

## ÜBER PAPIERIONOPHORESE BEI SPANNUNGSGEFÄLLEN VON 50 V/cm

### IV. ÜBER DIE PAPIERIONOPHORESE VON ABBAUSÄUREN (DICARBONSÄUREN) \*

H. MICHL UND G. HÖGENAUER

*II. Chemisches Institut der Universität Wien (Österreich)*

Eine der wichtigsten chemischen Methoden zur Strukturaufklärung organischer Stoffe ist der oxydative Abbau. Das bei dieser Methode anfallende Reaktionsprodukt enthält meistens ein komplexes Gemisch organischer Säuren, dessen Auftrennung mit klassischen chemischen Methoden oft nicht leicht ist.

Verteilungschromatographische Verfahren führen nur teilweise zum Ziel. Wenn Hochvoltelektrophorese in der richtigen Weise angewandt wird, erhält man schnell Ergebnisse über Art und Anzahl der entstandenen Säuren. In erster Linie werden nicht flüchtige, zwei oder mehrere Carboxylgruppen enthaltende Säuren erfasst.

Bei den chromatographischen Verfahren<sup>1</sup> ist der Zusammenhang zwischen der chemischen Konstitution der Säure und ihrer Lage im Chromatogramm nicht immer klar erkennbar. Dagegen liefert die Hochvoltelektrophorese, da mehrbasische organische Säuren vom Filtrierpapier fast nicht adsorbiert werden, einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Dissoziationskonstante und der Wanderungsgeschwindigkeit<sup>2,3</sup>. Ferner kann der Einfluss der chemischen Konstitution auf die Dissoziationskonstante der Säure häufig abgeschätzt werden, daher ist die Identifizierung einer unbekanntenen Säure lediglich aus ihrer Lage im Elektropherogramm und durch Vergleich mit den in Tabelle I und Fig. 1 angegebenen Wanderungsgeschwindigkeiten wesentlich erleichtert.

Durch Vergleich einer unbekanntenen Dicarbonsäure mit den Vertretern der homologen, nicht verzweigten Dicarbonsäuren erhält man zunächst einen Hinweis auf die Zahl der Kohlenstoffatome zwischen den Carboxylgruppen. Aus der Tabelle kann man erkennen, dass verzweigte Dicarbonsäuren nur wenig langsamer als die entsprechenden nicht verzweigten, also auf alle Fälle viel schneller als das nächst höhere Homologe wandern. Säuren des Typs  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CHR}-\text{COOH}$  unterscheiden sich in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit kaum von den Homologen der Hauptreihe. Durch den induktiven Effekt der  $\alpha$ -ständigen Alkylgruppe wird ja nur die zweite Dissoziationskonstante ( $K_2$ ) beeinflusst, während die bei den tabellierten pH-Werten die Wanderungsgeschwindigkeit bestimmende  $K_1$  fast gleich der

\* III. Mitt. siehe Ref.4.

TABELLE I

RELATIVE GESCHWINDIGKEITEN (MALONSÄURE = 1.00) AUF SCHLEICHER-SCHÜLL 2043 B

Säure	Essigsäure-Pyridin	Essigsäure-Pyridin
	5.5:1.5 pH = 3.9	5.5:2.5 pH = 4.15
<i>Versuch bei 10° Kühlwassertemperatur</i>		
Äthylmalonsäure	0.78	0.78
Adipinsäure	0.26	0.34
Bernsteinsäure	0.40	0.50
Diäthylmalonsäure	0.76	0.76
<i>α,α'</i> -Dimethyladipinsäure	0.24	0.32
Glutarsäure	0.32	0.42
<i>n</i> -Hexan- $\beta, \beta, \epsilon, \epsilon$ -tetracarbonsäure	0.87	0.87
Malonsäure	1.00	1.00
Methylmalonsäure	0.83	0.83
Oxalsäure	1.10	1.10
Pimelinsäure	0.22	0.30
Benzoessäure	0.28	0.34
Isophthalsäure	0.47	0.55
Phthalsäure	0.59	0.59
<i>Versuch bei 40°</i>		
Benzoessäure	0.27	
Isophthalsäure	0.49	
Phthalsäure	0.61	

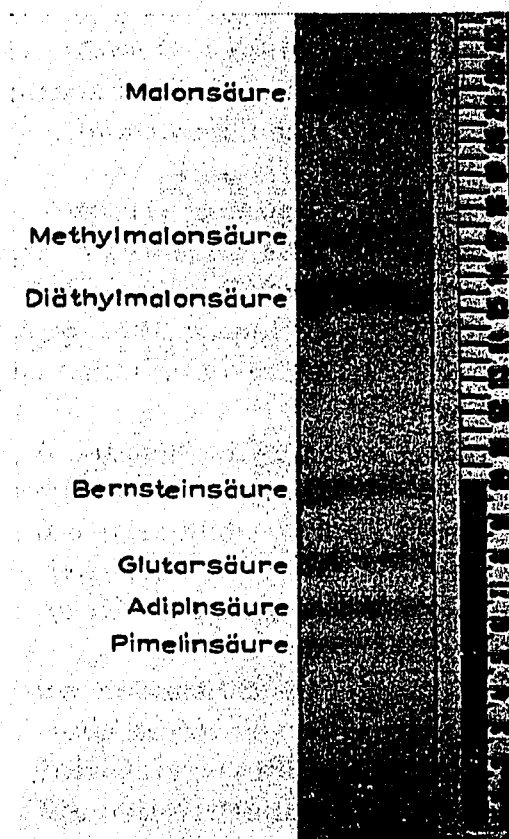


Fig. 1. 38 V/cm, 3.0 mA/cm Streifenbreite. Puffer: 5.5 ml Essigsäure, 2.5 ml Pyridin, auf 100 ml Wasser (pH 4.15).

unverzweigten Säure ist. So wandern die (nicht tabellierte) Methylbernsteinsäure und  $\alpha$ -Methylglutarsäure praktisch genau so schnell wie Bernsteinsäure bzw. Glutarsäure. Eine Trennung erreicht man hier erst durch Einstellen des Puffers auf pH-Werte, bei denen die zweite Dissoziationskonstante wirksam wird. Für die Trennung höherer Säuren mit verschiedenen langen Seitenketten (Methyl- und Äthylmalonsäure lassen sich elektrophoretisch noch leicht trennen) sind papierchromatographische Verfahren vorzuziehen. Das gleiche gilt für Dicarbonsäuren, die nicht  $\alpha$ -ständig verzweigt sind, etwa Methylglutarsäure und Glutarsäure.

Die genaue Identifizierung erfordert das Aufbringen entsprechender Vergleichssubstanzen. Die Wahl dieser Säuren wird durch die nun bekannte Zugehörigkeit zu einem Glied der homologen Reihe, die für oxydative Abbaureaktionen geltenden Gesetzmässigkeiten und eventuell durch eine teilweise Kenntnis der Struktur der abgebauten Substanz wesentlich erleichtert.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Die Apparatur und die Versuchstechnik wurde an anderer Stelle ausführlich beschrieben<sup>4,5</sup>. Verwendet wurde eine Apparatur vom Sandwich-Typ, die mit fliessendem Leitungswasser (10°) oder mit Hilfe eines Thermostaten auf die gewünschte Temperatur gebracht wurde.

Nach dem oxydativen Abbau—etwa mit  $\text{KMnO}_4$ —reichert man die Säuren durch Aufnehmen in Lauge und Ausäthern nach dem Ansäuern an. Unter Umständen kann auch eine Hochvakuumdestillation, bei der flüchtige Säuren abgetrennt und Polycarbonsäuren zu den übersichtlicheren Dicarbonsäuren decarboxyliert werden, zweckmässig sein.

Der Papierstreifen, in dem die Trennung erfolgen soll, wird mit dem Puffer getränkt und zwischen Filtrierpapier gut abgepresst. Das Gewicht des trockenen Streifens zum Gewicht des aufgenommenen Puffers soll etwa 1:1.0–1.2 betragen. Die Abbausäuren bringt man mittels eines feinen Pinsels oder einer Pipette bis zur Streifenmitte auf, die andere Hälfte der Streifenbreite ist für Vergleichssubstanzen reserviert.

Der pH-Wert des Puffers soll in der Nähe der pK-Werte der Säuren liegen. Die von uns am häufigsten verwendeten Puffergemische bestehen aus einem Gemisch von 5.5 ml Essigsäure und 1.5 ml nicht besonders gereinigtem Pyridin oder 5.5 ml Essigsäure und 2.5 ml Pyridin in je 100 ml Wasser (pH 3.9 bzw. 4.15). Das letztere Puffergemisch eignet sich besonders dann, wenn man im Bereich der längerkettigen Säuren operiert.

Nach einer Versuchsdauer von  $\frac{1}{2}$  bis 2 Stunden wird der Streifen bei 120° getrocknet und sodann mit einem Gemisch aus 10 mg Glucose, 5 mg Arabinose in 6 ml Äthanol–Butanol 1:1, das mit 0.5 ml Anilin versetzt wird, besprüht. Kurzes Erhitzen auf 140° lässt die Lage der Säuren als braune Streifen auf weissem Grund erscheinen. Ein anderes, auf dem gleichen Prinzip beruhendes Sprühmittel besteht aus einem Gemisch von 2 g Glucose, 2 ml Anilin in 50 ml Butanol–Äthanol–Wasser wie 6:2:2<sup>6</sup>.

Es empfiehlt sich, als Vergleichssubstanz immer Malonsäure mitlaufen zu lassen, da die Bestimmung der relativen Lage einfacher ist, als die der scheinbaren Ionenbeweglichkeit. Letztere lag bei Malonsäure und den für die Tabelle angegebenen Versuchsbedingungen bei  $1.05 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sec}^{-1} (10^\circ)$  bzw.  $1.6 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sec}^{-1} (40^\circ)$ .

Sind die zu untersuchenden Säuren schwer löslich (z.B. Benzoesäure, Isophthalsäure), kann man bei erhöhter Temperatur arbeiten. Dabei muss man das Spannungsgefälle meist reduzieren, bei  $40^\circ$  etwa auf die Hälfte des bei  $10^\circ$  verwendeten.

Durch Verwendung breiter Streifen und mehrfaches Wiederholen des Versuches konnten bestimmte Abbausäuren der Bitterstoffe Lactucin und Laserpitin im mg-Masstab isoliert und durch Schmelzpunktbestimmungen sowie Papierchromatographie identifiziert werden<sup>7</sup>.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Im vorliegenden Aufsatz wird eine Methode zur Erkennung schwerflüchtiger Säuren, wie sie nach einem oxydativen Abbau entstehen, beschrieben.

Man kann mit Hilfe der Papierionophorese und unter Verwendung von Essigsäure-Pyridinpuffern komplizierte Gemische von Abbausäuren auftrennen.

#### SUMMARY

A method is described for the identification of acids that are difficultly volatile, such as those obtained by oxidative degradation. Complicated mixtures of these acids can be separated by means of paper ionophoresis, using acetic acid-pyridine buffers.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> Vergl. E. LEDERER UND M. LEDERER, *Chromatography*, 2. Aufl., Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1957, S. 171 ff.
- <sup>2</sup> H. BERBALK UND O. SCHIER, *Monatsh. Chem.*, 86 (1955) 146.
- <sup>3</sup> D. GROSS, *Nature*, 178 (1956) 29.
- <sup>4</sup> H. MICHL, H. KUHN UND H. BÜHN, *Fachliche Mitt. Österr. Tabakregie*, (1956) 1.
- <sup>5</sup> H. MICHL, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 93.
- <sup>6</sup> H. SCHWEPPE zit. nach F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 4. Aufl., Verl. Chemie, Weinheim, 1958, S. 156.
- <sup>7</sup> H. MICHL UND G. HÖGENAUER, *Monatsh. Chem.*, 89 (1958) 317 und nicht veröffentlichte Versuche.

Eingegangen den 17. November 1958