

**139. Separazione per via cromatografica dell'acido palmitico e stearico da un miscuglio di acido oleico, palmitico e stearico**

di Carmela Manunta.

(24. VIII. 39.)

Era interessante esaminare il comportamento cromatografico di un miscuglio di acidi saturi e non saturi, a catena di carbonio più o meno lunga. Il problema riusciva molto interessante non solo per sè stesso ma anche per l'utile applicazione che può avere nell'aiutare a chiarire la composizione di certi lipidi il cui studio, come per esempio nel caso della tignola degli alveari (*Galleria mellonella*), offre un grande interesse dal punto di vista biologico.

Come acidi sono scelti l'acido oleico non saturo ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) e gli acidi stearico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ) e palmitico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) saturi, perché più a portata di mano.

Vengono primieramente presi in esame vari assorbenti. Non si sono mostrati adatti allo scopo: l'ossido di alluminio, il carbonato di calcio ed il carbonato di zinco. Essi formano sali con gli acidi grassi e questi sono così fortemente assorbiti che non è possibile ottenere uno sviluppo del cromatogramma con vari solventi (etere di petrolio, etere, miscela a p.e. di petroletere ed etere, benzolo): pressochè tutto il miscuglio di acidi grassi si è riscontrato, dopo l'eluizione con etere contenente 1% di acido acetico ed evaporazione del solvente, nei primi due-tre  $cm^3$  di assorbente (sia ossido di alluminio che carbonato di calcio o di zinco) nella parte più alta della colonna cromatografica.

Ha dato invece buoni risultati l'uso, come assorbente, del solfato di magnesio anidro con  $\frac{1}{2}$  di  $H_2O$  e la franconite (questa ultima è da preferirsi al solfato di magnesio, sia per il fatto che possiede un potere di assorbimento maggiore, sia perchè il liquido di sviluppo passa attraverso la colonna molto più lentamente e quindi è possibile in questo caso una separazione più netta).

Tanto con il solfato di magnesio che con la franconite si è potuto constatare che l'acido stearico è meno assorbito dell'acido palmitico, dato che il primo si ritrova, dopo una successione di tre cromatogrammi, nella parte inferiore della colonna cromatografica ed il secondo nella parte superiore.

È quindi da ritenere per certo che nell'assorbimento cromatografico di un miscuglio di acidi grassi saturi questi si distribuiscono lungo la colonna in modo che quello a catena più breve di carbonio, essendo più assorbito, resta in alto e seguono man mano gli altri a catena di atomi di carbonio crescente.

In quanto all'acido oleico è probabilmente assorbito nella parte più alta della colonna, come secondo un recente lavoro del Giapponese *Kondo*<sup>1)</sup> pare dimostrato. Sicchè la serie successiva di affinità di assorbimento degli acidi grassi sarebbe: prima gli acidi non saturi (probabilmente in serie a partire da quello a più doppi legami e, a parità di doppi legami, a peso molecolare meno grande), poi gli acidi saturi in ordine successivo, da quello a catena di atomi di carbonio più corta fino a quello a catena più elevata.

A me non è riuscito di separare l'acido oleico, avendo ottenuto sempre dai residui degli eluati una parte cristallizzabile dall'alcool e dalla concentrazione dell'alcool di cristallizzazione un residuo semi-solido, probabilmente perchè nel cercare di separare l'acido palmitico dallo stearico lavavo finchè la prima goccia di solvente filtrato per evaporazione lasciava un residuo di acido grasso solido. Ma essendo ormai stato dimostrato, dal Giapponese *Kondo*, che l'acido oleico ha un potere di assorbimento maggiore dell'acido palmitico, è da ritenere che nell'analisi per via cromatografica di un miscuglio di acidi grassi non saturi e saturi convenga prima separare (lavando fino ad eliminare tutti gli acidi saturi nel primo cromatogramma) i due miscugli saturi da una parte e non saturi dall'altra e poi per successive cromatografie individuare i singoli componenti dei due miscugli.

#### Parte sperimentale.

Una soluzione petrolerea di un miscuglio di acidi oleico, palmitico, stearico (1 gr. di ognuno) viene fatta assorbire su tre colonne (diam. 3 cm, altezza 60) di solfato di magnesio con  $\frac{1}{2}$  di  $H_2O$ , previo lavaggio preliminare con 100 cm<sup>3</sup> di petroliere per ogni colonna cromatografica. Il cromatogramma viene sviluppato lavando la colonna con petroliere, regolando l'aspirazione in modo che il liquido di sviluppo prosegua lentamente (in un saggio preliminare ho notato che se l'aspirazione è troppo forte ed il lavaggio troppo abbondante, quasi tutto il miscuglio di acidi grassi si ritrova nell'ultima zona). Ritengo il cromatogramma sviluppato dopo lavaggio di circa 300—400 cm<sup>3</sup> di petroliere per ogni colonna. Poichè, essendo gli acidi grassi incolori e privi di fluorescenza, non si ha alcuna indicazione sull'andamento cromatografico, ogni colonna viene divisa dall'alto in basso in 6 zone (di 10 cm) e la serie delle zone rispettive riunite e eluite con etere.

Le soluzioni eteree sono evaporate fino a secchezza ed i residui sciolti in alcool assoluto. Le soluzioni alcoliche sono evaporate fino a due-tre-quattro ecc. cm<sup>3</sup> (a seconda che ci si trova in presenza di quantità meno o più abbondanti) e messe in frigorifero per qualche ora fino a cristallizzazione. Le singole frazioni cristallizzate sono

<sup>1)</sup> J. Pharm. Soc. Japan, Trans. 57, 218 (1937).

filtrate in camera frigorifera, lavate con un pò di alcool assoluto e indi messe in essiccatore.

Si è ottenuto:

per la zona	frazione cristallizzata	p. d. f.	residuo (dopo evaporaz. dell'alcool di cristallizzaz.)
1 <sup>a</sup>	—	—	0,1
2 <sup>a</sup>	0,10 gr.	55—57°	0,1
3 <sup>a</sup>	0,15 gr.	53—55,5°	0,3
4 <sup>a</sup>	0,35 gr.	52—55°	0,1
5 <sup>a</sup>	0,55 gr.	52—56,5°	0,3
6 <sup>a</sup>	tracce	—	tracce

Come si vede i punti di fusione delle varie zone sono lontani tanto dall'acido palmitico (60—62°) che dallo stearico (64—66°); siamo dunque in presenza di miscugli. Occorre quindi analizzare cromatograficamente le frazioni cristallizzate delle zone estreme (in tal caso la 2<sup>a</sup> e la 5<sup>a</sup>). Dato però che la quantità ottenuta è troppo piccola eseguisco un'altra serie di tre cromatogrammi nello stesso modo già suddescritto e ottengo:

per la zona	fraz. cristallizzata	p. d. f.
1 <sup>a</sup>	0,15 gr.	55—57°
2 <sup>a</sup>	0,30 gr.	55—57°
3 <sup>a</sup>	0,30 gr.	54—56°
4 <sup>a</sup>	0,40 gr.	54—57°
5 <sup>a</sup>	0,25 gr.	56—58°
6 <sup>a</sup>	tracce	—

Riunisco allora la frazione cristallizzata della seconda zona della prima serie di cromatogrammi e la prima e seconda della seconda serie, da una parte, e, dall'altra, le frazioni cristallizzate dalla quinta zona di ambedue le serie di cromatogrammi e sciolgo in petroletere. Le due soluzioni vengono fatte assorbire su due colonne di solfato di magnesio (di diam. 2 cm e di 46 cm di altezza). Dopo sviluppo ogni colonna è divisa in 4 zone (di 12 cm ciascuna) e ripetuto il trattamento già descritto, si ottiene:

Per la frazione superiore:

per la zona	fraz. cristallizzata	p. d. f.
1 <sup>a</sup>	0,12 gr.	54—57°
2 <sup>a</sup>	0,20 gr.	53—56°
3 <sup>a</sup>	0,10 gr.	—
4 <sup>a</sup>	0,05 gr.	—

Per la frazione inferiore:

per la zona	fraz. cristallizzata	p. d. f.
1 <sup>a</sup>	0,10 gr.	56—58°
2 <sup>a</sup>	0,15 gr.	52—55°
3 <sup>a</sup>	0,10 gr.	55—60°
4 <sup>a</sup>	0,20 gr.	57—62°

Di nuovo con lo stesso procedimento indicato sono cromatografate la frazione cristallizzata dalla 1<sup>a</sup> zona e rispettivamente dalla quarta zona di questi ultimi cromatogrammi su due piccole colonne di circa 36 cm di altezza e di 1,5 di diametro. Dopo lo sviluppo ogni colonna è divisa in tre zone:

Si ha per la parte superiore:

per la zona	fraz. cristallizzata	p. d. f.
1 <sup>a</sup>	0,08 gr.	55—60,5°
2 <sup>a</sup>	tracce	—
3 <sup>a</sup>	tracce	—

Questa frazione dopo esser stata seccata nel vuoto dà alla microanalisi:

$C_{16}H_{32}O_2$	Calcolato C 75,00	H 12,5%
	Trovato „ 75,23	„ 12,63%

Evidentemente pur essendo il punto di fusione un pò più basso dell'acido palmitico, dalla microanalisi si può ritenere per certo trattarsi di acido palmitico pressochè puro.

Per la parte inferiore si ha:

per la zona	fraz. cristallizzata	p. d. f.
1 <sup>a</sup>	tracce	—
2 <sup>a</sup>	0,10 gr.	59—60,5°
3 <sup>a</sup>	0,05 gr.	61—64°

Per la frazione cristallizzata della terza zona alla microanalisi si ha:

$C_{18}H_{36}O_2$	Calcolato C 76,09	H 12,67%
	Trovato „ 75,99	„ 12,78%

Il punto di fusione è un pò più basso dell'acido stearico (64—66°) ma la microanalisi è da ritenersi quasi esatta per l'acido stearico. Lo stesso procedimento è stato eseguito usando come assorbente la

franconite e come liquido di sviluppo una miscela di petroletere e 20% di etere.

Dopo tre separazioni cromatografiche ottengo per la zona superiore una frazione cristallizzata a p. d. f. 56—58° (un pò più basso di quello dell'acido palmitico) che dà alla microanalisi:

$C_{16}H_{32}O_2$	Calcolato	C 75,00	H 12,5%
	Trovato	„ 75,28	„ 12,65%

pressochè come si è ottenuto con l'uso del solfato di magnesio. Ugualmente per la zona inferiore si ha una frazione cristallizzata a p. d. f. 64—66° identico a quello dell'acido stearico e alla microanalisi si ha:

$C_{18}H_{36}O_2$	Calcolato	C 76,09	H 12,67%
	Trovato	„ 75,90	„ 12,64%

È quindi evidente che l'acido palmitico ha un'affinità di assorbimento maggiore che l'acido stearico.

Occorre notare che il punto di fusione dell'acido palmitico è un pò più basso probabilmente perché contiene tracce di acqua, che non si possono eliminare neanche col vuoto dato che non si può riscaldare oltre 30—40°.

Istituto di Chimica dell'Università di Zurigo.

#### 140. 7-Keto-3-oxy-ätio-chole-(5)-säure und verwandte Verbindungen

von T. Reiehstein und H. G. Fuchs<sup>1)</sup>.

(25. VIII. 39.)

Durch Oxydation von Cholesterin-acetat mit Chromsäure nach der von *J. Mauthner* und *W. Suida*<sup>2)</sup> aufgefundenen Methodik wird neben anderen Produkten 7-Keto-cholesterin-acetat erhalten. Dieser Stoff, der ursprünglich als  $\beta$ -Oxy-cholestenol-acetat bezeichnet wurde, hat in den letzten Jahren erhebliche Bedeutung erlangt, da er nach *Windaus*, *Lettré* und *Schenk*<sup>5)</sup> in 7-Dehydro-cholesterin und weiter in Vitamin D<sub>3</sub> umgeformt werden kann. Die Konstitution ist besonders von *Windaus* und Mitarbeitern<sup>3)4)5)</sup> aufgeklärt worden, die auch eine verbesserte Vorschrift geben<sup>5)</sup>. Trotzdem die Ausbeuten bei dieser Art der Einführung einer Ketogruppe begreiflicherweise ziemlich schlecht sind, so stellt die Methode doch einen der bequemsten und

<sup>1)</sup> Auszug aus der Diss. *H. G. Fuchs*, die später erscheint.

<sup>2)</sup> *J. Mauthner*, *W. Suida*, M. **17**, 579, bes. 594 (1896).

<sup>3)</sup> *A. Windaus*, *C. Resau*, B. **48**, 851 (1915).

<sup>4)</sup> *A. Windaus*, *B. Kirchner*, B. **53**, 619 (1920).

<sup>5)</sup> *A. Windaus*, *H. Lettré*, *F. Schenk*, A. **520**, 98 (1935).