

Zur Biosynthese der Benzoesäuren

Von

H. Kindl und G. Billek

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 9. Mai 1964)

Es wird über die Biosynthese natürlich vorkommender Benzoesäuren aus Zimtsäuren berichtet. Der Abbau von Ferulasäure zu Vanillinsäure und der Übergang von Zimtsäure zu Gentsisinsäure wird unter Anwendung ^{14}C -markierter Vorstufen bei *Hydrangea macrophylla*, *Astilbe chinensis* und *Sinapis alba* genauer untersucht.

Im Rahmen von Arbeiten über die Biosynthese pflanzlicher Stilbene¹ wurde die Bildung des Hydrangenols in der Gartenhortensie (*Hydrangea macrophylla*) aufgeklärt. Obwohl diese Untersuchungen vorerst nur die Biosynthese des Hydrangenols betrafen, war die Kenntnis der übrigen phenolischen und sauren Inhaltsstoffe dieser Pflanze wünschenswert, um gegebenenfalls Vorstufen des Hydrangenols und Zusammenhänge mit anderen Substanzklassen zu erkennen. Entsprechende Analysen der Phenolfractionen wurden auch bei acht weiteren Arten der Gattung *Hydrangea* durchgeführt — nicht zuletzt, um das geeignete Pflanzenmaterial für die Versuche auszuwählen. Schließlich analysierten wir auch Vertreter anderer Gattungen der Familie *Saxifragaceae*².

Hierbei konnte festgestellt werden, daß sich die Art *H. macrophylla* durch einen ungewöhnlich hohen Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen auszeichnet, deren Gesamtmenge (über 3%, bezogen auf das Trockengewicht) die ähnlicher Inhaltsstoffe anderer Arten der Gattung *Hydrangea* um das 10—20fache übertrifft. Die papierchromatographische Analyse, verbunden mit einer Vorreinigung durch fraktionierte Hochvakuumsublimation im „liegenden Rohr“, ergab das Vorhandensein von zahl-

¹ Zusammenfassung: G. Billek, „Stilbene im Pflanzenreich“, Fortschr. Chem. org. Naturst. **22** (1964), im Druck.

² G. Billek und H. Kindl, Mh. Chem. **93**, 85 (1962).

Tabelle 1

Inhaltsstoffe	Menge	Aktivität nach Infusion von			
		Acetat- ¹⁴ C	Glucose- ¹⁴ C (U)	Benzoesäure-carboxyl- ¹⁴ C	Zimtsäure- ³⁻¹⁴ C
Benzoesäuren:					
Salicylsäure	+			+	
4-Hydroxybenzoesäure	+			++	
2,3-Dihydroxybenzoesäure	+			+	
2-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure	+			+	
Gentisinsäure	+++		(+)	+++	+++
Protocatechusäure	+				
Vanillinsäure	++				
Isovanillinsäure	+++			+	
Phenylelessigsäuren:					
4-Hydroxyphenylelessigsäure	+				
Phenylpropionsäuren:					
2-Hydroxyphenylpropionsäure	+		++		++
4-Hydroxyphenylpropionsäure	+				++
Zimtsäuren:					
o-Cumarsäure	+				
p-Cumarsäure	++		+		+
Kaffeensäure	++		+		++
Ferulasäure	+				+
Cumarine:					
Umbelliferon	+++		++		++
7-Hydroxy-8-methoxycumarin	+		++		++
Flavonole:					
Kämpferol	++	++	++		+
Stilbene:					
Hydrangenol	++++	++	+++		++

reichen Benzoe-, Phenylessig-, Phenylpropion- und Zimtsäurederivaten, neben Hydrangenol, dem Flavonol Kämpferol und zwei Cumarinderivaten (Umbelliferon und 7-Hydroxy-8-methoxy-cumarin). Die gefundenen Inhaltsstoffe sind in Tab. 1 angeführt, deren 2. Spalte auch eine halb-quantitative Auswertung der Analysen enthält.

Zur Aufklärung der Biosynthese des Hydrangenols wurden verschiedene ¹⁴C-markierte Verbindungen den Blättern von *H. macrophylla* infundiert. Über die Ergebnisse dieser, lediglich das Hydrangenol betreffenden Arbeiten wurde bereits berichtet³. Es war naheliegend, gleichzeitig auch den Einbau der vorgegebenen markierten Verbindungen in andere Inhaltsstoffe dieser Pflanze zu untersuchen, wobei vorerst auf quantitative Untersuchungen kein besonderer Wert gelegt wurde. Ein

³ G. Billek und H. Kindl, Mh. Chem. **92**, 493 (1961); **93**, 814 (1962).

Einbau in die betreffende Verbindung, wie dies in Tab. 1 wiedergegeben ist, wurde aber erst nach Re-Chromatographie in einem oder mehreren anderen Laufmitteln und nach Verdünnung mit einer authentischen Probe, anschließender Reinigung und neuerlicher Aktivitätsbestimmung als erwiesen angesehen.

Acetat-1-¹⁴C wurde lediglich in Kämpferol und in das Stilbenderivat Hydrangenol eingebaut, was auf Grund der bereits bekannten Bildung von Flavonoiden und Stilbenen zu erwarten war. Nach einer Gabe von Glucose-¹⁴C-(U) war die Zahl der markierten Verbindungen in der Phenolfraction weitaus reichhaltiger, es war jedoch auffallend, daß bei Kurzzeitversuchen kein Einbau in die Derivate der Benzoesäure stattfand, während einzelne Zimtsäuren deutliche Aktivität besaßen. Benzoesäure-carboxyl-¹⁴C hatte wohl die Bildung hydroxylierter und methoxylierter Derivate zur Folge, wurde aber nicht zu einem Phenylpropankörper aufgebaut. Zimtsäure-3-¹⁴C lieferte alle Inhaltsstoffe, die sich von einer Phenylpropaneinheit ableiten, aber zusätzlich auch — ebenso wie Glucose-¹⁴C-(U) im Langzeitversuch — markierte Gentisinsäure, was auf einen Abbau hinwies.

Wir zogen daraufhin den Schluß, daß in höheren Pflanzen die Biosynthese der Benzoesäuren durch Abbau der Phenylpropankörper, möglicherweise der Zimtsäuren erfolgen kann⁴. Dies wurde durch weitere Einbauversuche bestärkt. Bei *H. macrophylla* gab Ferulasäure-3-¹⁴C in relativ guter Ausbeute Vanillinsäure-carboxyl-¹⁴C, während Zimtsäure-3-¹⁴C bei *Astilbe chinensis* zur Bildung von Gentisinsäure-carboxyl-¹⁴C führte⁵.

Für die Biosynthese der Benzoesäuren wurden bis vor kurzem nur zwei Reaktionswege in Betracht gezogen, die vorwiegend auf Untersuchungen mit Mikroorganismen beruhten. Ein bestimmter Strukturtypus (6-Methylsalicylsäure, Orsellinsäure u. a.⁶) wird aus Acetat nach dem von *Birch* und *Donovan*⁷ angegebenen Reaktionsweg gebildet. Die natürliche Synthese einer anderen Gruppe von Benzoesäuren (4-Hydroxy-benzoesäure⁸, Protocatechusäure⁹, Gallussäure¹⁰) zweigt von Zwischenstufen (5-Dehydro-shikimisäure, Shikimisäure-5-phosphat) des von *Davis* und *Sprinson*¹¹ angegebenen Schemas der Bildung aromatischer Aminosäuren ab, womit eine plausible Erklärung der Biosynthese dieses zweiten Strukturtypus gegeben war.

⁴ Teilergebnisse dieser Arbeit wurden am Symposium International de Chimie Organique in Brüssel 1962 vorgetragen.

⁵ *H. Kindl* und *G. Billek*, Österr. Chemiker-Ztg. **63**, 290 (1962).

⁶ *R. Bentley*, Ann. Rev. Biochem. **31**, 589 (1962).

⁷ *A. J. Birch* und *F. W. Donovan*, Austral. J. Chem. **6**, 360 (1953).

⁸ *D. B. Sprinson*, Adv. Carbohydrate Chem. **15**, 235 (1960).

⁹ *S. R. Gross*, J. biol. Chem. **233**, 1146 (1958).

¹⁰ *E. Haslam*, *R. D. Haworth* und *P. F. Knowles*, J. Chem. Soc. [London] **1961**, 1854; *E. E. Conn* und *T. Swain*, Chem. and Ind. **1961**, 592.

¹¹ *B. D. Davis*, J. biol. Chem. **191**, 315 (1951).

Vermutlich deshalb wurde eine weitere Möglichkeit der Entstehung von Benzoesäuren, nämlich durch Abbau einer bereits gebildeten Phenylpropaneinheit, wenig beachtet, obwohl gewisse Hinweise bereits gegeben waren¹². Erst in jüngster Zeit konnten *Grisebach* und *Vollmer*¹³ eindeutig beweisen, daß Salicylsäuremethylester (Einbaurate unter 0,05%) in *Gaultheria procumbens* L. durch Abbau einer vorgegebenen Zimtsäure entsteht, während Acetat nicht zur Bildung dieser Verbindung beitrug. Nach *Zenk*¹⁴ wird Gallussäure in *Rhus typhina* durch Abbau von D,L-Phenylalanin gebildet, dessen Einbaurate (0,5%) um etwa eine Zehnerpotenz höher war als jene von Glucose, D,L-Tyrosin und Benzoesäure.

Im folgenden soll über die quantitative Auswertung unserer Versuche über die Biosynthese der Vanillinsäure und Gentisinsäure berichtet werden, wobei auch neue Pflanzenarten einbezogen und Folgereaktionen berücksichtigt werden.

Vanillinsäure

Die Bildung der Vanillinsäure wurde bei *H. macrophylla* und *Sinapis alba* untersucht; als Vorstufe wurde die in der Seitenkette kernnah markierte Ferulasäure-3-¹⁴C eingesetzt. Beide Pflanzenarten enthalten Ferulasäure und Vanillinsäure als natürliche Inhaltsstoffe, die vorgegebene Verbindung kann daher nicht als artfremd angesehen werden und ihr weiteres Verhalten dürfte normalen Stoffwechselvorgängen entsprechen. In beiden Pflanzen führte die infundierte Ferulasäure zur Bildung von Vanillinsäure in der ungewöhnlich hohen Ausbeute von 4 bis 8% (Tab. 2). Die Abhängigkeit der Ausbeute vom Alter der Versuchs-

Tabelle 2

Pflanzenart	Alter Monate	Frischgewicht (g)	Versuchsdauer (Tage)	Vanillinsäure (Einbaurate, %)
<i>H. macrophylla</i>	0,5	20	5	4,2
<i>H. macrophylla</i>	5	18	3	3,8
<i>H. macrophylla</i>	6	30	6	8,1
<i>S. alba</i>	0,5	40	3	3,1
<i>S. alba</i>	2	20	5	5,0

Vorstufe: Ferulasäure-3-¹⁴C, 110 µC/mMol, je 5 mg.

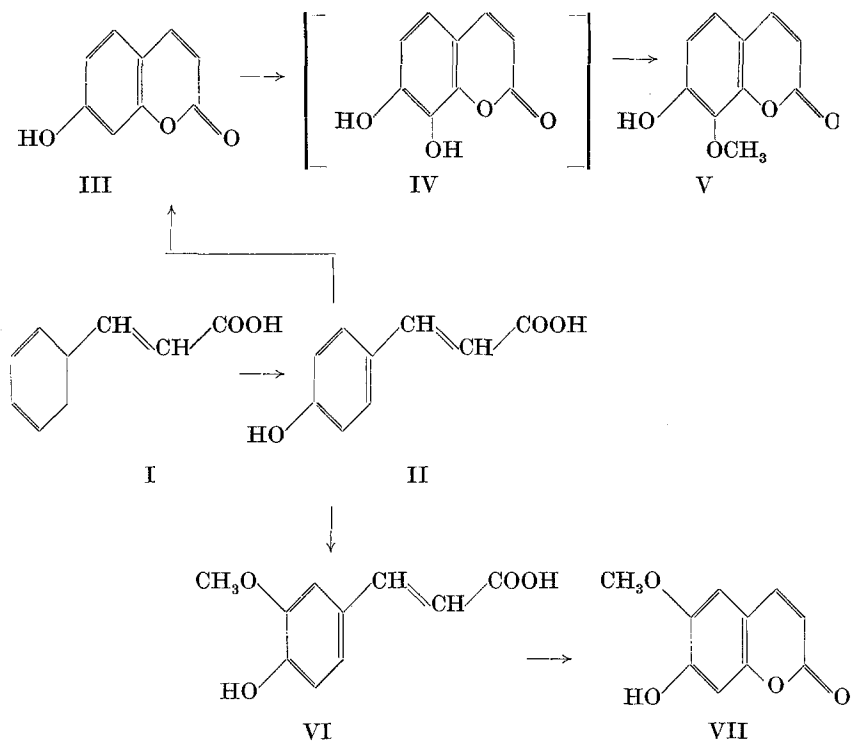
pflanzen bzw. von der Versuchsdauer ist unbedeutend. Außer der Vanillinsäure waren lediglich einige nicht näher identifizierte Flavonoide (insgesamt ca. 10% der vorgegebenen Aktivität) und wenig Sinapinsäure

¹² *W. Bruckner*, *Planta* [Berlin], **48**, 627 (1957); *D. Gross* und *H. R. Schütte*, *Arch. Pharmaz.* **296**, 1 (1963).

¹³ *H. Grisebach* und *K. O. Vollmer*, *Z. Naturforsch.* **18 b**, 753 (1963).

¹⁴ *M. H. Zenk*, *Z. Naturforsch.* **19 b**, 83 (1964).

(in *S. alba*), aber keine weiteren aktiven phenolischen Inhaltsstoffe nachweisbar. Dies deutet somit auf eine beträchtliche Stabilität der 3-Methoxy-4-hydroxy-Struktur hin, und schließt einen Abbau des Aromaten mit darauffolgender Neogenese aus.



Bei *H. macrophylla* war es außerdem auffallend, daß 7-Hydroxy-8-methoxy-coumarin (V) nicht aus Ferulasäure (VI) gebildet wurde, obwohl sich die Struktur dieses Coumarinderivates daraus unmittelbar ableiten läßt. Ein isomeres Coumarin hingegen, das Scopoletin (VII, 6-Methoxy-7-hydroxy-coumarin), konnten Reznik und Urban¹⁵ aus Ferulasäure bei *Helianthus annuus*, *Zea mays* und *Triticum vulgare* in guter Ausbeute erhalten. Wir haben deshalb die Biosynthese des 7-Hydroxy-8-methoxy-coumarins mittels verschiedener markierter Vorstufen untersucht (Tab. 3). Im Gegensatz zu Scopoletin (VII) wird 7-Hydroxy-8-methoxy-coumarin (V) aus Umbelliferon (III), vermutlich über die Zwischenstufe des Daphnetins (IV) gebildet.

Die Suche nach dieser Zwischenstufe war bei *H. macrophylla* erfolglos. Daphnetin (IV), ein relativ wenig verbreiteter Naturstoff, konnte

¹⁵ H. Reznik und R. Urban, Naturwiss. 44, 13 (1957).

aber bei *Saxifraga rotundifolia*, welche ebenfalls der Familie der *Saxifragaceae* angehört, nachgewiesen werden.

Tabelle 3

Vorstufe	spez. Akt. (mC/mMol)	Menge (mg)	7-OH-8-OCH ₃ -Cumarin (Einbaurate, %)
Phenylalanin-3- ¹³ C	1,0	1,0	3,5
Phenylalanin-2- ¹⁴ C	0,46	1,0	4,5
Zimtsäure-3- ¹⁴ C	0,35	14	0,01
p-Cumarsäure-3- ¹⁴ C	1,0	4,0	0,25
Umbelliferon-U- ¹⁴ C	1,2	0,3	35
Ferulasäure-3- ¹⁴ C	0,11	5,0	0,0

Versuchsobjekt: *H. macrophylla*, Alter 2—3 Monate, Frischgewicht 15 g, Versuchsdauer 3 Tage.

Gentisinsäure

Die Bildung von Gentisinsäure aus Zimtsäure wurde zuerst bei *H. macrophylla* beobachtet. Wegen der großen Zahl von Inhaltsstoffen, insbesondere verschiedenartig substituierter Zimtsäuren und deren Folgeprodukte, erschien diese Species für eine quantitative Auswertung der Einbaurate wenig geeignet. Deshalb wurde eine ebenfalls der Familie der *Saxifragaceae* angehörende Art, *Astilbe chinensis*, ausgewählt, von der bereits bekannt war, daß sie wohl zahlreiche Benzoesäuren, aber nur sehr wenige Derivate der Zimtsäure enthält².

Nach einer Infusion von 50 μ C Zimtsäure-3-¹⁴C (0,35 mC/mMol) durch die Wurzeln eines ganzen Stockes (Gewicht 350 g) von *A. chinensis* und einer Versuchsdauer von 25 Tagen konnten aus den Blättern isoliert werden:

	Einbaurate %
Gentisinsäure	0,20
p-Cumarsäure	0,05
p-Hydroxyphenylpropionsäure	0,04
7-Hydroxy-8-methoxyeumarin	0,01

Hier war, wie bei dem Vorversuch mit *H. macrophylla*, auffallend, daß aus der vorgegebenen Zimtsäure trotz des Vorhandenseins von anderen phenolischen Benzoesäuren nur die Gentisinsäure in aktiver Form isoliert werden konnte.

Beim Abbau der Ferulasäure zur Vanillinsäure bleibt der Substitutionstyp erhalten. Bei der Bildung der Gentisinsäure aus Zimtsäure hingegen erhebt sich die Frage, ob die Hydroxylierung auf der Stufe der

Zimtsäure erfolgt oder erst nach dem Abbau durch β -Oxydation; das Auftreten von markierter Benzoessäure als mögliches Zwischenprodukt wurde nicht beobachtet. Der Einsatz von Benzoessäure-*carboxyl*- ^{14}C sollte uns Hinweise auf die Reaktionsfolge geben.

Zum Stoffwechsel der Benzoessäuren

Benzoessäure-*carboxyl*- ^{14}C (1 mC/mMol) wurde sowohl bei *H. macrophylla* als auch bei *A. chinensis* infundiert. Die Ergebnisse zeigt Tab. 4. Aktive Verbindungen fanden sich nur in der Gruppe der Benzoessäuren; erwartungsgemäß war kein Aufbau zu Phenylpropankörper eingetreten.

Tabelle 4

Stoffwechselprodukt	<i>H. macrophylla</i> %	<i>A. chinensis</i> %
Salicylsäure	0,9	1,8
2,3-Dihydroxybenzoessäure	0,15	0,3
2-Hydroxy-3-methoxybenzoessäure	0,12	—
Gentisinsäure	1,5	5,8
4-Hydroxybenzoessäure	0,35	1,1

Beide Pflanzenarten zeigten ein weitgehend ähnliches Verhalten. Aus der Benzoessäure entstand vorwiegend Gentisinsäure, aber auch die anderen Derivate wurden mit nicht unbeträchtlichen Einbauraten erhalten.

Ähnliche Übergänge sind schon bei anderen Pflanzen beobachtet worden. *Ibrahim* und *Towers*¹⁶ berichteten über die Umwandlung von Salicylsäure in Gentisinsäure und 2,3-Dihydroxybenzoessäure, während *Klämbt*¹⁷ Salicylsäure aus Benzoessäure erhielt.

In bezug auf den Abbau der Zimtsäure zu Gentisinsäure in *A. chinensis* würde das Fehlen von Aktivität bei den anderen Benzoessäuren bedeuten, daß die Benzoessäure selbst als echte Zwischenstufe nicht in Frage kommt und die Hydroxylierungen schon vor dem Abbau an der Zimtsäure einsetzen.

Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Stellung der Zimtsäure im pflanzlichen Stoffwechsel. Es ist nicht ausgeschlossen, daß Stoffe mit einem bestimmten Hydroxylierungstyp, nämlich in den Positionen 2 und 5, besonders rasch einem Abbau unterliegen, der, wie hier bei *A. chinensis* beobachtet, direkt zur Bildung der Gentisinsäure führt. Andere Benzoessäurederivate könnten aus den bereits entsprechend substituierten Zimtsäuren, die selbst als Naturprodukte auftreten, durch Abbau ent-

¹⁶ R. K. Ibrahim und G. H. N. Towers, Nature [London] **184**, 1803 (1959).

¹⁷ H. D. Klämbt, Nature [London] **196**, 491 (1962).

stehen. Dies wurde beim Übergang von Ferulasäure zu Vanillinsäure bei *H. macrophylla* nachgewiesen. Das soll aber keinesfalls die Möglichkeit ausschließen, daß einmal gebildete Benzoesäuren nicht weiteren Hydroxylierungen und Methoxylierungen unterliegen, wie die klar erkennbaren Übergänge innerhalb dieser Substanzklasse zeigen.

Diese Arbeit wurde aus den Mitteln des *Theodor-Körner*-Stiftungsfonds unterstützt, wofür auch an dieser Stelle gedankt sei (*H. K.*).

Experimenteller Teil

Synthese der markierten Vorstufen

Die carbonyl-markierten Aldehyde Benzaldehyd¹⁸, 4-Hydroxy-benzaldehyd¹⁹ und Vanillin²⁰, wurden nach bekannten Methoden hergestellt und mit Malonsäure in Pyridin—Anilin nach der seinerzeit für die Synthese der Ferulasäure-3-¹⁴C angegebenen Vorschrift²¹ umgesetzt. 4-Hydroxybenzoesäure-*carboxyl*-¹⁴C wurde durch Abspaltung der Benzylgruppe mit 20proz. HCl aus 4-Benzyl-oxy-benzoesäure-*carboxyl*-¹⁴C²² erhalten. Phenylalanin-3-¹⁴C und Phenylalanin-2-¹⁴C wurden von The Radiochemical Centre, Amersham, bezogen.

Infusion und Aufarbeitung

Mit Ausnahme des Phenylalanins wurden alle Säuren als Na-Salze in etwa 0,2proz. wäßr. Lösung einzelnen Blättern durch die Blattstiele infundiert. Nach 3—5 Tagen wurden die Phenol- und Säurefraktion nach einer bereits beschriebenen Methode² aufgearbeitet.

Trennung der Phenolcarbonsäuren

Die Säurefraktion wurde durch präparative Papierchromatographie mittels bereits früher² verwendeter Laufmittel getrennt. Eine besondere Schwierigkeit ergab sich bei einem wesentlichen Teil dieser Arbeit insofern, als es weder mittels Papierchromatographie (vgl. auch *Reio*²³) noch Dünnschichtchromatographie²⁴ gelang, Vanillinsäure von der Ferulasäure quantitativ zu trennen. Dies war erst durch die Hochspannungspapierelktrophorese (Gerät nach *Wieland* und *Pfleiderer*) möglich, die auch bei allen anderen Phenolcarbonsäuren eine wertvolle Ergänzung papierchromatographischer Methoden darstellt. In Tab. 5 sind die R_F -Werte aller Verbindungen angegeben, die im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt wurden.

¹⁸ *T. A. Geissmann*, Atomic Energy Com. Report UCRL-1233; *A. Murray III* und *D. L. Williams*, Organic Synthesis with Isotopes S. 627; Interscience, New York, 1956.

¹⁹ *G. Billek*, *A. Schimpl* und *H. Kindl*, in Vorbereitung.

²⁰ *K. Kratzl* und *G. Billek*, Holzforschung **7**, 66 (1953).

²¹ *K. Kratzl*, *G. Billek*, *A. Graf* und *W. Schweers*, Mh. Chem. **87**, 60 (1956).

²² *G. Billek* und *E. F. Herrmann*, Mh. Chem. **90**, 89 (1959).

²³ *L. Reio*, J. Chromatogr. **1**, 338 (1958).

²⁴ *J. Halmekoski*, Suomen Kemistilehti **B 35**, 39 (1962).

Tabelle 5

	1	2	3
2-Hydroxybenzoesäure	1,00	1,00	—
2-Hydroxyphenylelessigsäure	0,78	—	—
2-Hydroxyphenylpropionsäure	0,52	—	—
2-Hydroxyzimtsäure, <i>trans</i> -	0,41	—	—
4-Hydroxybenzoesäure	0,55	—	—
4-Hydroxyphenylelessigsäure	0,68	—	—
4-Hydroxyphenylpropionsäure	0,57	—	—
4-Hydroxyzimtsäure, <i>cis</i> -	0,79	—	—
4-Hydroxyzimtsäure, <i>trans</i> -	0,37	—	—
2,3-Dihydroxybenzoesäure	—	0,70	—
2-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure	—	0,87	—
2,4-Dihydroxybenzoesäure	—	0,45	—
2,5-Dihydroxybenzoesäure	0,74	0,60	—
2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure	—	0,78	—
3,4-Dihydroxybenzoesäure	0,48	—	—
3,4-Dihydroxyzimtsäure, <i>cis</i> -	0,68	—	—
3,4-Dihydroxyzimtsäure, <i>trans</i> -	0,28	—	—
3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure	0,53	—	0,57
3-Methoxy-4-hydroxyphenylelessigsäure	0,63	—	—
3-Methoxy-4-hydroxyphenylpropionsäure	0,55	—	0,43
3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure, <i>cis</i> -	0,65	—	1,00
3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure, <i>trans</i> -	0,28	—	0,27
3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure	0,53	—	0,57
3-Hydroxy-4-methoxyphenylelessigsäure	0,63	—	—
3-Hydroxy-4-methoxyphenylpropionsäure	0,55	—	0,43
3-Hydroxy-4-methoxyzimtsäure, <i>cis</i> -	0,65	—	1,00
3-Hydroxy-4-methoxyzimtsäure, <i>trans</i> -	0,28	—	0,27
3,4,5-Trihydroxybenzoesäure	0,30	—	—
3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoesäure	0,45	—	—

Spalte 1. R_s -Werte bezogen auf den Wanderungsweg der Salicylsäure; 0,1 n-Na-Citrat—NaOH-Puffer, pH = 5,4; 36 V/cm.

Spalte 2. R_s -Werte; 0,1 n-Na-Citrat—HCl-Puffer, pH = 2,65, 25 V/cm. Es wandern nur die o-Hydroxybenzoesäuren.

Spalte 3. R_x -Werte, bezogen auf den Wanderungsweg der *cis*-Ferulasäure; 0,1 m-Pyridin-Acetatpuffer, pH = 4,5, 35 V/cm.