

Zusammenfassung.

Es wurden unter standardisierten Reaktionsbedingungen relative Geschwindigkeiten der Chromsäureoxydation verschiedener sekundärer Steroid-Alkohole bestimmt. In Übereinstimmung mit einer von *D. H. R. Barton* ausgesprochenen Regel konnte dabei festgestellt werden, dass von den in die Untersuchung einbezogenen Verbindungen die axialen Alkohole durchwegs rascher oxydiert werden als die entsprechenden äquatorialen Epimeren; auf Grund der experimentellen Befunde kann diese Erscheinung entgegen einer in der Literatur vertretenen Hypothese darauf zurückgeführt werden, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Chromsäureoxydation eines gesättigten, sekundären Alkohols umso rascher abläuft, je grösser der damit verbundene Abbau an nichtklassischer Spannung in der Molekel ist.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

184. Zur papierchromatographischen Analyse von Fettsäuregemischen aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit 12 bis 22 C-Atomen

von H. Wagner, L. Abisch und Karl Bernhard¹⁾.

(27. VIII. 55.)

In den letzten Jahren wurden verschiedentlich Verfahren zur Papierchromatographie gesättigter Fettsäuren mitgeteilt. *Kaufmann & Nitsch*²⁾ haben die Verwendung von petrolgetränktem Papier vorgeschlagen und, unter Benützung von Kupferacetat bzw. Kalium-ferrocyanid zur Entwicklung, Trennungen von Caprin-, Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure durchgeführt. Ganz kürzlich erfolgten Hinweise von *Inouye, Noda & Hirayama*³⁾ zur Papierchromatographie ungesättigter Fettsäureester als Quecksilberacetat-Additionsverbindungen.

Wir berichten im folgenden über die papierchromatographische Trennung gesättigter und ungesättigter Fettsäuren mit 12–22 C-Atomen und die quantitative Auswertung der

¹⁾ Teilweise vorgetragen anlässlich des XIV. Internationalen Kongresses für reine und angewandte organische Chemie, in Zürich, vom 21.–27. Juli 1955.

²⁾ *H. P. Kaufmann & W. H. Nitsch*, Fette und Seifen **56**, 154 (1954).

³⁾ *Y. Inouye, M. Noda & O. Hirayama*, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **32**, 132 (1955).

Chromatogramme. Als stationäre Phase und zur Imprägnierung des Papiers wird eine bei $190-220^{\circ}$ siedende Petrolfraktion benutzt, während als mobile Phase damit gesättigte 90-proz. Essigsäure dient. Die Chromatographie erfolgt absteigend bei einer von der Außen-temperatur abhängigen Laufzeit von 20-45 Std. Nach erfolgter Trocknung gelangen die Chromatogramme in Kupferacetatlösung und dann zur Umwandlung der Kupferseifen in verdünnte Kaliumferrocyanidlösung. Die braunroten Kupferferrocyanidkomplexe sind licht-beständig; durch Messung ihrer Lichtabsorption mittels eines geeigneten Kolorimeters gelingt mit befriedigender Genauigkeit eine quantitative Analyse eines in Mengen von $100-400 \gamma$ aufgetragenen Fettsäuregemisches.

A u s f ü h r u n g .

Lösungsmittel. Petroleum des Handels wird destilliert und die bei $190-220^{\circ}$ übergehende Fraktion (= KW) aufgefangen. 500 ml 90-proz. Essigsäure sind 15 Min. unter möglichst gleichbleibenden Temperaturbedingungen (d. h. im Chromatographierraum) mit 25 ml KW zu schütteln. Nach völliger Schichtentrennung werden zur Essigsäurephase nochmals 20 ml 90-proz. Essigsäure zugesetzt, um die Sättigung mit KW geringfügig zu unterschreiten. Es kann damit die schon bei geringen Temperaturschwankungen beginnende Entmischung verhindert werden. Die Atmosphäre des Chromatographiegefäßes wird während 24 Std. vor Beginn mit diesem Essigsäure-KW-Gemisch gesättigt.

Papier. *Schleicher & Schüll* Papier No. 2043b schneiden wir in der Pfeilrichtung des Wasserzeichens in Streifen von 14,5 cm Breite und 50 cm Länge. Von der Startlinie ausgehend werden in das Papier in Abständen von ca. 3 cm bis nahe an den unteren Rand mittels eines Rasiermessers Einschnitte angebracht. Diese Bahnentrennung begünstigt die gleichmässige, vertikale Wanderung der Einzel-Komponenten. Das vertikal aufgespannte Papier besprühen wir sodann unter Verwendung eines Stickstoffgebläses mit etwa 2 g KW und blasen darauf mit Warmluft den Überschuss weg, bis die auf dem Papier verbleibende Menge unmittelbar vor seinem Einhängen in das Gefäß noch 900-1100 mg wiegt.

Auftragen der Fettsäuren. Die Fettsäuregemische tragen wir in Mengen von $50-100 \gamma$ pro Komponente als 0,25-proz. benzolische Lösung auf. Liegen z. B. vermutlich 4 Fettsäuren vor, so benutzen wir $200-400 \gamma$ des Gemisches in 1-proz. Lösung.

Laufzeit. Sie kann durch Temperaturerhöhung gesenkt werden, beträgt indessen im allgemeinen 20-45 Std. Gemische, welche Fettsäuren mit 14 und 16 C-Atomen aufweisen und solche mit höheren ungesättigten Fettsäuren benötigen meist nur eine Laufzeit von 20 Std.

Entwicklung. Wir trocknen nach Ablauf der vorgesehenen Laufzeit das Papier 2 Std. bei $80-100^{\circ}$ in einem Trockenschrank und bringen es anschliessend in ein Bad, das pro 1000 ml 20 ml gesättigte Kupferacetatlösung enthält. Nach 15 Min. nimmt man das Papier heraus, lässt abtropfen und wäscht es 15 Min. in einem Trog von ca. 10 l Inhalt mit Leitungswasser, das man anfänglich zweckmässig mit etwa 1 ml Essigsäure ansäuert, um die Entstehung basischer Kupfersalz-Niederschläge auf dem Papier zu verhindern. Es soll dabei stets von allen Seiten mit Wasser umspült werden, also nicht etwa zusammengefaltet liegen. Zur Umwandlung der Fettsäure-Cu-Salze in die braunroten Kupferferrocyanidkomplexe tauchen wir das Chromatogramm kurze Zeit in 1,5-proz. $K_4Fe(CN)_6$ -Lösung. Es dürfen sich nur die Fettsäureflecken braun färben; das übrige Papier muss farblos bleiben, also frei sein von den erwähnten basischen Kupfersalzen. Ein allfälliger Überschuss an Kaliumferrocyanid wird durch Leitungswasser ausgewaschen und das Papier hierauf getrocknet. Unter Lichteinfluss findet nach einigen Tagen eine

geringe Verfärbung desselben statt, die Kupferferrocyanidkomplexe sind indessen lichtbeständig.

Quantitative Auswertung. Die entwickelten und getrockneten Chromatogramme werden in Streifen auseinander geschnitten. Von der Startlinie ausgehend wird mit Bleistift eine 5 mm-Skala aufgezeichnet und jeder Papierstreifen mittels eines speziellen Einsatzes im *Lumetron-Kolorimeter*¹⁾ (vgl. Fig. 1) auf seine Absorption geprüft.

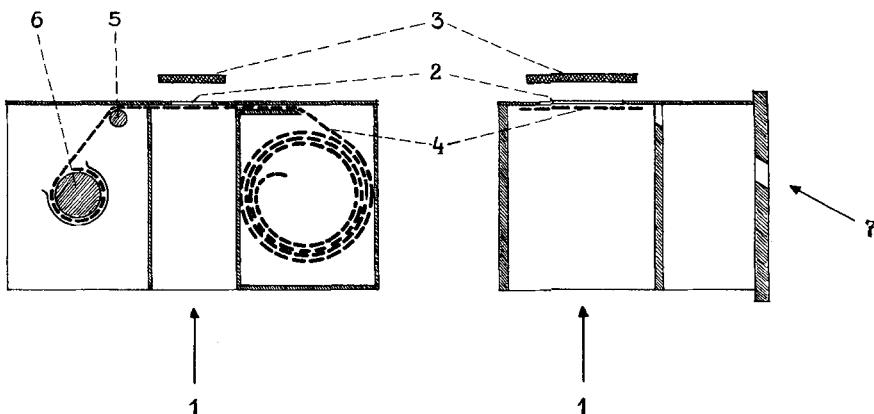


Fig. 1.

Einsatzgerät für das Lumetron-Kolorimeter

zur Messung der Absorption der auf den Papierstreifen fixierten Kupferferrocyanidkomplexe.

- 1 Lichtstrahl
- 2 Blende 1×2 cm
- 3 Photozelle
- 4 Chromatogramm-Streifen (30 mm breit)
- 5 Führungsspule
- 6 Aufwickelpule
- 7 Einblick auf die Skaleneinteilung (5 mm Abstände) des Papierstreifens

Nach dem Prinzip des Filmtransports einer Kleinkamera verschieben wir ihn stufenweise um je 5 mm und messen die Absorption der entsprechenden Streifenfläche unter Verwendung eines Filters von $490 \text{ m}\mu$. Durch eine kleine Öffnung des Einsatzes bleibt die Skala zur Ablesung der Extinktionswerte gut beobachtbar. Wurde das Chromatogramm durch Zugabe von etwas Eisessig zum Waschwasser richtig ausgewaschen, so bleibt das die braunroten Flecken umgebende Papier weiß und der Nullwert ist einheitlich. Letzterer kann indessen infolge von Strukturunterschieden im Papier geringfügig schwanken. Die für je 5 mm Papierfeld gemessenen Extinktionswerte werden auf Millimeterpapier aufgetragen und die einzelnen Punkte zu einer Absorptionskurve verbunden, die in weitgehender Annäherung trotz der diskontinuierlichen Messung die richtige Absorption wiedergeben dürfte. Die Gesamtextinktion eines Fleckens ergibt sich durch Addition der Einzelextinktionen nach Abzug des jeweiligen Nullwertes. Erstere ist mit dem Molekulargewicht der zugehörigen Säure zu multiplizieren. Die Summe dieser Werte ist gleich 100% zu setzen und der prozentuale Anteil der Einzelkomponenten durch einfache Proportionen zu berechnen. Die Messung gelingt gut, Wiederholungen mit ein und demselben Streifen ergeben praktisch keine Abweichungen.

¹⁾ *Lumetron-Kolorimeter Mod. 401-A der Photovolt Corp., New York.*

Diskussion.

Die beschriebene Methode haben wir in zahlreichen Fällen zur Untersuchung bekannter und unbekannter Fettsäuregemische angewendet und ihre Brauchbarkeit durch verschiedene Mitarbeiter überprüft. Die Sättigung des Papiers mit einer gleichbleibenden Petrolmenge ist unerlässlich. Ein von *Ahrens & Craig*¹⁾ empfohlenes Lösungsmittelgemisch aus Formamid, Acetonitril und Eisessig (1:1:1 oder 1:3:3), das sich im *Craig'schen* Verteilungsapparat zur Trennung höherer Fettsäuren als sehr geeignet erweist, haben wir nach Sättigung mit KW gleichfalls zur Fettsäuretrennung auf dem Papier verwenden können. Die Laufgeschwindigkeit betrug nur 12 Std. bei guter Trennung, die Flecken des Kupferferrocyanidkomplexes waren indessen ziemlich diffus, und eine Abtrennung der höheren Fettsäuren mit mehr als 20 C-Atomen war nicht möglich. Eine Herauslösung der Fettsäuren aus dem Papier findet höchstens nur geringfügig statt. Zwei Papierchromatogramme gleicher Mengen eines radioaktiven Fettsäuregemisches zeigten vor und nach Entwicklung der Farbflecken dieselben Aktivitäten. Um eine beim Auftropfen des Fettsäuregemisches auf das Papier mögliche Oxydation höherer ungesättigter Fettsäuren zu prüfen, wurden Versuche mit Linol- und Linolensäure unter Zugabe einer 0,2-proz. Lösung von Octylgallat durchgeführt. Eine Intensitätserhöhung des Linol- oder Linolensäurefleckens konnte indessen nicht beobachtet werden. Eventuelle Diskrepanzen bei der Ausmessung von Flecken aus Fettsäuregemischen können durch die Diskontinuität der Messmethode oder nicht völlig einheitlichen Nullwert bedingt werden.

Im folgenden seien einige Beispiele mitgeteilt:

Vier zeitlich unabhängig voneinander ausgeführte Analysen eines Gemisches von je 100 γ Stearin- und Palmitinsäure ergaben folgende Werte:

% Stearinsäure: 49,5; 51,0; 51,5; 48,0; % Palmitinsäure: 50,5; 49,0; 49,5; 52,0.

In einem Gemisch von je 100 γ Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure wurden diese Komponenten in folgendem Ausmass wieder aufgefunden (Zahlenangaben in %; 100% entspr. 100 γ):

Analyse Nr.	Laurinsäure	Myristinsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure
1	94	103	101	101
2	94	96	101	110
3	101	94	115	90
4	103	94	100	103
Mittel	98	97	104	101

Die Untersuchung eines Gemisches aus Eruca-, Stearin-, Palmitin-, Öl- und Linolsäure ergab folgende Resultate (Zahlenangaben in % der Gesamtmenge):

¹⁾ *E. H. Ahrens jr. & L. C. Craig*, J. biol. Chemistry 195, 299 (1952).

Analyse Nr.	Erukasäure	Stearinsäure	Palmitin- u. Ölsäure	Linolsäure
1	52,5	11,8	27,1	8,5
2	52,0	8,9	28,4	10,6
3	53,0	11,5	24,0	11,5
Mittel	52,5	10,7	26,5	10,2

Die Zusammensetzung eines anderen ähnlichen Gemisches ist aus Fig. 2 ersichtlich. Fig. 3 stellt ein Beispiel einer quantitativen Analyse flüssiger Fettsäuren dar. Fig. 4 zeigt die Auswertung des Chromatogrammes einer aus dem Handel bezogenen als rein bezeichneten Linolsäure, die sich als Linol-Ölsäure-Gemisch erwies.

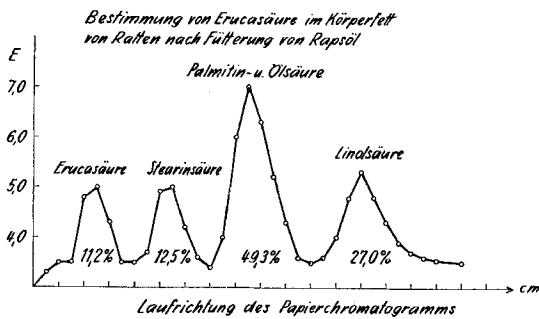


Fig. 2.

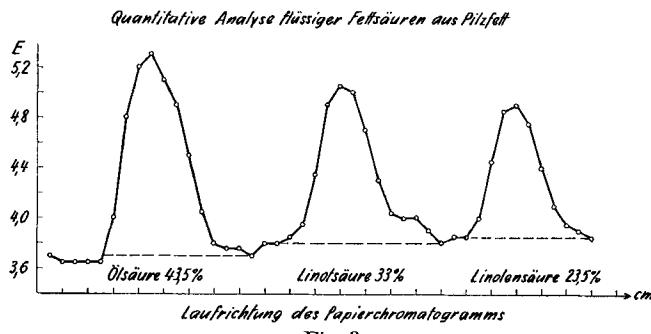


Fig. 3.

Natürliche Gemische aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren sind vor der Analyse durch das übliche Bleisalzverfahren in feste und flüssige Säuren zu trennen, da eine Separierung der Palmitin- von der Ölsäure zufolge ihrer gleichen Verteilungskoeffizienten auf dem Papier nicht gelingt.

Die hier beschriebene Methode hat gegenüber dem Verfahren zur quantitativen Analyse von Fettsäuregemischen durch fraktionierte Destillation der Methylester den Vorteil eines bedeutend geringeren Arbeitsaufwandes und erlaubt, was vor allem hervorgehoben werden darf, die quantitative Untersuchung sehr kleiner Fettmengen.

Hinsichtlich der erzielten Genauigkeit dürfte sie nicht hinter der Destillationsmethode zurückstehen.

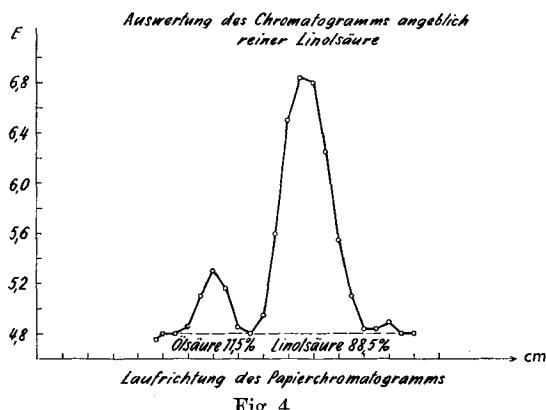


Fig. 4.

Herrn C. Berthe und Fräulein E. Seelig danken wir für experimentelle Mithilfe.

Die vorliegende Arbeit wurde zum Teil mit den dem physiologisch-chemischen Institut Basel von der ASTRA Fett- & Ölwerke AG., Steffisburg, zur Verfügung gestellten Mitteln durchgeführt.

SUMMARY.

A method is described by which saturated and unsaturated fatty acids with 12–22 C atoms can be separated by paper chromatography. By measuring the light absorption of the copper-ferrocyanide complexes developed from the fatty acids on the paper a satisfactory quantitative analysis of such fatty acid mixtures was possible.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

185. Zur Kenntnis des Kohlenstoffringes.

67. Mitteilung¹⁾.

Solvolysegeschwindigkeit der Cyclanyl-p-toluolsulfonate mittlerer Ringgrösse in Eisessig

von R. Heck und V. Prelog.

(27. VIII. 55.)

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass bei mittleren Ringverbindungen die Reaktionsgeschwindigkeiten oft stark von der Ringgrösse abhängig sind²⁾, doch fehlen besonders bei Verbindungen

¹⁾ 66. Mitt. Helv. **38**, 1095 (1955).

²⁾ Vgl. dazu die zusammenfassende Darstellung V. Prelog, J. chem. Soc. **1950**, 420, sowie H. C. Brown, R. S. Fletcher & R. B. Johannessen, J. Amer. chem. Soc. **73**, 212 (1951); H. C. Brown & M. Borkowski, J. Amer. chem. Soc. **74**, 1894 (1952); S. F. Van Straten, R. V. V. Nicholls & C. A. Winkler, Canadian Journ. Chemistry **29**, 372 (1951).