

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BEZIEHUNG ZWISCHEN STRUKTUR UND CHROMATOGRAPHISCHEM VERHALTEN IN DER DÜNNSCICHT-CHROMATOGRAPHIE

GYÖRGY PATAKI

Laboratorium der Universitäts-Frauenklinik**, Basel (Schweiz)*

(Eingegangen den 5. Juni 1964)

Für die Papierchromatographie postulierte MARTIN¹ eine lineare Beziehung zwischen R_M -Wert² und Anzahl homologer Bauelemente. Diese Gesetzmässigkeit konnte in der Folge von vielen Autoren bestätigt werden (für Zusammenfassung siehe Zit. 3, 4).

In der Dünnschichtchromatographie fanden einerseits BRENNER *et al.*⁴⁻⁶ sowie HALMEKOSKI UND HANNIHAINEN⁷ eine Linearität zwischen R_M -Wert und Anzahl CH_2 -Gruppen, andererseits beobachteten HROMATKA UND AUE⁸ eine lineare Beziehung zwischen $\log R_F$ -Wert und Anzahl C-Atome.

Der Beitrag einer bestimmten Gruppe zum R_M -Wert des Gesamtmoleküls kann vom Molekülrest und von der Stellung dieser Gruppe im Molekül abhängig sein. So fanden z.B. SCHAUER UND BULIRSCH⁹, dass die Gruppenkonstante (in den folgenden als $G(\mu)$ bezeichnet) für die α - bzw. ε - NH_2 -Gruppe im Aminosäuremolekül verschieden ist. Um die gegenseitige Beeinflussung der einzelnen Gruppen zu eliminieren führten LEIBNITZ *et al.*¹⁰ und BEHRENS *et al.*¹¹ "komplexe Gruppenkonstanten" ein.

Besonders eingehend beschäftigten sich LEDERER¹², BRENNER *et al.*⁴⁻⁶ und GREEN *et al.*^{13,14} mit den von FRANC UND JOKL¹⁵ und von HOWE¹⁶ gefundenen Abweichungen vom Additivitätsprinzip der R_M -Werte. BRENNER *et al.*⁴⁻⁶ haben gezeigt, dass die Fließmittelmischung die Additivität dünnschichtchromatographischer R_M -Werte wesentlich beeinflusst. In einigen Fällen (Adsorptionschromatographie?) konnte die "log-log"-Beziehung von FRANC UND JOKL¹⁵ gefunden werden. Die englischen Autoren^{13,14} haben u.a. ausgeführt, dass die Chromatographiertechnik die Linearität der R_M -Werte beeinflusst und haben festgestellt, dass ausser "normalen" Gruppenkonstanten auch konstitutionelle Verhältnisse sowie atomische $G(\mu)$ -Parameter berücksichtigt werden müssen (vgl. dazu auch LEIBNITZ *et al.*¹⁰).

In Fortsetzung früherer Untersuchungen^{4,6} chromatographierten wir Aminosäuren und Carbobenzoxy(CbO)-Aminosäuren auf Kieselgel-G-Schichten unter Verwendung von Äthylalkohol-Wasser (7:3, V/V) als Fließmittel. In diesem Fließmittel fanden wir früher^{4,6} eine lineare Beziehung zwischen R_M -Werte und Anzahl CH_2 -Gruppen homologer Aminosäuren. In den Tabellen I und II sind die R_M -Werte angegeben (für experimentelle Einzelheiten vgl. PATAKI¹⁷).

* Leiter: Dr. M. KELLER.

** Direktor: Prof. Dr. TH. KOLLER.

TABELLE I

 R_M -WERTE* VON CARBOBENZOXY-AMINOSÄUREN

<i>CbO-Aminosäure</i>	R_M -Wert	<i>CbO-Aminosäure</i>	R_M -Wert
Ala	—0.298	Met	—0.368
Asp	—0.070	Phe	—0.399
Arg	+0.017	Pro	—0.308
Glu	—0.149	Ser	—0.317
Gly	—0.288	Tyr	—0.410
ϵ -CbO-Lys	+0.070	Val	—0.357

* Mittelwerte aus je 6 Einzelbestimmungen auf Kieselgel-G-Schichten. Fließmittel: Äthylalkohol-Wasser (7:3, V/V) nach PATAKI¹⁷.

TABELLE II

 R_M -WERTE* VON AMINOSÄUREN

<i>Aminosäure</i>	R_M -Wert	<i>Aminosäure</i>	R_M -Wert
Ala	+0.194	Met	—0.017
Asp	+0.061	Phe	—0.087
Arg	+1.510	Pro	+0.410
Glu	—0.087	Ser	+0.176
Gly	+0.269	Tyr	—0.122
Lys	+1.690	Val	+0.061

* Mittelwerte aus je 6 Einzelbestimmungen auf Kieselgel-G-Schichten. Fließmittel: Äthylalkohol-Wasser (7:3, V/V) nach PATAKI¹⁷.

TABELLE III

 $G(\text{CH}_2)$ -PARAMETER

<i>Verbindungspaar</i>	$G(\text{CH}_2)_{\text{AS}}$ *	$G(\text{CH}_2)_{\text{CbO-AS}}$ **
Gly/Ala	—0.075	—0.010
Glu/Asp	—0.148	—0.079

* Aminosäuren.

** CbO-Aminosäuren.

TABELLE IV

VERSCHIEDENE GRUPPENKONSTANTEN IN DER REIHE VON AMINOSÄUREN UND VON CbO-AMINOSÄUREN

	<i>Freie Aminosäure</i>	<i>CbO-Aminosäure</i>
$G(\beta\text{-COOH})$	—0.133	+0.228
$G(\gamma\text{-COOH})$	—0.206	+0.159
$G(\beta\text{-Phenyl})$	—0.281	—0.101
$G(\beta\text{-OH aliph.})$	—0.018	—0.019
$G(\beta\text{-OH arom.})$	—0.035	—0.011

Definiert man für den R_M -Wert von Alanin bzw. von CbO-Alanin:

$$R_{MAla} = R_{MGly} + G(CH_2)_{AS} \quad (1)$$

$$R_{MCbO-Ala} = R_{MCbO-Gly} + G(CH_2)_{CbO-AS} \quad (1a)$$

Hierbei bezeichnen die Indices AS (= Aminosäure) und CbO die Gruppenkonstanten für die CH_2 -Gruppe in beiden Verbindungsreihen, so lässt sich aus Gl. (1) und aus Gl. (1a) $G(CH_2)$ für die beiden Reihen bestimmen.

Bemerkenswert ist, dass die $G(CH_2)$ -Parameter bei den freien Aminosäuren und bei den CbO-Aminosäuren verschieden sind* (Tabelle III).

Die beiden Verbindungspaare Glutaminsäure/Asparaginsäure und die entsprechenden CbO-Derivate unterscheiden sich ebenfalls durch eine CH_2 -Gruppe. Subtraktion beider R_M -Werte ergibt für beide Verbindungsreihen die $G(CH_2)_{Asp/Glu}$ -Parameter, welche von den $G(CH_2)$ -Parameter erheblich abweichen (vgl. Tabelle III).

Tabelle IV enthält weitere Gruppenkonstanten, welche in Anlehnung an REICHL¹⁸ und an SCHAUER UND BULIRSCH⁹ nach den Gln. (2) bis (6) berechnet wurden:

$$G(\beta-COOH) = R_{MAsp} - R_{MAla} \quad (2)$$

$$G(\gamma-COOH) = R_{MGlu} - R_{MAla} - G(CH_2)_{AS} \quad (3)$$

$$G(\beta-OH \text{ aliph.}) = R_{MSer} - R_{MAla} \quad (4)$$

$$G(\beta-OH \text{ arom.}) = R_{MTyr} - R_{MPhe} \quad (5)$$

$$G(\beta-Phenyl) = R_{MPhe} - R_{MAla} \quad (6)$$

(analog für die CbO-Aminosäuren).

Wie bereits erwähnt, zeigen die $G(CH_2)_{Asp/Glu}$ -Parameter von den $G(CH_2)$ -Parameter grosse Abweichungen (Tabelle III). Diese Tatsache ist leicht zu erklären. Glutaminsäure und Asparaginsäure unterscheiden sich zwar formal durch eine CH_2 -Gruppe, jedoch ist die gegenseitige Lage, und somit auch die gegenseitige Beeinflussung, der beiden Carboxyl-Gruppen in den beiden Verbindungen verschieden. Sie stellen deshalb im Sinne vom MARTIN¹ keine homologe Verbindungen dar.

Für die R_M -Werte von Asparaginsäure, Glutaminsäure und deren CbO-Derivate kann man schreiben:

$$R_{MAsp} = R_{MGly} + G(CH_2)_{AS} + G(\beta-COOH)_{AS} \quad (7)$$

$$R_{MGlu} = R_{MGly} + 2 G(CH_2)_{AS} + G(\gamma-COOH)_{AS} \quad (8)$$

(analog für die CbO-Verbindungen).

Aus Gl. (7) und Gl. (8) folgt:

$$G(CH_2)_{Asp/Glu} = R_{MGlu} - R_{MAsp} = G(CH_2)_{AS} + G(\gamma-COOH)_{AS} - G(\beta-COOH)_{AS} \quad (9)$$

$G(CH_2)_{Asp/Glu}$ ist demnach in beiden Reihen mit einem "Fehler" behaftet.

* Diese Tatsache widerspricht nicht dem MARTIN'schen-Postulat, da durch die Einführung der CbO-Gruppe auch die Ionisierung der NH_2 - und $COOH$ -Gruppe verändert wird.

Aus Gl. (9) folgt:

$$G(\text{CH}_2)_{\text{AS}} = G(\text{CH}_2)_{\text{Asp/Glu}} - G(\gamma\text{-COOH})_{\text{AS}} + G(\beta\text{-COOH})_{\text{AS}} =$$

$$-0.148 + 0.206 - 0.133 = -0.075 \quad (10)$$

und:

$$G(\text{CH}_2)_{\text{CbO.AS}} = G(\text{CH}_2)_{\text{CbO.Asp/CbO.Glu}} - G(\gamma\text{-COOH})_{\text{CbO.AS}} +$$

$$G(\beta\text{-COOH})_{\text{CbO.AS}} = -0.079 - 0.159 + 0.228 = -0.010 \quad (10a)$$

Die nach Gl. (10) und Gl. (10a) berechneten $G(\text{CH}_2)$ -Parameter stimmen mit den Werten der Tabelle III überein.

Subtrahiert man aus dem R_M -Wert einer CbO-Aminosäure den R_M -Wert der entsprechenden freien Aminosäure, so erhält man den jeweiligen scheinbaren Beitrag der CbO-Gruppe zum R_M -Wert des Moleküls. Tabelle V enthält die $G(\text{"CbO"})$ -Parameter, die erwartungsgemäss grosse Abweichungen zeigen. Die Differenzen lassen sich folgendermassen deuten.

TABELLE V

$G(\text{"CbO"})$ -PARAMETER

Verbindungs- paar (CbO- Aminosäure/ Aminosäure)	$G(\text{"CbO"})$	Verbindungs- paar (CbO- Aminosäure/ Aminosäure)	$G(\text{"CbO"})$
Ala	-0.492	Met	-0.351
Asp	-0.131	Phe	-0.312
Arg	-1.493	Pro	-0.718
Glu	-0.062	Ser	-0.493
Gly	-0.557	Tyr	-0.288
Lys	-1.602		

Betrachten wir zunächst die Gruppenkonstante $G(\text{"CbO"})_{\text{Gly}}$ bzw. $G(\text{"CbO"})_{\text{Ala}}$. Bildet man die Differenzen:

$$G(\text{"CbO"})_{\text{Ala}} - G(\text{"CbO"})_{\text{Gly}} = +0.065 \quad (11)$$

ferner:

$$G(\text{CH}_2)_{\text{Gly/Ala}} - G(\text{CH}_2)_{\text{CbO.Gly/CbO.Ala}} = -0.065 \quad (12)$$

so stimmen die rechten Seiten von Gln. (11) und (12) mit umgekehrten Vorzeichen überein; d.h. die Unterschiede der $G(\text{"CbO"})$ -Parameter entsprechen dem Unterschied der $G(\text{CH}_2)$ -Parameter in den beiden Reihen.

Ausserdem gilt:

$$G(\text{"CbO"})_{\text{Glu}} - G(\text{"CbO"})_{\text{Asp}} = +0.069 \quad (13)$$

und:

$$G(\text{CH}_2)_{\text{Glu/Asp}} - G(\text{CH}_2)_{\text{CbO.Glu/CbO.Asp}} = -0.069 \quad (14)$$

Um die "wahre" Gruppenkonstante für die CbO-Gruppe zu erhalten, muss $G("CbO")_{Ala}$ mit -0.065 korrigiert werden:

$$G("CbO")_{Ala} - 0.065 = -0.492 - 0.065 = -0.557 \quad (15)$$

Für Asparaginsäure erscheint $G(\beta-COOH)_{AS} - G(\beta-COOH)_{CbO-AS}$ und für Glutaminsäure $G(\gamma-COOH)_{AS} - G(\gamma-COOH)_{CbO-AS}$ als zusätzliches Korrekturglied, d.h.:

$$G("CbO")_{Asp} - 0.069 + G(\beta-COOH)_{AS} - G(\beta-COOH)_{CbO-AS} = \\ - 0.131 - 0.069 - 0.133 - 0.228 = -0.561 \quad (16)$$

bzw.:

$$G("CbO")_{Glu} - 2 \times (0.069) + G(\gamma-COOH)_{AS} - G(\gamma-COOH)_{CbO-AS} = - 0.062 - \\ 0.138 - 0.206 - 0.159 = -0.565 \quad (17)$$

Der berechnete Mittelwert aus $G("CbO")_{Gly}$ sowie aus Gln. (15), (16) und (17):

$$G(CbO) = -0.560 \quad (18)$$

dürfte den "wahren" Beitrag der CbO-Gruppe zum R_M -Wert in guter Näherung angeben.

Die Abweichungen der übrigen $G("CbO")$ -Parameter der Tabelle V von der "wahren" Gruppenkonstante für die CbO-Gruppe können vermutlich durch Heranziehung weiterer Vergleichssubstanzen auf ähnliche Weise beseitigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte lediglich gezeigt werden, dass der Beitrag einer Gruppe zum R_M -Wert des Gesamtmoleküls von den übrigen Gruppen im Molekül abhängig ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Vergleich der R_M -Werte von organischen Verbindungen, die sich um bestimmte Gruppen voneinander unterscheiden, wird gezeigt, dass der Beitrag einer Gruppe zum dünn-schichtchromatographischen R_M -Wert des Moleküls von den übrigen Gruppen im Molekül abhängig ist.

SUMMARY

Comparison of the R_M values of organic compounds differing by specific groups shows that in thin-layer chromatography the contribution of one group to the R_M value of the molecule is dependent on the other groups in the molecule.

LITERATUR

- 1 A. J. P. MARTIN, *Biochem. Soc. Symp. (Cambridge, Engl.)*, 3 (1950) 4.
- 2 E. C. BATE-SMITH UND R. G. WESTALL, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 427.
- 3 J. DVOŘÁK, I. M. HAIS UND A. TOCKSTEIN, in I. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, VEB Fischer Verlag, Jena, 1963, S. 17.
- 4 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND R. WEBER, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünn-schicht-Chromatographie*, Springer, Berlin, 1962, S. 103.

- 5 A. NIEDERWIESER, *Dissertation*, Universität Basel, 1962.
- 6 G. PATAKI, *Dissertation*, Universität Basel, 1962.
- 7 I. HALMEKOSKI UND H. HANNIHAINEN, *Suomen Kemistilehti*, B 36 (1963) 24.
- 8 O. HROMATKA UND W. A. AUE, *Monatsh. Chem.*, 95 (1962) 503.
- 9 H. K. SCHAUER UND R. BULIRSCH, *Z. Naturforsch.*, 10b (1955) 683.
- 10 E. LEIBNITZ, U. BEHRENS UND M. RINGPFEIL, *Wasserwirtsch.-Wassertech.*, 6 (1956) 299; 7 (1957) 3.
- 11 U. BEHRENS, M. RINGPFEIL UND G. STRIEGLER, *Monatsber. Deut. Akad. Wiss. Berlin*, 3 (1961) 635.
- 12 M. LEDERER UND A. M. PIRELLI, *Sci. Rept. Ist. Super. Sanita*, 1 (1961) 582.
- 13 J. GREEN UND S. MARCINKIEWICZ, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 35.
- 14 S. MARCINKIEWICZ, J. GREEN UND D. McHALE, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 42.
- 15 J. FRANC UND J. JOKL, *J. Chromatog.*, 2 (1959) 423.
- 16 J. R. HOWE, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 389.
- 17 G. PATAKI, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 541.
- 18 E. R. REICHL, *Monatsh. Chem.*, 86 (1955) 69.

J. Chromatog., 17 (1965) 327-332