschwächt worden. Die Stellen der Umschaltung auf andere Empfindlichkeiten sind durch einen Unterbruch der Kurven gekennzeichnet. Bei der Auswertung sind diese Peakflächen, bzw.: Peakhöhen mit dem Faktor 4 zu multiplizieren. Bei jeder Umschaltung ist auch eine entsprechende Korrektur für die Chromatogramm-Basislinie anzubringen, wie dies *Kaiser* (1) in Band IV, Seite 126 beschreibt.

Für die Chromatogramme zur quantitativen Auswertung wurde im Empfindlichkeits-Bereich zwischen 10×4 und 10×64 gearbeitet. Dies entspricht einer Empfindlichkeit von 12 bis 192. 10^{-10} Amp. Selbstverständlich könnte man auch mit noch höheren Empfindlichkeiten arbeiten. Es erscheinen aber meistens zahl-

reiche neue Peaks von Fettsäuren, die nur in Spuren vorkommen und bei normalen Analysen vernachlässigt werden. Mengen unter 0,2 % haben wir bei unseren Analysen in der Regel nicht berücksichtigt. Die Empfindlichkeit sollte so gewählt werden, daß langkettige Fettsäuren (C_{22}—C_{24}), die im Fett in einer Menge von 0,5 % vorhanden sind, nach der Methode Höhe mal Retentionszeit noch ausmeßbare Peaks ergeben. (Peakhöhe mindestens 2 mm).

Tabelle 1
Retentionszeiten der verschiedenen Fettsäure-methylester

Säulenfüllung: 10 % Polyaethylenglycol-succinat auf Chromosorb W
Probe: Senfsamenöl, selbst isoliert

Fettsäure	Retentionszeit in Minuten		Relative Retentionszeit (C_{16} = 1,0)	
	170 ° C	185 ° C	170 ° C	185 ° C
C_{12}	2,50	1,53	0,31	0,34
C_{14}	4,50	2,58	0,56	0,57
C_{15}	6,00	3,45	0,75	0,77
C_{16}	8,00	4,50	1,00	1,00
$C_{16:1}$	9,65	5,37	1,21	1,19
C_{17}	10,70	5,88	1,34	1,30
$C_{16:2}$	12,55	6,83	1,57	1,52
C_{18}	14,30	7,07	1,79	1,68
$C_{18:1}$	17,14	9,08	2,14	1,96
$C_{18:2}$	22,1	11,60	2,78	2,57
C_{20}	25,8	13,04	3,22	2,90
$C_{18:3}$	30,6	15,65	3,82	3,48
$C_{20:2}$	38,9	19,4	4,86	4,37
C_{22}	46,7	22,8	5,85	5,07
$C_{22:1}$	55,0	27,1	6,87	6,03
$C_{22:2}$	68,8	33,6	8,60	7,47
C_{24}	82,2	38,7	10,3	8,60
$C_{24:1}$	93,6	44,2	11,7	9,82

c) Temperatur-programmierte Chromatogramme

Um in Fetten, wie beispielsweise Kokosfett, die sowohl kurzkettige, als auch langkettige Fettsäuren enthalten, saubere Gaschromatogramme zu erhalten, muß mit einem Temperatur-Programm gearbeitet werden. Damit die niederen Fettsäuren voneinander getrennt werden, beginnt man bei relativ niedriger Temperatur (ca. 90 ° C) und steigert die Temperatur bis auf 170 °—190 ° C. Das Temperatur-Programm ist so zu wählen, daß alle Peaks ungefähr die gleiche

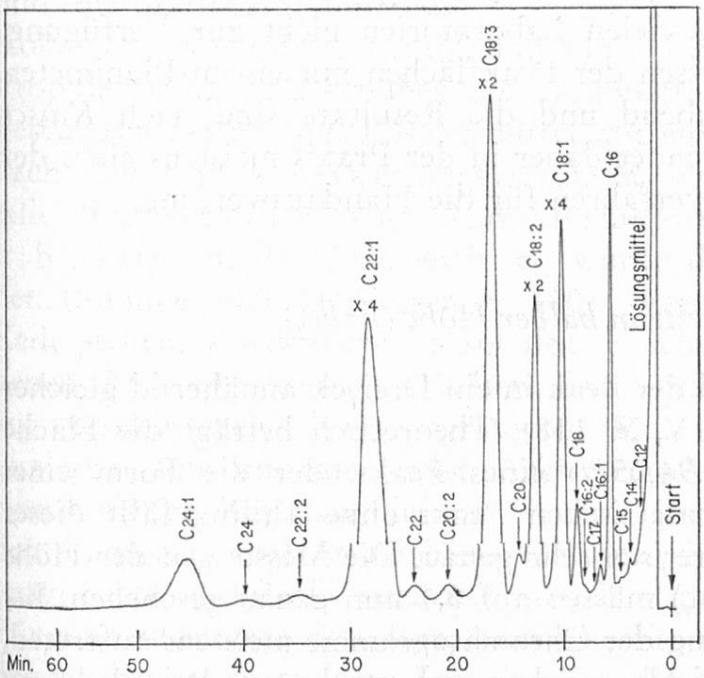
Breite in halber Höhe aufweisen. Für unbekannte Fette mit niederen Fettsäuren erwies sich bei unseren Versuchen nachstehendes Programm als günstig:

5 Min. isotherm bei 95 ° C, anschließend aufheizen mit einer Anstiegsrate von 4 °/Min. bis 180 °, dann wieder isotherm. Alle anderen apparativen Bedingungen waren gleich wie bei den unter a) beschriebenen Uebersichtschromatogrammen. Temperaturprogrammierte Gaschromatogramme werden in der 2. Mitteilung beim Nachweis der Buttersäure abgebildet und diskutiert.

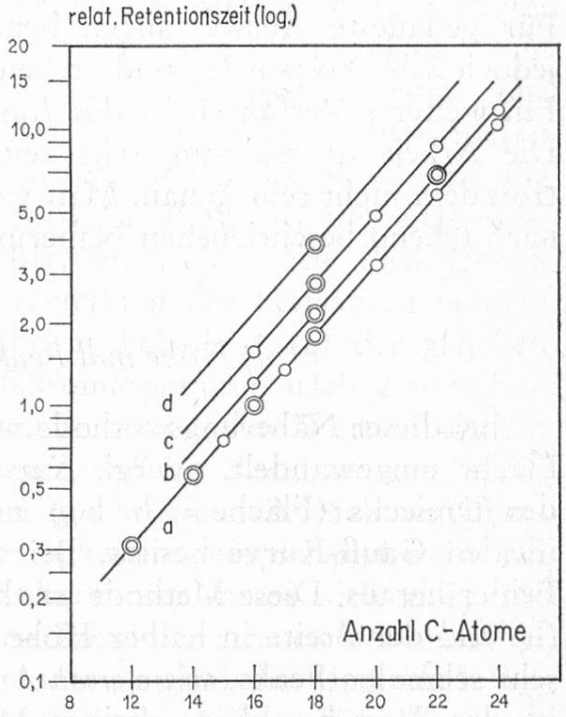
4. Identifizierung der Fettsäuren

Die einzelnen Fettsäuren können in der Regel durch die Lage ihrer Peaks identifiziert werden. Von einigen der wichtigsten Fettsäuren haben wir die reinen Methylester eingespritzt und die Peaks identifiziert. Verschiedene Fettsäuren wurden in einem graphischen Diagramm durch die Logarithmen ihrer relativen Retentionszeiten charakterisiert. Es gilt die Gesetzmäßigkeit, daß innerhalb einer homologen Reihe der Logarithmus der Retentionszeit proportional mit der Anzahl C-Atome im Molekül ansteigt.

Im Gaschromatogramm eines Senfsamenöls wurden 18 Peaks beobachtet (Siehe Figur 3.) In der Tabelle 1 haben wir zunächst die relativen Retentionszeiten der verschiedenen Fettsäuren berechnet. (Palmitinsäure-methylester = 1,00.)



Figur 3. Gaschromatogramm der Methylester eines selbst isolierten Senfsamenöles, Temperatur 185 ° C



Figur 4. Relative Retentionszeiten
a) gesättigte Fettsäuren
b) 1 C = C Doppelbindung
c) 2 C = C Doppelbindungen
d) 3 C = C Doppelbindungen

In der Figur 4 sind die Logarithmen der relativen Retentionszeiten gegen die Anzahl C-Atome aufgetragen. Die Fettsäure-methylester einer homologen Reihe liegen jeweils auf einer Geraden. Man erhält für die gesättigten, die einfach und die zweifach ungesättigten Fettsäuren 3 parallel verlaufende Geraden. Fettsäure-methylester, deren Retentionszeit durch Einspritzen von Reinsubstanzen festgelegt wurde, sind in Figur 4 durch Doppelkreise bezeichnet.

Für die Berechnung der relativen Retentionszeiten haben wir auf den Chromatogrammen die Strecke von der ersten steil ansteigenden Kante des Lösungsmittel-Peaks bis zum Peakmaximum gemessen. Diese Strecke entspricht in nächster Näherung der Retentionszeit t_r, d. h. der Aufenthaltszeit der einzelnen Fettsäure-methylester in der flüssigen Phase. Mißt man dagegen die Gesamtretentionszeit t_{dr}, vom Moment des Einspritzens der Substanz (Start) bis zum Peak-Maximum, so erhält man weniger gute Kurven. Bei den niedrigen Fettsäuren biegt die Kurve nach oben ab. Dies kommt daher, weil die Totzeit t_d (oder Durchbruchszeit, Durchlaufzeit) d. h. die Zeit welche das Trägergas braucht, um durch die Säule zu fließen, nicht berücksichtigt wird.

5. Quantitative Auswertung der Chromatogramme

Zur quantitativen Auswertung der Gaschromatogramme werden verschiedene Methoden angewandt. Die Stoffmenge ist theoretisch der Peakfläche proportional. Für genaueste Auswertungen benutzt man daher Integratoren. Dieselben sind jedoch sehr kostspielig und stehen in vielen Laboratorien nicht zur Verfügung. Ein weiteres Verfahren ist das Ausmessen der Peakflächen mit einem Planimeter. Die Arbeit ist mühsam, sehr zeitraubend und die Resultate sind nach *Kaiser* trotzdem nicht sehr genau. Man verwendet daher in der Praxis meistens eines der nachstehend beschriebenen Näherungsverfahren für die Handauswertung.

a) Höhe mal Peakbreite in halber Höhe ($h \cdot b_{1/2}$)

Bei dieser Näherungsmethode wird der Peak in ein Dreieck annähernd gleicher Fläche umgewandelt. (Vergl. *Kaiser* IV, S. 118). Theoretisch beträgt die Fläche des Dreiecks (Fläche $= h \cdot b_{1/2}$) nur 94,05 % eines Peaks, der die Form einer idealen Gauß-Kurve besitzt. Bei symmetrischen Peaks ohne Tailing fällt dieser Fehler heraus. Diese Methode ist theoretisch sehr genau. Die Messungen der Höhe (h) und der Breite in halber Höhe ($b_{1/2}$) müssen auf 0,1 mm genau geschehen. Bei sehr schmalen Peaks, wie sie am Anfang der Chromatogramme meistens auftreten, ist der Wert $b_{1/2}$ klein; geringe Meßfehler wirken sich stark aus. Bei niedrigen und sehr flachen Peaks dagegen ist die Messung der Breite in halber Höhe kaum genau möglich. Ein großer Vorteil der Methode besteht darin, daß auch temperaturprogrammierte Chromatogramme ausgewertet werden können.

b) Höhe mal Gesamtretentionszeit. ($h \cdot t_{dr}$)

Isotherme Gaschromatogramme lassen sich in einfacher Weise nach einem Näherungsverfahren auswerten. Man mißt auf dem Chromatogramm die Peakhöhe (h) und die totale Retentionszeit (t_{dr}) vom Start bis zum Peakmaximum (in mm). Das Produkt $h \cdot t_{dr}$ ist der Substanzmenge des betreffenden Peaks proportional. Die Methode beruht auf der Gesetzmäßigkeit, daß die Gesamtretentionszeit und die Breite in halber Höhe eines Peaks fast linear zusammenhängen; in erster Annäherung gilt:

$$t_{dr} \approx a \cdot b_{1/2}$$

Die annähernde Konstante a wird nach *Kaiser* (Bd. IV, S. 115) mit fortschreitender Gesamtretentionszeit langsam größer. Somit sind Analysenwerte, nach dieser Näherung bei den zeitig erscheinenden Komponenten systematisch zu niedrig, und bei den spät erscheinenden Komponenten systematisch zu hoch. Trotz dieser systematischen Fehler liefert die Methode in der Praxis durchaus brauchbare Resultate. Durch Einführung von Korrekturfaktoren lassen sich übrigens die systematischen Fehler ausschalten. Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, daß sich sowohl extrem schmale als auch breite Peaks, sowie unvollständig getrennte Peaks gut ausmessen und berechnen lassen. Die Meßwerte sind außerordentlich gut reproduzierbar. Als Nachteil des Verfahrens muß erwähnt werden, daß es nur bei isothermen, nicht bei temperaturprogrammierten Chromatogrammen angewendet werden kann.

Wir haben nun einige Chromatogramme nach beiden Methoden ausgewertet und die Resultate miteinander verglichen. Wir trennten die Propylester von Kokosfett, Kakaofett, Leinöl und einer Mischung der drei Komponenten. Die Propylester haben gegenüber den Methylestern den Vorteil, daß sich die niederen Fettsäuren besser vom Lösungsmittel abtrennen lassen. In der Tabelle 2 sind die nach den beiden Auswertungsverfahren erhaltenen Resultate zusammengestellt. Alle Werte wurden ohne Korrekturfaktoren berechnet. Aus den Peakflächen $h \cdot b_{1/2}$ bzw. aus den Flächen $h \cdot t_{dr}$ wurde die Verteilung der Fettsäuren berechnet. (Summe aller Fettsäuren = 100). Werte, die in Tabelle 2 auf der gleichen Zeile stehen, wurden jeweils aus dem gleichen Chromatogramm nach 2 verschiedenen Auswertmethoden erhalten. Die untereinander stehenden Werte stammen aus verschiedenen Chromatogrammen. Man erkennt, daß die Resultate gut reproduzierbar sind und die beiden Auswertmethoden mit wenigen Ausnahmen übereinstimmende Resultate liefern. Gewisse Unstimmigkeiten, wie beispielsweise bei den Palmitin- und Stearinsäure-Gehalten in Kakaobutter lassen sich z. T. auf unsymmetrische Peaks zurückführen. Die meisten Resultate streuen nur zufällig. Für eine bestimmte Fettsäure, beispielsweise C_{12} liefert einmal die Methode $h \cdot t_{dr}$ höhere, bei einem anderen Fett dagegen die Methode $h \cdot b_{1/2}$ höhere Werte.

Unsere Versuche bestätigen die Ergebnisse von *Bartlet* und *Iverson* (2), welche eine Studie über die Auswertung von Gaschromatogrammen von Fettsäuremethylestern veröffentlicht haben. Die Resultate von Ringversuchen wurden nach der

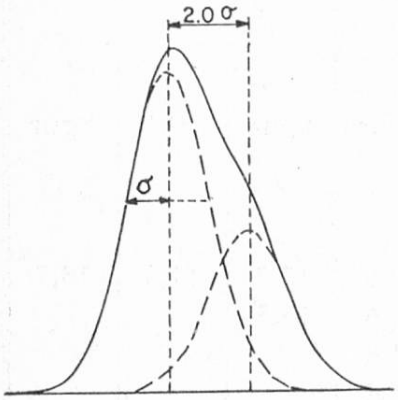
Tabelle 2

Auswertung von Gaschromatogrammen der Propylester nach 2 Handauswertungs-Verfahren

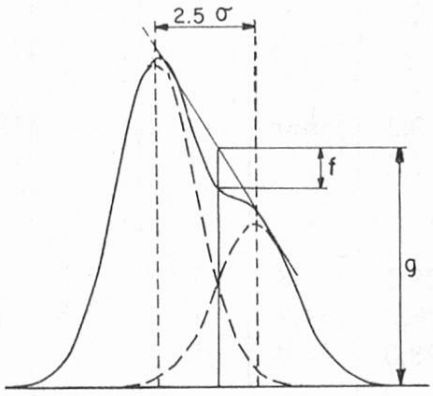
Fettsäure	Kokosfett raffiniert		Kakaobutter raffiniert		Leinöl naturbelassen		Mischung je 1/3 von jeder Komponente		theoret berechnet für die Mischung	
	$h \cdot t_{dr}$	$h \cdot b_{1/2}$	$h \cdot t_{dr}$	$h \cdot b_{1/2}$	$h \cdot t_{dr}$	$h \cdot b_{1/2}$	$h \cdot t_{dr}$	$h \cdot b_{1/2}$	$h \cdot t_{dr}$	$h \cdot b_{1/2}$
C_6	0,7	0,5	—	—	—	—	Spur	Spur	0,2	0,2
	0,5									
	0,6									
	Spur									
C_8	9,8	8,1	—	—	—	—	3,2	2,8	3,2	2,7
	9,9						3,5	4,1		
	9,3						3,5			
	9,3						3,3			
							3,2			
C_{10}	6,7	6,6	—	—	—	—	2,3	2,1	2,3	2,2
	6,9						2,4	2,2		
	6,6						2,4			
	6,7						2,3			
C_{12}	46,8	47,1	0,1	—	—	—	16,3	16,5	15,6	15,8
	46,1		0,1				16,3	15,5		
	46,9						16,8			
	45,8						16,1			
							15,9			
C_{14}	17,1	17,0	0,1	—	—	—	5,9	5,9	5,8	5,7
	17,8		0,1				5,9	5,6		
	17,1						6,1			
	18,0						6,0			
C_{16}	8,6	9,0	27,8	25,6	4,8	4,9	12,8	13,0	13,6	13,1
	7,3		27,2	25,5	4,8	4,7	12,8	13,7		
	8,5		27,1	25,6	4,2	4,9	13,0			
	8,9						12,9			

Fettsäure	Kokosfett raffiniert		Kakaobutter raffiniert		Leinöl naturbelassen		Mischung je 1/3 von jeder Komponente		theoret berechnet für die Mischung	
	h . t_{dr}	h . $b_{1/2}$	h . t_{dr}	h . $b_{1/2}$	h . t_{dr}	h . $b_{1/2}$	h . t_{dr}	h . $b_{1/2}$	h . t_{dr}	h . $b_{1/2}$
$C_{16:1}$	—	—	0,2 0,2	Spur	—	—	Spur	Spur	0,1	Spur
$C_{16:2}$	—	—	0,2 0,2	Spur	—	—	Spur	Spur	0,1	Spur
C_{18}	2,6 2,6 2,7 2,7	2,6	28,2 29,7 29,0	34,8 34,8 33,9	3,4 3,2 3,2	3,7 3,8 3,6	12,5 12,6 11,4 12,1 12,4	13,2 13,3	11,5	13,7
$C_{18:1}$	6,9 6,9 6,7 7,1	7,0	37,6 37,2 38,2	35,9 35,7 36,8	13,8 12,7 12,7	13,7 13,6 13,2	16,9 18,4 18,2 18,8 19,1	18,4 18,5	19,1	18,8
$C_{18:2}$	1,7 1,9 1,8 1,5	1,6	4,4 4,3 4,9	3,6 3,8 3,6	17,6 17,6 18,0	15,2 15,4 17,2	7,6 7,6 7,7 7,7	7,5 7,3	7,9	6,9
$C_{18:3}$	—	—	—	—	60,6 61,6 62,0	62,6 62,4 61,1	22,3 20,5 20,9 20,7 20,6	20,7 19,7	20,3	20,8
C_{20}	—	—	1,3 1,2 1,0	— —	—	—	0,2 Spur Spur	0,1 Spur	0,4	Spur

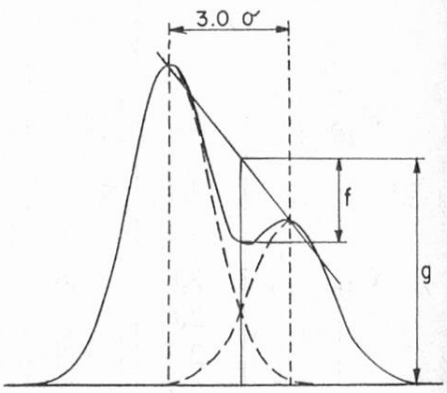
Dreiecksmethode und nach der Methode Höhe mal Retentionszeit berechnet. Beide Methoden gaben recht gut übereinstimmende Werte. Es konnten keine statistisch gesicherten Unterschiede zwischen den beiden Methoden festgestellt werden. Die Autoren kommen zum Schluß, daß die Methode Höhe mal Retentionszeit in vielen Fällen genauer und zuverlässiger ist als die Dreiecksmethode. Besonders bei Peaks, die nur mangelhaft getrennt sind und sich stark überlappen, können nach der Methode Höhe mal Retentionszeit noch brauchbare Resultate erzielt werden, während die Dreiecksmethode nicht mehr anwendbar ist. *Bartlet* und *Smith* (3) diskutieren den Effekt der Ueberlappung zweier Peaks. In den Figuren 5 bis 7 sind einige Beispiele angegeben.



Figur 5. Abstand der Peak-Maxima 2 σ. Auflösung nicht meßbar. Fehler bei der Auswertung nach $h \cdot t_{dr}$-Methode = + 13,5 %



Figur 6. Abstand der Peak-Maxima 2,5 σ. Auflösung = 17 %. Fehler bei der Auswertung nach $h \cdot t_{dr}$-Methode = + 4,4 %



Figur 7. Abstand der Peak-Maxima 3 σ. Auflösung 36 % Fehler bei der Auswertung nach $h \cdot t_{dr}$-Methode = + 1,1 %

Sind die Maxima zweier Peaks nur um 2 σ voneinander entfernt, wie in Figur 5 angegeben, so macht sich der zweite Peak nur durch eine schwache Ausbuchtung bemerkbar. (σ bedeutet die Standardabweichung der Gaußkurve, oder halbe Peakbreite im Wendepunkt der Kurve.)

Die Auflösung der beiden Peaks in Figur 5 ist praktisch null. Trotzdem können die Mengen der beiden Stoffe nach der Methode Höhe mal Retentionszeit annähernd berechnet werden. Beide Resultate werden wegen der Ueberlappung um 13,5 % zu hoch.

Sind die Maxima der beiden Peaks um 2,5 σ voneinander entfernt, (Figur 6) macht sich der 2. Peak durch eine Schulter bemerkbar. Nach *Kaiser* (Bd. I, S. 35 und 51) berechnet sich die Auflösung ϑ nach der Formel:

$$\vartheta = \frac{f}{g}$$

f und g sind die in den Figuren 6 und 7 eingezeichneten Abschnitte. Für das Beispiel in Figur 6 berechnet sich ϑ = 0,17. Die Auflösung beträgt 17 %. Der Fehler,

welcher bei der Auswertung nach der Formel Höhe mal Retentionszeit infolge Ueberlappung entsteht, beträgt + 4,4 %. Figur 7 zeigt 2 Peaks, deren Peak-Maxima um 3,0 σ voneinander entfernt sind. Die Trennung ist noch keineswegs gut, die Auflösung beträgt nur 36 %. Trotzdem sind die aus diesem Chromatogramm nach der Methode Höhe mal Retentionszeit berechneten Werte nur mit einem geringen Fehler von + 1,1 % behaftet.

c) Integrator-Auswertung und Vergleich mit der Handauswertung

Nach Literaturangaben (1) sind alle Handauswertungsmethoden mit ziemlich großen Fehlern behaftet. Diese rühren von Schreiberungenauigkeiten und Meßfehlern her. Am genauesten sind Auswertungen mit Integratoren. Wir haben deshalb eine Serie von Chromatogrammen mit einem modernen elektronischen Integrator ausgewertet. Gleichzeitig wurden die Gaschromatogramme mit einem Schreiber aufgezeichnet und anschließend von Hand nach der Methode Höhe mal Retentionszeit ausgewertet. Als Testgemisch diente eine selber mit angeblich reinen Chemikalien hergestellte Mischung aus 3 gesättigten und 3 ungesättigten Fettsäure-methylestern.

In der Tabelle 3 sind oben zunächst die theoretischen Werte des Testgemisches angegeben, die sich aus den Einwaagen an Reinsubstanzen errechnen ließen. Anschließend folgen die nach der Integrator-Methode erhaltenen Resultate von 5 unmittelbar hintereinander aufgenommenen Gaschromatogrammen. Die Werte sind durchwegs gut reproduzierbar. Die relative Standardabweichung beträgt für die C_{16} und C_{18}-Säuren 0,3—0,5 %, für die Myristinsäure (C_{14}) ist sie etwas höher 1,9 %. Die Werte für die Streuung decken sich mit den Angaben der Lieferfirma des Integrators. Bei der Trennung von Kohlenwasserstoffen (Isomere gesättigte und ungesättigte C_4-Kohlenwasserstoffe) wurden laut Prospekt mit dem Digital-Integrator relative Standardabweichungen (Variationskoeffizient) von 0,20—0,88 % errechnet.

Aus der Standardabweichung haben wir den sog. Wiederholstreubereich für die statistische Sicherheit P = 95 % berechnet. Er gibt an, wie weit bei 100 Wiederholungen der gleichen Messung 95 Werte streuen können. Der Streubereich beträgt beispielsweise in unserem Fall für die Palmitin- und Stearinsäure-Methylester ± 0,2 %. Von 20 Werten liegt nur einer außerhalb folgender Schranken.

Palmitinsäure = 13,71 ± 0,20 (= ± 1,5 % relativ)
Stearinsäure = 18,15 ± 0,20 (= ± 1,1 % relativ)

In der unteren Hälfte der Tabelle 3 sind die Resultate der Handauswertung der gleichen Gaschromatogramme angegeben. Diese Werte stimmen erstaunlich gut mit den aus den Integrator-Werten berechneten überein, womit die Brauchbarkeit des Handauswertungsverfahrens erneut bewiesen wird. Wie zu erwarten war, gibt die Handauswertung eine größere Streuung. Die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) beträgt ± 0,7 bis 1,2 % für die C_{16} und C_{18}-Säuren und 2,4 % für die Myristinsäure. Die Versuchsstreuung bzw. der

Tabelle 3 *Vergleich der Resultate nach 2 Auswertungsverfahren*
(Modell-Mischung mit angeblich reinen Fettsäuremethylestern)

Methylester der		Myristinsäure C_{14}	Palmitinsäure C_{16}	Stearinsäure C_{18}	Oelsäure $C_{18:1}$	Linolsäure $C_{18:2}$	Linolensäure $C_{18:3}$
Testgemisch theoretisch	%	8,85	13,01	17,59	14,72	23,26	22,57
Integrator-Auswertung							
Einspritzmenge 0,8 µl		9,37	13,70	18,18	13,86	22,83	22,03
0,6 µl		9,30	13,65	18,15	13,87	22,83	22,10
0,6 µl		9,39	13,66	18,24	13,84	22,75	22,07
0,6 µl		9,73	13,82	18,07	13,76	22,64	21,85
0,6 µl		9,62	13,74	18,11	13,81	22,62	21,99
Mittelwert	$\bar{x}$	9,55	13,71	18,15	13,82	22,73	22,00
Standardabweichung	s	± 0,19	± 0,07	± 0,07	± 0,05	± 0,09	± 0,11
Relative Standardabweichung	s %	± 1,9	± 0,5	± 0,4	± 0,3	± 0,4	± 0,5
Relativer Wiederholstreubereich (P = 95)	Δ x in %	± 5,3	± 1,5	± 1,1	± 0,9	± 1,1	± 1,4
Korrekturfaktor (Mittel)		0,927	0,949	1,005	1,065	1,023	1,026
Vertrauensbereich des Faktors (P = 95)		± 0,021	± 0,006	± 0,005	± 0,004	± 0,005	± 0,006
Handauswertung, $h \cdot t_{dr}$							
Einspritzmenge 0,8 µl		9,64	13,91	17,67	13,81	23,05	21,90
0,6 µl		9,49	13,77	17,90	13,79	23,09	21,93
0,6 µl		9,98	14,01	17,64	13,61	23,08	21,64
0,6 µl		9,58	13,77	17,76	13,61	23,08	22,17
Mittelwert	$\bar{x}$	9,67	13,86	17,74	13,70	23,07	21,91
Standardabweichung	s	± 0,24	± 0,12	± 0,13	± 0,10	± 0,002	± 0,26
Relative Standardabweichung	s %	± 2,4	± 0,9	± 0,7	± 0,7	± 0,01	± 1,2
Relativer Wiederholstreubereich (P = 95)	Δ x in %	± 7,9	± 2,7	± 2,3	± 2,3	± 0,3	± 3,8
Korrekturfaktor (Mittel)		0,915	0,939	0,992	1,074	1,008	1,030
Vertrauensbereich des Faktors (P = 95)		± 0,033	± 0,012	± 0,010	± 0,011	± 0,013	± 0,018

Wiederholstreubereich ist etwa doppelt so groß wie bei der Integrator-Methode. Auf die Berechnung der Korrekturfaktoren wird in einem späteren Abschnitt eingegangen.

d) Reproduzierbarkeit von Untersuchungen an Oelen

Alle in Abschnitt c) beschriebenen Versuche wurden mit künstlich hergestellten Mischungen von Reinsubstanzen ausgeführt. Die Resultate waren durchwegs gut reproduzierbar. In der Praxis muß die zu untersuchende Oelprobe vor der gaschromatographischen Untersuchung nach einem geeigneten Verfahren chemisch aufgearbeitet werden, um die Methylester der Fettsäuren zu erhalten. Zahlreiche der in der Literatur beschriebenen Methylierungs- oder Umesterungsverfahren sind mit Fehlern behaftet, die zu großen Versuchsstreuungen führen. Arbeitet man nach einem der von uns überprüften, zuverlässigen Umesterungsverfahren (siehe 2. Mitteilung) so erhält man gut reproduzierbare Resultate, wie bereits aus den Werten der Tabelle 2 hervorgeht. Auch die Umesterung ist gut reproduzierbar. Von einem kalt gepreßten, naturbelassenen Leinöl haben wir in Abständen von 1 bis 2 Monaten jeweils eine Probe umgeestert und gaschromatographisch untersucht. Dabei wurden durchwegs gut übereinstimmende Resultate erhalten, wie aus der Tabelle 4 hervorgeht.

Tabelle 4 Reproduzierbarkeit der Resultate

Oelmuster und Datum der Analyse	Palmitinsäure C_{16} %	Stearinsäure C_{18} %	Oelsäure $C_{18:1}$ %	Linolsäure $C_{18:2}$ %	Linolsäure $C_{18:3}$ %
Leinöl					
Hand-auswertung					
7. 3. 67	4,7	3,4	13,0	17,6	60,6
24. 4. 67	4,8	3,2	12,7	17,6	61,0
20. 6. 67	4,7	3,4	13,1	17,7	60,7
Mohnöl					
Integrator-auswertung	10,82	1,49	14,40	73,27	—
18. 8. 67	11,00	1,32	14,42	73,24	—
	11,13	1,37	14,35	73,12	—
Hand-auswertung	10,82	1,74	14,32	73,10	—
18. 8. 67	11,10	1,72	14,49	73,67	—
	10,97	1,64	14,15	73,22	—

In der Tabelle 4 sind noch die Resultate für ein Mohnöl angegeben, die nach der Integratorauswertung und nach Handauswertung erhalten wurden. (3mal die gleiche Lösung eingespritzt.) Auch diese Werte sind sehr gut reproduzierbar. Beide Auswertungsverfahren geben ohne Korrekturfaktoren recht gut übereinstimmende Resultate.

6. Korrekturfaktoren

Bei Gaschromatogrammen erhält man im Idealfall scharf getrennte symmetrische Peaks. Die Peakfläche ist nur näherungsweise der Stoffmenge proportional. Zur genauen Berechnung werden daher vielfach stoffspezifische Faktoren verwendet. Ueber die Größe dieser Faktoren gehen die Meinungen auseinander. Die Faktoren sind von den Versuchsbedingungen (Säule, Detektor), sowie vom Auswertungsverfahren abhängig. Oft wird bei der Berechnung der Fettsäureverteilung auf die Verwendung von Faktoren verzichtet, da ihre genaue Ermittlung umständlich ist und meistens die Testsubstanzen nicht in genügender Reinheit erhältlich sind.

a) Berechnung der Jodzahl aus der Fettsäureverteilung

Zur Kontrolle, ob unsere gaschromatographisch ermittelten Resultate einigermaßen stimmen, haben wir die Resultate mit Hilfe der Jodzahl nachgeprüft. Nach Literatur-Angaben sollen vor allem die ungesättigten Fettsäuren stark abweichende Korrekturfaktoren besitzen. Nach *Seher* (4) gelangen von Oelsäuremethylester nur 83—84 % der eingespritzten Menge in den Detektor. Derartige Fehler müßten sich bei Oelen mit hohem Oelsäure-Gehalt auf die theoretisch aus der Fettsäurenzusammensetzung berechnete Jodzahl auswirken.

Aus der gaschromatographisch gefundenen Fettsäureverteilung (berechnet ohne Korrekturfaktoren) und den theoretischen Jodzahlen der einzelnen Fettsäuren haben wir die zu erwartende Jodzahl eines Olivenöls berechnet. Der theoretische Wert stimmte erstaunlich gut mit der nach der Methode *Wijs* (5) experimentell gefundenen Jodzahl überein.

JZ theoretisch berechnet (siehe Tabelle 5)	= 81,9
JZ gefunden nach Methode *Wijs*	= 82,3 ± 0,2

Aus diesem Resultat darf geschlossen werden, daß man nach unserer GC-Technik ohne Anwendung von Korrekturfaktoren annähernd richtige Werte für die Fettsäurenverteilung erhält. Würden Verluste von Oelsäure entstehen, müßte bei Olivenöl, das 75 % Oelsäure enthält, die aus der Fettsäureverteilung berechnete Jodzahl viel zu niedrig ausfallen.

Die Berechnung der theoretischen Jodzahl in Tabelle 5 ist nicht absolut richtig. Olivenöl enthält neben Fettsäuren auch noch geringe Mengen von Sterinen, Squalen und anderen ungesättigten Kohlenwasserstoffen, die ebenfalls

Tabelle 5 Berechnung der Jodzahl aus der Fettsäurenverteilung eines Olivenöls

Fettsäure	Fettsäurenverteilung im Olivenöl %	JZ theoretisch	JZ-Anteil der einzelnen Fettsäuren
C_{16}	11,3	0	0
$C_{16:1}$	0,6	99,8	0,6
C_{18}	2,7	0	0
$C_{18:1}$	75,8	89,9	68,1
$C_{18:2}$	8,3	181,1	15,0
$C_{18:3}$	0,9	273,5	2,5
C_{20}	0,4	0	0
Total	100,0		86,2

Theoretische Jodzahl des Fettsäurengemisches	=	86,2
Fettsäurengehalt des Olivenöls	≈	95 %
Theoretisch zu erwartende Jodzahl des Olivenöls = 0,95 · 86,2	=	81,9
Experimentell bestimmt nach *Wijs*	=	82,3 ± 0,2

eine gewisse, aber nicht genau definierbare Menge Halogen addieren (6). Die experimentell bestimmte Jodzahl wird daher stets etwas höher ausfallen als die aus dem Anteil an ungesättigten Fettsäuren berechnete theoretische Jodzahl.

b) Berechnung der Korrekturfaktoren

Zur genauen Berechnung der einzelnen Fettsäuren müssen Korrekturfaktoren berücksichtigt werden.

Kaiser (IV, S. 193) gibt folgende Definitionen:

Der *stoffspezifische Korrekturfaktor* ist die Zahl, mit welcher der exakte Flächenwert einer GC-getrennten Komponente korrigiert werden muß, damit das analytische Endergebnis in Gewichtskonzentrationswerten (Gew.-%) erhalten wird. Nur dieser «sKf» ist vorausberechenbar und in andere, molare Größen umrechenbar.

Dem steht gegenüber der

Korrekturfaktor: eine Zahl, mit der die nach Näherungswerten erhaltene GC-Peakfläche in Gew.-% umgerechnet werden kann. Er ist nicht vorausberechenbar, aber enthält den stoffspezifischen Korrekturfaktor.

Nach Literaturangaben weichen die Faktoren der Fettsäureester zum Teil stark vom theoretischen Wert = 1,000 ab. Besonders die ungesättigten Fettsäuren sollen sich abnorm verhalten.

Auf Grund theoretischer Ueberlegungen erhielt *Ackman* (7) folgende Formeln zur Berechnung der Korrekturfaktoren für den Flammenionisations-Detektor:

$$f = \frac{M}{12 \cdot N_b} \quad \text{bzw. } f = 0{,}70998 \cdot \frac{M}{12 \cdot N_b}$$

M = Molekulargewicht
N_b = verfügbare C-Atome im Molekül.

Verfügbar sind in Fettsäureestern alle C-Atome mit Ausnahme des C-Atoms der Carbonyl-Gruppe. Nach obiger Formel erhält man Faktoren, die innerhalb der homologen Reihe mit steigender Anzahl C-Atome ständig abnehmen.

Seher (4) hat die von *Ackman* theoretisch berechneten Faktoren für den Flammenionisations-Detektor experimentell nachgeprüft und bestätigt. Für den Wärmeleitfähigkeitsdetektor fand er ganz andere Faktoren. Diese steigen mit zunehmendem Molekulargewicht an.

Die Faktoren für die ungesättigten Fettsäuren fallen nach *Seher* völlig aus dem Rahmen. Von Oelsäure-methylester gelangen beispielsweise nur 83—84 % der eingespritzten Menge in den Detektor. Die Verluste sind für den Wärmeleitfähigkeits-Detektor und den Flammenionisationsdetektor gleich. Sie sind entweder auf Adsorption in der Säule oder auf chemische Zersetzung zurückzuführen. *Seher* hat durch Versuche mit einem Testgemisch, das einen Anteil an radioaktivem 1-C-14-Oelsäure-methylester enthielt, bewiesen, daß der fehlende Anteil an Oelsäure-methylester in der Säule zurückbleibt. Die Radioaktivität der Säule nach Beendigung des Chromatogramms entsprach genau dem Verlust an Oelsäure-methylester. Auch bei anderen ungesättigten Säuren hat *Seher* sehr große Verluste beobachtet. (Linolsäure: 16—24 %; Linolensäure: 27—39 %). Von diesen Beobachtungen abweichende Feststellungen publiziert *Ackman* (8). Zwar fand er nach längerer Arbeitspause (z. B. während der Nacht) bei den ersten GLC-Analysen wechselnde Verluste an ungesättigten Fettsäuren; in den nachfolgenden Trennungen entsprachen die Peakflächen jedoch wieder der erwarteten Größe. Zur Deutung dieses Effektes nimmt er an, daß durch Reaktion des geringen Sauerstoff-Anteils im Trägergas während der Ruhepause eine aktive Oxidschicht auf der metallischen Wandung der Trennsäule entsteht, die zunächst auf die ungesättigten Fettsäuren einwirkt. Nach einigem Gebrauch der Säule, wenn das vorhandene Metalloxid umgesetzt ist, sollen keine Verluste mehr eintreten. Bei Benutzung von Glassäulen erreichen nach *Ackman* die ungesättigten Fettsäuren den Detektor stets quantitativ. Daher haben *Ackman* und *Sipos* (9) für ungesättigte Fettsäuren Eichfaktoren angegeben, die den theoretischen Werten entsprachen. Nach diesen, sich völlig widersprechenden Angaben der Literatur, erschien es uns als unerläßlich, die Faktoren für die wichtigsten Fettsäuremethylester unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen zu bestimmen.

c) *Eigene Bestimmung der Korrekturfaktoren*

Zur Bestimmung der Korrekturfaktoren haben wir Test-Gemische von genau bekannter Zusammensetzung unter gleichen Bedingungen getrennt wie die Fettsäure-methylester der Oele und Fette.

Tabelle 6 Bestimmung von Korrekturfaktoren
(Handauswertung: Höhe mal Gesamtretentionszeit)

		Palmitinsäure-methylester C_{16}	Stearinsäure-methylester C_{18}	Linolsäure methylester $C_{18:2}$
Theoretische Zusammensetzung	%	32,77	32,90	34,33
Gaschromatographische Analysen	1.	34,26	32,72	32,99
	2.	34,09	32,80	33,09
	3.	33,94	32,98	33,07
	4.	34,07	32,68	33,24
Mittelwert	$\bar{x}$	33,09	32,80	33,10
Standardabweichung	s	± 0,16	± 0,15	± 0,12
Vertrauensbereich des Mittelwertes (P = 95)	$\Delta \bar{x}$	± 0,23	± 0,22	± 0,18
Wiederholstreubereich des Einzelwertes (P = 95)	Δx	± 0,50	± 0,47	± 0,39
Relativer Wiederholstreubereich in % (P = 95)		± 1,46	± 1,40	± 1,20
Korrekturfaktor	f	0,990	1,003	1,037
Vertrauensbereich (P = 95)		± 0,023	± 0,022	± 0,018

In der Tabelle 6 sind die Resultate für ein Testgemisch, bestehend aus den Methylestern der Palmitin-, Stearin- und Linolsäure, wiedergegeben. Die chemisch reinen Substanzen wurden auf der Analysenwaage abgewogen, zusammengemischt und in der 10fachen Menge Methanol-Benzol 1 : 1 gelöst. Von diesem Testgemisch wurden je 0,6 µl in den Gaschromatographen eingespritzt und aus den erhaltenen Gaschromatogrammen die Fettsäuren-Verteilung nach der Methode Höhe mal Gesamtretentionszeit berechnet. Die Resultate von 4 nacheinander aufgenommenen Chromatogrammen stimmen sehr gut überein. Die Näherungsstandardabweichung für wenige Meßwerte, berechnet nach *Dean* und *Dixon* (10), beträgt 0,12 bis 0,16; d. h. die Resultate sind auf 0,1 bis 0,2 % reproduzierbar. Der Vertrauensbereich des Mittelwertes berechnet sich zu 0,18 bis 0,22 %. Der Wiederholstreubereich für den Einzelwert (statistische Sicherheit P = 95 %) beträgt 0,4—0,5 % oder 1,2—1,5 % relativ. Die experimentell gefundenen Werte weichen nur wenig von den theoretischen Werten, die aus den abgewogenen Einzelkomponenten berechnet wurden, ab. Der Korrekturfaktor ist

jener Faktor, mit dem das gaschromatographisch gefundene Resultat multipliziert werden muß, um den theoretischen, oder wahren Wert zu erhalten. In unserem Fall wird er wie folgt berechnet:

$$\text{Korrekturfaktor f} = \frac{\text{theoretischer Wert}}{\text{experimentell gefundener Wert}}$$

Dieser Korrekturfaktor beträgt nach den Ergebnissen in Tabelle 6 für Stearinsäure fast genau 1,00. Er liegt für die Palmitinsäure um 1 % tiefer, für die Linolsäure um 3,7 % höher.

Um abzuklären, ob die Faktoren von der Stoffmenge anhängig sind, haben wir von einem anderen Testgemisch wechselnde Mengen (0,2—1,3 µl) eingespritzt und aus den Chromatogrammen die Fettsäureverteilung und hieraus die Faktoren berechnet. Bei derartigen Versuchsreihen ist es wichtig, mit der höchsten Konzentration oder der größten Einspritzmenge zu beginnen und die Serie mit der niedrigsten Konzentration zu beenden. Verfährt man in der umgekehrten Reihenfolge, so erhält man oft streuende Werte, weil bei der ersten Spritzung von jedem Stoff geringe Mengen auf dem Trägermaterial adsorbiert oder in der flüssigen Phase der Säule zurückgehalten werden können. Aus diesen Gründen soll das erste Chromatogramm auch nicht quantitativ ausgewertet werden.

Tabelle 7 Variieren der Einspritzmenge
Testgemisch: Methylester der Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure
Säulentemperatur: 170 ° C isotherm
Handauswertung: $h \cdot t_{dr}$

	Verteilung in %			Faktoren		
	C_{14}	C_{16}	C_{18}	C_{14}	C_{16}	C_{18}
Theoret. Werte	25,31	31,19	43,50	—	—	—
Gefunden nach Einspritzung						
von: 1,3 µl	25,76	31,98	42,25	0,983	0,975	1,030
0,8 µl	25,81	32,21	41,97	0,990	0,968	1,036
0,8 µl	25,64	31,80	42,54	0,987	0,980	1,022
0,6 µl	25,79	31,36	42,83	0,981	0,994	1,016
0,4 µl	25,73	31,74	42,51	0,984	0,983	1,023
0,2 µl	26,03	31,48	42,48	0,972	0,991	1,024
Mittelwerte	25,79	31,76	42,43	0,981	0,982	1,025
Standardabweichung s	± 0,16	± 0,34	± 0,34			
Relativer Wiederholstreubereich (P = 95) in %	± 1,6	± 2,7	± 2,1			

In der Tabelle 7 sind die Resultate für 3 gesättigte Fettsäuren zusammengestellt. Die Werte sind von der Stoffmenge unabhängig. Für den von uns benutzten Bereich (0,2—1,3 µl, entsprechend 20—130 µg Substanz-Gemisch) arbeiten Trennsäule und Detektor linear.

Die aus 2 verschiedenen Testgemischen berechneten Korrekturfaktoren für Palmitinsäure (siehe Tabellen 6 und 7) stimmen auf 0,8 %, diejenigen der Stearinsäure auf 2,2 % (relativ) überein. Diese Fehler liegen nahezu innerhalb der Versuchsstreuung. Nach *Kaiser* (Bd. IV, S. 202) können die mit Handauswertmethoden bestimmten Faktoren schon wegen des Schreibfehlers nicht genauer als auf ± 1,5 % (relativ) bestimmt werden.

In der Tabelle 3 sind die Faktoren aus einem etwas komplizierter zusammengesetzten Testgemisch berechnet worden. Einzelne dieser Faktoren weichen etwas mehr ab. (1,5—5,4 %). Diese Abweichungen sind sehr wahrscheinlich auf Verunreinigungen im Testgemisch zurückzuführen. Zur Herstellung desselben haben wir frische und möglichst reine Präparate verwendet. Bei der gaschromatographischen Kontrolle erwiesen sich die Ester der Myristin-, Palmitin-, Stearinsäure, sowie diejenigen der Linol- und Linolensäure als rein. Reiner Oelsäuremethylester war uns nicht zugänglich. Das von uns verwendete Präparat (Reinheitsangabe: mindestens 99 %) enthielt 0,06 % Palmitinsäure-, 1,2 % Stearinsäure-, 9,4 % Linolsäure- und 2,2 % Linolensäure-methylester. Der Gehalt an Oelsäuremethylester, aus der Verteilung berechnet, ergab 87,1 %. Zur Berechnung der theoretischen Zusammensetzung des Testgemisches in Tabelle 3 wurden diese Verunreinigungen berücksichtigt. Eine gewisse Unsicherheit bleibt bei der Verwendung von unreinen Testsubstanzen trotzdem bestehen. Sie wirkt sich auch auf die Faktoren aus.

Die meisten Korrekturfaktoren liegen nahe bei 1. Der Faktor der Oelsäure fällt etwas aus dem Rahmen. Der zu hohe Faktor (1,065 anstatt ca. 1,01, wie er sich aus der homologen Reihe ergeben würde), ließe auf die oft behaupteten Verluste an Oelsäure-methylester in der Säule schließen. Da jedoch die beiden anderen ungesättigten Fettsäuren (Linolsäure und Linolensäure) praktisch quantitativ in den Detektor gelangen und normale Faktoren geben, die nahe bei 1 liegen, ist nicht einzusehen, weshalb nur der Faktor der Oelsäure abweichen sollte. Die beobachtete Abweichung ist sehr wahrscheinlich auf das unreine Oelsäure-methylester-Präparat im Testgemisch zurückzuführen.

Unsere Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Befunden von *Ackman* (7). Bei allen unseren Versuchen steigen die Faktoren innerhalb einer homologen Reihe mit zunehmendem Molekulargewicht allmählich an. Die von *Ackman* theoretisch berechneten und von *Seher* (4) experimentell bestätigten Faktoren nehmen mit steigendem Molekulargewicht ab.

Für die ungesättigten Fettsäuren erhielt *Seher,* wie erwähnt stark von 1 abweichende Faktoren, weil die Ester der ungesättigten Säuren nicht quantitativ in den Detektor gelangten. Vermutlich ist die von uns benutzte Trennsäule besser, da bei ihr die eingespritzten Substanzen, einschließlich die ungesättigten Fett-

säuren, quantitativ in den Detektor gelangen. Verluste durch Adsorption oder durch Zersetzung einzelner Fettsäure-ester haben wir nie beobachtet.

Ganz ähnliche Faktoren wie wir, bestimmte übrigens *Frauendorf* (11) bei der gaschromatographischen Trennung freier Fettsäuren. Im Flammenionisationsdetektor fand er für Essigsäure den Faktor 0,960 für Caprylsäure 1,00. Von C_8 bis C_{18} lagen alle Faktoren sehr nahe bei 1. (0,98—1,01). Auch die ungesättigten Fettsäuren hatten ähnliche Faktoren. Mit steigender Anzahl C-Atome werden die Faktoren, wie bei unseren Versuchen, etwas größer. Für C_{20} und C_{22}-Fettsäure-methylester fand *Frauendorf* den Faktor 1,04.

Unser Detektor kommt unter den angewandten Versuchsbedingungen dem von *Kaiser* (Bd. IV, S. 196) gewünschten theoretischen nur massenmessenden Detektor «Q» recht nahe. Für eine ganze Anzahl der wichtigsten Fettsäuremethylester liegt der Korrekturfaktor praktisch bei 1, so daß auf die etwas umständlichen Korrekturen verzichtet werden kann. Wir haben daher bei allen unseren Analysen von Oelen die Fettsäuren-Verteilung ohne Korrekturfaktoren berechnet. Die dadurch verursachten systematischen Fehler betragen für die gesättigten und ungesättigten C_{14} bis C_{18}-Säuren höchstens 2—3 % relativ. Dieser Fehler darf vernachlässigt werden, da nach *Kaiser* die Fehlergrenze der Handauswertungsmethoden bereits ± 1,5 % beträgt.

7. Bewertung der verwendeten Trennsäule

Zur Charakterisierung und Bewertung einer Trennsäule berechnet man nach *Kaiser* (Bd. I, S. 50) aus den mit dieser Säule unter bestimmten Versuchsbedingungen erhaltenen Gaschromatogrammen die nachstehenden Größen: Trennstufenzahl, Trennleistung, Trennfaktor, Trennstufenhöhe und die Auflösung.

Zu unseren Berechnungen diente ein Gaschromatogramm der Methylester eines Testgemisches bestehend aus je 1/3 Kokosfett, Kakaobutter und Leinöl. (Siehe Figur 8.)

Trennstufenzahl n

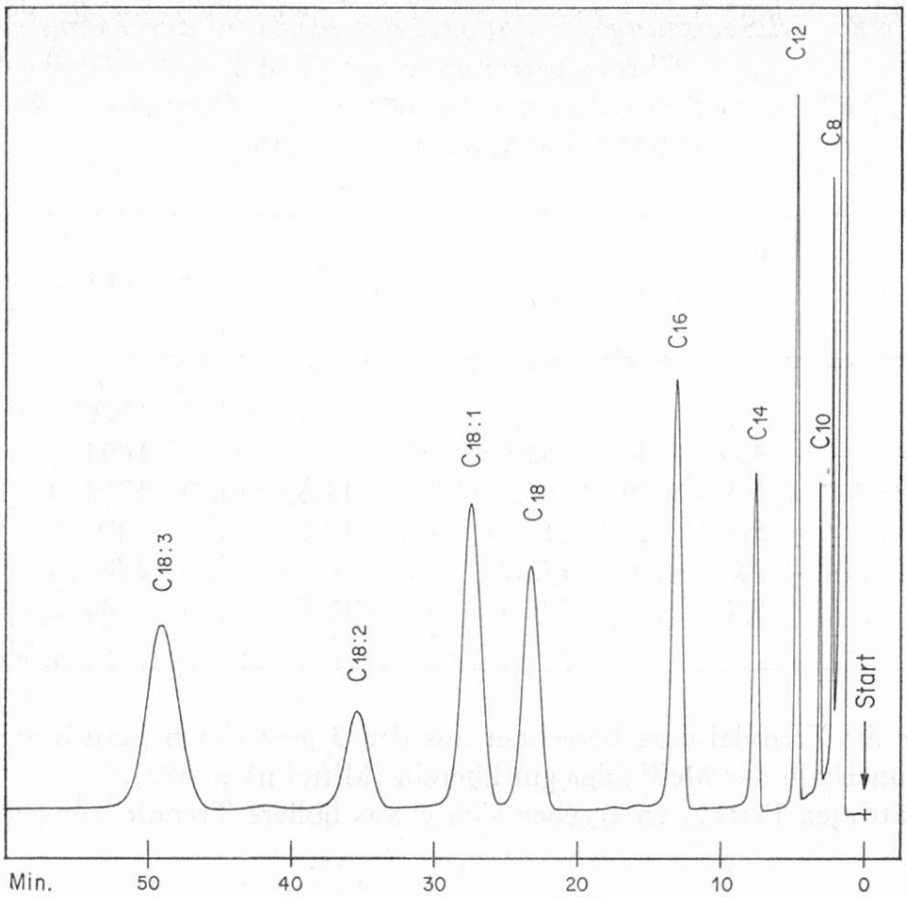
Sie wird nach *Kaiser* am zweckmäßigsten nach folgender Formel brechnet:

$$n = 8 \ln 2 \left(\frac{t_{dr}}{b_{1/2}}\right)^2$$

$$= 5{,}54 \cdot \left(\frac{t_{dr}}{b_{1/2}}\right)^2$$

$$= 5{,}54\, \beta^2$$

t_{dr} = Gesamtretentionszeit (gemessen in mm)
$b_{1/2}$ = Bandenbreite in halber Höhe in mm
β = Trennfaktor



Figur 8. Gaschromatogramm der Methylester eines Gemisches bestehend aus je 1/3 Kokosfett, Kakaofett und Leinöl (isotherm 160 ° C)

Trennleistung n^1

Die Trennleistung ist die Anzahl Trennstufen auf 1 m Säulenlänge

$$n^1 = 5{,}54 \cdot \left(\frac{t_{dr}}{b_{1/2}}\right)^2 \cdot \frac{1}{L}$$

$$n^1 = \frac{n}{L}$$

L = Säulenlänge in m (unsere Säule hat eine Länge von 4,5 m)

Aus dem oben erwähnten Gaschromatogramm des Test-Gemisches ergeben sich die in Tabelle 8 aufgeführten Daten.

Kaiser gibt als Beurteilungsgrundlage für die Trennleistung von Säulenfüllungen folgende Werte:

sehr gute Säulenfüllungen	n^1 = 2 000 bis 4 000
gute Säulenfüllungen	n^1 = 800 bis 1 200
mäßig bis schlechte Säulenfüllungen	n^1 = $<$600

Tabelle 8 *Berechnung der Trennstufenzahl und der Trennleistung*
Chromatogramm: Siehe Figur 8
Säule: 10 % Polyaethylenglycol-succinat auf Chromosorb W
Säulentemperatur: 160 ° C isotherm

Fettsäure	$b_{1/2}$ mm	t_{dr} mm	$\beta = \frac{t_{dr}}{b_{1/2}}$	$n = 5{,}54 \cdot \beta^2$	$n^1 = \frac{n}{4.5}$
C_{14}	1,7	30,5	17,9	1770	393
C_{16}	3,0	52,5	17,5	1694	375
C_{18}	5,3	93,5	17,6	1718	382
$C_{18:1}$	5,8	110,0	19,0	1995	444
$C_{18:2}$	7,0	142,0	20,3	2280	506
$C_{18:3}$	9,9	196,5	19,8	2180	485

Die Werte für die Trennleistung berechnet aus den 3 gesättigten Fettsäuren C_{14}, C_{16} und C_{18} stimmen innerhalb der Meßfehler gut überein (Mittel $n^1 = 383$).
Für die ungesättigten Fettsäuren ergeben sich etwas höhere Trennleistungen der Säule.

Unsere Säulenfüllung mit einer Trennleistung n^1 je nach Fettsäureester von 380 bis 500 ist als mäßig zu beurteilen. Mit einer genügend langen Säule von 4,5 m erzielten wir trotzdem gute Trennungen, wie aus den Gaschromatogrammen hervorgeht.

Trennstufenhöhe (HTS)

Das Verhältnis zwischen der Verbreiterung des Substanzpeaks (gemessen in Zeitwerten) zur Retentionszeit bezogen auf die Säulenlänge ist als Trennstufenhöhe definiert

$$HTS = 180{,}5 \cdot \left(\frac{b_{1/2}}{t_{dr}}\right)^2 \cdot L$$

HTS = Trennstufenhöhe in mm
$b_{1/2}$ = Peakbreite in halber Höhe, gemessen in mm
t_{dr} = Gesamtretentionszeit, gemessen in mm
L = Säulenlänge in m

Zwischen der Höhe einer Trennstufe (HTS) und der Trennleistung n^1 besteht folgender einfacher Zusammenhang:

$$HTS = \frac{1000}{n^1} \text{ (mm)}$$

In unserem Beispiel berechnet sich die Trennstufenhöhe für die Methylester gesättigter Fettsäuren wie folgt:

$$HTS = \frac{1000}{n^1} = \frac{1000}{383} = 26{,}2 \text{ mm}$$

Auflösung

Die Auflösung eines Stoffpaares ist definiert als das Maß, wie stark sich die Peaks beider Stoffe überlagern.

In einem Chromatogramm werden die Maxima zweier benachbarter Peaks durch eine Gerade verbunden. (Siehe Figur 7.) Nun wird das Lot durch das Tal zwischen beiden Peaks bis zur Null-Linie gefällt. Es entstehen 2 Streckenabschnitte. Der große Abschnitt g entspricht der mittleren Peakhöhe beider Peaks, der kleinere Abschnitt f ist um die Strecke zwischen Minimum und Null-Linie gekürzt. Das Verhältnis ϑ ist als Auflösung definiert.

$$\vartheta = \frac{f}{g} \text{ (stets kleiner als 1)}$$

Für das ziemlich schwer zu trennende Stoffpaar Stearinsäure-methylester und Oelsäure-methylester berechnet sich aus unseren Chromatogrammen die Auflösung ϑ zu 0,98. Die Auflösung beträgt somit 98 %. *Kaiser* gibt hierzu folgende Angaben:

Bei einem ϑ von	50 %	überlagert sich das Stoffpaar um	12,5 %
	80 %	überlagert sich das Stoffpaar um	3,2 %
	90 %	überlagert sich das Stoffpaar um	0,9 %
	99 %	überlagert sich das Stoffpaar um	0,0001 %

Die Ueberlagerung ist der Reinheit einer der beiden Komponenten gleichzusetzen, wenn man den Stoff präparativ gewinnen wollte. So ist z. B. bei einer Auflösung von 80 % jede Komponente mit 3,2 % der anderen verunreinigt. Die mit unserer Säule erreichte Auflösung von 98 % der Methylester der Stearin- und Oelsäure ist als sehr gut anzusehen. Andere Säuren werden zu 100 % voneinander getrennt.

Zusammenfassung

1. Es wird über gaschromatographische Trennungen von Fettsäureestern auf Lac-4-R-886-Säule berichtet. Die optimalen apparativen Bedingungen werden angegeben und einige Typen von Gaschromatogrammen erläutert.

2. Eine Integrator-Methode und 2 Handauswertungs-Methoden zur quantitativen Auswertung der Gaschromatogramme werden diskutiert und an praktischen Beispielen miteinander verglichen.
   Nach der Integrator-Methode ergab sich eine Standardabweichung von ± 0,3 bis ± 1,9 % (relativ), bei der Handauswertung eine solche von ± 0,7 bis ± 2,4 %.
   Der Wiederholstreubereich (P = 95) bei Handauswertung der Gaschromatogramme nach der Methode Höhe mal Retentionszeit schwankt je nach Fettsäure und Versuchsbedingungen zwischen ± 1,2 und 8 % (relativ).
3. An Modell-Mischungen mit reinen Fettsäure-methylestern haben wir Korrekturfaktoren für einzelne Fettsäuren bestimmt. Im Gegensatz zu den Angaben anderer Autoren, weichen die von uns bestimmten Faktoren für gesättigte und ungesättigte Fettsäuren nur minim von 1 ab.
4. Für die von uns benutzte Trennsäule haben wir Trennfaktor, Trennstufenzahl, Trennleistung und Trennstufenhöhe berechnet. Für das schwer zu trennende Stoffpaar Stearinsäure- und Oelsäure-methylester fanden wir eine Auflösung von 98 %. Die meisten übrigen Fettsäuren wurden quantitativ getrennt.

Résumé

1. Dans le présent mémoire, on étudie la séparation d'esters méthyliques d'acides gras par chromatographie gaz-liquide, sur une phase stationnaire de Lac-4-R-886. Les meilleures conditions d'opération sont indiquées et quelques types de fractogrammes sont discutés.
2. L'intégration à l'aide d'un intégrateur et deux méthodes d'évaluation manuelle ont été comparées. L'intégrateur reproduit les résultats avec une déviation standard relative de ± 0,3 à ± 1,9 %, tandis que ± 0,7 à ± 2,4 % sont obtenus par évaluation manuelle. Le domaine correspondant à un niveau de confiance de 95 % a été calculé pour une méthode manuelle: celle qui consiste à calculer le produit: temps de rétention fois hauteur, comme mesure de la surface d'un pic. Les valeurs trouvées dépendent de l'acide examiné et des conditions expérimentales, et se situent entre ± 1,2 % et ± 8 %.
3. Les facteurs de correction de la réponse du détecteur à ionisation de flamme ont été déterminés pour les esters méthyliques de quelques acides gras. Contrairement aux résultats indiqués par d'autres auteurs, les facteurs que nous avons trouvés ne s'écartent que très peu de l'unité.
4. Le nombre de plateaux théoriques de la colonne utilisée à été calculé, ainsi que quelques grandeurs qui en dérivent. La résolution entre pics fut de 98 % pour le mélange, difficilement séparable, des esters méthyliques de l'acide stéarique et de l'acide oléique. Une résolution à 100 % est obtenue pour les esters méthyliques de la plupart des autres acides gras.

Summary

1. The separations of fatty acid esters by gas-liquid chromatography (columns with Lac-4-R-886 or EGS on Chromosorb W) is discussed and the optimum operating conditions are given.
2. One integrator method and two manual methods are discussed and compared in practical examples of quantitative evaluation.

Relative standard deviation was ± 0,3 to ± 1,9 % for the integrator method, and ± 0,7 to ± 2,4 % for the manual method. (Scatter with [P = 95] for the manual method of evaluating chromatograms [peak height × retention time] varies according to fatty acids and experimental conditions between ± 1,2 and ± 8 % relative).

3. The correction factors for individual fatty acids have been determined by means of model mixtures of pure methyl esters. Contrary to data from other authors, we find our factors differing only slightly from 1.
4. We have calculated four characteristics relating to the separating power of the column used. In the case of the couple methylstearate methyloleate, difficult to separate, a resolution of 98 % was obtained. Most other fatty acids were quantitatively separated.

Literatur

1. *Kaiser R.:* Chromatographie in der Gasphase, Mannheim. Bibliographisches Institut.
   I Gaschromatographie B. I.-Hochschultaschenbücher 22/22 a (1965).
   II Kapillar-Chromatographie, Dünnfilm- und Dünnschichtkapillar-GC. 2. Aufl. B. I.-Hochschultaschenbücher 23/23 a (1966).
   III Tabellen zur Gas-Chromatographie, B. I.-Hochschultaschenbücher 24/24 a (1962).
   IV Quantitative Auswertung, B. I.-Hochschultaschenbücher 92/92 a (1965).
2. *Bartlet J. C.* und *Iverson J. L.:* J. Assoc. Off. Agric. Chem. **49**, 21 (1966).
3. *Bartlet J. C.* und *Smith D. M.:* Can. J. Chem. **38**, 2057 (1960).
   Zitiert nach *Bartlet* und *Inverson* (2).
4. *Seher A.:* Fette, Seifen, Anstrichmittel **68**, 255 (1966).
5. *Kaufmann H. P.:* Analyse der Fette und Fettprodukte I, 574, Berlin / Göttingen / Heidelberg, Springer-Verlag (1958).
6. *Hadorn H.* und *Jungkunz R.:* diese Mitt. **40**, 61 (1949), ebenda **41**, 435 (1950).
7. *Ackman R. G.:* J. of Gas Chrom. **2**, 173 (1964) zitiert nach *Kaiser* Bd. IV, S. 198 und *Seher* (4) S. 258.
8. *Ackman R. G.:* Facts and Methods **6**, 6 (1965).
9. *Ackman R. G.* und *Sipos J. C.:* J. Amer. Oil Chemist's Soc. **41**, 377 (1964), zitiert nach *Seher* (4).
10. *Dean R. B.* und *Dixon W. J.:* Analytic. Chem. **23**, 636 (1931), zitiert nach *Kaiser* (1) Bd. IV, S. 40.
11. *Frauendorf H.:* Z. anal. Chem. **221**, 305 (1966).