

epithio fatty acids. Separation of epithio and epoxy acids are only slightly less satisfactory than by the direct systems. In both epithio and epoxy compounds neither geometrical nor positional isomers are resolved by reversed-phase TLC.

Separation of epithio fatty alcohols are less satisfactory than the corresponding fatty acids both by direct and reversed-phase TLC, as can be seen from Table II.

Thus epithio fatty acids and their derivatives can be well resolved both by direct and reversed-phase TLC in a manner corresponding to their oxygen analogues.

*Regional Research Laboratory,  
Hyderabad (India)*

M. R. SUBBARAM  
M. W. ROOMI  
K. T. ACHAYA

- 1 R. SUBBARAO, M. W. ROOMI, M. R. SUBBARAM AND K. T. ACHAYA, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 295.
- 2 T. W. FINDLEY, D. SWERN AND J. T. SCANLAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 67 (1945) 4126.
- 3 G. KING, *J. Chem. Soc.*, (1949) 1817.
- 4 D. SWERN, G. N. BILLEN, T. W. FINDLEY AND J. T. SCANLAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 67 (1945) 1786.
- 5 A. LAPWORTH AND E. N. MOTTRAM, *J. Chem. Soc.*, (1925) 1628.
- 6 H. P. KAUFMANN AND R. SCHICKEL, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 65 (1963) 625.
- 7 M. W. ROOMI, M. R. SUBBARAM AND K. T. ACHAYA, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 106.

Received August 30th, 1965

*J. Chromatog.*, 21 (1966) 324-326

## Dünnschicht-Chromatographie von Lipiden mit Gradienten-Elution auf Kieselgel G

Das Gebiet der Lipide umfasst zahlreiche Substanzklassen, die sich zum Teil sehr erheblich voneinander unterscheiden. Trotzdem gewinnt man sie aus biologischem Material in der Regel mit Hilfe organischer Lösungsmittel als Total-Lipid-extrakt<sup>1</sup>. Eine vollständige Auftrennung des Rohextraktes ist daher gegenwärtig fast nie möglich, und man muss sich häufig mit einer Trennung in einzelne Gruppen begnügen. Mit einem normalen Dünnschicht-Chromatogramm ist selbst dieses bescheidene Ziel nicht ohne weiteres erreichbar: Ein beträchtlicher Anteil des Extraktes wandert mit der Fließmittelfront oder bleibt am Startpunkt zurück. Bessere Resultate erzielt man mit Hilfe der Mehrfachchromatographie (vgl. z.B. Lit. 2). Dieser Technik haftet aber neben dem grossen Aufwand an Zeit vor allem der schwerwiegende Nachteil an, dass sich die chromatographierten Substanzen während der erforderlichen Zwischentrocknungen teilweise verändern können.

Beides wird bei Gradienten-Elution vermieden. Schon mit einem sehr einfachen, konvexen Elutionsgradienten erreicht man unter Umständen befriedigende Trennungen, z.B. von Mono-, Di- und Triglyceriden sowie verschiedenen Pentaerythritestern nach RYBICKA<sup>3</sup>. Eine gute Anpassung an spezielle Probleme wird aber erst möglich, wenn die Form des Elutionsgradienten frei wählbar und nicht mehr an die Versuchsanordnung gebunden ist. Wir haben vor kurzem eine Technik entwickelt<sup>4,5</sup>, die praktisch jede beliebige Gradientenform zu verwenden gestattet<sup>6</sup>. Man kann

*J. Chromatog.*, 21 (1966) 326-331

damit sogar die Konzentrationen mehrerer Elutionsmittelkomponenten in unterschiedlicher Weise variieren und so den speziellen Eigenschaften einzelner Substanzen in der zu chromatographierenden Probe Rechnung tragen (z.B. durch Zusatz von Säuren, Basen oder Komplexbildnern zum Fließmittel). Der Elutionsvorgang ist reproduzierbar und bleibt übersichtlich, da man die momentane Fließmittelzusammensetzung am Eintauchspiegel während der ganzen Chromatographie kennt.

Im folgenden werden zwei Gradienten beschrieben, die sich besonders gut dazu eignen, einen Überblick auf die verschiedenen Substanzklassen eines Lipidgemisches zu vermitteln (Fig. 1 und 3). Kohlenwasserstoffe, Cholesterylester, Glyceride, Cholesterin, Cerebroside, Ganglioside und Lecithin beginnen dabei nacheinander zu wandern. Die Substanzen zeigen auffallend schmale Fleckenformen mit relativ hoher örtlicher Substanzdichte. Eine eventuelle Neigung zur "Schwanzbildung" ist stark reduziert und der Nachweis von Substanzen, die nur in geringen Konzentrationen in der Probe vorliegen, ganz erheblich erleichtert.

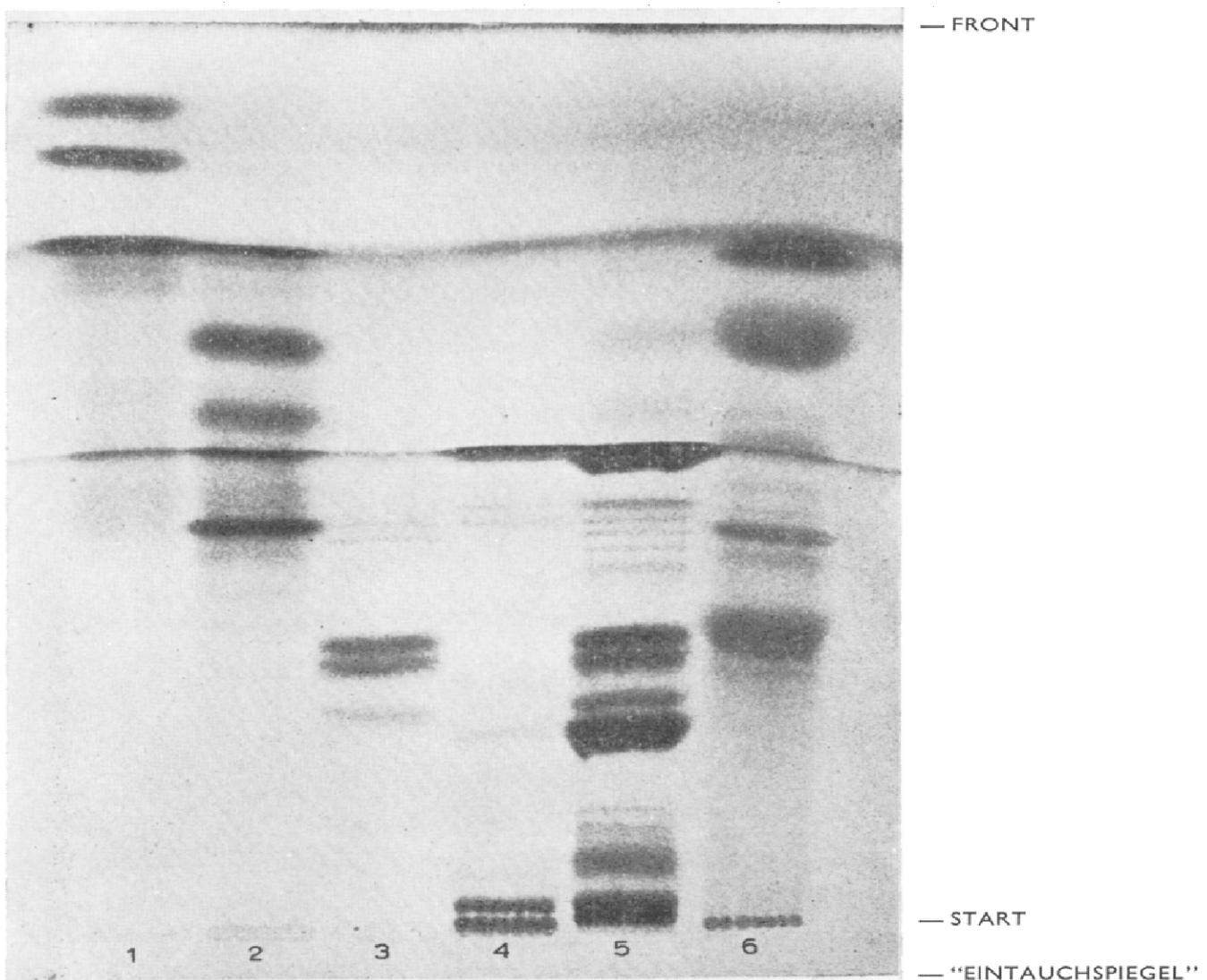


Fig. 1. Gradienten-Elution der Lipidproben 1-5 und der Farbstoff-Testmischung 6 mit Fließmittel A auf Kieselgel G. Gesamtlauftrecke des Fließmittels (6 ml);  $s_0 = 18$  cm in etwa 50 Min. Verlauf der Konzentrationsgradienten, siehe Fig. 3; Trennbedingungen, siehe Text.

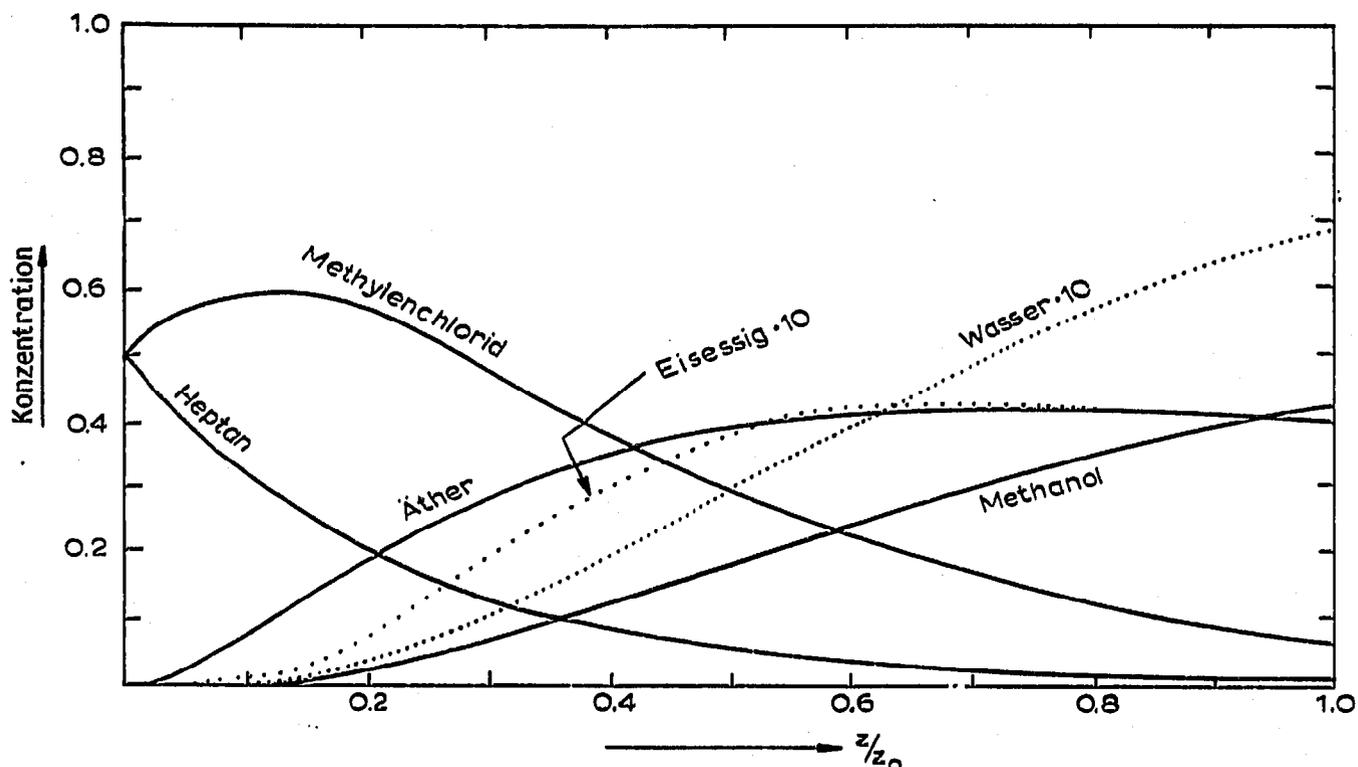


Fig. 2. Konzentrationsverlauf der Komponenten von Fließmittel A in Abhängigkeit vom Streckenverhältnis: momentane Fließmittellaufstrecke  $z$ /Gesamtlaufstrecke  $z_0$  (siehe Fig. 1). Die relativ kleinen Konzentrationen von Eisessig und von Wasser wurden um den Faktor 10 vergrößert eingezeichnet. Unberücksichtigt blieben hier die kleinen Konzentrationsverschiebungen, welche beim Durchlaufen des Fließmittels durch den Fließmittelbehälter auftreten (vgl. dazu Fig. 7 in Lit. 4).

#### Anordnung zur Chromatographie

Eine brauchbare Anordnung zur Dünnschicht-Chromatographie mit Gradienten-Elution wurde früher<sup>4</sup> beschrieben. Sie liess sich inzwischen stark vereinfachen: Eine als Fließmittelbehälter dienende Teflonkapillare ist zickzackförmig auf einer schiefen Ebene mit verstellbarem Neigungswinkel montiert. Das Fließmittel läuft daraus kontinuierlich über eine mehrfach durchbrochene Stahlkapillare nach Art einer Berieselungsanlage direkt auf die Dünnschicht, wobei die Fließmittelfuhr durch hydrostatischen Druck und durch Kapillarkräfte reguliert wird. Die Chromatographie erfolgt in einer Sandwich-Kammer (BN-Kammer\*). Eine genaue Beschreibung der vereinfachten Anordnung findet sich in Lit. 5 und 6. Eine entsprechende Ausführungsform wird in Kürze im Handel erhältlich sein\*.

#### Herstellung der Fließmittel

Auf Einfachheit der Fließmittelzusammensetzung wurde bewusst verzichtet, um die Variationsfähigkeit der Methode zu demonstrieren (Fig. 2 und 4). Fließmittel A wird in einer kleinen 6-Kammer-Mischbatterie<sup>4</sup> hergestellt; Fließmittel B entsteht direkt in der Teflonkapillare: Die 5 hintereinander eingesaugten Flüssigkeiten durchmischen sich teilweise aufgrund von Reibung beim laminaren Durchströmen der Kapillare<sup>5</sup>. In beiden Fällen ergeben sich die Konzentrationen der ver-

\* Firma C. Desaga GmbH, Heidelberg (Deutschland).

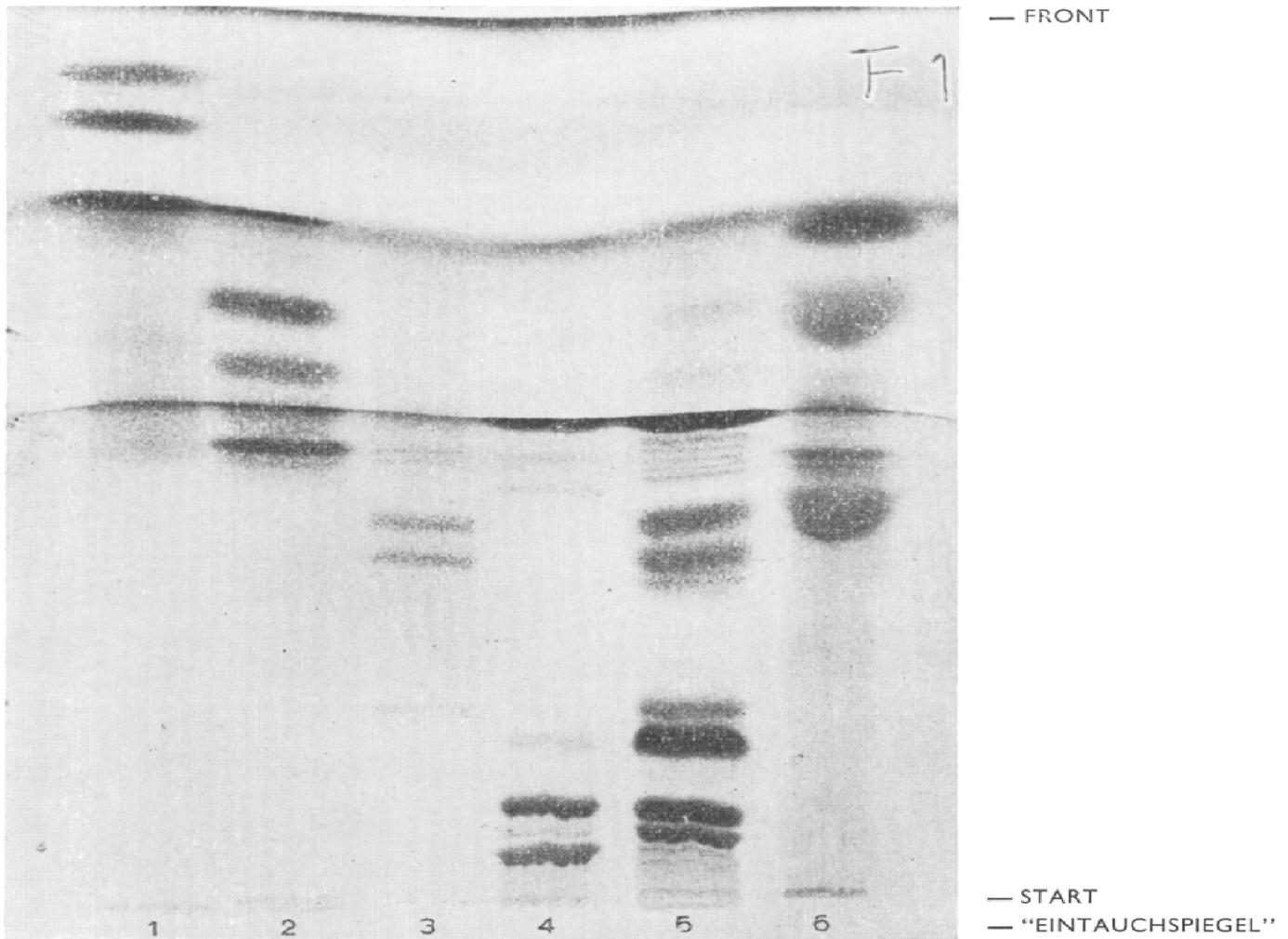


Fig. 3 Gradienten-Elution der Lipidproben 1-5 und der Farbstoff-Testmischung 6 mit Fließmittel B auf Kieselgel G. Gesamtlaufstrecke des Fließmittels (6 ml):  $z_0 = 17.5$  cm in etwa 50 Min. Verlauf der Konzentrationsgradienten siehe Fig. 4. Trennbedingungen siehe Text.

schiedenen Komponenten im Auslauf der "Mischbatterien" ( $\approx$  am Eintauchspiegel des Chromatogramms) durch Summation von (Relativ-)Beiträgen der einzelnen Kammern bzw. Volumensegmente. Diese Beiträge sind in Modellversuchen mit Salzlösungen durch Leitfähigkeitsmessungen ermittelt worden.

Das erste Drittel von Fließmittel B (Fig. 4) wurde in Anlehnung an das erste Drittel von A zusammengestellt. Die verbliebenen, zum Teil doch beachtlichen Unterschiede wirken sich überraschenderweise kaum auf die Chromatographie aus, wie ein Vergleich der oberen Chromatogrammhälften in Fig. 1 und 3 zeigt. Dies mag ein Grund sein für die erstaunlich gute Reproduzierbarkeit der Methode. Ein strenger Vergleich beider Gradienten wäre allerdings nur unter Berücksichtigung der in der Dünnschicht zwangsläufig auftretenden Fließmittelentmischung<sup>7</sup> möglich.

#### Fließmittel A

- Die 6 Mischbatterie-Kammern<sup>4</sup> mit je 1.3 ml Inhalt werden gefüllt mit:
- (I) Heptan-Methylenchlorid (1:1, v/v);
  - (II) Methylenchlorid;

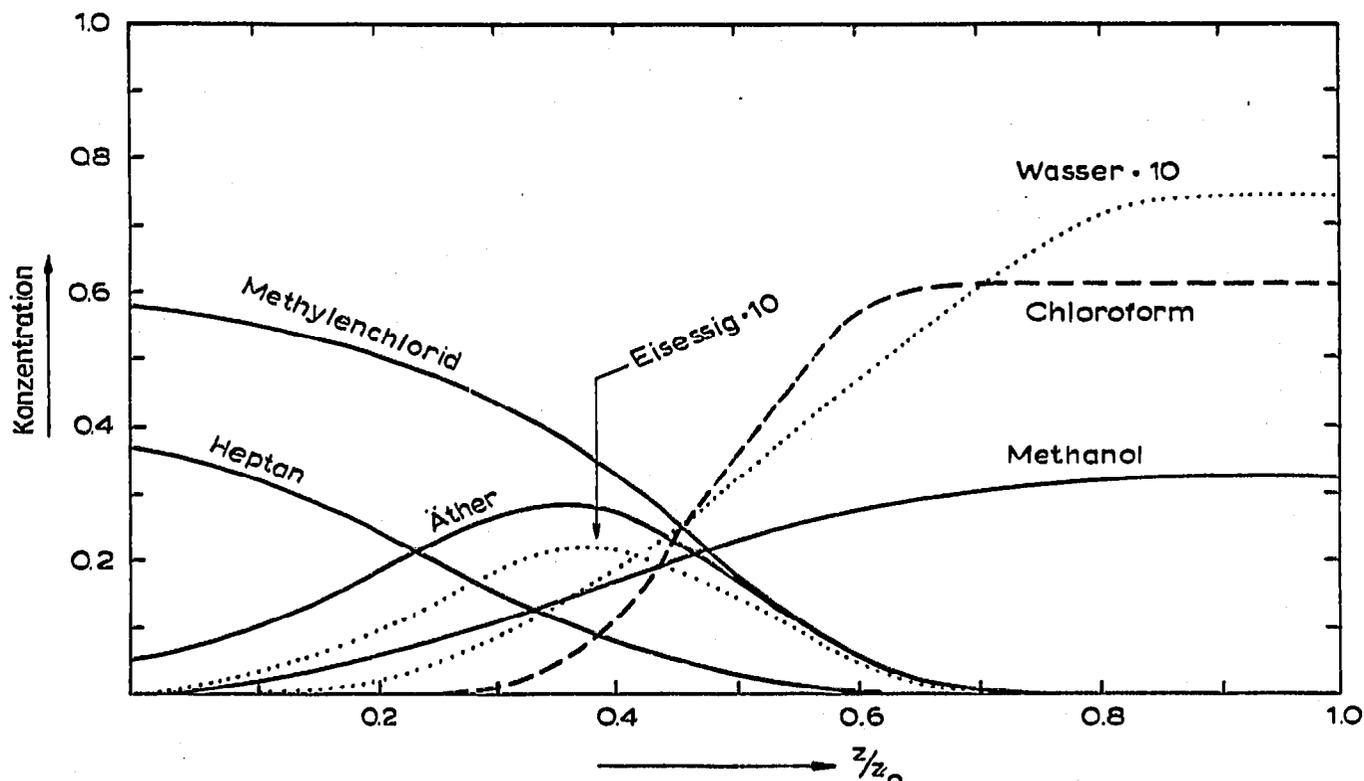


Fig. 4. Konzentrationsverlauf der Komponenten von Fließmittel B am Eintauchspiegel des Dünnschicht-Chromatogramms in Fig. 2 in Abhängigkeit vom Streckenverhältnis: momentane Fließmittellaufstrecke  $z$ /Gesamtlaufstrecke  $z_0$ . Die relativ kleinen Konzentrationen von Eisessig und von Wasser sind um den Faktor 10 vergrößert eingezeichnet.

- (III) Äther;
- (IV) Äther-Methanol-Eisessig-Wasser (30:50:20:8, v/v);
- (V) Äther-Methanol-Wasser (50:10:10, v/v);
- (VI) wie V.

Der Auslauf der Mischbatterie (aus Kammer Nr. 1) wird in die 6 ml-Teflonkapillare (360 cm lang, Innendurchmesser 1.45 mm) geleitet und die Kapillare so mit der Zuleitung verbunden, dass der unpolare Teil des Fließmittels zuerst auf die Dünnschicht gelangt.

#### Fließmittel B

In die 6 ml-Teflonkapillare (360 cm lang, Innendurchmesser 1.45 mm) werden hintereinander ohne Einschluss einer trennenden Luftblase folgende Flüssigkeiten in der angegebenen Reihenfolge eingesaugt (Füllgeschwindigkeit etwa 0.1 ml/sec):

- (I) 1 ml Heptan-Methylchlorid-Äther (37:58:5, v/v);
- (II) 1 ml Heptan-Methylchlorid-Äther-Methanol-Eisessig (19:48:24:7:1.5, v/v);
- (III) 1 ml Heptan-Methylchlorid-Äther-Methanol-Eisessig-Wasser (5:35:35:20:3:2, v/v);
- (IV) 1 ml Chloroform-Methanol-Wasser (69:26.5:4.5, v/v);
- (V) 2 ml Chloroform-Methanol-Wasser (60:32.5:7.5, v/v).

Die Kapillare wird so mit der Zuleitung verbunden, dass der unpolare Teil des Fließmittels zuerst auf die Dünnschicht gelangt.

*Substanzproben*

Substanzen jeweils nach zunehmender Polarität geordnet.

1. Squalen (Fluka)  
Cholesteryl-stearat (Merck)  
Methyl-oleat (Fluka)
2. Triolein (Fluka)  
Diolen (Fluka) } alle Isomere  
Monoolein (Fluka)
3. Cerebroside
4. Cholesterin (Merck)  
Ei-Lecithin "reinst" (Merck)
5. Total-Lipidextrakt aus Kuhrückmark nach FOLCH<sup>1</sup>, unter anderem enthaltend: Cholesterin, Cerebroside, Ganglioside, Lecithin
6. Sudanschwarz B (Merck)  
Cibacetrot B (Ciba)  
Artisilblau BSQ (Sandoz)  
Artisilblaugrün S (Sandoz).

*Trennbedingungen und Nachweis der Substanzen*

Die in Fig. 1 und 3 gezeigten Chromatogramme wurden auf den üblichen, 200 × 200 mm Platten erzielt, beschichtet mit Kieselgel G (Merck), Streichdicke 0.25 mm. Unmittelbar vor der Chromatographie wurde die lufttrockene Schicht 10 min bei 110° aktiviert, die Platte 5 min auf dem Kühlblock der BN-Kammer abgekühlt, auf die erkaltende Schicht die Substanzproben aufgetragen und dann sofort die Chromatographie (bei 18°) gestartet. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 70 %.

Die fertigen, 5 min bei 110° getrockneten Chromatogramme wurden mit etwa 6 ml 10% iger Phosphomolybdänsäure in abs. Äthylalkohol besprüht und 10 min auf 110° erhitzt.

*Dank*

Die vorliegenden Experimente wurden zum überwiegenden Teil im Forschungslabor der Neurologischen Universitätsklinik Basel (Schweiz) durchgeführt.

*Forschungslaboratorium für Medizinische Akustik,  
Universität Düsseldorf (Deutschland)*

A. NIEDERWIESER

- 1 J. FOLCH, M. LEES UND G. H. SLOAN-STANLEY, *J. Biol. Chem.*, 226 (1957) 497;  
M. LEES, J. FOLCH, G. H. SLOAN-STANLEY UND S. CARR, *J. Neurochem.*, 4 (1959) 9.
- 2 H. JATZKEWITZ UND E. MEHL, *Z. Physiol. Chem.*, 320 (1960) 251.
- 3 S. M. RYBICKA, *Chem. Ind. (London)*, (1962) 308.
- 4 A. NIEDERWIESER UND C. G. HONEGGER, *Helv. Chim. Acta*, 48 (1965) 893.
- 5 A. NIEDERWIESER, *J. Chromatog.*, in press.
- 6 A. NIEDERWIESER UND C. G. HONEGGER, in C. GIDDINGS AND R. A. KELLER (Editors), *Advances in Chromatography*, Vol. II, Dekker, New York, in press.
- 7 A. NIEDERWIESER UND M. BRENNER, *Experientia*, 21 (1955) 50, 105.

Eingegangen den 30. August 1965