

DIE TRENNUNG VON GESÄTTIGTEN, ALIPHATISCHEN MONOCARBON-SÄUREN AUF CELLULOSESCHICHTEN

H. BAYZER

*Biologische Forschung der Österreichischen Stickstoffwerke A.G. *, Linz/Donau (Österreich)*

(Eingegangen den 5. September 1966)

Zur Trennung von gesättigten, aliphatischen Monocarbonsäuren ist eine Reihe von papierchromatographischen Methoden bekannt¹. Es war naheliegend, die schnellere und empfindlichere Dünnschichtchromatographie hierfür ebenfalls heranzuziehen und es fehlt in dieser Richtung auch nicht an Versuchen^{2,3}, doch gelang auf den verwendeten Kieselgelschichten keine Auftrennung von Ameisen- und Essigsäure³.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der dünnschichtchromatographischen und elektrophoretischen Trennung von kurzkettigen, gesättigten, aliphatischen Monocarbonsäuren auf Celluloseschichten, wobei die flüchtigen Säuren vor der Auftrennung entweder in ihre Ammoniumsalze oder nach Veresterung in die entsprechenden Hydroxamate übergeführt werden.

TRENNUNG DER AMMONIUMSALZE

Dünnschichtchromatographie

Glasplatten vom Format 20 × 20 cm oder 20 × 10 cm wurden mit Cellulose MN 300, ohne Gipszusatz, der Firma Macherey, Nagel & Co., Düren, beschichtet. Die wässrigen Lösungen, die pro μl je 3–5 μg der aufzutrennenden Säuren enthielten, wurden vor dem Auftragen auf die Celluloseschicht mit Ammoniak neutralisiert. Von den zahlreichen verwendeten ammoniakhaltigen Fließmitteln erwiesen sich die folgenden zur Trennung der niederen Fettsäuren als besonders geeignet (Tabelle I und Fig. 1):

Fließmittel 1: *n*-Propanol–Ammoniak–Wasser (9:1:2),

Fließmittel 2: Isopropanol–Ammoniak–Wasser (9:1:2),

Fließmittel 3: Äthanol–Ammoniak–Wasser (80:4:16).

Als Nachweisreagens wurde eine Lösung von 25 mg Bromphenolblau und 100 mg Citronensäure in 100 ml eines Gemisches von Aceton–Wasser (9:1) verwendet. Die Ammoniumsalze der Carbonsäuren erscheinen als blaue Flecke auf hellgelbem Untergrund und es lassen sich auf den Celluloseschichten auf diese Art und Weise noch 2–3 μg der einzelnen Säuren nachweisen. Vor dem Besprühen müssen die Dünnschichtplatten etwa eine halbe Stunde lang in einem warmen Luftstrom getrocknet werden, um die Ammoniakreste des Fließmittels zu entfernen, die den Nachweis stören würden. Von einer Trocknung der Platten im Trockenschrank ist abzuraten, da bei höheren Temperaturen eine Zersetzung der Ammoniumsalze der Carbonsäuren erfolgen kann.

* Leiter: Dr. H. H. MAYR.

TABELLE I

R_{St} -WERTE* DER AMMONIUMSALZE AUF CELLULOSESCHICHTEN

	Dünnschichtchromatographie			Elektrophorese
	Fliessmittel	Fliessmittel	Fliessmittel	0.5 M
	1	2	3	(NH ₄) ₂ CO ₃
Ameisensäure	0.93	0.96	0.98	1.45
Essigsäure	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>n</i> -Propionsäure	1.26	1.19	1.14	0.84
<i>n</i> -Buttersäure	1.47	1.38	1.24	0.71
<i>n</i> -Valeriansäure	1.62	1.54	1.34	0.65

$$* R_{St} = \frac{\text{Wanderungsstrecke der Analysesubstanz}}{\text{Wanderungsstrecke des Essigsäurederivates}}$$

Wie aus Fig. 1 zu ersehen ist, gelingt in keinem der drei Fliessmittel eine zufriedenstellende Trennung von Ameisen- und Essigsäure. Die gleichen Schwierigkeiten ergaben sich auch bei der Trennung von Ammoniumformiat und -acetat mittels Papierchromatographie¹ bzw. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgeschichten². Es wurde daher untersucht, ob die Möglichkeit einer elektrophoretischen Trennung der beiden ersten Glieder der Fettsäurereihe auf Celluloseschichten besteht.

Dünnschichtelektrophorese

Die elektrophoretischen Untersuchungen wurden mit Hilfe einer Elektrophoreseapparatur nach WIELAND UND PFLEIDERER⁴ durchgeführt, doch kann dafür prinzipiell jedes Elektrophoresegerät verwendet werden, das eine kühlbare Auflage-

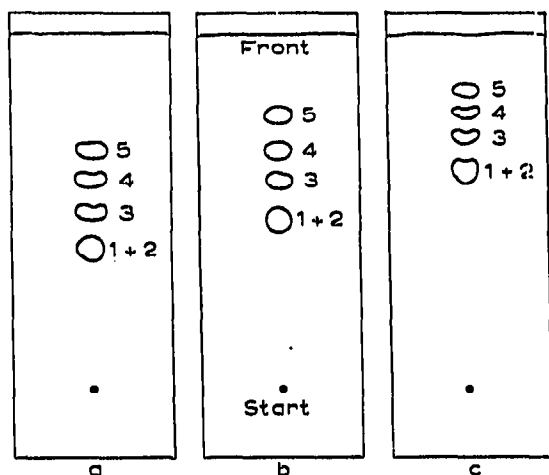


Fig. 1

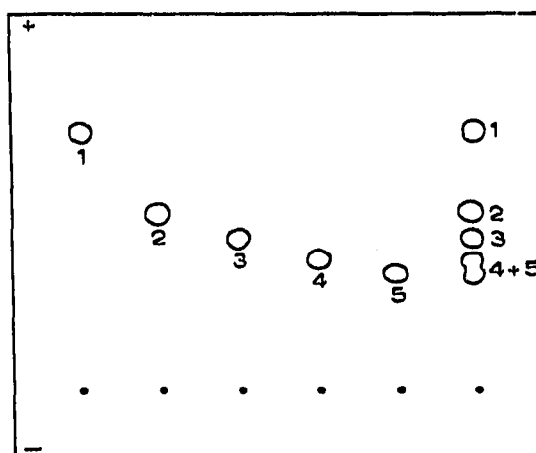


Fig. 2

Fig. 1. Dünnschichtchromatographische Trennung der Ammoniumsälze. (a) *n*-Propanol-Ammoniak-Wasser (9:1:2); (b) Isopropanol-Ammoniak-Wasser (9:1:2); (c) Äthanol-Ammoniak-Wasser (80:4:16). 1 = Ameisensäure, 2 = Essigsäure, 3 = *n*-Propionsäure, 4 = *n*-Buttersäure, 5 = *n*-Valeriansäure.

Fig. 2. Dünnschichtelektrophoretische Trennung der Ammoniumsälze. 0.5 M Ammoniumcarbonatlösung, 30 V/cm. 1 = Ameisensäure, 2 = Essigsäure, 3 = *n*-Propionsäure, 4 = *n*-Buttersäure, 5 = *n*-Valeriansäure.

fläche für das Trägermaterial besitzt und das Anlegen von Spannungen bis etwa 1000 V gestattet. Die mit Cellulose MN 300 beschichteten Glasplatten vom Format 20×20 cm oder 20×10 cm wurden mit dem Puffer, in dem die Elektrophorese ausgeführt wurde, besprüht und nach Auftragen des Substanzgemisches auf die gekühlte Auflagefläche der Elektrophoreseapparatur gelegt. Die Trägerschicht wurde durch Filterpapier- oder Leinenstreifen, deren auf der Schicht aufliegende Enden in Cellophanfolien eingeschlagen wurden, mit den puffergefüllten Elektrodengefäßen verbunden und mit einer Glasplatte geeigneter Grösse überdeckt.

Die besten Trennergebnisse wurden mit einer 0.5 M Ammoniumcarbonatlösung erhalten, in der die Ammoniumsalze der Carbonsäuren nach Anlegen des elektrischen Feldes zur Anode wandern. Die Trenndauer betrug bei einem Spannungsfälle von 25–30 V/cm etwa 45 Min. (Tabelle I und Fig. 2). Nach der Elektrophorese wurden die Dünnschichtplatten wie vorhin beschrieben getrocknet und mit der citronensauren Bromphenolblaulösung besprüht. Die untere Nachweisgrenze liegt für die einzelnen Carbonsäuren bei 2–3 μg .

Wie Fig. 2 zeigt, gelingt mit Hilfe der Dünnschichtelektrophorese auf Cellulose-schichten die Trennung von Ameisen-, Essig- und *n*-Propionsäure sehr gut. Die Wanderungsgeschwindigkeiten von *n*-Buttersäure und *n*-Valeriansäure sind dagegen einander so ähnlich, dass unter den angegebenen Bedingungen keine zufriedenstellende Trennung dieser beiden Carbonsäuren erreicht werden kann.

Zweidimensionale Trennung

Da mittels Dünnschichtelektrophorese eine einwandfreie Auftrennung der Ammoniumsalze von Ameisen- und Essigsäure gelingt und die nächsten Glieder der homologen Reihe dünnschichtchromatographisch getrennt werden können, war anzunehmen, dass durch Kombination der beiden Methoden eine vollständige Auftrennung von Gemischen der geradkettigen, gesättigten C_1 – C_5 Monocarbonsäuren erreicht werden kann.

Auf cellulosebeschichteten Glasplatten vom Format 20×20 cm wurde punktförmig das Substanzgemisch, das 10–40 μg von jeder Säure enthielt, aufgetragen und in der 1. Richtung entweder in *n*-Propanol–Ammoniak–Wasser (9:1:2) oder Isopropanol–Ammoniak–Wasser (9:1:2) aufsteigend dünnschichtchromatographisch entwickelt, bis die Fließmittelfront fast den oberen Plattenrand erreichte. Es wurde dann etwa 30 Min. lang in einem warmen Luftstrom zwischengetrocknet und hierauf die Dünnschichtplatte vorsichtig mit der 0.5 M Ammoniumcarbonatlösung besprüht. Sodann wurde in der 2. Richtung unter den oben angegebenen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, die Platte im Warmluftstrom getrocknet und die Ammoniumsalze der Carbonsäuren mit citronensaurer Bromphenolblaulösung nachgewiesen.

Wie aus Fig. 3 zu ersehen ist, gelingt auf diese Art und Weise die vollständige Trennung der ersten fünf Glieder der Fettsäurereihe.

TRENNUNG DER HYDROXAMATE

Die Carbonsäuren können bekanntlich nach Umwandlung in ihre Methylester durch Reaktion mit einer methanolischen Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid in die entsprechenden Hydroxamate übergeführt werden. Für die dünnschichtchromatographische Trennung der Hydroxamate der ersten fünf Glieder der Fett-

säurereihe auf Celluloseschichten erwiesen sich die beiden folgenden Fließmittel als besonders geeignet (Tabelle II und Fig. 4):

Fließmittel 4: *n*-Propanol–5 *N* NH_4OH –10 % $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (6:1:2),

Fließmittel 5: *n*-Butanol–Eisessig–Wasser (4:1:5, obere Phase).

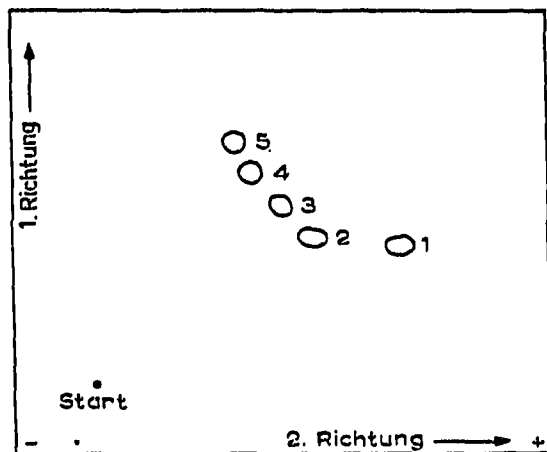


Fig. 3

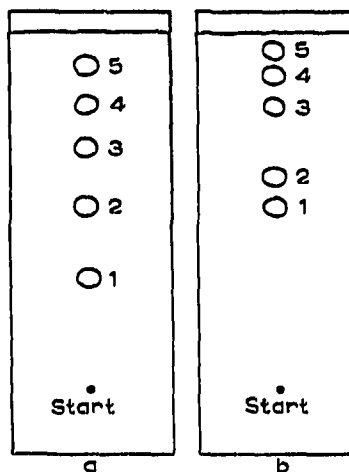


Fig. 4

Fig. 3. Zweidimensionale Trennung der Ammoniumsalze. 1. Richtung: Dünnschichtchromatographie in *n*-Propanol–Ammoniak–Wasser (9:1:2). 2. Richtung: Dünnschichtelektrophorese, 0,5 *M* Ammoniumcarbonatlösung, 30 V/cm. 1 = Ameisensäure, 2 = Essigsäure, 3 = *n*-Propionsäure, 4 = *n*-Buttersäure, 5 = *n*-Valeriansäure.

Fig. 4. Dünnschichtchromatographische Trennung der Hydroxamate. (a) *n*-Propanol–5 *N* NH_4OH –10 % $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (6:1:2); (b) *n*-Butanol–Eisessig–Wasser (4:1:5) (obere Phase). 1 = Ameisensäure, 2 = Essigsäure, 3 = *n*-Propionsäure, 4 = *n*-Buttersäure, 5 = *n*-Valeriansäure.

TABELLE II

R_{St} -WERTE* DER HYDROXAMATE AUF CELLULOSESCHICHTEN

	Dünnschichtchromatographie	
	Fließmittel 4	Fließmittel 5
Ameisensäure	0.61	0.85
Essigsäure	1.00	1.00
<i>n</i> -Propionsäure	1.32	1.32
<i>n</i> -Buttersäure	1.54	1.48
<i>n</i> -Valeriansäure	1.75	1.58

$$* R_{St} = \frac{\text{Wanderungsstrecke der Analysensubstanz}}{\text{Wanderungsstrecke des Essigsäurederivates}}$$

Die entwickelten Dünnschichtplatten wurden in einem Warmluftstrom getrocknet und mit einer Eisen(III)-chloridlösung (5.4 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und 4.8 ml konz. Salzsäure mit Äthanol auf 100 ml aufgefüllt) besprüht. Die Hydroxamate erscheinen als rotviolette Flecke. Die untere Nachweisgrenze liegt für die einzelnen Verbindungen bei etwa 2 μg . Da in beiden angeführten Fließmitteln das *n*-Valeriansäurehydroxamat nahe der Fließmittelfront wandert, empfiehlt sich eine Vorreinigung der Celluloseschichten mit dem jeweiligen Fließmittelgemisch, um Störungen der Tren-

nung durch die vom Fließmittel aus der Celluloseschicht herausgelöst und mit der Front wandernden Verunreinigungen zu vermeiden. Aus diesem Grunde wurden die Dünnschichtplatten vor dem Auftragen der Substanzgemische in dem entsprechenden Fließmittel entwickelt, bis die Front den oberen Plattenrand erreicht hatte und die Platten anschliessend bei 80° getrocknet.

Fig. 4 zeigt, dass nach Überführung der Carbonsäuren in die entsprechenden Hydroxamate die dünnschichtchromatographische Auftrennung der ersten fünf Glieder der Fettsäurereihe auf Celluloseschichten keinerlei Schwierigkeiten bereitet. Es ist auf diese Art und Weise also auch eine Trennung von Ameisen- und Essigsäure möglich, was bei der Trennung der Ammoniumsalze nur mit Hilfe der Elektrophorese gelingt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Auftrennung von gesättigten, aliphatischen Monocarbonsäuren auf Celluloseschichten beschrieben. Werden die flüchtigen Säuren in ihre Ammoniumsalze übergeführt, so lassen sich Ameisensäure und Essigsäure mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nicht trennen und es müssen zur vollständigen Auftrennung der ersten fünf Glieder der homologen Reihe Dünnschichtchromatographie und Elektrophorese kombiniert werden. Nach Umwandlung in die entsprechenden Hydroxamate können alle C_1 - C_5 Monocarbonsäuren dünnschichtchromatographisch voneinander getrennt werden.

SUMMARY

The separation of saturated, aliphatic monocarboxylic acids on cellulose layers is described. For complete separation of the ammonium derivatives of C_1 - C_5 carboxylic acids combination of thin-layer chromatography and electrophoresis is necessary, while separation of the hydroxamates is possible by thin-layer chromatography only.

LITERATUR

- 1 I. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, Band I, 2. Aufl., Fischer, Jena, 1963, S. 385.
- 2 O. HROMATKA UND W. A. AUE, *Monatsh. Chem.*, 93 (1962) 503.
- 3 J. M. BRÜMMER, *Brot Gebäck*, 19 (1965) 238.
- 4 TH. WIELAND UND G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 257.

J. Chromatog., 27 (1967) 104-108