

## DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON FETTSÄUREN AUF SILANISIERTEM KIESELGEL

DIETER HEUSSER

Kontroll-Laboratorium, E. Merck AG, Darmstadt (Deutschland)

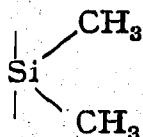
### SUMMARY

#### *Thin-layer chromatography of fatty acids on silanized silica gel*

Fatty acid hydroxamates and esters as well as free fatty acids are separated on Silica Gel HF<sub>2b4</sub> silanized for thin-layer chromatography, by the principle of reversed phase chromatography. It is shown that the reproducibility of the separations is satisfactory. A thin-layer chromatographic analytical procedure was worked out, with which the lower, unsaturated and higher fatty acids are successively detected.

Zur Trennung von Fettsäuren bzw. deren Estern wendet man in der Papierchromatographie paraffin-, undecan- bzw. siliconimprägnierte Papiere als stationäre Phasen an. Dieses Verfahren wurde sinngemäss auf die Dünnschichtchromatographie übertragen. Hier verwendet man als Trägermaterial Kieselgel G oder Kieselgur G, das mit den genannten Hydrophobierungsmitteln imprägniert wird. Als Fließmittel bewährten sich u.a. Eisessig-Wasser-Mischungen und Chloroform-Methanol-Wasser-Gemische (25:75:5). Diese sog. umgekehrte Phasen-Chromatographie ist mit dem Nachteil behaftet, dass die Imprägnierung nur schwer reproduzierbar ist. So gelangten wir in der Papierchromatographie der Fettsäuren nur dann zu reproduzierbaren Ergebnissen, wenn die Imprägnierung des Papiers gewichtsmässig überwacht wurde. Die reproduzierbare Imprägnierung auf Dünnschichten gestaltet sich noch schwieriger. Es lag daher nahe, ein Sorptionsmittel zu entwickeln, das vom Produktionsgang her einen gleichmässigen Hydrophobierungsgrad aufweist: das silanisierte Kieselgel. Dieses Präparat wird hergestellt durch Umsetzung von Kieselgel mit Dimethyldichlorsilan. Hierbei reagieren die freien OH-Gruppen der Kieselsäure mit dem Dichlordimethylsilan.

Die in der Fig. 1 wiedergegebene Struktur der hierbei entstehenden Verbindung ist am wahrscheinlichsten. Das Kieselgel ist also beladen mit



Gruppen. Diese durch chemische Umsetzung imprägnierte Kieselgeloberfläche wirkt nun als stationäre hydrophobe Phase. Man muss sich jedoch von vornherein darüber

klar sein, dass eine solche Schicht nicht die gleichen Eigenschaften haben kann wie eine paraffin-imprägnierte Schicht, da das Lösungsvermögen der Lipide in letzterem besser ist als in silanisiertem Kieselgel. Ausserdem sind noch Adsorptionserscheinungen zu beobachten, so dass dieses silanierte Kieselgel auch als desaktiviertes Kieselgel für die Adsorptionschromatographie eingesetzt werden kann. Die Bedingungen aus der umgekehrten Phasen-Chromatographie lassen sich also nicht ohne weiteres auf die silanierte Schicht übertragen.

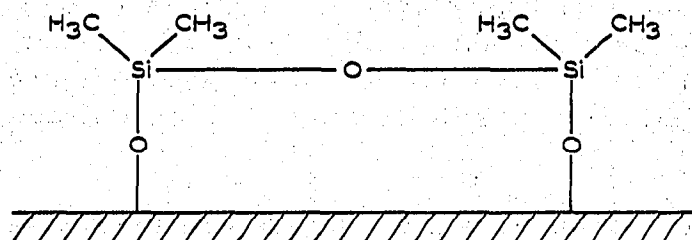


Fig. 1. Wahrscheinliche Struktur der Oberfläche des silanisierten Kieselgels.

Die Beschichtung der Platten mit silanisiertem Kieselgel wird wie folgt vorgenommen:

30 g Kieselgel HF<sub>254</sub> silanisiert (Art. Nr. 7750)\* werden mit 60 ml einer Wasser-Methanol-Mischung (2:1) so lange kräftig geschüttelt, bis eine homogene Suspension entstanden ist. Zu dieser Suspension werden nochmals 5 g Kieselgel HF<sub>254</sub> silanisiert zugegeben, und es wird wiederum bis zur Homogenität kräftig geschüttelt. Die Suspension dient zur Beschichtung von 5 Platten. Das Bereiten der Schicht erfolgt wie üblich; die Platten werden an der Luft ohne Anwendung eines Ventilators getrocknet und 30 Min. bei 105° nachgetrocknet.

Wir setzten silanisieretes Kieselgel u.a. zur Trennung von Fettsäuren ein. Die Trennung beruht auf folgendem Prinzip:

Die niederen Fettsäuren Capron-, Capryl- und Caprinsäure werden als Hydroxamate auf silanisiertem Kieselgel nachgewiesen. Die höheren Fettsäuren ab Laurinsäure werden nach Abtrennung der ungesättigten Fettsäuremethylester als Quecksilberacetat-Addukte, als Methylester auf silanisiertem Kieselgel getrennt.

Zur Untersuchung eines Fettes wird in der üblichen Weise verseift. Nach Ansäuern wird mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wird auf ca. 10 ml eingengt, 2 ml Methanol zugegeben und die Methylester der Fettsäuren durch Zusatz eines Überschusses von ätherischer Diazomethanlösung<sup>1</sup> hergestellt. Die Reaktionslösung bleibt 30 Min. lang bei Zimmertemperatur stehen.

Diese Lösung der Methylester wird vorsichtig bei 30–40° auf ca. 10 ml eingengt, in ein 20 ml-Kölbchen gegeben und mit Methanol zur Marke aufgefüllt (Stammlösung). Die eine Hälfte dieser Lösung dient zur Identifizierung der niederen Fettsäuren als Hydroxamate. Der dünnschichtchromatographische Nachweis der niederen Fettsäuren—Capron-, Capryl- und Caprinsäure—in freier Form oder als Methylester ist wegen deren Flüchtigkeit recht unbefriedigend bzw. nicht möglich.

Die andere Hälfte der Stammlösung wird für den Nachweis der höheren Fettsäuren verwendet.

\* Hersteller: E. Merck AG, Darmstadt.

## NACHWEIS DER NIEDEREN FETTSÄUREN

Zur Identifizierung der niederen Fettsäuren werden deren Hydroxamate herangezogen, die wenig flüchtig sind und sich vor allem auf silanisiertem Kieselgel ausgezeichnet trennen lassen. Mit Eisen (III)chlorid können noch 2–3  $\mu\text{g}$  der betreffenden Hydroxamsäure nachgewiesen werden.

*Darstellung der Hydroxamsäuren*

10 ml der Methylesterlösung werden im 20 ml-Messkölbchen mit 5 ml Hydroxylamin-Reagenz\* versetzt und nach gutem Durchmischen 30 Min. lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wird mit ca. 1,6 ml verdünnter Schwefelsäure (16%) neutralisiert, das Kölbchen mit Methanol aufgefüllt und vom ausgefallenen Natriumsulfat abfiltriert.

Die Chromatographie der Hydroxamsäuren wird auf einer mit silanisiertem Kieselgel beschichteten Platte vorgenommen. Fließmittel: Methanol-Dioxan-Chloroform-Glycocollpuffer (pH 3.0) (4:3:1:4). Die Kammer soll nicht mit Papier ausgekleidet werden; es wird also ohne Kammerübersättigung gearbeitet. Die Steighöhe des Fließmittels beträgt 10 cm, die Laufzeit ca. 4 Std.

Anfärbereagenz: 7 ml Eisen(III)-chloridlösung (10%) + 3 ml Salzsäure (25%) + 45 ml Methanol + 45 ml Äther. Die Tabelle I zeigt die gute Reproduzierbarkeit der  $R_F$ -Werte der Hydroxamsäuren.

TABELLE I

 $R_F$ -WERTE DER FETTSÄUREHYDROXAMATE

Ansatz	Stearin- säure- hydro- xamat	Palmitin- säure- hydro- xamat	Myristin- säure- hydro- xamat	Laurin- säure- hydro- xamat	Caprin- säure- hydro- xamat	Capryl- säure- hydro- xamat	Capron- säure- hydro- xamat
1	0.18	0.23	0.31	0.40	0.49	0.60	0.72
2	0.18	0.24	0.32	0.40	0.49	0.60	0.72
3	0.19	0.26	0.33	0.41	0.50	0.61	0.72
4	0.17	0.24	0.31	0.39	0.48	0.59	0.72
5	0.18	0.25	0.32	0.40	0.49	0.59	0.72
6	0.17	0.23	0.29	0.38	0.47	0.58	0.72
7	0.17	0.26	0.33	0.42	0.51	0.60	0.71
8	0.19	0.26	0.32	0.41	0.50	0.59	0.71
9	0.17	0.23	0.32	0.40	0.48	0.59	0.72
10	0.17	0.23	0.31	0.38	0.47	0.58	0.71

Wir ziehen dieses Chromatogramm, wie bereits erwähnt, in erster Linie zur Identifizierung der niederen Fettsäuren heran, da auch die Hydroxamsäuren der kritischen Paare auf silanisiertem Kieselgel nicht zu trennen sind. Der sichere Nachweis der Palmitin-, Myristin- und Laurinsäure ist bei Anwesenheit ungesättigter Fettsäuren auf diese Weise nicht möglich.

\* Hydroxylamin-Reagenz: 1 Teil Hydroxylammoniumchloridlösung (5% in Methanol) + 1 Teil methanolische Natronlauge (12.5%) werden gemischt und vom ausgefallenen Natriumchlorid abfiltriert.

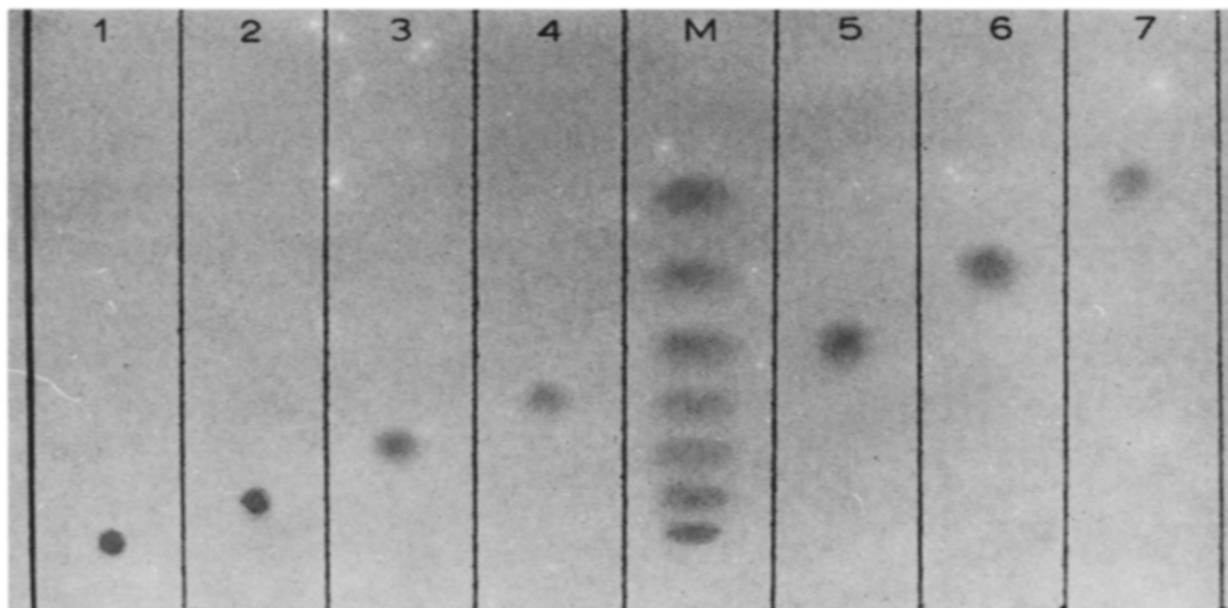


Fig. 2. Trennung der Fettsäurehydroxamate. Schicht: Kieselgel HF<sub>254</sub> silanisiert. Fließmittel: Methanol/Dioxan/Chloroform/Glykokoll-Salzsäurepuffer pH 3.0 (4:3:1:4). Steighöhe; 10 cm. Anfärbereagenz: Eisen(III)chloridlösung. (1) Stearinsäurehydroxamat, 40 µg; (2) Palmitinsäurehydroxamat, 20 µg; (3) Myristinsäurehydroxamat, 20 µg; (4) Laurinsäurehydroxamat, 20 µg; (M) Mischung; (5) Caprinsäurehydroxamat, 20 µg; (6) Caprylsäurehydroxamat, 20 µg; (7) Capronsäurehydroxamat, 20 µg.

In diesem Falle müssen die ungesättigten Fettsäuren zunächst abgetrennt werden; die gesättigten Fettsäuren werden dann als Methylester nachgewiesen. Als besonders vorteilhaft erwies sich der von MANGOLD<sup>2</sup> eingeschlagene Weg der dünn-schichtchromatographischen Abtrennung der als Methylester vorliegenden ungesättigten Fettsäuren als Quecksilberacetat-Addukte. Auf diese Weise ist es möglich, zunächst die ungesättigten Fettsäuren als Quecksilberacetat-Addukte zu identifizieren und in einem zweiten Arbeitsgang, wobei grössere Mengen zum Einsatz kommen, die Methylester der gesättigten Fettsäuren zu isolieren.

#### NACHWEIS DER UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN

Die 2. Hälfte der Stammlösung wird auf dem Dampfbad vom Äther befreit. Der Rückstand wird je nach Menge des eingesetzten Fettes mit 40–80 ml Quecksilber-(II)acetatlösung (14 g Quecksilber(II)acetat werden in 250 ml Methanol, das 1 ml Eisessig und 2.5 ml Wasser enthält, gelöst) aufgenommen und nach Durchmischen 24 Std. lang im Dunkeln aufbewahrt. Es entstehen hierbei die von JANTZEN UND ANDREAS<sup>3</sup> beschriebenen Acetoxymethylmercurimethoxy-Addukte der ungesättigten Fettsäuremethylester. Die gesättigten Fettsäureester bleiben unverändert. Die Reaktionslösung wird im Rotationsverdampfer weitgehend eingengt, der Rückstand mit 40 ml Chloroform in einen Scheidetrichter übergespült und vier- bis fünfmal mit je 25 ml Wasser gewaschen. Der Chloroformextrakt wird mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und mit Chloroform auf ein entsprechendes Volumen gebracht.

Zur Identifizierung der ungesättigten Fettsäuren geht man nach MANGOLD<sup>2</sup> wie folgt vor:

Eine entsprechende Menge der Chloroformlösung wird auf eine Kieselgel G-

Platte aufgetragen. Mit dem Fließmittel Petroläther–Diäthyläther (4:1) wird zur Entfernung der gesättigten Fettsäuremethylester bis zu einer Steighöhe von 18 cm entwickelt, wobei diese an die Steigmittelfront wandern. Das 2. Fließmittel *n*-Propanol–Eisessig (100:1) trennt die Quecksilberacetat-Addukte der ungesättigten Fettsäuremethylester. Die Steighöhe beträgt 12 cm. Der Nachweis der Quecksilber-Addukte erfolgt mit Diphenylcarbazidlösung (1% in Äthanol). Die ungesättigten Fettsäuren trennen sich nach Anzahl ihrer Acetoxymethyl-Gruppen.

#### NACHWEIS DER HÖHEREN GESÄTTIGTEN FETTSÄUREN

Zur Isolierung der gesättigten Fettsäuren wird eine grössere Menge des Chloroformextraktes als Band von 5–10 cm Breite auf eine Kieselgel G-Platte aufgetragen und diese mit dem Fließmittel Petroläther–Diäthyläther (4:1) bis zu einer Steighöhe von 18 cm entwickelt. Durch Einstellen der Platte in eine mit Jodkristallen beschickte Kammer werden die gesättigten Fettsäuremethylester, die sich als Band auf dem oberen Drittel der Platte befinden, sichtbar gemacht und sofort nach dem Herausnehmen der Platte markiert. Die markierte Zone wird in ein 10 ml-Messkölbchen geschabt und dieses mit Chloroform aufgefüllt. Nach 5 Min. langem Schütteln wird vom Kieselgel abzentrifugiert.

Die Trennung der gesättigten Fettsäuremethylester—es können Stearinsäure- bis Caprinsäuremethylester nachgewiesen werden—erfolgt auf silanisierendem Kieselgel. Die Methylester der Capryl- und Capronsäure werden hierbei nicht erfasst, da sie leicht flüchtig sind und schon beim Auftragen auf die Kieselgelschicht deutliche Verluste zu verzeichnen sind. Weitere Verluste werden durch das für den Nachweis mit Phosphormolybdänsäure erforderliche Erhitzen hervorgerufen.

Fließmittel: Aceton–Methanol–Wasser–Eisessig (70:50:35:1). Steighöhe: 12 cm. Laufzeit: ca. 4 Std.

Wie bei der Trennung der Hydroxamsäuren wird auch hier ohne Kammerübersättigung gearbeitet.

Anfärbung: Die Platte wird mit Phosphormolybdänsäure (20% in Äthanol (50%)) besprüht und ca. 30 Min. auf 150° erhitzt. Die Fettsäuremethylester erscheinen als blaue Flecken auf gelblichem Untergrund. Durch Einstellen der Platte in

TABELLE II

#### $R_F$ -WERTE DER FETTSÄUREMETHYLESTER

	Ansatz Stearinsäure-methylester	Palmitinsäure-methylester	Myristinsäure-methylester	Laurinsäure-methylester	Caprinsäure-methylester
1	0.16	0.25	0.35	0.43	0.51
2	0.15	0.23	0.32	0.42	0.50
3	0.15	0.25	0.32	0.40	0.49
4	0.15	0.24	0.34	0.45	0.51
5	0.15	0.24	0.33	0.41	0.50
6	0.16	0.24	0.32	0.41	0.49
7	0.17	0.26	0.34	0.42	0.49
8	0.15	0.23	0.33	0.41	0.50

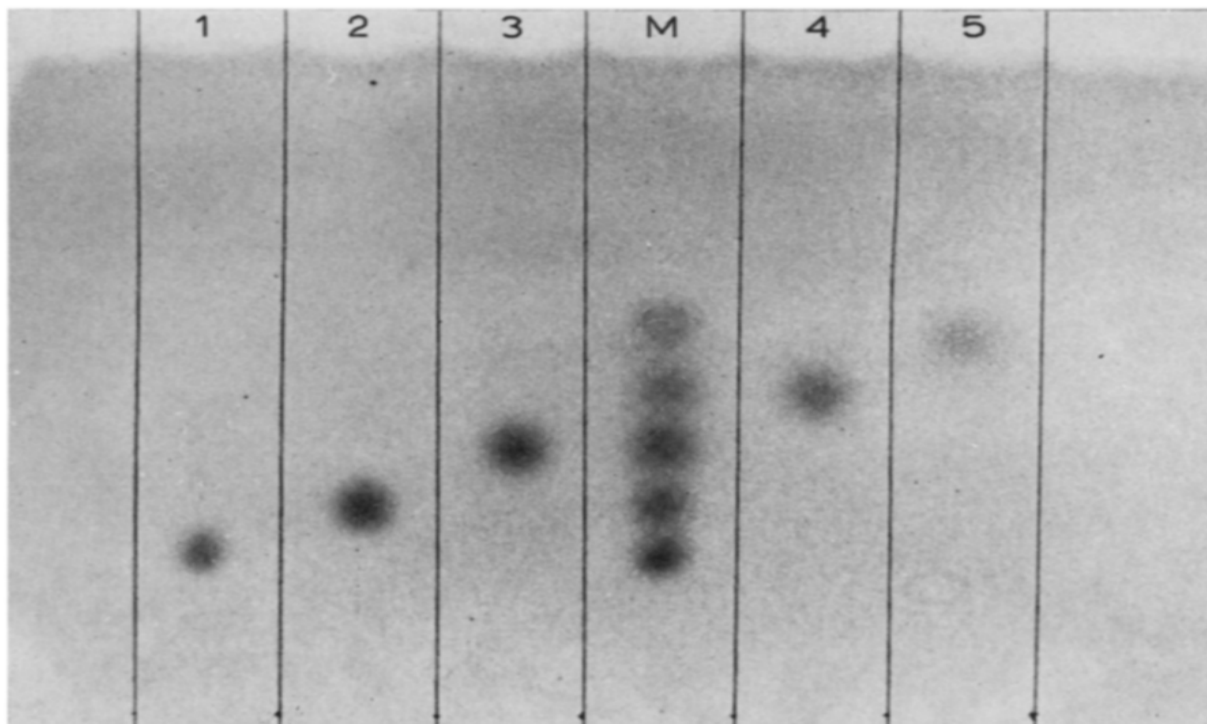


Fig. 3. Trennung der Fettsäuremethylester. Schicht: Kieselgel  $\text{HF}_{264}$  silanisiert. Fließmittel: Aceton/Methanol/Wasser (7:5:3.5). Steighöhe: 12 cm. Anfärbereagenz: Phosphormolybdänsäurelösung (20% in 50% igem Äthanol). (1) Stearinsäuremethylester, 3  $\mu\text{g}$ ; (2) Palmitinsäuremethylester, 5  $\mu\text{g}$ ; (3) Myristinsäuremethylester, 5  $\mu\text{g}$ ; (M) Mischung; (4) Laurinsäuremethylester, 5  $\mu\text{g}$ ; (5) Caprinsäuremethylester, 5  $\mu\text{g}$ .

Ammoniakatmosphäre wird der Nachweis noch empfindlicher, da der Untergrund entfärbt wird.

Die Nachweisempfindlichkeit erstreckt sich bis zu 2–3  $\mu\text{g}$ .

Auch hier sei auf die gute Reproduzierbarkeit der  $R_F$ -Werte hingewiesen. (Fig. 3 und Tabelle II).

Es ist aber auch möglich, auf silanisiertem Kieselgel die *freien Fettsäuren* zu trennen. Die Flüchtigkeit der niederen Fettsäuren erschwert deren Nachweis.

Fließmittel: Dioxan–Wasser–Ameisensäure (60:35:5). Steighöhe: 10–12 cm. Laufzeit: ca. 4 Std. Anfärbung: wie bei den Fettsäuremethylestern mit Phosphormolybdänsäure.

TABELLE III

$R_F$ -WERTE DER FETTSÄUREN

Ansatz	Stearin- säure	Palmitin- säure	Myristin- säure	Laurin- säure	Caprin- säure	Capryl- säure	Capron- säure
1	0.11	0.17	0.25	0.33	0.45	0.55	—
2	0.13	0.19	0.27	0.36	0.46	0.56	0.65
3	0.11	0.18	0.26	0.34	0.45	0.55	—
4	0.11	0.18	0.25	0.34	0.44	0.56	—
5	0.11	0.17	0.26	0.35	0.45	0.56	0.66
6	0.11	0.18	0.25	0.34	0.44	0.55	0.65
7	0.11	0.17	0.25	0.34	0.43	0.54	—
8	0.11	0.17	0.24	0.34	0.43	0.54	0.64

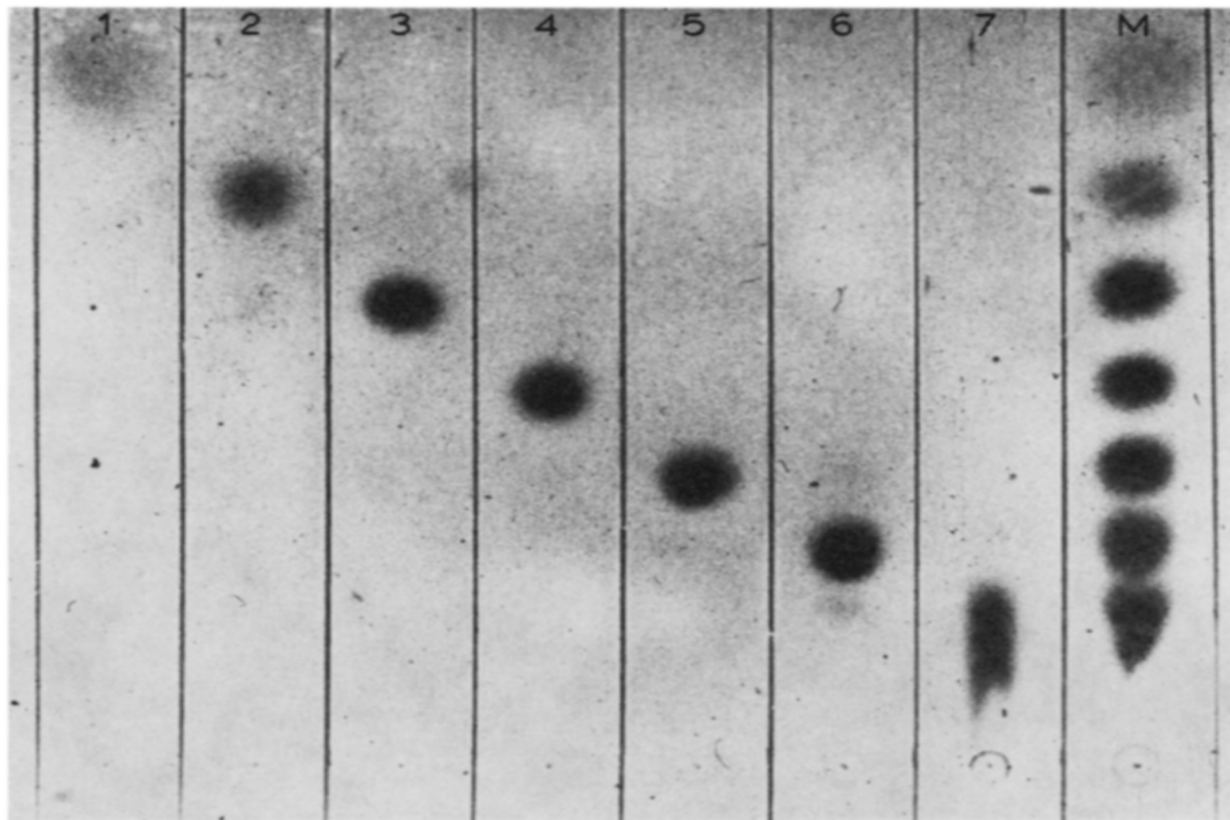


Fig. 4. Trennung der Fettsäuren. Schicht: Kieselgel HF<sub>254</sub> silanisiert. Fließmittel: Dioxan/Wasser/Ameisensäure (60:35:5), unter Anwendung des mit Kieselgel beschickten Sorbentientroges von BENNETT UND HEFTMANN<sup>4</sup>. (1) Capronsäure, 50  $\mu\text{g}$ ; (2) Caprylsäure, 10  $\mu\text{g}$ ; (3) Caprinsäure, 10  $\mu\text{g}$ ; (4) Laurinsäure, 10  $\mu\text{g}$ ; (5) Myristinsäure, 10  $\mu\text{g}$ ; (6) Palmitinsäure, 10  $\mu\text{g}$ ; (7) Stearinsäure, 10  $\mu\text{g}$ ; (M) Mischung.

Die kritischen Paare werden, wie zu erwarten, nicht getrennt. Es lässt sich jedoch leicht der Nachweis führen, ob ungesättigte Fettsäuren vorhanden sind. Die Platte wird hierzu in eine mit Jodkristallen beschickte Kammer eingestellt. Die ungesättigten Fettsäuren erscheinen sofort als braune Flecken. Gesättigte Fettsäuren sind im Konzentrationsbereich von 5–10  $\mu\text{g}$  auf diese Weise nicht nachzuweisen.

In Tabelle III sind die  $R_F$ -Werte mehrerer Trennungen aufgeführt, was wiederum die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bestätigt.

Die Trennung der Fettsäuren gelingt noch besser, wenn man die Laufstrecke erhöht. Am besten bewährt sich hier das kontinuierliche Verfahren unter Einsatz des Sorbentientroges nach BENNETT UND HEFTMANN<sup>4</sup>. Der am oberen Teil der Platte befestigte Metalltrog ist mit Kieselgel gefüllt, das das aufsteigende Laufmittel aufnimmt.

Fig. 4 zeigt die auf diese Weise erzielte einwandfreie Trennung.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Fettsäurehydroxamate und -ester sowie freie Fettsäuren werden auf silanisiertem Kieselgel nach dem Prinzip der umgekehrten Phasen-Chromatographie getrennt. Die gute Reproduzierbarkeit der Trennungen wird gezeigt. Ein dünnschichtchromatographischer Analysengang, bei dem nacheinander die niederen, die ungesättigten und höheren Fettsäuren nachgewiesen werden, wurde ausgearbeitet.

## LITERATUR

- 1 L. GATTERMAN UND T. WIELAND, *Die Praxis des organischen Chemikers*, Walter de Gruyter, Berlin, 1958, S. 235.
- 2 K. H. MANGOLD UND R. K. KAMMERECK, *Chem. Ind. (London)*, 1961, 1032.
- 3 E. JANTZEN UND H. ANDREAS, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 1427.
- 4 R. D. BENNETT UND E. HEFTMANN, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 245.

*J. Chromatog.*, 33 (1968) 62-69