

330. Trennung komplizierter Fettsäuregemische durch Chromatographie an Silbernitrat-haltigem Silicagel¹⁾

von Heribert Wagner, Jean-Daniel Goetschel und Peter Lesch

(4. XI. 63)

Die Trennung der gesättigten von den ungesättigten Fettsäuren mit Hilfe des Bleisalzverfahrens oder der Tiefkühlkristallisation hat sich bei gas-chromatographischer Kontrolle als unvollständig erwiesen. Neuerdings erzielt man durch Chromatographie von Quecksilberaddukten sehr gute Ergebnisse²⁻⁴⁾. Leider sind diese Verfahren zeitraubend und bei Routineuntersuchungen nicht immer sehr gut reproduzierbar. Einen wesentlichen Fortschritt brachte die Chromatographie an mit Silbernitrat imprägniertem Kieselgel⁵⁾. Wir haben diese Methode auf die Trennung verschiedener Fettsäuregemische biochemischer Bedeutung angewandt. In den Lipiden des Gehirns enthalten vor allem die Cerebroside neben den normalen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auch solche mit einer Hydroxylgruppe. Bis jetzt trennten wir die vier sich daraus ergebenden, strukturell verschiedenen Fettsäurereihen folgendermassen auf: Abtrennung der hydroxylhaltigen von den nicht-hydroxylierten Fettsäure-methylestern durch Chromatographie an einer Silicagelsäule unter nachfolgender Isolierung der gesättigten bzw. ungesättigten Fraktionen über die Quecksilberacetataddukte²⁾ ⁶⁾. Diese vier Fraktionen erhalten wir jetzt an einer mit 10% AgNO₃ versehenen Silicagelsäule in einem Arbeitsgang. Als Elutionsmittel diente Chloroform, bei dem wir mittels eines Gradienten die Konzentration von Äther auf maximal 10% erhöhten.

Tabelle 1 gibt die Resultate von vier Versuchen. Die Reihenfolge der Elution ist folgende: Gesättigte unsubstituierte, ungesättigte unsubstituierte, hydroxylierte gesättigte und hydroxylierte ungesättigte Fettsäure-methylester. Die Ausbeute betrug 97% der angewendeten Menge. Wir sammelten Fraktionen zu je 10 ml und bestimmten die Grenzen der einzelnen Gruppen mittels Dünnschichtchromatographie an Silbernitrat-haltigen Silicagelplatten. Die gas-chromatographische Analyse zeigte nur noch geringfügige Verunreinigungen der einzelnen Fraktionen untereinander (Tab. 2).

Ein weiteres Problem ergab sich bei Untersuchungen über den Stoffwechsel der Stearolsäure. Interessanterweise verhält sich diese Substanz gas-chromatographisch an einer Bernsteinsäure-Äthylenglykol-Polyester-Kolonnen fast wie Linolensäure. Die Retentionszeiten der beiden Methylester sind so wenig verschieden, dass man

¹⁾ Herrn Prof. Dr. KARL BERNHARD zum 60. Geburtstag gewidmet.

²⁾ Y. KISHIMOTO & N. S. RADIN, *J. Lipid Res.* **1**, 72 (1959).

³⁾ E. JANTZEN & H. ANDREAS, *Angew. Chem.* **70**, 656 (1958).

⁴⁾ E. JANTZEN & H. ANDREAS, *Chem. Ber.* **94**, 628 (1961); H. B. WHITE & F. W. QUACKENBUSCH, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **39**, 511 (1962).

⁵⁾ B. DE VRIES, *Chemistry & Ind.* **1962**, 1049; *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **40**, 184 (1963); L. J. MORRIS, *ibid.* **1962**, 1238.

⁶⁾ K. BERNHARD & W. PEDERSEN, *Helv.* **46**, 2363 (1963).

Tabelle 1. *Auftrennung eines Testgemisches und von Cerebrosidfettsäure-methylestern*

	Test- gemisch	Hirnregion				Lösungsmittel 100 ml CHCl ₃ + CHCl ₃ :Äther 9:1
		Grosshirn Rinde	Mark	Zwischen- hirn	Rauten- hirn	
aufgetragen mg	106	74	85	91	95	ml
Fraktion 1 *)	30	12	16	16	16	50–130
Fraktion 2	16	13	22	21	25	140–170
Fraktion 3	44	22	20	23	27	180–200
Fraktion 4	13	25	24	28	24	240–300
wiedergefunden mg	103	72	82	88	92	
wiedergefunden %	97	97	97	97	97	

*) Fraktion 1 = unsubstituierte-gesättigte
Fraktion 2 = unsubstituierte-ungesättigte
Fraktion 3 = hydroxy-gesättigte
Fraktion 4 = hydroxy-ungesättigte

Tabelle 2. *Gas-chromatographische Analyse einzelner Fraktionen*

Fettsäure- methyl- ester unsubst.	Fraktionen								Fettsäure- methyl- ester subst.
	1		2		3		4		
	Test- gem.	Cere- bros.	Test- gem.	Cere- bros.	Test- gem.	Cere- bros.	Test- gem.	Cere- bros.	
14:0	1,0	0,90			0,5				14:0
16:0	9,5	14,8		0,9	0,7	0,2			16:0
17:0	2,1				0,3				17:0
18:0	70,1	49,3		3,0	0,7	1,5	0,4		18:0
20:0	1,4	1,6			0,4	0,5			20:0
22:0	0,7	3,3			0,7	0,3	0,8		21:0
23:0	1,3	6,1			9,3	12,9	0,5		22:0
24:0	13,7	16,5			24,3	23,6	0,9		23:0
25:0		6,1			50,0	48,6	0,3		24:0
26:0		1,3			9,8	10,8			25:0
16:1				0,4	2,1	1,6			26:0
17:1			1,0				1,4		14:1
18:1			99,1	10,9	0,6		1,0	0,1	16:1
20:1				1,0			0,4	0,1	18:1
22:1				1,0				0,7	22:1
23:1				2,5			0,7	2,1	23:1
24:1				58,3			43,5	65,0	24:1
25:1				14,6			24,1	18,7	25:1
26:1				7,9			26,2	13,3	26:1

bei der Chromatographie eines Gemisches nur einen Hügel erhält. Dünnschicht-chromatographie an Platten von Kieselgel mit 10% Silbernitrat ergab aber einen ähnlichen Rf-Wert für den Stearol- wie für den Ölsäure-methylester. Wir haben nun diese Ergebnisse auf eine Silicagelsäule mit 10% Silbernitrat übertragen und erhielten nach Elution mit Äthylchlorid und Mischungen desselben mit Äther in der ersten Fraktion die gesättigten Fettsäure-methylester, in der zweiten Fraktion

die Monoensäure- und den Stearolsäure-ester und in der dritten Fraktion mit reinem Äther alle Methylester mit mehr als einer Doppelbindung. Tabelle 3 gibt die Resultate der Trennung eines Gemisches von Stearolsäure- und Leinölfettsäure-estern. Tabelle 4 enthält die entsprechenden gas-chromatographischen Analysenwerte. Da in Fraktion 2 nicht einmal eine Spur von Linolsäure nachweisbar war, kann in derselben auch keine Linolensäure vorhanden sein – dies bedeutet, dass die anstelle der Linolensäure im Gas-Chromatogramm auftretende Stearolsäure rein ist. Das gleiche gilt für die Linolensäure; da in Fraktion 3 keine Ölsäure und damit auch keine Stearolsäure enthalten ist, so muss der Hügel der Linolensäure in Fraktion 3 aus letzterer bestehen.

Tabelle 3. *Trennung von Stearol- und Linolensäure-methylester an einer 10% Silbernitrat enthaltenden Silicagelsäule*

	Methylester von				Lösungs- mittel
	Stearol- säure (1)	Leinölfett- säure (2)	1 + 2	1 + 2	
aufgetragen mg	54,0	104,0	97,4	94,0	
Fraktion 1	0,5	9,0	5,8		75 ml I*) + 75 ml I-1% II
Fraktion 2	52,7	13,7	54,7	58,4	220 ml I-1% II
Fraktion 3	3,0	80,5	40,8	36,3	150 ml II
wiedergefunden in mg	56,1	103,2	101,3	94,7	
wiedergefunden in %	103	99	103	101	

*) I Äthylchlorid, II Äthyläther

Tabelle 4. *Gas-chromatographische Analyse der einzelnen Fraktionen*

Fettsäure- methylester	Stearolsäure- methylester (I)			Leinölfettsäure- methylester (II)			1 + II		
	Frakt.			Frakt.			Frakt.		
	Frakt. 2	1	2	3	1	2	3	1 + 2	3
14:0		3,9			1,8				0,2
16:0		57,5	1,8		53,5	0,5			2,5
17:0		0,6			1,0				
18:0		37,1			43,1	0,3			1,7
20:0		1,0							
18:1			98,2			10,7			6,8
18:2				18,7			20,6		18,0
18:3				81,3			79,4		82,1
18:1	99,5						88,5		88,7

Experimentelles. – *Herstellung der Säulenfüllung:* 1 kg Silicagel MERCK 0,05–0,3 mm für Chromatographie wird in einem Stutzen mit konz. Salzsäure unter Rühren bedeckt, über Nacht stehengelassen, darauf dreimal mit Wasser abdekantiert, auf eine Nutsche gebracht, mit dest. Wasser neutral gewaschen, mit 1 l Methanol von der Hauptmenge des Wassers befreit und 12 Std.

bei 120° getrocknet. 35 g dieses gereinigten Materials werden mit 7 g einer 50-proz. Silbernitratlösung versetzt, 5 Min. geschüttelt und dann 4 Std. bei 120° getrocknet. Länge der Säule: 50 cm, innerer Durchmesser: 18 mm. Zum Schutze gegen Licht wurde die Säule mit Aluminiumfolie umwickelt.

Chromatographie: A) Trennung substituierter und normaler gesättigter und ungesättigter Fettsäuren. Die obige Menge reicht für eine Säule. Das Einfüllen und Spülen geschah mit Chloroform. Um einen Konzentrationsgradienten zu erhalten, haben wir einen Kolben mit Magnetrührer, Tropftrichter und Verbindungsrohr der Säule vorgeschaltet. Der Kolben enthält zu Beginn 100 ml Chloroform; durch den Tropftrichter lässt man das zweite Lösungsmittel, in unserem Falle Chloroform: Äther 9:1 zufließen. Die Mengen sind aus Tabelle 1 ersichtlich. 100 mg Methylstergemisch lassen sich auf diese Weise noch gut auftrennen. Die Säulen regenerieren wir mit reinem Chloroform, so dass sie wiederholt verwendbar sind.

B) *Trennung von Stearol- und Linolensäuremethylester.* Die Füllung der Säule erfolgt wie unter A, aber mit Äthylenchlorid. Letzteres dient auch als Lösungsmittel für den Beginn der Elution; danach folgen Äthylenchlorid: Äther 9:1 und reiner Äther (Tab. 3).

C) Die *Dünnschichtchromatographie* führten wir nach STAHL durch⁷⁾. Laufmittel: Chloroform: Äther 9:1. Sichtbarmachung der Flecken: durch ultraviolettes Licht nach Besprühen der Platten mit einer 0,05-proz. Lösung von Rhodamin B in 50-proz. wässrigem Äthanol.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

SUMMARY

Column chromatography on silicagel impregnated with 10% silver nitrate results in a good resolution of a complex mixture of fatty acid methyl esters. Examples are shown for separation of (a) saturated, unsaturated and monohydroxylated and (b) linolenic and stearolic esters.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel

⁷⁾ E. STAHL, *Chemikerzeitg.* 82, 323 (1958).

331. Recherches sur la formation et la transformation des esters XLVIII¹⁾

Sur la préparation de monoesters phosphoniques d' amino-alcools et sur leur quaternisation

par **Emile Cherbuliez, A. Gabbai, M. Gowhari et J. Rabinowitz**

(15 VIII 63)

Les oxydes (anhydrides) phosphoniques réagissent facilement avec les alcools, pour donner exclusivement les monoesters phosphoniques correspondants²⁾. Avec les alcools sensibles à l'acidité libérée par cette réaction (alcools tertiaires, terpéniques, etc.), il faut travailler en présence de base tertiaire³⁾, quoique ceci diminue en soi la vitesse de l'alcoolyse de la fonction P–O–P⁴⁾.

¹⁾ XLVII^e communication: *Helv.* 46, 2464 (1963).

²⁾ E. CHERBULIEZ, BR. BAEHLER, F. HUNKELER & J. RABINOWITZ, *Helv.* 44, 1812 (1961).

³⁾ E. CHERBULIEZ, G. WEBER, A. YAZGI & J. RABINOWITZ, *Helv.* 45, 2652 (1962).

⁴⁾ E. CHERBULIEZ, BR. BAEHLER & J. RABINOWITZ, *Helv.* 44, 1820 (1961).