

Zur papierchromatographischen Trennung gesättigter Fettsäuren*.

Von

A. Holasek und **K. Winsauer**.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut und *Pregl*-Laboratorium der
Universität Graz.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 29. März 1954.)

Nach einer Zusammenfassung der über dieses Thema bisher erschienenen Arbeiten wird eine Methode zur Trennung der gesättigten Fettsäuren von C_4 bis C_{18} beschrieben. Mit einem Gemisch von Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-konz. Ammoniak lassen sich diese Säuren auf einem mit 0,5%iger Lösung von Aluminiumalaun imprägnierten Papier entwickeln. Nach dem Besprühen mit einer Rhodamin B-Lösung werden die Fettsäureflecken im ultravioletten Licht sichtbar.

Im Rahmen von Studien über den Fettstoffwechsel ergab sich die Notwendigkeit, einfache Methoden zur Identifizierung der Fettsäuren aus einem nur in geringer Menge zur Verfügung stehenden Material zu entwickeln. Es war naheliegend, die auf anderen Gebieten der analytischen Chemie sehr erfolgreiche Papierchromatographie anzuwenden. Bei der Durchsicht der an sich nicht sehr umfangreichen Literatur über papierchromatographische Fettanalyse wurde keine Methode gefunden, die die gestellten Aufgaben voll lösen würde.

Die Untersuchungsmethoden auf diesem Gebiete kann man in drei Gruppen teilen, und zwar: 1. Versuche zur papierchromatographischen Trennung ohne Vorbehandlung der Fettsäuren oder des Papiers, 2. Trennung mit Hilfe eines imprägnierten Papiers, 3. Trennung nach Überführung der Fettsäuren in ihre Hydroxamate.

Zu 1. Niedere Fettsäuren bis etwa C_8 lassen sich mit einem Entwicklungsgemisch trennen, bestehend aus ammoniakalischen Wasser-Alkohol-

* Herrn Univ.-Prof. Dr. *Ludwig Ebert* zum 60. Geburtstag gewidmet.

Gemischen¹⁻⁴. Bei Betrachtung der von den Autoren angegebenen R_f -Werten³ sieht man, daß der Abstand zwischen den einzelnen Säuren mit zunehmender Kettenlänge immer geringer wird. Fettsäuren über C_8 kann man auf diese Art überhaupt nicht mehr trennen⁴. Da im biologischen Geschehen die höheren Fettsäuren von größerer Bedeutung sind als die niederen, war diese Methode für unsere Arbeiten ungeeignet.

Relativ leicht lassen sich zwei höhere Fettsäuren voneinander trennen, wenn man die geeignete Alkohol-Wasser-Mischung zur Entwicklung verwendet⁵. Allerdings muß man für jedes zu trennende Fettsäurepaar ein ganz bestimmtes Alkohol-Wasser-Gemisch verwenden. Das bedeutet, daß die Trennung mehrerer Fettsäuren auf einem Chromatogramm nicht durchführbar ist.

Zu 2. Zur Imprägnierung des Papiers wurden verwendet Latex⁶, Olivenöl⁷, Paraffin⁸ oder Silikon⁹. Die Entwicklung erfolgte mit Alkoholen. Eine Trennung der langkettigen Fettsäuren soll auch nach Erzeugung des Octadecyl-oxymethyläthers der Cellulose am Papier gelungen sein¹⁰. Diese Methoden wurden nicht überprüft, da einerseits die Erzeugung gleichmäßig imprägnierter Papiere und andererseits die Sichtbarmachung kleiner Mengen von Fettsäuren nach Angabe der Autoren nicht immer gelingt^{6, 7}.

Zu 3. Nach der Überführung in ihre Hydroxamate soll es möglich sein, die Fettsäuren von C_2 bis C_{22} papierchromatographisch zu identifizieren^{11, 12}. Die von den Autoren angegebenen R_f -Werte zeigen so geringe Differenzen, daß von einer Trennung nicht die Rede sein kann. So liegen die R_f -Werte der Fettsäuren mit gerader C-Anzahl von C_6 bis C_{22} zwischen 0,93 und 0,98*.

¹ *F. Brown* und *L. P. Hall*, *Nature* **166**, 66 (1950); ref. Chem. Abstr. **44**, 9868 b (1950).

² *E. R. Hiscox* und *N. J. Berridge*, *Nature* **166**, 522 (1950).

³ *E. P. Kennedy* und *H. A. Barker*, *Analyt. Chemistry* **23**, 1033 (1951).

⁴ *R. L. Leid* und *M. Lederer*, *Biochemic. J.* **50**, 60 (1951).

⁵ *H. P. Kaufmann* und *J. Budwig*, *Fette u. Seifen* **53**, 390 (1951).

⁶ *J. Bolding*, *Exper.* **4**, 270 (1948).

⁷ *G. Nunez* und *J. Spiteri*, *Bull. soc. chim. biol.* **35**, 851 (1953).

⁸ *J. Asselineau*, *Bull. soc. chim. France* **1952**, 884.

⁹ *R. Wegemann*, *Fette u. Seifen* **55**, 780 (1953).

¹⁰ *R. G. Bacher*, *Biochemic. J.* **54** (1953), Proc. 39.

¹¹ *K. Fink* und *R. M. Fink*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **70**, 654 (1949).

¹² *Y. Inoue* und *M. Noda*, *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **23**, 294 (1950); **24**, 291 (1951); ref. Chem. Abstr. **45**, 8449 f (1951); **46**, 6408 a (1952).

* Während der Drucklegung erhielten wir Kenntnis über die Arbeit von *F. Micheel* und *H. Schweppe* [*Angew. Chem.* **66**, 136 (1954)], denen eine gute Trennung der Hydroxamate auf Zelluloseacetat-Papier gelang, sowie über die Arbeit von *H. P. Kaufmann* und *W. H. Nitsch* [*Fette u. Seifen* **56**, 154 (1954)], die die Fettsäuren auf mit Kohlenwasserstoffen imprägniertem Papier trennten.

Ebenso schwierig wie die Trennung der einzelnen Fettsäuren ist das Sichtbarmachen kleinster Mengen derselben am Papier. Die meisten der oben zitierten Autoren verwenden Indikatoren, wie Bromkresolpurpur, Bromphenolblau, Methylrot usw. Die erzielte Farbe der Flecken ist jedoch stark abhängig von der Beschaffenheit des Papiers und außerdem unbeständig. Dabei muß darauf aufmerksam gemacht werden, daß kleine Mengen von Fettsäuren nach dem Entwickeln des Chromatogramms viel schwerer anzufärben sind als beim gewöhnlichen Auftropfen derselben auf Papier. Dies gilt jedoch nicht nur für die genannten Indikatoren, sondern für alle anderen Methoden zur Erkennung der Fettsäureflecken. Eine Reihe solcher Methoden wurde von *H. P. Kaufmann*¹³ angegeben.

Eigene Versuche.

Bei der Weiterentwicklung der von *Kaufmann* angegebenen Methode mit Fluoreszenzindikatoren fanden wir, daß sehr schöne Kontraste beim Besprühen eines alainimprägnierten Papiers mit einer wäßrigen Lösung von Rhodamin B auftreten. Nach dem Trocknen sind die Fettsäuren im ultravioletten Licht als helle Flecken sichtbar.

Blau konnten wir die Fettsäuren auf imprägniertem und unimprägniertem Papier mit *Cyanol extra* in einer gesättigten Bleiacetatlösung anfärben. Da man die mit Farbstoff besprühten Papiere mit Wasser waschen muß, besteht die Gefahr, daß insbesondere die niederen Fettsäuren ausgewaschen werden.

Unsere Versuche zur Trennung von Fettsäuren auf unbehandeltem Papier unter Anwendung von ammoniakalischen Alkohol-Wasser-Gemischen führten zu keinen brauchbaren Ergebnissen. Es kamen dabei Methanol, Äthanol, Isopropanol, n-Butanol und n-Amylalkohol zur Anwendung. Die Lösungen müssen ammoniakalisch sein, da sich sonst die niederen Fettsäuren verflüchtigen. Die R_f -Werte waren so ungünstig und die Streifenbildung so stark, daß bei einem Gemisch dreier höherer Fettsäuren nur ein langer Streifen ohne Abgrenzung zu sehen war. Aber auch bei den niederen Fettsäuren, die teilweise getrennt werden konnten, waren die Flecken unscharf und langgestreckt.

Weitaus günstigere Ergebnisse erhielten wir, als wir mit Metallhydroxyden (Aluminium, Zink, Kupfer) imprägnierte Papiere anwendeten. Bei der Weiterverfolgung dieses Weges hat sich die Vorbehandlung des Papiers mit einer Alaunlösung als besonders gut, ja sogar als notwendig erwiesen.

Den entscheidenden Vorteil aber brachte eine Änderung des Entwicklungsgemisches. Die ammoniakalischen Alkohol-Wasser-Gemische wurden durch ein Gemisch von Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-Ammoniak ersetzt.

¹³ *H. P. Kaufmann* und *J. Budwig*, *Fette u. Seifen* **55**, 85 (1953).

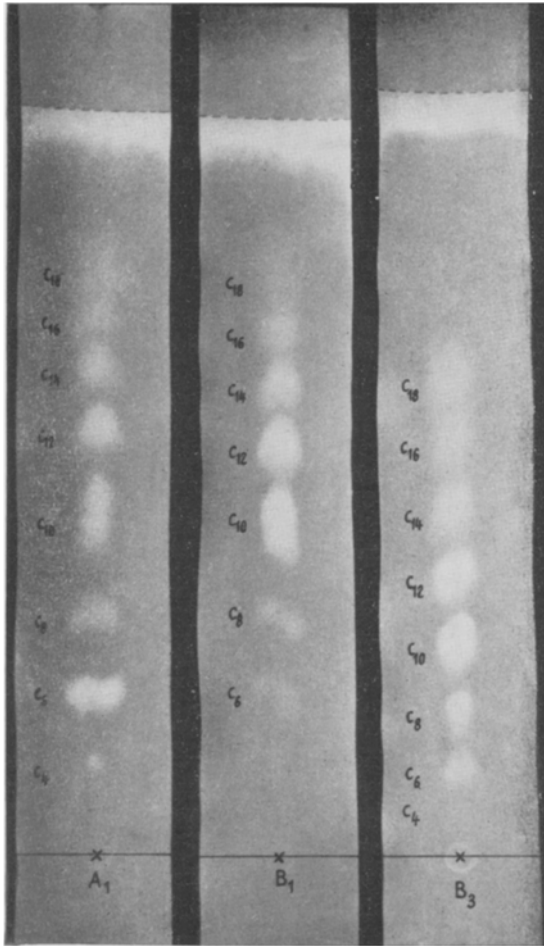


Abb. 1. Chromatogramme eines Gemisches der Fettsäuren von C_4 bis C_{18} (je $30 \mu\text{g}$). A_1 und B_1 entwickelt mit Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-Ammoniak im Volumverhältnis 81 : 18 : 1; A_1 gefärbt mit Rhodamin B in 0,05 n HCl und B_1 gefärbt mit Rhodamin B in Wasser. B_3 entwickelt mit Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-Ammoniak 80 : 19 : 1 und gefärbt mit Rhodamin B in Wasser. (Aufnahme der Fluoreszenz im ultravioletten Licht.)

Arbeitsvorschrift.

Das Papier (Schleicher & Schüll 2043 b) wird in einer 0,5%igen Lösung von $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ gebadet. Die überschüssige Lösung läßt man abtropfen und trocknet nun das Papier bei 60 bis 100° . Man kann eine größere Menge Papier auf Vorrat imprägnieren.

Zur Entwicklung verwendet man ein Gemisch von Tetrachlorkohlenstoff, Methanol und konz. Ammoniak im Volumsverhältnis 81 : 18 : 1. Der Tetrachlorkohlenstoff sowie das vorher getrocknete Methanol werden über eine

gut wirkende Kolonne destilliert. Konz. Ammoniak p. a. (D: 0,91) und Methanol werden gemischt und dann wird die entsprechende Menge Tetrachlorkohlenstoff zugesetzt. In einem gut verschlossenen Gefäß ist das Gemisch unbegrenzt lange haltbar. Wenn sich eine Trübung zeigt, ist es zur Entwicklung ungeeignet. In dicht schließenden Entwicklungsgefäßen ist ein Gemisch für mehrere Entwicklungen so lange brauchbar, als es klar bleibt. In bestimmten Grenzen kann man auch andere Mischungsverhältnisse herstellen. Nur muß dabei beachtet werden, daß kleine Variationen relativ hohe Änderungen der R_f -Werte verursachen (siehe Abb. 1).

Zur aufsteigenden Entwicklung des eindimensionalen Chromatogramms trocknet man einen 40 cm langen, mit Alaun imprägnierten Papierstreifen $\frac{1}{2}$ Std. bei 80 bis 100°. Die petrolätherische Lösung des zu analysierenden Fettsäuregemisches wird aufgetragen, wobei das Papier 10 Min. an der Luft verbleibt. Man hängt den Streifen nun auf 2 Stdn. in den mit dem Lösungsmitteldampf gesättigten Zylinder und beginnt dann die Entwicklung durch Eintauchen des Papiers in das Entwicklungsgemisch. Der Zylinder soll dabei nicht geöffnet werden. Nach 13 bis 15 Stdn. ist die Lösungsmittelfront bei 20° C etwa 30 cm gewandert und damit ist die Entwicklung beendet. Das Papier wird bei 60 bis 70° getrocknet, mit einer 0,1%igen Lösung von Rhodamin B in 0,05 n HCl besprüht und abermals bei der angegebenen Temp. getrocknet. Die Anfärbung aller Säuren mit Ausnahme der Buttersäure gelingt auch dann, wenn Rhodamin B ohne Salzsäure aufgesprüht wird. Ein Farbstoffüberschuß ist von Nachteil. Man sieht bereits bei Tageslicht die niederen und mittleren Fettsäuren als dunkle, rot gefärbte Flecken. Im ultravioletten Licht sind alle Fettsäuren mit gerader C-Anzahl von C₄ bis C₁₈ als hellrote, gut getrennte Flecken auf violetter Unterlage sichtbar. Fettsäuren über C₁₈ standen uns in reiner Form nicht zur Verfügung. Es ist sehr wahrscheinlich, daß auch die Säuren mit 20 und 22 C abgetrennt werden können.

An der Front findet man einen 10 bis 15 mm breiten, stark fluoreszierenden Streifen. Es ist uns nicht gelungen, Bedingungen zu finden, unter denen das Erscheinen dieses Streifens verhindert werden kann. Die Trennung der höheren Fettsäuren wird dadurch nicht gestört.

Mengen von 10 bis 100 μg jeder Säure lassen sich aus einem Gemisch gut trennen. Es empfiehlt sich, in diesen Grenzen zu bleiben, das heißt vom Gemisch nur so viel aufzutragen, daß von der am stärksten vertretenen Säure nicht mehr als 100 μg enthalten sind. Bei Anwendung größerer Mengen werden die Flecken zu groß, worunter die Trennschärfe leidet. Wenn weniger als 10 μg vorliegen, ist die Anfärbung teilweise unzureichend.

Die R_f -Werte der gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren gehen proportional mit der Kettenlänge. Wir finden also im Chromatogramm die höchste Säure am weitesten gewandert. Die R_f -Werte der ungesättigten unterscheiden sich nicht merklich von denen der entsprechenden gesättigten Säuren. An der Abtrennung der ungesättigten Säuren von den gesättigten wird gearbeitet, worüber gegebenenfalls berichtet werden wird.

Soll ein Fettsäuregemisch untersucht werden, in dem eine oder mehrere

Tabelle 1. R_f -Werte bei Entwicklung mit einem Gemisch von Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-Ammoniak 81:18:1.

Buttersäure.....	0,11	Laurinsäure	0,56
Capronsäure	0,21	Myristinsäure	0,64
Caprylsäure.....	0,32	Palmitinsäure	0,72
Caprinsäure.....	0,44	Stearinsäure	0,80

Säuren in so geringer Menge vorkommen, daß ihre Sichtbarmachung auch bei Anwendung der höchst zulässigen Menge an Gemisch nicht gelingt, so kann die Harnstoffällung oft sehr gute Dienste leisten¹⁴. Man kann die Bedingungen der Fällung so wählen, daß entweder die im Überschuß vorhandenen störenden oder die zu analysierenden Fettsäuren zum Großteil gefällt werden.

¹⁴ A. Holasek und M. G. Ibrahim, Fette u. Seifen 55, 601 (1953).