

CHROM. 3412

Dünnschicht-Chromatographie von Carbonsäuren an Cellulose

Verschiedene Methoden zur Trennung von Carbonsäuren durch Dünnschicht-Chromatographie (DC) nach STAHL¹⁻⁶ wurden beschrieben: BRAUN UND GEENEN⁷, PETROWITZ UND PASTUSKA⁸, LYNES⁹, TING UND DUGGER¹⁰ sowie RAJAGOPAL, SARASWATHY, SUBBARAM UND ACHAYA¹¹ verwenden Kieselgel-Schichten; SCHWEIGER¹², BANCHER UND SCHERZ¹³, DITTMANN¹⁴, HIGGINS UND VON BRAND¹⁵, LEHMANN UND MARTINOD¹⁶, MYERS UND HUANG¹⁷, BAYZER¹⁸ sowie RASMUSSEN¹⁹ arbeiten mit Cellulose-Schichten. DANCIS, HUTZLER UND LEVITZ²⁰, HÄKKINEN UND KULONEN²¹ und WHITFIELD²² trennen Ketosäure-2,4-dinitrophenylhydrazone; RONKAINEN²³ trennt Methylester von Ketosäure-2,4-dinitrophenylhydrazonen; THOMPSON UND HEDIN²⁴ trennen Carbonsäure-2,4-dinitrophenylhydrazide; RINK UND HERRMANN²⁵ chromatographieren Rhodanin-Derivate von Ketosäuren. BACHUR²⁶ beschreibt verschiedene Nachweisverfahren der getrennten Säuren; COPIUS-PEEREBOOM²⁷ hat eine Übersicht über die DC von Carbonsäuren geschrieben.

Zweck dieser Arbeit ist die Beschreibung des Verhaltens einer grösseren Zahl biochemisch interessanter Carbonsäuren bei DC an Cellulose.

Material

Streichgerät für konstante Schichtdicke (Desaga); Cellulosepulver MN 300 (Macherey, Nagel & Co.); Amylalkohol zur Fettbestimmung nach GERBER, Ameisensäure 98–100 % z.A., *n*-Butanol zur Chromatographie, *sek.*-Butanol zur Chromatographie, Ammoniak-Lösung min. 25 % z.A. (alles E. Merck AG).

Methode

15 g Cellulosepulver werden in einem Mixgerät *ca.* 30 Sek. mit 90 ml Wasser intensiv verrührt; Glasplatten von 20 × 20 cm² Fläche werden durch Lagern in konzentrierter Soda-Lösung entfettet, mit Wasser gründlich gewaschen und nach Trocknen und Abkühlen mit der Cellulose-Suspension beschichtet. Die Platten bleiben zunächst in einem staubarmen Raum 2 Std. bei Zimmertemperatur waagrecht liegen, anschliessend werden sie 4 Std. auf 105° erwärmt. Abgekühlt und aufbewahrt werden die fertigen Platten in einem Exsikkator über Blaugel²⁸. Im allgemeinen wurden wässrige Lösungen der Substanzen aufgetragen; Fumarsäure war in 40 %ig. wässrigem *n*-Propanol gelöst; DL- α -Hydroxybuttersäure, Isocitronensäure und Glyoxylsäure wurden als Natrium-Salze verwendet. Die Konzentrationen der Lösungen waren im allgemeinen so gewählt, dass die in Tabelle I angegebenen Mengen in jeweils 1 μ l Lösung enthalten waren.

Zur Herstellung der Dinitrophenylhydrazone einiger Ketosäuren wurden zu jeweils 10 mg Ketosäure: 0.5 ml Isopropanol + 0.4 ml Wasser + 0.1 ml Reagenz-Lösung (300 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 100 ml 2 N HCl) gegeben; diese Lösung wurde direkt aufgetragen.

Chromatographiert wird einmal 10 cm aufsteigend, ohne Kammersättigung, bei Raumtemperatur von *ca.* 23°. Die Proben werden in Einzelmengen von höchstens 0.5 μ l unter Zwischentrocknung 17 mm von unteren Rand der Platte entfernt auf möglichst kleinem Fleck aufgetragen.

Sprühreagenzien

*Alkalischer Indikator*²⁰. 40 mg Bromkresolgrün in 100 ml Äthanol gelöst, 0.1 N NaOH bis zur Blaufärbung zugegeben; diesen Indikator für Platten nach Entwicklung mit Systemen I oder II verwendet.

*Saurer Indikator*³⁰. 50 mg Bromphenolblau + 200 mg Citronensäure in 100 ml Wasser gelöst; diesen Indikator nach Entwicklung mit System III benutzt.

Natronlauge. 0.5 N; Besprühen mit diesem Reagenz erhöht die Empfindlichkeit des Nachweises von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen.

Entwickler-Systeme

System I: Amylalkohol-Ameisensäure-Wasser (40:40:2, v/v/v)¹².

System II: *n*-Butanol-Ameisensäure-Wasser (60:10:20, v/v/v)¹³.

System III: *sek.*-Butanol-2 N wässrige NH₃-Lösung (80:20, v/v/v)¹⁴.

Ergebnis

Aufgetragene Mengen und gemessene R_F -Werte sind in Tabelle I zusammengefasst. Die Mengen betragen etwa das Doppelte der minimal nachweisbaren Mengen. (Die Indikatoren müssen mehrfach gesprüht werden, alkalischer Indikator häufiger)

TABELLE I

NACHGEWIESENE MENGEN, R_F -WERTE UND STANDARDABWEICHUNGEN DER R_F -WERTE

Substanz	Menge (μg)	System I	System II	System III
Ameisensäure	1.3			0.21 \pm 0.00
Essigsäure	1.0			0.21 \pm 0.01
Propionsäure	2.0			0.31 \pm 0.01
Buttersäure	2.0			0.44 \pm 0.01
Isobuttersäure	0.9			0.43 \pm 0.02
Valeriansäure	1.4			0.63 \pm 0.01
Isovaleriansäure	1.4			0.60 \pm 0.02
Capronsäure	1.4			0.80 \pm 0.02
Isocapronsäure	1.4			0.79 \pm 0.02
Oxalsäure	1.0	0.58 \pm 0.02	0.62 \pm 0.04	0.04 \pm 0.01
Malonsäure	1.5	0.66 \pm 0.01	0.79 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02
Bernsteinsäure	2.0	0.74 \pm 0.07	0.85 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02
Maleinsäure	3.5	0.73 \pm 0.03	0.78 \pm 0.02	0.07 \pm 0.04
Fumarsäure	1.0	0.77 \pm 0.04	0.93 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02
<i>cis</i> -Aconitsäure (Nebenleck)	4.0	0.54 \pm 0.02 0.65 \pm 0.02	0.66 \pm 0.02 0.81 \pm 0.02	0 \pm 0
Glykolsäure	2.5	0.66 \pm 0.03	0.70 \pm 0.02	0.20 \pm 0.04
Milchsäure	2.5	0.77 \pm 0.02	0.84 \pm 0.02	0.23 \pm 0.04
α -Hydroxybuttersäure	1.9	0.86 \pm 0.01	0.93 \pm 0.01	0.37 \pm 0.04
β -Hydroxybuttersäure	2.5	0.82 \pm 0.02	0.90 \pm 0.02	0.31 \pm 0.02
α -Hydroxyisobuttersäure	2.5	0.85 \pm 0.03	0.89 \pm 0.06	0.35 \pm 0.02
α -Hydroxyisovaleriansäure	1.9	0.90 \pm 0.01	1 \pm 0	0.48 \pm 0.02
α -Hydroxyisocapronsäure	3.8	0.92 \pm 0.01	1 \pm 0	0.62 \pm 0.04
Äpfelsäure	1.0	0.55 \pm 0.03	0.64 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01
Weinsäure	1.0	0.35 \pm 0.02	0.45 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01

(Fortsetzung S. 409)

TABELLE I (Fortsetzung)

Substanz	Menge (μg)	System I	System II	System III
Citronensäure	0.5	0.42 ± 0.03	0.57 ± 0.04	0.01 ± 0.01
Isocitronensäure	1.9	0.38 ± 0.03	0.55 ± 0.01	0.02 ± 0.01
D-Galacturonsäure	1.5	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.04 ± 0.03
D-Glucuronsäure	1.5	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.04 ± 0.03
L-Ascorbinsäure	5.0	0.45 ± 0.04	0.47 ± 0.02	0.15 ± 0.03
Glyoxylsäure	4.5	0.45 ± 0.04 und 0.70 ± 0.02	0.76 ± 0.04	0.04 ± 0.01
Glyoxylsäure-2,4-dinitrophenyl- hydrazon (Nebenfleck)	10^a			0.35 ± 0.04 0.63 ± 0.01
Brenztraubensäure-2,4-dinitrophenyl- hydrazon	10^a			0.55 ± 0.06
Lävulinsäure	1.8	0.86 ± 0.03	0.91 ± 0.03	0.33 ± 0.04
Lävulinsäure-2,4-dinitrophenyl- hydrazon	10^a			0.66 ± 0.08
α -Ketoglutarsäure	2.5	0.66 ± 0.02	0.78 ± 0.04	0.08 ± 0.03
α -Ketoglutarsäure-2,4-dinitrophenyl- hydrazon	10^a			0.26 ± 0.02
Aceton-2,4-dinitrophenylhydrazon	10^a			0
Schwefelsäure ^b	1.5	0.23 ± 0.02 0.30 ± 0.02 0.36 ± 0.02	0.22 ± 0.01 0.11 ± 0.03 0.31 ± 0.01	
Phosphorsäure ^c	1.5	0.46 ± 0.02 0.41 ± 0.02	0.34 ± 0.05 0.22 ± 0.05	

^a Bei den 2,4-Dinitrophenylhydrazonen beziehen sich die Mengenangaben auf die Mengen eingesetzter reiner Ketosäure.

^b Im System I haben alle drei Flecke etwa gleiche Grösse; im System II ist dagegen die Hauptmenge der Substanz bei R_F 0.22 lokalisiert.

^c In den Systemen I und II sind jeweils die Flecke mit dem kleineren R_F -Wert^a (0.41 bzw. 0.22) kleiner als die Flecke mit dem grösseren R_F -Wert.

als saurer Indikator.) Die R_F -Werte sind jeweils Mittelwerte von vier Platten. Hinter den R_F -Werten sind deren Standardabweichungen ($n = 4$) angegeben.

Die beiden Flecke, die man mit Glyoxylsäure im System I erhält, sind etwa gleich gross. Man muss wohl an Umlagerung bzw. Disproportionierung während der Chromatographie denken. Der Nebenfleck mit R_F 0.63, der dagegen bei der DC des Glyoxylsäure-2,4-dinitrophenylhydrazons auftritt, ist möglicherweise so zu deuten, dass sich stereoisomere 2,4-Dinitrophenylhydrazone bei der DC trennten.

Die bei der DC von *cis*-Aconitsäure in beiden sauren Entwickler-Systemen auftretenden Nebenflecken kommen wohl dadurch zustande, dass sich ein Teil der Substanz in *trans*-Aconitsäure umgewandelt hat.

Bei anderen Säuren wurden dagegen Nebenflecke beobachtet, die durch teilweise Zersetzung der Substanzen vor oder während der DC erklärt werden müssen: Brenztraubensäure, Phenylbrenztraubensäure, *p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, Oxallessigsäure und die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der drei letztgenannten Ketosäuren. DC dieser Säuren ist unter den hier beschriebenen Bedingungen nicht möglich.

α -Ketobuttersäure, α -Ketoisovaleriansäure und α -Ketoisocaprinsäure lassen

sich zwar mit den beiden sauren Systemen I und II zersetzungsfrei chromatographieren, und die 2,4-Dinitrophenylhydrazone dieser drei Ketosäuren lassen sich auch mit System III gut abtrennen; alle Substanzen haben jedoch sehr ähnliche R_F -Werte zwischen 0.87 und 0.98. Deshalb wurden diese Verbindungen nicht in Tabelle I erwähnt.

Neurochirurgische Universitäts-Klinik,
Homburg/Saar (Deutschland)

JÜRGEN DITTMANN

- 1 E. STAHL, *Pharmazie*, 11 (1956) 633.
- 2 E. STAHL, *Chemiker-Ztg.*, 82 (1958) 323.
- 3 E. STAHL, *Parfüm. Kosmetik*, 39 (1958) 564.
- 4 E. STAHL, *Pharm. Rundschau*, 1 (1959) 1.
- 5 E. STAHL, *Angew. Chem.*, 73 (1961) 646.
- 6 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
- 7 D. BRAUN UND H. GEENEN, *J. Chromatog.*, 7 (1962) 56.
- 8 H. J. PETROWITZ UND G. PASTUSKA, *J. Chromatog.*, 7 (1962) 128.
- 9 A. LYNES, *J. Chromatog.*, 15 (1964) 108.
- 10 I. P. TING UND W. M. DUGGER, JR., *Anal. Biochem.*, 12 (1965) 571.
- 11 N. S. RAJAGOPAL, P. K. SARASWATHY, M. R. SUBBARAM UND K. T. ACHAYA, *J. Chromatog.*, 24 (1966) 217.
- 12 A. SCHWEIGER, *Z. Lebensmittel-Untersuch. -Forsch.*, 124 (1963) 20.
- 13 E. BANCHER UND H. SCHERZ, *Mikrochim. Acta*, (1964) 1159.
- 14 J. DITTMANN, *Z. Klin. Chem.*, 4 (1966) 266.
- 15 H. HIGGINS UND TH. VON BRAND, *Anal. Biochem.*, 15 (1966) 122.
- 16 G. LEHMANN UND P. MARTINOD, *Z. Lebensmittel-Untersuch. -Forsch.*, 130 (1966) 269.
- 17 W. F. MYERS UND K.-Y. HUANG, *Anal. Biochem.*, 17 (1966) 210.
- 18 H. BAYZER, *J. Chromatog.*, 27 (1967) 104.
- 19 H. RASMUSSEN, *J. Chromatog.*, 26 (1967) 512.
- 20 J. DANCIS, J. HUTZLER UND M. LEVITZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 78 (1963) 85.
- 21 H.-M. HÄKKINEN UND E. KULONEN, *J. Chromatog.*, 18 (1965) 174.
- 22 A. E. WHITFIELD, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 401.
- 23 P. RONKAINEN, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 403.
- 24 A. C. THOMPSON UND P. A. HEDIN, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 13.
- 25 M. RINK UND S. HERRMANN, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 523.
- 26 N. R. BACHUR, *Anal. Biochem.*, 13 (1965) 463.
- 27 J. W. COPIUS-PEERREBOOM, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, S. 620.
- 28 J. DITTMANN, *Z. Klin. Chem.*, 1 (1963) 190.
- 29 E. MERCK AG, *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie*, Darmstadt, S. 7.
- 30 H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1955, S. 88.

Eingegangen den 23. Januar 1968

J. Chromatog., 34 (1968) 407-410