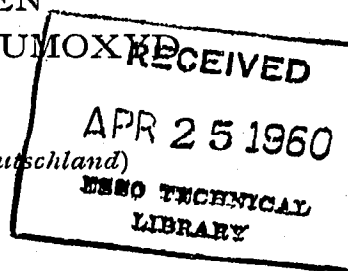


ÜBER DAS CHROMATOGRAPHISCHE VERHALTEN VON HYDROXYLHALTIGEN CARBONSÄUREN UND PHOSPHORSÄUREESTERN AN ALUMINIUMOXID

HERBERT GRASSHOF

Chemisches Laboratorium der Firma M. Woelm, Eschwege (Deutschland)

(Eingegangen den 11. Juni 1959)



Die starke Adsorptionsfähigkeit von Aluminiumoxyd, die durch van der Waals'sche Kräfte bedingt, in organischen Lösungsmitteln für die chromatographische Analyse ausgenutzt wird, zeigt sich auch bei wässrigen Lösungen. Hierbei tritt jedoch der Ionenaustausch in den Vordergrund, der je nach Charakter des verwendeten Aluminiumoxyd-Präparates verschieden verläuft. In diesem Sinne werden basische Farbstoffe bevorzugt von basischem (natriumhaltigem), saure Farbstoffe bevorzugt von saurem (Cl-haltigem) Aluminiumoxyd sorbiert¹. Diese Erscheinungen lassen sich zur Charakterisierung und Standardisierung von Aluminiumoxyd-Präparaten benutzen². Neutrales Oxyd verhält sich jedoch gegenüber diesen Farbstoffen in wässriger Lösung indifferent³.

Saures Aluminiumoxyd nimmt z.B. den sauren Farbstoff Orange GG (Cassella) auf². War dasselbe durch Behandlung mit überschüssiger Salzsäure erhalten worden, ist die Aufnahme des Farbstoffes eine maximale. Wenn man aber neutrales (eventuell auch basisches) Aluminiumoxyd nur mit einer beschränkten Menge Säure behandelt, indem man über eine Säule eine geringe Menge Säure enthaltende Lösung laufen lässt, dann wird nur soviel Orange adsorbiert, wie der angewandten Menge Säure entspricht⁴. Man kann, nachdem der überschüssige Farbstoff mit Wasser ausgewaschen ist, durch Eluieren des festgehaltenen Orange GG mit Natronlauge und Messen der erhaltenen Lösung in einem Kolorimeter mit Hilfe einer Eichkurve den Effekt zur Bestimmung von Säuren, auch in Spuren, verwenden. Bestimmt wurde nach dieser Methode Kohlensäure, Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure und Stearinsäure.

Die Untersuchungen wurden nunmehr auf einige Dicarbonsäuren, Hydroxymono-, -di- bzw. -tricarbonsäuren ausgedehnt. Jeweils 200 mg der Säure wurden in 20 ml Wasser gelöst und auf eine Säule aus Aluminiumoxyd Woelm neutral von 10.3 mm Durchmesser und 22 cm Länge gegeben. Nach Entwicklung mit 25 ml einer etwa 0.01 M Lösung von Orange GG (gereinigt*) wurde der überschüssige Farbstoff erst

* Das früher⁴ verwendete "Orange GG konz. bes. rein" von Cassella wird nicht mehr geliefert. Das stattdessen verfügbare "Orange GG" wird gereinigt, indem man eine Lösung von 5 g Farbstoff in 1 l dest. Wasser zuerst durch eine Säule von 25 g Aluminiumoxyd Woelm sauer, dann durch eine Säule von 260 g Aluminiumoxyd Woelm neutral laufen lässt und das bei beiden Säulen zuerst anfallende farblose Filtrat verwirft. Die so erhaltene gereinigte Lösung ist etwas weniger als 1/100 M.

mit 10 ml, dann nach Einsickern mit 25 ml destilliertem Wasser ausgewaschen. In Tabelle I sind die beobachteten Zonenlängen zusammengestellt, die vom oberen Rand der Säule an gerechnet werden. Bei Tartronsäure, Weinsäure, Citronensäure und Äpfelsäure ist die ganze Säule farblos.

TABELLE I

Glykolsäure	4.5 cm orange
Milchsäure	7.0 cm orange
Salicylsäure	6.5 cm orange
Tropasäure	4.0 cm orange
Bernsteinsäure	12.0 cm orange
Malonsäure	2.0 cm farblos
und	20.0 cm orange
Tartronsäure	22.0 cm farblos
Weinsäure	22.0 cm farblos
Citronensäure	22.0 cm farblos
Äpfelsäure	22.0 cm farblos

Wie man der Tabelle I entnehmen kann, steht das Verhalten der Hydroxymonocarbonsäuren und Bernsteinsäure in Übereinstimmung mit den früher⁴ mitgeteilten Befunden, nach denen die durch das Aluminiumoxyd fixierten Säuren gegen den Farbstoff Orange ausgetauscht werden. Die Länge der Zonen ist davon abhängig, wie stark die betr. Säure vom Aluminiumoxyd festgehalten wird und wie stark das ausgetauschte Orange auf der Säule haftet. Malonsäure zeigt in gewisser Weise einen Übergang zu den untersuchten mehrbasischen Hydroxycarbonsäuren Tartronsäure, Weinsäure, Citronensäure und Äpfelsäure, die ein ganz anderes Verhalten zeigen. Nach dem Entwickeln mit Orange-Lösung und Nachwaschen mit Wasser bleibt keine gefärbte Zone zurück, die ganze Säule ist farblos. Diese Befunde lassen zwei Möglichkeiten offen: entweder werden die Säuren nicht adsorbiert, dann kann natürlich auch kein Austausch gegen Orange stattfinden, oder die Säuren werden zwar festgehalten, werden aber nicht gegen Orange ausgetauscht.

Eine eindeutige Erklärung kann man finden, wenn man sich bei der Chromatographie des sauren Aluminiumoxyds bedient. Hierbei wurden wieder 200 mg der betr. Säure in 20 ml Wasser auf eine Säule aus Aluminiumoxyd Woelm sauer von denselben Ausmassen gegeben, mit 25 ml einer etwa 0.01 M gereinigten Orange-Lösung entwickelt und mit 10 + 25 ml Wasser ausgewaschen. Die Ergebnisse sind in Tabelle II enthalten, in der die Zonen wieder vom oberen Rand der Säule an gerechnet werden.

Die Fixierung der Bernsteinsäure findet bei dem sauren Aluminiumoxyd durch Austausch gegen die Cl-haltigen sauren Zentren statt, wobei dann die Säuren wieder weiter gegen Orange ausgetauscht werden. Diese so erhaltene Zone gibt sich durch die Farbe hell-orange zu erkennen, bei der anschliessenden dunkel-orangen Zone handelt es sich um den direkten Austausch der noch vorhandenen salzsauren Zentren

TABELLE II

Bernsteinsäure		20.0 cm hell-orange	1.0 cm dunkel-orange
Malonsäure	1.0 cm farblos	19.5 cm hell-orange	
Tartronsäure	12.0 cm farblos		3.0 cm dunkel-orange
Weinsäure	8.0 cm farblos	3.0 cm hell-orange	2.5 cm dunkel-orange
Citronensäure	10.0 cm farblos		5.0 cm dunkel-orange
Äpfelsäure	9.0 cm farblos	4.0 cm hell-orange	3.0 cm dunkel-orange

gegen den Farbstoff. Während die Länge der hellen Zone von der Art und Menge der angewandten Säure abhängt, wird die Länge der dunklen von der Menge des angewandten Farbstoffes bestimmt. Bei den mehrbasischen Oxysäuren sehen wir wieder eine farblose Zone. Dieser Effekt kann nur dadurch zustande gekommen sein, dass die Säuren die sauren Zentren durch Austausch verdrängt haben und dann aber nicht gegen Orange ausgetauscht werden. Malonsäure nimmt auch hier wieder eine Zwischenstellung ein.

Auch beim neutralen Aluminiumoxyd lässt sich leicht nachweisen, dass die farblose Zone nicht leer ist, sondern tatsächlich die aufgebene Säure enthält. Werden zum Beispiel unter den Bedingungen der Tabelle I 200 mg Citronensäure auf die neutrale Säule gegeben und dann vor der Entwicklung mit der Orange-Lösung und dem Auswaschen mit Wasser noch 25 ml einer $N/1000$ Essigsäure nachgegeben, ist nicht wie in Tabelle I die ganze Säule farblos, sondern unter einer farblosen Zone von 14 cm Länge ist die Säule bis zum unteren Ende hell-orange gefärbt: Die Essigsäure wird also *unter* der Citronensäure festgehalten. Wiederholt man denselben Versuch, behandelt aber die Säule vor der Aufgabe der Essigsäure erst mit $N/10$ Natronlauge und dann gründlich mit Wasser, erscheint am oberen Anfang der Säule eine hell-orange Zone. An dieser Stelle muss in Übereinstimmung mit früheren Befunden⁴ die Essigsäure sitzen, nachdem die Citronensäure mit Natronlauge eluiert worden war.

Die Erklärung für die beobachteten farblosen Zonen dürfte darin zu finden sein, dass infolge der Affinität der Hydroxylgruppe zum Aluminiumoxyd sich ein Chelat bildet und dadurch die mehrbasischen Hydroxysäuren im Gegensatz zu anderen Säuren so fest an Aluminiumoxyd gebunden sind, dass ein Austausch gegen Orange nicht mehr stattfinden kann. Es ist ein ähnliches Verhalten wie bei Glutaminsäure und Asparaginsäure, die nach Austauschadsorption an saurem Aluminiumoxyd nicht durch den Farbstoff Bromthymolblau, der sonst leicht aufgenommen wird, verdrängt werden⁵.

Interessanterweise zeigt das eben geschilderte Verhalten der untersuchten Hydroxysäuren an neutralem Aluminiumoxyd auch noch eine andere Verbindungs-kategorie, nämlich Phosphorsäureester von mehrwertigen Alkoholen. Unter den Bedingungen der Tabellen I und II, jedoch unter Anwendung der 200 mg Phosphorsäure äquivalenten Mengen und nach Einstellung mit Salzsäure auf pH 1.5, da Salze verwandt wurden, war bei Glycerophosphat, Glucosephosphat und Glykolphosphat die ganze Säule farblos.

Das Auftreten einer farblosen Zone bei den Phosphorsäureestern ist offenbar wieder an die Gegenwart einer Hydroxylgruppe gebunden, wie sich oben bei den Carbonsäuren aus dem unterschiedlichen Verhalten von Malonsäure bzw. Bernsteinsäure einerseits und Tartronsäure bzw. Weinsäure andererseits ergab. Phosphorsäure selbst zeigt die Erscheinung der farblosen Zone nur zum Teil und entspricht in diesem Verhalten etwa der Malonsäure (Tabelle I), ebenso Propylphosphat (Herstellung nach⁶).

Nach BROCKMANN⁷ ist die Adsorptionsaffinität von den funktionellen Gruppen abhängig und fällt in der Reihe: COOH, OH, NH₂, CO, OAlk. Ein Phosphorsäureester, der anstelle einer freien OH-Gruppe eine freie COOH-Gruppe enthält, muss also erst recht fest an Aluminiumoxyd gebunden sein und nicht durch Orange ersetzt werden, was bei der Untersuchung von Brenztraubensäurephosphat⁸ und Ketoglutar-säurephosphat* durch Beobachtung von farblosen Zonen an neutralem Aluminiumoxyd bestätigt wurde.

Bei gleichem Verhalten an neutralem Aluminiumoxyd beobachtet man jedoch bei den Phosphorsäureestern an saurem Aluminiumoxyd im Gegensatz zu den Hydroxysäuren wie Citronensäure nicht eine vollständig farblose Säule, wie Tabelle III zeigt. Die Ergebnisse wurden unter den bisher üblichen Bedingungen gewonnen,

TABELLE III

Glycerophosphat	3.5 cm farblos	5.5 cm hell-orange	2.0 cm dunkel-orange
Glucosephosphat	4.5 cm farblos	9.0 cm hell-orange	2.5 cm dunkel-orange
Phosphorsäure	2.5 cm farblos	4.5 cm hell-orange	2.5 cm dunkel-orange

jedoch wurden 360 mg Natrium-glycerophosphat bzw. die äquivalente Menge an Calcium-glucosephosphat angewendet, unter Einstellung des pH der Lösung in 20 ml Wasser auf 1.5. Zum Vergleich wurde das Verhalten von Phosphorsäure untersucht (200 mg).

Zwischen der Phosphorsäure und ihren Estern besteht nur ein quantitativer Unterschied. Diese Stoffe zusammen stehen in ihrem Verhalten an saurem Aluminiumoxyd zwischen den Säuren vom Typus der Glykolsäure bzw. Bernsteinsäure und den Säuren vom Typus der Citronensäure, werden also weniger fest gebunden als letztere.

Durch die fehlende Austauschfähigkeit gegenüber Orange lassen sich also bestimmte Hydroxycarbonsäuren und Phosphorsäureester in ihrem Gemisch mit anderen Säuren anhand ihres Chromatogramms erkennen bzw. lassen sich markieren und können dann mit Natronlauge eluiert werden.

Während sich die untersuchten Hydroxy-di- bzw. -tricarbonsäuren an Aluminiumoxyd als starke, die untersuchten Phosphorsäureester als schwächere Chelatbildner erweisen, verhalten die sich sonst als Chelatbildner bekannten Säuren, wie Nitrilotriessigsäure und Aethylendiamintetraessigsäure anders. Das Chromatogramm

* Diese Verbindung liess sich nach der Methode herstellen, die bei Brenztraubensäure beschrieben ist.

der Nitrilotriessigsäure entspricht etwa dem der Glykolsäure, das der Aethylendiamin-tetraessigsäure ist ähnlich, jedoch ist bei beiden Oxyden am oberen Ende eine schmale farblose Zone erkennbar.

ZUSAMMENFASSUNG

Während an Aluminiumoxyd fixierte Säuren normalerweise gegen den Farbstoff Orange GG ausgetauscht werden, findet dieser Austausch bei gewissen Hydroxy-di- bzw. -tricarbonsäuren und hydroxylhaltigen Phosphorsäureestern nicht statt. Eine Erklärung für dieses Verhalten dürfte in der infolge Chelatbildung auftretenden festeren Bindung zu finden sein.

SUMMARY

Normally, acids adsorbed on aluminium oxide can be replaced by the dye Orange GG. However, in the case of certain hydroxy-dicarboxylic and -tricarboxylic acids, and phosphoric esters containing hydroxyl groups, this exchange does not occur. A possible explanation for this behaviour could be sought in stronger adsorption due to chelate formation.

LITERATUR

- ¹ G. HESSE UND O. SAUTER, *Naturwiss.*, 34 (1947) 251.
- ² G. HESSE, I. DANIEL UND G. WOHLLEBEN, *Angew. Chem.*, 64 (1952) 103.
- ³ H. GRASSHOF, *Angew. Chem.*, 63 (1951) 96.
- ⁴ H. GRASSHOF, *Angew. Chem.*, 63 (1951) 219.
- ⁵ G. SCHRAMM UND J. PRIMOSIGH, *Ber.*, 77 (1944) 426.
- ⁶ J. CAVALIER UND E. PROST, *Bull. soc. chim. France*, [3] 23 (1900) 678.
- ⁷ H. BROCKMANN, *Angew. Chem.*, 59 (1947) 203.
- ⁸ W. KIESSLING, *Ber.*, 68 (1935) 599.

J. Chromatog., 3 (1960) 285-289