

Zur Kenntnis der Elektrophorese.

2. Mitteilung: Die Papierelektrophorese organischer Säuren und Phenole.

Von

H. Berbalk und **O. Schier**.

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Wien.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 17. November 1954.)

Es wird eine Methode zur Analyse und Trennung organischer Säuren durch Papierelektrophorese beschrieben.

Die Papierelektrophorese (PE) hat in der organischen Chemie eine außergewöhnlich breite Anwendung zur Untersuchung von Aminosäuren, Eiweißstoffen und Kohlehydraten gefunden, wengleich viele Ergebnisse noch mit Versuchsfehlern behaftet sind. Wir haben darauf schon früher hingewiesen¹. Abgesehen von Indikatoren und Farbstoffen, die als Testsubstanzen dienen, sind dagegen Versuche zur PE organischer Säuren nur vereinzelt geblieben. *Th. Wieland* und *U. Feld*² untersuchten die Wanderung der Natriumsalze von Weinsäure und Citronensäure in Acetatpuffer (Nachweis durch Retentionsanalyse mit Kupferacetat in Tetrahydrofuran), aber erst *H. Michl*³ trennte freie organische Säuren (Äpfelsäure und Bernsteinsäure). Es sind das unseres Wissens die einzigen Versuche auf diesem Gebiete geblieben.

Unsere Arbeit verfolgte den Zweck, die PE ganz allgemein zur Analyse und Trennung von sauren Gemischen aller Art, auch in Anwesenheit von Neutralstoffen, Aminen, anorganischen Ionen usw. anwendbar zu machen. Darüber hinaus strebten wir an, durch PE derartiger, elektrochemisch leicht überblickbarer Substanzen neue Erkenntnisse über den

¹ *H. Berbalk*, Mh. Chem. **85**, 1314 (1954).

² *Th. Wieland* und *U. Feld*, Angew. Chem. **63**, 258 (1951).

³ *H. Michl*, Mh. Chem. **82**, 489 (1951).

Mechanismus der Ionenwanderung in stabilisierten Medien zu gewinnen. Wir werden die ausführliche theoretische Interpretation der experimentell festgestellten Gesetzmäßigkeiten in einer gesonderten Mitteilung (3. Mitteilung in dieser Zeitschrift) veröffentlichen.

Unsere Methode bezieht sich auf Säuren, deren Flüchtigkeit einen bestimmten Wert nicht übersteigt; Beispiele enthält Tabelle 1.

Verwendete Apparatur.

Bezüglich der apparativen Einzelheiten verweisen wir auf Abb. 1 und unsere 1. Mitteilung¹. Als Stromquelle diente ein mehrstufig regel-

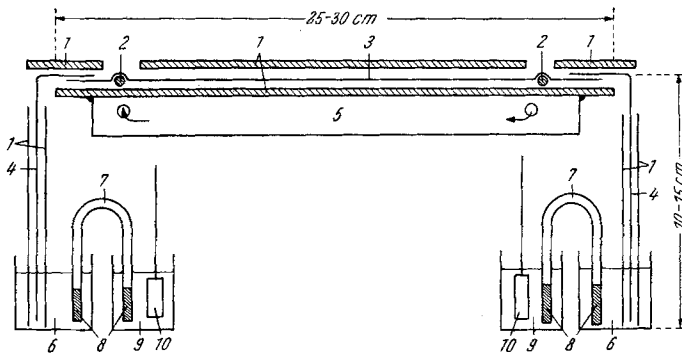


Abb. 1. Schema der Apparatur. 1 Glasplatten, 2 Kohlestäbe, 3 Filterpapierbahn, 4 Filterpapierbrücken, 5 Metallkühler, 6 Gefäß mit Grundlösung, 7 Heber, 8 Diaphragmen, 9 Elektrodengefäß, 10 Elektroden.

barer Zweiweg-Hochspannungsgleichrichter für Spannungen bis 2500 V. Wegen der hohen Arbeitsspannungen sind rigorose Vorsichtsmaßnahmen notwendig.

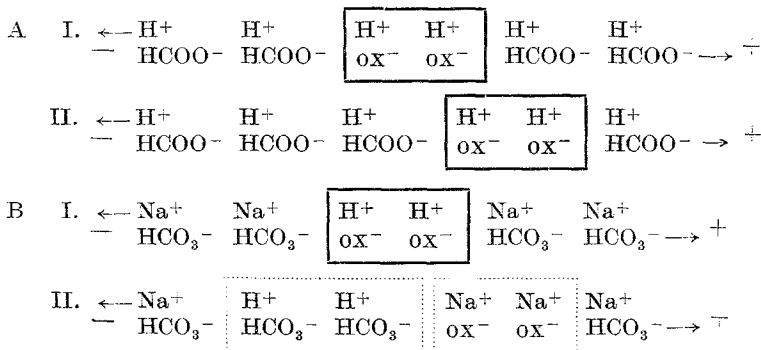
Wahl des Grundmediums. Nachweis der Säure.

Zur Analyse von unbekanntem Säuregemischen sowie von Säuren, die durch spezielle Reaktionen nicht nachweisbar sind, ist ein allgemeiner Nachweis unbedingt erforderlich. Prinzipiell ist dazu festzustellen, daß es sich bei der PE organischer Säuren nicht um eine Wanderung der Gesamtsubstanz, sondern um eine solche ihrer Ionen handelt⁴: die Säure-

⁴ Der Name „Elektrophorese“ bezeichnete ursprünglich die Wanderung suspendierter, makroskopischer Teilchen in einer Flüssigkeit, während hier elektrokinetische Effekte nichtmolekulardisperser Systeme von untergeordneter Bedeutung sind. Das Papier dient in erster Linie zur Konvektionshemmung und zur räumlichen Stabilisierung der Substanzlage. Der deshalb vorgeschlagene, richtigere Name „Ionophorese“ hat sich jedoch nicht allgemein durchgesetzt. Man findet derzeit beide Bezeichnungen für die gleiche

H-Ionen wandern in der Richtung der Kathode (Kataphorese), die Säureanionen in der Richtung der Anode (Anaphorese). Die am Ende der PE vorliegenden und nachzuweisenden Stoffe sind daher primär die Säureanionen im Dissoziationsgleichgewicht mit beliebigen, in der Grundlösung vorhandenen positiven Ionen, so daß die Elektroneutralität gewahrt bleibt.

Das sich aus diesen Überlegungen ergebende Schema einer PE weicht insofern von dem bekannten Schema einer normalen Elektrolyse ab, als hier die elektrolysierte Substanz nicht gleichmäßig über die gesamte Grundlösung verteilt ist, sondern zu Beginn in der Mitte des Elektrolyten lagestabilisiert ist. Für die PE der Oxalsäure ($H \cdot ox$) erhält man z. B. folgendes Schema für zwei Medien: A in saurer Grundlösung (mit der Säure $HCOOH$), B in schwach alkalischem Grundmedium ($NaHCO_3$), I. vor, II. nach der Wanderung:



Ein allgemeiner Nachweis ist natürlich nur unter Verwendung eines bestimmten Kations möglich; wir haben bei unseren Versuchen die Kombination mit dem H-Ion als Nachweismöglichkeit benützt. Damit ist die Verwendung einer sauren Grundlösung bereits festgelegt.

Da am Ende der PE der „H-Ionenüberschuß“, das heißt die Säure des Grundmediums, entfernt werden muß, kommt als solche nur eine flüchtige Säure in Frage, z. B. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure oder Schwefelige Säure. Die genannten Säuren sind durch 20- bis 60minütiges Belassen des feuchten Papiers in einem eventuell ventilierten Abzug vollständig entfernbar. Abzulehnen ist der Versuch einer thermischen Entfernung dieser flüchtigen Säuren; wie schwierig diese ist, zeigt die kombinierte Wasserdampf-Infrarot-Behandlung, die *F. Denison* und *E. Phares*⁵, anscheinend in Unkenntnis der leichten Entfernbarkeit der Säuren in der Kälte, bei der Säurechromatographie anwenden.

Erscheinung nebeneinander, was beim Gebrauch von Sachregistern zu berücksichtigen ist.

⁵ *F. Denison* und *E. Phares*, *Analyt. Chemistry* **24**, 1628 (1952).

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die Wanderungsweite der untersuchten Säuren mit der Dissoziationskonstante wächst. Da aber der Dissoziationsgrad einer Säure durch den pH-Wert der Grundlösung innerhalb gewisser Grenzen einstellbar ist, gilt dasselbe auch für den Einfluß des pH-Wertes auf die elektrophoretische Geschwindigkeit. Die Abb. 2 zeigt die Abhängigkeit des Logarithmus der PE-Wanderungsgeschwindigkeit w der Citronensäure vom pH-Wert der ameisen-sauren Grundlösung. Der annähernd lineare Verlauf der Kurve ist bei den untersuchten schwachen organischen Säuren von uns wiederholt festgestellt worden⁶.

Wir haben bei allen Versuchen Ameisensäure als wäßrige Lösung von $\text{pH} = 2,00$ verwendet (zirka 0,55 n). Dieses Medium ist für Säuren mit Dissoziationskonstanten um 10^{-4} am besten geeignet, da man bei genügend hoher PE-Geschwindigkeit noch gute und deutlich ausgeprägte Stoffverteilungen erhält. Für stärkere Säuren empfiehlt sich eine stärker saure Grundlösung. Besteht die Gefahr einer reduzierenden Wirkung der Ameisensäure auf die untersuchte Substanz, so liefert die Lösung einer anderen Säure gleicher H-Ionenaktivität analoge Ergebnisse.

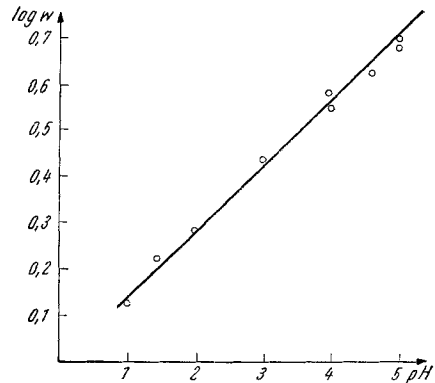


Abb. 2. Abhängigkeit der elektrophoretischen Wanderungsweite w vom pH der Grundlösung.

Technik der Versuche.

Man trägt die zu bestimmende Säure in Form ihrer wäßrigen Lösung oder gelöst in einem geeigneten organischen Lösungsmittel auf. Es ist dabei aber zu beachten, daß die Nachweisempfindlichkeit des verwendeten Indikators oder eines speziellen Reagens der nach der erfolgten PE vorliegenden Säuremenge pro Flächeneinheit angepaßt sein muß. Außerdem muß die angewandte Säuremenge in der Grundlösung der PE vollständig löslich sein. Bleibt nämlich am Startpunkt durch Überschreiten der Löslichkeit einige Zeit lang ungelöste Säure zurück, so führt dies zu einer Schwanz- oder Streifenbildung, die mitunter die Auswertung unmöglich macht, auf jeden Fall aber die Trennung von langsamer wandernden Säuren verhindert.

Etwa 0,003 bis 0,004 ml der Lösung werden mit einer Kapillarpipette an einer vorher bezeichneten Stelle des Filterpapiers als kreisförmiger Fleck oder in Form eines Streifens aufgetragen, das Papier wird mit der Grundlösung so gleichmäßig wie möglich besprüht, oberflächlich mit Filterpapier abgepreßt und hierauf in die PE-Apparatur eingelegt. Erfolgt das Besprühen des Papiers

⁶ Diese Erscheinungen sind theoretisch erklärbar. Wir verweisen auf unsere 3. Mitteilung.

genügend gleichmäßig und sorgfältig, so ist diese Methode der in der Literatur beschriebenen des Auftragens der Substanz auf den bereits feuchten Streifen vorzuziehen, die oft zu einem unkontrollierten Zerlaufen des Lösungstropfens führt.

Als Filterpapier wurde eine der üblichen Chromatographiersorten verwendet, im allgemeinen S & S 2043 b.

Nach erfolgter PE wird aus dem Papier die Ameisensäure des Grundmediums durch halbstündige Ventilation entfernt und die verbleibende nichtflüchtige Säure durch einen geeigneten pH-Indikator nachgewiesen. Wir haben bei der Mehrzahl der Versuche eine auf eben noch alkalisch eingestellte, alkohol. Bromphenolblaulösung verwendet. Andere allgemeine Nachweise, z. B. mit KJ—KBrO₃-Stärke oder Hg(CN)₂—KJ—J₂ oder alkalischer KMnO₄-Lösung, haben sich als nicht so geeignet erwiesen.

Die Geschwindigkeitskomponente der Lösungseinwanderung¹ wurde durch Auftragen von Glucose oder Tetramethylglucose an verschiedenen charakteristischen Punkten des Papierstreifens bei jedem Versuch gesondert ermittelt.

Ergebnisse.

Es wurde eine größere Anzahl organischer Säuren hinsichtlich ihrer PE-Beweglichkeit überprüft. Man erkennt aus der Tabelle 1, daß die PE-Geschwindigkeit im großen und ganzen mit der Dissoziationskonstante der Säure absinkt.

Da die beiden untersuchten Aminosäuren in der angewandten Grundlösung von pH 2 unterhalb ihres isoelektrischen Punktes liegen, sind sie positiv und wandern zur Kathode.

Das Vorzeichen der PE-Geschwindigkeit entspricht dem Vorzeichen der Elektrode, zu der die entsprechenden Ionen wandern.

Bei der Mehrzahl der angegebenen Daten handelt es sich um statistische Mittelwerte aus einer Vielzahl von Messungen. Die Reproduzierbarkeit entspricht der der Papierchromatographie.

Die angegebene PE-Geschwindigkeit ist die Wanderweite des Konzentrationsmaximums. Da dieses durchaus nicht immer in der Mitte des nachweisbaren Säureflecks liegt, sind Ausmessungen bei großen Flecken unsicher.

Analytische Anwendungen.

Es wurde eine größere Zahl praktisch anfallender sowie künstlich hergestellter Säuregemische durch PE getrennt. So ließ sich z. B. ein Gemisch aus gleichen Teilen Bernsteinsäure, Äpfelsäure, Citronensäure, Weinsäure, Fumarsäure und Maleinsäure in 30 Min. bei 75 V/cm ohne Schwierigkeit auftrennen, wobei diese 6-Säuretrennung noch nicht das Leistungsmaximum der Methode darstellt.

Bei der Trennung mehrerer Säuren deutet eine einseitige Verlängerung eines Fleckes in der Richtung des angelegten Potentials auf unvollständige Auftrennung zweier oder mehrerer Substanzen. Ist die Ausbreitung

Tabelle 1. PE-Geschwindigkeit (w) der untersuchten organischen Carbonsäuren und Phenole (gruppenweise nach ihrer Säurestärke geordnet).

| Grundmedium: HCOOH von pH 2 Temperatur: 10° C | $K \cdot 10^4$ | (w) $10^4 \cdot \text{cm}^2/\text{sec. V.}$ |
|--|----------------|--|
| Oxalsäure | 650 | 9,0 |
| Dichloressigsäure | 330 | 6,5 |
| Maleinsäure | 120 | 6,7 |
| Brenztraubensäure | 30 | 3,7 |
| Monochloressigsäure | 15 | 2,9 |
| Aconitsäure | 15 | 2,4 |
| Fumarsäure | 10 | 2,2 |
| Weinsäure | 9,8 | 2,3 |
| Citronensäure | 8,3 | 1,9 |
| Sulfanilsäure | 6,2 | 1,6 |
| Äpfelsäure | 3,8 | 1,4 |
| Glycerinsäure | 2,3 | 1,2 |
| Glykolsäure | 1,5 | 0,7 |
| Itaconsäure | 1,5 | 0,7 |
| Milchsäure | 1,4 | 0,7 |
| Bernsteinsäure | 0,64 | 0,2 |
| Glutarsäure | 0,47 | 0,1 |
| Adipinsäure | 0,33 | 0,1 |
| Valeriansäure | 0,16 | 0,05 |
| Gluconsäure | — | 0,7 |
| Pikrinsäure | 3810 | 6,1 |
| Dinitrophenol-1,2,4 | 0,80 | 0,2 |
| Asparaginsäure | — | — 1,3 |
| Glutaminsäure | — | — 1,3 |

aber in allen Richtungen gleichmäßig erfolgt, so läßt dies auf Diffusion schließen. Im Zweifelsfalle genügt kurzzeitiges Umpolen; im ersten Fall wird der Säurefleck kleiner werden, im Falle von Diffusion jedoch dieselbe Fläche einnehmen.

Die qualitative Bestimmung einer unbekanntenen Säure ist durch PE wenigstens annähernd möglich, wenn man im gleichen Elektrophogramm jene Säuren mitwandern läßt, die mit der zu bestimmenden identisch sein können. Eine derartige Analyse ist dann von Wert, wenn

1. die in Frage kommenden Säuren gleiche funktionelle Gruppen tragen und dadurch auf die organischen Gruppenreagenzien gleich ansprechen,

2. nur geringste Probemengen zur Verfügung stehen,

3. die Analyse rasch durchgeführt werden muß (papierelektrophoretisch 10 bis 30 Min., chromatographisch durchschnittlich 16 bis 24 Stdn.).

Eine qualitative Bestimmung kann aber auch möglich sein, wenn etwa bei selten dargestellten Säuren augenblicklich keine Vergleichslösung vorliegt. Es ist aus der Tabelle 1 ersichtlich, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der Säure eine zwar rohe, aber oft genügend sichere

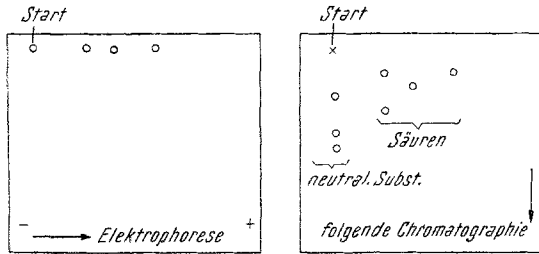


Abb. 3. Schema der Kombination Elektrophorese—Papierchromatographie.

Abschätzung ihrer Dissoziationskonstante gestattet. Ist diese in der Literatur angegeben, oder läßt sie sich aus ähnlichen Säuren größenordnungsmäßig bestimmen, so kann aus der PE-Geschwindigkeit meist

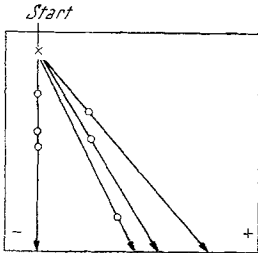


Abb. 4. Schema der Elektrochromatographie.

die Zahl der überhaupt möglichen Strukturen entscheidend eingengt werden. Wir selbst hatten eine Carbonsäure zur Analyse, deren mutmaßliche Struktur entweder $X \cdot \text{CHOH} \cdot \text{COOH}$ (I) oder $X \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH}$ (II) sein konnte ($X =$ ein organischer Rest). Aus den Dissoziationskonstanten ähnlich gebauter Verbindungen und der PE-Wanderung konnte die Struktur I als wahrscheinlicher bezeichnet werden, da die in α -Stellung stehende Ketogruppe eine stärkere Dissoziation und damit eine über der beobachteten liegende Wanderungsgeschwindigkeit bedingt hätte.

Kombination von PE und Papierchromatographie; Elektrochromatographie.

Es gibt zwei Möglichkeiten, die Vorteile von PE und Chromatographie zu verbinden:

1. die Aufeinanderfolge der beiden Methoden (Kombinationsmethode) und
2. die gleichzeitige Anwendung beider Verfahren (Elektrochromatographie).

Während man bei der Elektrochromatographie (Abb. 4) an die gleichzeitige Verwendbarkeit der Grundlösung in PE und Chromatographie gebunden ist, stellt das Kombinationsverfahren (Abb. 3) die Wahl

des — meist schlecht leitenden, organischen — Chromatographiergemisches frei. Man kann hier schließlich so weit gehen, daß man nach durchgeführter PE den Papierbogen entsprechend zerschneidet und für Säuren, Neutralstoffe usw. gesonderte Chromatographiergemische anwendet. Im allgemeinen wird man daher in der praktischen Analyse der Kombinationsmethode den Vorzug geben. Die Elektrochromatographie ermöglicht dagegen die Gewinnung von wertvollen Substanzen. Benützt man den Startpunkt als ständigen Zuflußpunkt des zu trennenden Gemisches, so wird das Verfahren vollkontinuierlich. Der Schnitt zwischen den eingezeichneten Resultanten in Abb. 4 und dem unteren Ende des Papierbogens gibt jene Punkte, an denen jede Substanz für sich abtropft. Wandern die zu trennenden Substanzen nicht im elektrischen Feld, so kann auch eine chromatographische Trennbarkeit die kontinuierliche Gewinnung nicht ermöglichen, zwei elektrophoretisch trennbare Stoffe aber sind immer durch Elektrochromatographie präparativ erhältlich.

Über spezielle Ergebnisse der auf diesen Methoden beruhenden Versuche werden wir zu einem späteren Zeitpunkt berichten.