

Aus der Unilever Forschungsgesellschaft Hamburg

Über die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Fisch-Frittierfetten, 3. Mitt.*) Gelpermeationschromatographie von Fisch-Frittierfetten

Von M. U n b e h e n d und H. S c h a r m a n n

Mit 8 Abbildungen und 3 Tabellen

(Eingegangen am 27. Dezember 1972)

In den beiden ersten Mitteilungen konnte gezeigt werden, daß durch Verfütterung von über das übliche Maß hinaus oxydierten Bratfetten weder das Wachstum und die Protein-Efficiency noch die Fortpflanzung von Wistar-Ratten negativ beeinflußt wurde. Die beiden Bratfettarten, teilweise hydriertes Erdnußöl und Sojaöl, wurden bereits früher¹⁾ vor und nach der Belastung mittels Säure- und Jodzahl, Alkalifärbung nach Wurziger (zur Charakterisierung des Gehaltes an Oxyacarbonsäuren und Lactonen) und durch die Bestimmung des Gehaltes an oxydierten Fettsäuren charakterisiert. Wir haben nun mit Hilfe der ursprünglich für Hochpolymere entwickelten Gelpermeationschromatographie (GPC) die Konzentrationen an dimeren und höher oligomeren Triglyceriden in diesen Fetten bestimmt. Methodische Einzelheiten werden an anderer Stelle ausführlich behandelt^{2).}

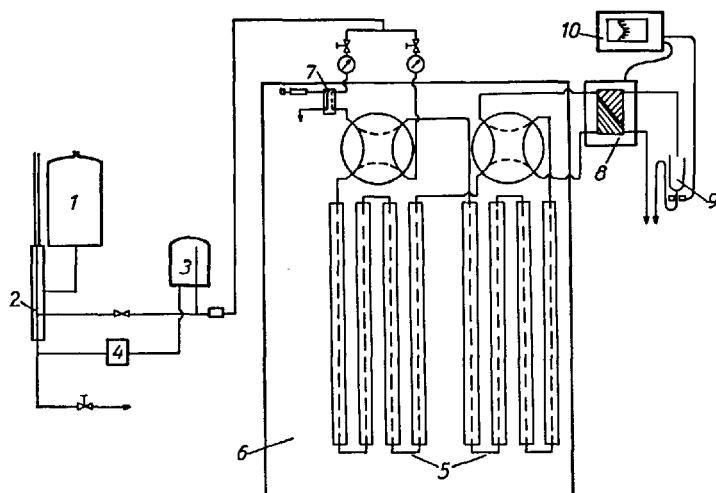


Abb. 1. Fließschema des Gelpermeationschromatographen.

* 1. Mitteilung: Lang, K., E. H. von Jan und J. Henschel, Z. Ernährungswiss. 9, 363 (1969).

2. Mitteilung: Lang, K. und J. Henschel, Z. Ernährungswiss. 10, 234 (1971).

Mit dieser Methode konnten die in Bratölen enthaltenen Oxydations- und Polymerisationsprodukte zum ersten Mal ohne Verseifung oder Umesterung der belasteten Fette direkt erfaßt werden.

Experimentelles

Prinzip der GPC und Eichung

Für die GP-Analyse stand der Chromatograph, Modell 200, der Fa. Waters zur Verfügung. Der Aufbau des Gerätes ist in Abb. 1 wiedergegeben. Das Lösungs- oder Elutionsmittel (in diesem Fall Tetrahydrofuran) wird aus einem Tank (1) über einen Entgaser (2), dessen Temperatur mindestens 10° C über der Betriebstemperatur liegt, und über einen Drucktank (3) mit Hilfe einer Milton-Roy-Dosierpumpe (4) auf zwei Säulensätze (5) für Proben- und Referenzseite im Säulenofen (6) gepumpt. Vor dem Säulensatz befindet sich noch die Probeneingabeeinheit (7), bestehend aus einer 2 ml fassenden Kapillare, die über ein Ventil mit dem Lösungsmittelstrom verbunden werden kann. Die Säulen enthalten die eigentliche Trennmatrix oder stationäre Phase, bestehend aus dicht gepackten vernetzten Polystyrol-Mikroperlen (Styragel) mit 40 bis 80 μm Durchmesser. Diese Perlen besitzen Poren, die je nach Gelsorte in gequollenem Zustand mittlere Durchmesser zwischen 40 nm und $1,3 \cdot 10^3$ nm aufweisen. Das Trennvermögen dieser Matrix beruht nicht auf Oberflächenadsorption, sondern auf dem Ausschluß der Moleküle oder ihrer Diffusion in die Poren. Bei der GPC verwendet man stets mehrere hintereinander geschaltete Trennsäulen, die – je nach Trennsäulentyp – mit Polystyrol-Mikroperlen mit Porendurchmessern definierter Größe gefüllt sind. Dadurch wird eine optimale Trennwirkung im interessierenden Molekulargewichtsbereich erreicht. Die Konzentrationsmessung hinter den Trennsäulen erfolgt meist mit Hilfe eines hochempfindlichen Differentialrefraktometers (8³). Das Elutionsvolumen wird durch einen sich selbsttätig entleerenden Syphon (9) gemessen, der 5 ml faßt. Bei Entleerung werden durch den Schreiber (10) auf dem Chromatogramm Markierungen (sogenannte Counts) eingezeichnet.

Die bei der Geräteeichung und den Bratfettuntersuchungen gewählten Versuchsbedingungen sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Die Eichung erfolgt mit einer Reihe von definierten mono- und polymeren Verbindungen, die entweder in Fetten vorkommen oder gelpermeationschromatographisch ein ähnliches Elutionsverhalten wie die Fette zeigen (s. Tab. 2). Abb. 2

Tab. 1. Untersuchungsbedingungen für die GPC-Analyse von Bratfetten

Gerät:	GP-Chromatograph, Modell 200, der Fa. Waters Ass., Framingham, Mass., USA
Lösungsmittel:	Tetrahydrofuran dest. (THF), rein, BASF
Säulensatz:	Mittlere Porendurchmesser des Styragels $1,3 \cdot 10^3$ Å; 120 Å (5 Säulen); 80 Å (2 Säulen); 60 Å; 40 Å
Temperaturen:	Im Säulenofen: 45° C Im Refraktometer: 44° C
Konzentration der Probenlösungen:	0,5 g/100 ml THF
Eingegebene Menge:	2 ml
Eingabedauer:	2 min
Durchflußgeschwindigkeit:	1 ml/min
1 Count:	Entspricht 5,0 ml Elutionsvolumen
Filtration vor Eingabe:	Durch HAK-1-Krueger-Cellulose-Asbest-Filter unter Stickstoff

Tab. 2. Molekulargewichte und Elutionsvolumina von GPC-Eichsubstanzen

Verbindung	Molekular- gewicht	Elutionsvolumen (Counts)
1. Triglyceride		
Tributyrin	302,3	67,5
Tricaproin	386,5	65,9
Trioenanthin	428,6	64,85
Tricaprylin	470,7	63,85
Tripelargonin	512,7	63,0
Tricaprin	554,8	62,6
Triundecanin	596,9	61,85
Trilaurin	638,9	61,1
Tristearin	891,8	59,1
2. Diglyceride		
Dicaprylin	326,5	65,6
Dicaprin	383,5	64,3
Dipalmitin	568,9	61,0
3. Monoglyceride		
Monopalmitin	330,5	65,2
Monostearin	358,6	64,25
4. Fettsäuren		
Caprinsäure	172,3	71,65
Laurinsäure	200,3	69,9
Myristinsäure	228,4	68,8
Palmitinsäure	256,4	67,7
Stearinsäure	284,5	66,3
5. Polyäthylenglykole (BDH Chemicals)		
Glykol	62,1	76,6
Polyäthylenglykol 400	400 ¹⁾	65,2
Polyäthylenglykol 600	600 ¹⁾	62,6
Polyäthylenglykol 1000	1000 ¹⁾	58,7
Polyäthylenglykol 1500	1500 ¹⁾	56,7
Polyäthylenglykol 6000	6000 ¹⁾	50,5
6. Polypropylenglykole (Waters)		
Polypropylenglykol 790	790 ¹⁾	59,9
Polypropylenglykol 1220	1220 ¹⁾	57,8
Polypropylenglykol 2020	2020 ¹⁾	55,0

¹⁾ Zahlenmittel-Molekulargewichte nach Hersteller-Angaben.

gibt die ermittelten Eichkurven (Auftragung des Logarithmus des Molekulargewichts gegen das Elutionsvolumen) wieder. Man erkennt, daß das Elutionsvolumen derartige Verbindungen im wesentlichen von ihrem Molekulargewicht abhängt. Der Einfluß der Polarität der Eichsubstanzen (Anzahl der Hydroxyl-, Keto- oder Carboxylgruppen, bez. auf die Molekulargewichtseinheit) ist jedoch deutlich erkennbar – vergleiche z. B. Tributyrin (MW 302,3) mit Monopalmitin (MW 330,5)²⁾.

Proben

Für die über einen längeren Zeitraum laufenden Fütterungsversuche wurden im Zentrallaboratorium der „Nordsee“ Deutsche Hochseefischerei GmbH, Bremerhaven, ein teilweise gehärtetes Erdnußöl und ein Sojaöl in drei getrennten

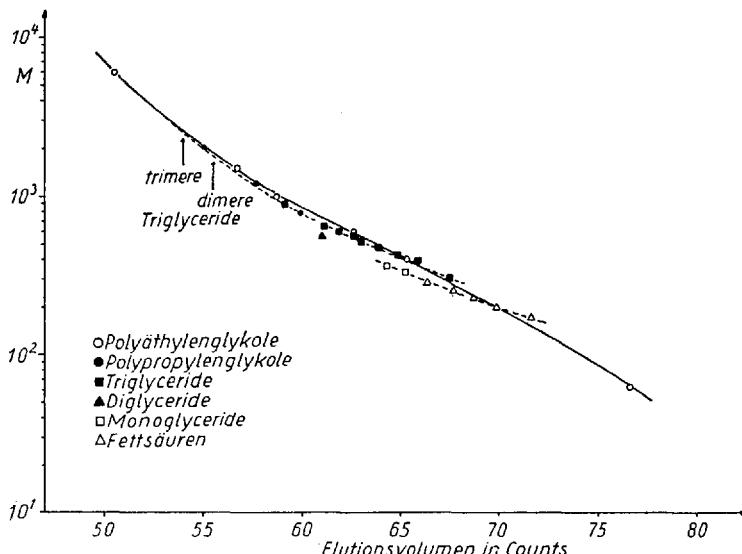


Abb. 2. GPC-Eichkurve für Fettsäuren, Glyceride und Polyglykole.

Serien (vgl. Tab. 3, Serienbezeichnung: I, II und III) im Laborbrater 72 h und 96 h bei $175^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ mit und ohne Bratgut erhitzt. Die genauen Versuchsbedingungen wurden in der ersten Mitteilung bereits eingehend beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion

- a) Interpretation der Chromatogramme und Fehlerquellen bei der quantitativen Auswertung.

Die Abb. 3–8 geben einige für die untersuchten Bratfette typischen Chromatogramme wieder. Am Beispiel der Abb. 4 soll zunächst das Wichtigste erläutert werden:

Registriert werden das Elutionsvolumen in Counts und die Brechungsdifferenz Δn zwischen Elutionsmittel und Eluat. Die beiden Peaks bei 53,8 und 55,5 Counts sind den größten vorkommenden Molekulargewichten zuzuordnen. Der Eichkurve zufolge besitzen diese Verbindungen das ungefähre Molekulargewicht 2600 bzw. 1800, sind also sehr wahrscheinlich trimere und dimere Triglyceride. Auf die Anwesenheit von höher oligomeren Triglyceriden kann aus der Verbreiterung des Peaks bei 53,8 Counts zu höheren Molekulargewichten geschlossen werden (vgl. z. B. Abb. 4, 6 und 8). Die Verbindungen, die den beiden Peaks bei 53,8 und 55,5 Counts entsprechen, konnten durch präparative GPC von den übrigen Bestandteilen des Bratfettes abgetrennt werden. Die Fraktion wurde mit Methanol umgeestert und gaschromatographisch sowie massenspektrometrisch untersucht. Dabei konnten dimere und trimere Fettsäuremethylester nachgewiesen werden².

Bei 59,0 Counts werden in Übereinstimmung mit der Eichkurve die Triglyceride der C₁₈-Fettsäuren eluiert. Es ist jedoch zu erwarten, daß diese Fraktion neben unveränderten auch oxydierte Triglyceride mit einer oder mehreren Keto-, Epoxy-, Hydroxy- oder Peroxygruppen enthält. Es

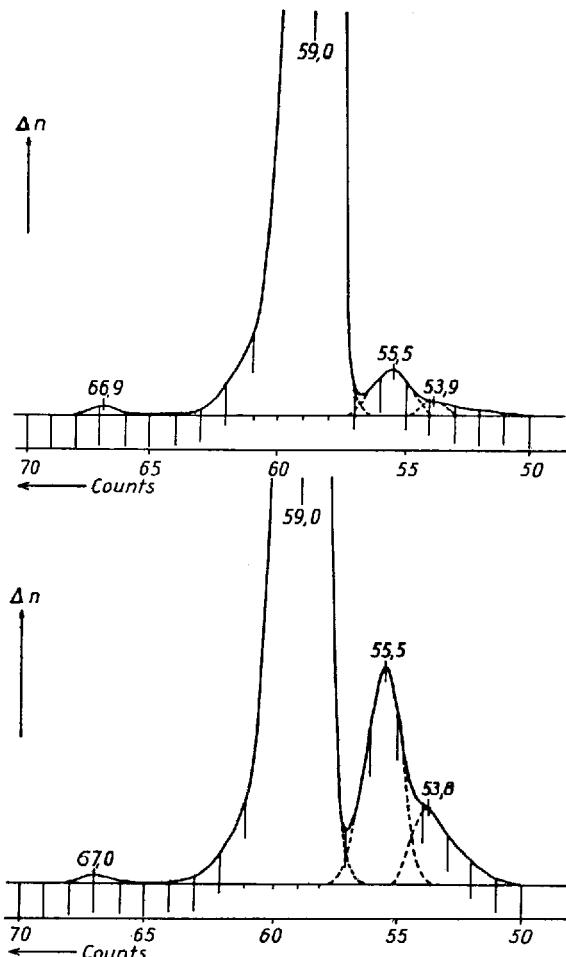


Abb. 3. BR 1/I. Serie; teilweise gehärtetes Erdnußöl, unbelastet.

Abb. 4. BR 2/II. Serie; teilweise gehärtetes Erdnußöl, 72 h belastet, ohne Bratgut.

erfolgt im allgemeinen keine Trennung der oxydierten von den unveränderten Triglyceriden, da durch diese Gruppen das Molekulargewicht nicht wesentlich verändert wird. Da die übrigen kleinen und sehr kleinen Peaks mit der größtmöglichen Empfindlichkeit des Differentialrefraktometers registriert wurden, erscheint der Triglycerid-Peak nur mit seinem unteren Teil. Deshalb haben wir jedes Chromatogramm bei genügend geringer Empfindlichkeit erneut gemessen, um mit Hilfe der Gesamtfläche die Flächenprozente der verschiedenen Bratfettbestandteile errechnen zu können.

Die linke Flanke des Triglycerid-Peaks zeigt bei etwa 61–62 Counts in allen Chromatogrammen eine Schulter, die offensichtlich von Diglyceriden (< 5-Flächen-%) herrührt*).

*). Wegen der sehr starken Überlagerung durch den Triglycerid-Peak ist eine genauere quantitative Auswertung nicht möglich, so daß Triglyceride und Diglyceride als Summe angegeben wurden.

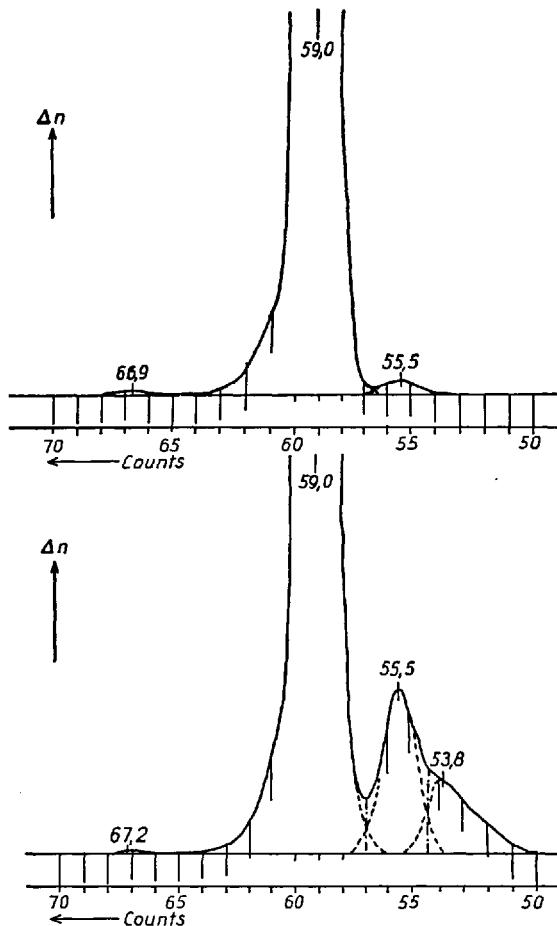


Abb. 5. BR 4/I. Serie; Sojaöl, unbelastet.
Abb. 6. BR 5/I. Serie; Sojaöl, 72 h belastet, ohne Bratgut.

Zuletzt tritt bei 66,8–67,2 Counts ein kleiner Peak auf, der freien Fettsäuren zuzuordnen ist. Aber auch Unverseifbares – z. B. pflanzliche Sterine, Fettalkohole – wird hier eluiert.

Die Interpretation von Peakprofilen, die wie bei oxydierten Triglyceriden von Substanzgemischen herühren, bietet erhebliche Schwierigkeiten. Die in den Abbildungen eingezeichneten gestrichelten Trennlinien entsprechen einer schematischen Flächentrennung durch eine im Minimum oder im Wendepunkt zwischen zwei Peaks auf die Abszisse heruntergezogene Senkrechte (angedeutet in Abb. 4). Wie man aber durch eine mathematische Analyse leicht abschätzen kann, sind bei diesem einfachen Verfahren relative Fehler bis zu 20 % möglich. Die Flächenprozentangaben können ganz allgemein nicht mit Gewichtsprozentwerten gleichgesetzt werden. So sind z. B. bei einem Mono-, Di- und Tripalmitin-Gemisch die Faktoren zur Umrechnung von Flächen- in Gewichtsprozente: 0,850, 1,002 und 1,040.

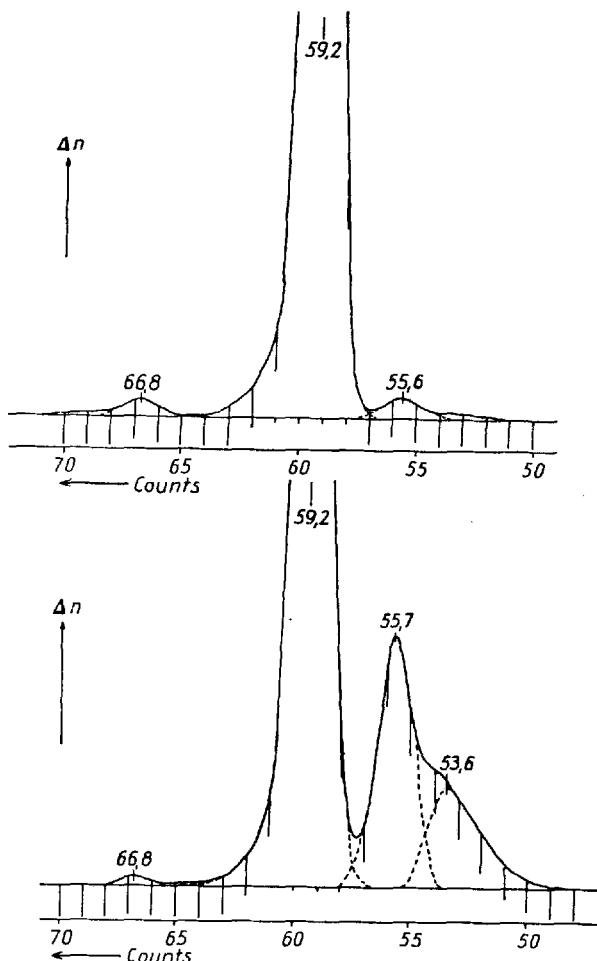


Abb. 7. BR 4/II. Serie; Sojaöl, unbelastet.
Abb. 8. BR 5/II. Serie; Sojaöl, 72 h belastet, ohne Bratgut.

b) Ergebnisse der GPC-Analyse der belasteten Bratfette.

In Tab. 3 sind die Ergebnisse der GPC-Analysen für die drei Bratfettserien zusammengestellt, wobei besonders bei den Angaben über trimere und höhere oligomere Triglyceride die eben genannten Fehlerquellen beachtet werden müssen.

In allen Serien steigen die Dimeren- und Trimeren-Gehalte mit der Belastungszeit an. Da Sojaöl (BR 4) 80% mehr Doppelbindung enthält als das teilweise gehärtete Erdnußöl, sollte man beim Sojaöl nach dem Braten einen wesentlich höheren Oligomerengehalt als beim Ernußöl erwarten. Der Zuwachs an oligomeren Triglyceriden beträgt beim gehärteten Erdnußöl nach 96stdg. Erhitzen im Mittel 18 Flächen-%, beim Sojaöl 25 Flächen-%. Das bedeutet, daß im Sojaöl nur rund 40% mehr oligomerisierte Triglyceride gebildet wurden als im gehärteten Erdnußöl. Der Unterschied

3 ZfE 2/73
Tab. 3. GPC-Untersuchungen an Bratfetten (Mengenangaben in Flächen-%)

Bezeichnung	Proben	Fettsäuren			Triglyceride neben wenig Diglyceriden			Dimere Triglyceride			Trimere und höhere oligomere Triglyceride*)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
BR 1	teilweise gehärtetes Erdnussöl, unbelastet	0,4	0,6	0,3	98,5	97,6	98,0	1,1	1,8	1,7	0,0	0,0	0,0
BR 2	teilweise gehärtetes Erdnussöl, 72 h bei 175°C belastet, ohne Bratgut	0,2	0,4	0,3	81,7	92,2	85,0	12,0	4,9	9,0	6,1	2,5	5,7
BR 3	teilweise gehärtetes Erdnussöl, 96 h bei 175°C belastet, ohne Bratgut	0,2	0,5	0,4	80,9	83,2	80,3	11,7	9,0	10,5	7,2	7,3	8,8
BR 4	Sojaöl, unbelastet	0,4	0,9	0,5	96,0	97,5	99,0	3,1	1,6	0,5	0,5	0,0	0,0
BR 5	Sojaöl, 72 h bei 175°C belastet, ohne Bratgut	0,4	0,4	0,9	81,4	80,3	71,5	13,3	12,3	15,7	4,9	7,0	11,9
BR 6	Sojaöl, 96 h bei 175°C belastet, ohne Bratgut	0,3	0,3	0,6	78,5	73,0	71,2	14,0	15,4	16,0	7,2	11,3	12,2
BR 7	Sojaöl, 56 h bei 175°C belastet, mit Bratgut	0,4	0,5	0,7	81,8	88,2	78,1	11,6	8,8	12,5	6,2	2,5	8,7
BR 8	Sojaöl, 72 h bei 175°C belastet, mit Bratgut	0,6	1,1	0,9	77,7	74,5	75,4	15,1	15,7	13,2	6,6	8,7	10,5

*) Erhöhte Fehlergrenze durch starke Überlappung (vgl. Text).

müßte aber auf Grund des verschiedenen Doppelbindungsgehaltes 80% betragen. Wie aus ähnlichen GPC-Untersuchungen an tierischen Fetten⁴⁾ hervorgeht, erfolgt der oxydative Angriff nicht nur in α -Stellung zu einer Doppelbindung, so daß die Unterschiede gerade unter den scharfen Oxydationsbedingungen beim Braten nicht mehr so deutlich in Erscheinung treten.

Wie bereits früher veröffentlicht¹⁾, wurden an den Bratfetten BR 3/I, BR 6/I und BR 8/I die Gehalte an apolaren dimeren Fettsäuren nach H. E. Rost⁴⁾ zu 1,2; 2,1 und 0,9 Gew.-% bestimmt. Diese Werte liegen nach Umrechnung in die entsprechenden Triglycerid-Konzentrationen viel niedriger als die mittels GPC bestimmten Werte, da mit der GPC-Methode sowohl polare als auch apolare oligomere Triglyceride erfaßt werden.

Die Flächenprozentwerte der drei Serien zeigen untereinander zum Teil große Unterschiede, die weit außerhalb der Fehlergrenze der Methode liegen. Es ist jedoch kaum zu erwarten, daß Bratversuche, die im Laborbrater im Abstand von vier Monaten durchgeführt werden, in allen Fällen zu gleichen Ergebnissen führen.

Es hat sich also gezeigt, daß die GPC eine rationelle und schnelle Methode zur Analyse von belasteten Bratfetten ist. Die Kenntnisse dergleicher Daten ist ein wichtiges Argument bei der Diskussion über die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von belasteten Bratfetten.

Danksagung

Wir danken Frau H. Heigenhauser für die sorgfältige Durchführung und Auswertung der GPC-Messungen.

Zusammenfassung

Die Anwendung der Gelpermeationschromatographie (GPC) zur Untersuchung von stark belasteten Bratfetten wird beschrieben. An Hand des Chromatogramms eines 96 h bei 175° C im Laborbrater erhitzten Fettes werden die wichtigsten Einzelheiten der Methode erläutert.

Mit Hilfe der GPC ist es grundsätzlich möglich, dimere, trimere und höher oligomere Triglyceride von unveränderten monomeren Triglyceriden und von den im Molekulargewicht nur wenig veränderten oxydierten monomeren Triglyceriden zu trennen. Freie Fettsäuren, Monoglyceride und mit bestimmten Einschränkungen auch Triglyceride können ebenfalls halbquantitativ bestimmt werden. Die Richtigkeit der Zuordnung spezifischer Peaks zu dimeren und trimeren Triglyceriden konnte durch vergleichende massenspektrometrische und gaschromatographische Untersuchungen an Fraktionen dieser Peaks erhärtet werden. Die an den überdurchschnittlich hoch belasteten Fisch-Frittierfetten gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß z. B. nach 96 h bei 175° C in Sojaöl bis zu 28% und in teilweise gehärtetem Erdnußöl bis zu 19% oligomere Triglyceride gebildet wurden.

Summary

The use of gel permeation chromatography (GPC) for investigation of over-treated frying oils has been described. The most important details of the method have been discussed on the basis of the chromatogram of an oil heated in a laboratory fryer for 96 h at 175°.

Its is principally possible to separate with GPC, dimeric, trimeric and higher oligomeric triglycerides from the unchanged and oxidised monomeric triglycerides which have changed only to a small extent w.r.t. molecular weight. Free fatty acids, monoglycerides and with certain limitations also triglycerides

can be also determined semiquantitatively. The correct assignment of specific peaks to dimeric and trimeric triglycerides could be confirmed by means of comparative mass spectrometric and gaschromatographic investigation of fractions of these peaks. The results obtained from extraordinarily over-treated fish frying oils show that, e.g. after 96 h at 175° C, up to 28 % oligomeric triglycerides are formed in soyabean oil and up to 19 % in partially hardened groundnut oil.

Literatur

1. Lang, K. und J. Henschel, Fette Seifen, Anstrichmittel 71, 1027 (1969). -
2. Scharmann, H., M. Unbehend und H. J. Strauß, Fette Seifen, Anstrichmittel, in Vorbereitung (vgl. auch: Unbehend, M und H. Scharmann, Vortrag Nr. 185, 11. ISF-Kongreß, Göteborg 1972). - 3. GPC 200 Instruction Manual, Waters Assoc. Inc., Framingham (Mass., USA). - 4. H. E. Rost, Fette, Seifen, Anstrichmittel 64, 427 (1962).

Anschrift der Verfasser:

Dr. M. Unbehend und Dr. H. Scharmann
Unilever Forschungsgesellschaft mbH, 2 Hamburg 50, Behringstr. 154