

Die quantitative säulenchromatographische Bestimmung von Brenzkatechinen in Produkten

Von E. LEIBNITZ, U. BEHRENS und H. CZECH

Mit 1 Abbildung

Inhaltsübersicht

Durch Übertragung bekannter papierchromatographischer Methoden zur Trennung von Brenzkatechinen auf die Cellulose-Säule gelang es, Produkte säulenchromatographisch auf ihren Gehalt an Brenzkatechin, Homobrenzkatechin, Isohomobrenzkatechin und Restbrenzkatechin zu untersuchen.

Sowohl die Herstellung von Cellulosepulver aus handelsüblichem Chromatographiepapier als auch die Arbeitsmethodik werden beschrieben.

Seit der Einführung der Verteilungschromatographie sind Phenole, die in Produkten oder Wässern enthalten sind, der Identifikation und quantitativen Bestimmung durch einfache analytische Methoden zugänglich.

Besonders die papierchromatographische Analyse der Polyphenole bereitet keine Schwierigkeiten. Durch Wahl des Laufmittels lassen sich alle Gruppen gut auftrennen. Das Fehlen von Testsubstanzen erschwert jedoch die Identifikation und das Aufstellen von Eichkurven für die quantitative Bestimmung.

Von zwei Arbeitsgruppen wurde versucht, das Problem der qualitativen Bestimmung der chromatographisch getrennten Polyphenole zu lösen. Ein englischer Arbeitskreis¹⁾ trennte destillativ gewonnene Fraktionen sowohl papier- als auch säulenchromatographisch weiter auf. Die Alkylderivate der Polyphenole wurden präparativ dargestellt und dienten als Referenzsubstanzen für die Festlegung der R_f-Werte und für die UV-Spektrometrie der Eluate von Chromatographie-Säulen.

¹⁾ The Gas Council, Research Communication GC 24 „An investigation into the composition of ammoniacal liquor“, The Gas Council, London, November 1955.

Von uns wurden vor einigen Jahren die Hauptinhaltsstoffe der Schwelwässer chromatographisch untersucht²⁻⁷). Es wurde dabei versucht, durch Errechnung der Struktur auf Grund des Rf-Wertes³), trotz Fehlens von Referenzsubstanzen, die Identifikation unbekannter Polyphenole durchzuführen.

Die quantitative Bestimmung papierchromatographisch getrennter Substanzen läßt sich leicht nach der Methode des Vergleiches der Fleckengröße oder durch Eluation mit anschließender Kolorimetrie des Eluats durchführen.

Für beide Methoden gilt jedoch im Falle der Polyphenole die Einschränkung, daß durch Fehlen von Testsubstanzen die Alkylderivate auf die Stammsubstanzen bezogen werden müssen, z. B. die Alkyl-Resorzine auf das Resorzin.

Einer quantitativen papierchromatographischen Bestimmung der Polyphenole muß ein Fehler bis zu $\pm 10\%$ zugeordnet werden. Der Fehler vergrößert sich noch, wenn wasserfreie Produkte bestimmt werden sollen. Die Produkte müssen auf eine etwa 1proz. Lösung eingestellt werden. Erfahrungsgemäß ist oft nur ein unvollständiges Lösen zu erreichen. Die ungelösten Anteile können noch beträchtliche Mengen der Phenole enthalten.

Für den Zweck einer Produktenanalyse erschien es uns notwendig, eine säulenchromatographische Methode zu entwickeln, um die polyphenolischen Bestandteile mit hinreichender Genauigkeit bestimmen zu können. Wegen der Bedeutung der Brenzkatechine sollte die zu erarbeitende Methodik auf diese Gruppe beschränkt bleiben.

Säulenchromatographische Bestimmungen wurden, wie schon erwähnt, vom Gas Council¹) durchgeführt. Destillativ gewonnene Fraktionen ließen sich an einer Silicagelsäule weiter auftrennen. Das Eluat wurde durch UV-Spektrophotometrie ausgewertet. Die Säule hatte eine aktive Länge von 50 cm und war mit eisenfreiem Silicagel-Pulver von einem Wassergehalt von 50 bis 70% gefüllt. Die Fraktionen wurden zu je 10 ml geschnitten. Als Elutionsmittel diente Benzol. Für die Elution der Substanzen mit niedrigem Rf-Wert wurde graduell wassergesättigtes

²) E. LEIBNITZ, U. BEHRENS u. M. RINGPFEIL, WWT 6, 205–210 (1956).

³) E. LEIBNITZ, U. BEHRENS u. M. RINGPFEIL, WWT 6, 299–304 (1956).

⁴) E. LEIBNITZ, U. BEHRENS u. M. RINGPFEIL, WWT 7, 266–296 (1957).

⁵) E. LEIBNITZ, U. BEHRENS, G. ROOS u. H.-U. STEIN, WWT 7, 296–301 (1957) und 7, 354–359 (1957).

⁶) E. LEIBNITZ, U. BEHRENS u. A. GABERT, WWT 8, 69–73 (1958).

⁷) E. LEIBNITZ, U. BEHRENS u. A. GABERT, WWT 8, 170–174 (1958).

Butanol zugegeben. Eine vollkommene Auftrennung, besonders der schnellaufenden Phenole, ließ sich nicht erreichen.

Versuche, eine Polyphenolbestimmung in technischen Produkten und Wässern — ohne vorherige destillative Auftrennungen nach dieser Methode durchzuführen — schlugen fehl. Schon die englischen Wissenschaftler wiesen darauf hin, daß an der Silicagelsäule keine so weitgehende Auftrennung erzielt werden konnte, wie dies bei der Papierchromatographie der Fall ist.

Wir versuchten daher, die papierchromatographische Methode direkt auf die Säule zu übertragen, wobei als Trägermaterial nicht Silicagel, sondern Cellulosepulver diente.

Herstellen von Cellulosepulver

Trockenvermahlung

Handelsübliches Elektrophorese- oder Chromatographiepapier (Abfallstreifen) wird vorzerkleinert (rotierendes Messerkreuz) und in einer Kugelmühle so lange zermahlen, bis die Faserstruktur der Cellulose weitgehend zerstört ist. Dieses wird nach etwa 8stündiger Mahlzeit erreicht.

Feuchtvermahlung

Nach der wie oben beschriebenen Vorzerkleinerung wird das Papier angemaischt und in einem Mahlscheiben-Holländer zermahlen. Nach einer 4stündigen Mahlzeit ist die Faserstruktur der Cellulose weitgehend zerstört.

Das nach den beiden Verfahren hergestellte Cellulosepulver eignete sich für die Säulenchromatographie und war einem Handelsprodukt (Schleicher & Schüll 113) gleichwertig.

Quantitative Auswertung der Eluate

Für die quantitative kolorimetrische Bestimmung des Brenzkatechin-gehaltes der Eluate standen eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Die gebräuchlichen Farbreaktionen der Phenole mit z. B. diazotierter Sulfanilsäure wurden trotz ihrer hohen Empfindlichkeit nicht benutzt. Die Reaktionen sind für Brenzkatechine nicht spezifisch. Bei einer unscharfen Trennung der Brenzkatechine von Resorenderivaten würden diese das Ergebnis verfälschen. Außerdem verlangen diese Reaktionen die unbesetzte p-Stellung.

Am aussichtsreichsten erschien uns die Reaktion, die die beiden benachbarten Hydroxyle mit Eisen-Salzen ergeben.

Die Eisenreaktion wurde in letzter Zeit von KURSSANOW und SAPROMETOW⁸⁾ eingehend untersucht. Eisen (Fe^{++}) wird als Eisentartrat in Lösung gehalten. Die optimale Farbbildung erfolgt bei einem pH -Wert von 8,1. Acetat- und Boratpuffer stören die Farbbildung. Die Autoren empfehlen daher einen Phosphatpuffer. Die unterste Auswertbarkeitsgrenze beträgt 1,5 mg/l Brenzkatechin. Die Färbung erreicht nach 3 Minuten das Maximum. Diese Analysen-Methode entsprach nach experimenteller Überprüfung und Vergleich mit anderen, unseren Anforderungen am besten.

Stationäre Phase

Von RINGPFEIL⁹⁾ wurde gezeigt, daß der Wassergehalt der Cellulose, also der Grad der Ausbildung der stationären Phase, den R_f -Wert und die Länge der Flecke bei der Papierchromatographie der Polyphenole beeinflußt. Bei richtiger Ausbildung der stationären Phase, was durch genügend langes Bedunsten des Papiers in einer feuchten Kammer erreicht wird, bleibt der R_f -Wert konstant, und die Flecke haben eine fast kreisrunde Form. Bei ungenügend ausgebildeter stationärer Phase, durch zu geringe Bedunstungszeit hervorgerufen, steigt der R_f -Wert, und die Fleckenform wird, umgekehrt proportional der Bedunstungszeit, zunehmend länglich.

Die Cellulosesäule muß somit, um reproduzierbare Verhältnisse und geringe Bandenbreite zu gewährleisten, eine gut ausgebildete stationäre Phase besitzen.

Um das Pulver mit Wasser zu beladen, wird in Petrischalen Cellulosepulver leicht aufgeschüttet und diese in abschließbare, als feuchte Kammer dienende Gefäße gestellt. Nach 5 Tagen ist eine ausreichende Wasseraufnahme der Cellulose erreicht.

Laufmittel

Bei unseren papierchromatographischen Polyphenolbestimmungen hat sich das Laufmittel von MRAZ¹⁰⁾, Tetrachlorkohlenstoff mit geringem Zusatz (1–5%) wassergesättigtem Butanol, bewährt.

Variationen hinsichtlich des Butanolgehaltes haben dadurch, daß Butanol als Schlepper für Wasser dient, den Effekt, daß ein Mehr an Butanol die Laufgeschwindigkeit der hydrophilen Substanzen erhöht.

⁸⁾ A. L. KURSSANOW, M. N. SAPROMETOW, *Biokhimiya* (russ.), **14**, 467 (1949).

⁹⁾ M. RINGPFEIL, Diplomarbeit, Karl-Marx-Universität, Math.-Nat.-Fak. Leipzig 1955.

¹⁰⁾ MRAZ, persönliche Mitteilung.

Ein Laufmittel mit 3% Butanol trennte das Brenzkatechin in einer aktiven Säule von 30 cm Länge scharf von den Homologen ab. Die Homologe traten als einheitliche Gruppe mit zwei bereits deutlich sich als Gipfel abzeichnende Maxima aus der Säule aus.

Eine Erhöhung des Butanolzusatzes führte zwar zur schnelleren Elution und zu höheren, schmaleren Maxima, aber eine Auftrennung des Massives der Alkylbrenzkatechine trat nicht ein. Eine Verringerung des Butanolzusatzes auf 2% verlangsamte die Elution. Homobrenzkatechin war jedoch bereits deutlich von den übrigen Homologen getrennt. Innerhalb der verbleibenden gemeinsamen Gruppe der Homologen waren im Massiv zwei Maxima zu erkennen. Nachteilig war die Breite der Banden.

Da eine weitere Trennung die zuerst eluierbaren Homologen erfassen mußte und der günstigste Butanolzusatz auf Grund der oben diskutierten Ergebnisse zwischen 2 und 3% liegt, mußte die Laufstrecke durch Verwendung längerer Säulen erhöht werden.

Säulenlänge

Die Erhöhung der aktiven Säulenlänge auf 120 cm führte zur Auftrennung:

Rest der Alkylbrenzkatechine — Isohomobrenzkatechin — Homobrenzkatechin — Brenzkatechin.

Eine weitere Erhöhung der Säulenlänge war aus räumlichen Gründen nicht möglich.

Arbeitsvorschrift

Voranalyse

Um ein Bild über die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Produktes zu erhalten, empfiehlt es sich, ein Papierchromatogramm anzufertigen und auszuwerten²⁻⁴).

Geräte

Chromatographierohr

Glasrohr von 10 mm Innendurchmesser, 1500 mm Länge, unten mit Fritte (G 2) und Kapillarhahn versehen, oben mit Schliff (14,5) zum Aufsetzen des Laufmittelbehälters.

Fraktioniervorrichtung

Das Volumen einer Fraktion soll bei 3 ml liegen.

Kolorimeter.

Lösungen und Reagenzien

Cellulosepulver wassergesättigt.

Laufmittel

97,5 Teile CCl_4 + 2,5 Teile n-Butanol + 100 Teile dest. Wasser. Verwendet wird die untere Phase.

Reagenz0,45 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,25 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

250 ml dest. Wasser

Haltbarkeit 48 Stunden.

Puffer24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

1 l dest. Wasser.

Füllen der Säule

25 g Cellulosepulver in 150 ml Laufmittel aufschlämmen und in die Säule bei geöffnetem Hahn füllen. Durch weiteres Auffüllen von Laufmittel die Säule sich verdichten lassen, Laufmittel abfließen lassen bis noch etwas Laufmittel über der Säule steht, Hahn schließen (aktive Säulenhöhe etwa 120 cm).

Lösen der Probe

Nur bis etwa 5 ml Probe auftragen. (Die Menge des Produktes richtet sich nach seinem – papierchromatographisch ermittelten – Gehalt an Brenzkatechinen. Bei 30 mg Gesamt-Brenzkatechin-Gehalt liegt, wenn nicht eine Komponente den wesentlichen Anteil aus-

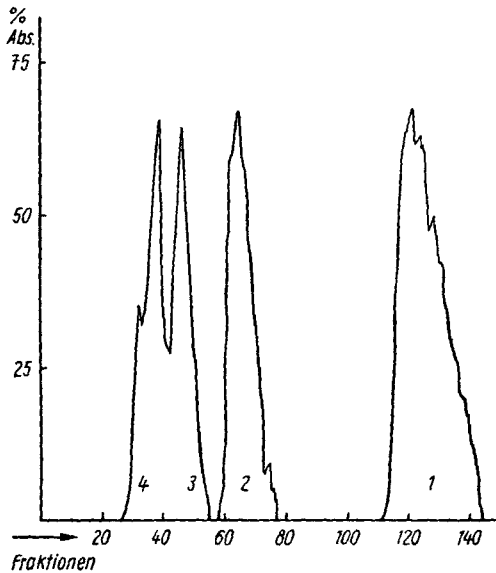


Abb. 1. Analyse von Böhlener Phenolöl. Max. 1: Brenzkatechin, Max. 2: Homobrenzkatechin, Max. 3: Isohomobrenzkatechin, Max. 4: übrige Alkyl-Brenzkatechine

macht, das Optimum.) Probe im Laufmittel lösen. Wenn keine vollständige Lösung erfolgt, mengenmäßige Variation der Komponenten versuchen. Butanol-Anteil jedoch nicht über 10–20% steigern.

Auswerten

Fraktion in Schütteltrichter überführen, mit

2 ml Reagenz,
20 ml dest. H₂O und
10 ml Puffer

versetzen, schütteln, obere Phase in kolorimetrische Küvette überführen. (Farbbildung durchläuft bei 3 Minuten das Maximum.)

Ergebnisse

Abb. 1 zeigt die graphische Aufzeichnung einer Analyse. In den Tab. 1, 2 und 3 sind einige Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 1
Analyse von Böhlener Phenolöl

1. Löseverfahren:
1 Teil Phenolöl (in g) auf 10 Teile Laufmittel (in ml)
2. Auftragsmengen:
Probe 1: 225,2 mg in 2 ml Lösung (= 100%);
Probe 2: wie Probe 1.
3. Einzelergebnisse:

	Probe 1	Probe 2	Mittelwerte
	%	%	%
Brenzkatechin	5,8	4,9	5,4
Homobrenzkatechin	3,2	3,3	3,3
Isobrenzkatechin	1,8	1,9	1,9
übrige Alkyl-Brenzkatechine	2,6	2,5	2,5
Alkyl-Brenzkatechine insgesamt	7,6	7,7	7,7
Brenzkatechine insgesamt	13,4	12,6	13,1

Tabelle 2
Analyse von Rohphenolöl Lauchhammer

1. Löseverfahren:
1 Teil Rohphenolöl (in g) auf 10 Teile Laufmittel (in ml)
2. Auftragsmengen:
Probe 1: 306,9 mg in 3 ml Lösung (= 100%);
Probe 2: 409,2 mg in 4 ml Lösung (=100%).
3. Einzelergebnisse:

	Probe 1	Probe 2	Mittelwerte
	%	%	%
Brenzkatechin	2,3	2,3	2,3
Homobrenzkatechin	0,7	0,8	0,8
Isobrenzkatechin	0,6	0,7	0,6
übrige Alkyl-Brenzkatechine	0,3	0,3	0,3
Alkyl-Brenzkatechine insgesamt	1,6	1,8	1,7
Brenzkatechine insgesamt	3,9	4,1	4,0

Tabelle 3
Analyse von Sr 501

1. Löseverfahren:
Im Laufmittel mit 6% Butanol.
2. Auftragsmengen:
68,4 mg in 3 ml Lösung (= 100%).
3. Einzelergebnisse:

	%
Brenzkatechin	12,1
Homobrenzkatechin	18,4
Isohomobrenzkatechin	8,9
übrige Alkyl-Brenzkatechine	8,3
Alkyl-Brenzkatechine, insgesamt.	35,6
Brenzkatechine, insgesamt	47,7

Diskussion

Durch Übertragung der papierchromatographischen auf die säulenchromatographische Methodik für die Analyse der Brenzkatechine gelang es, technische Produkte ohne destillative Vortrennung bei einer aktiven Säulenlänge von 120 cm in 4 Gruppen aufzutrennen.

Brenzkatechin, als letzte Substanz eluiert, ist von seinen Derivaten sicher abtrennbar. Meist beträgt der Abstand mehr als 30 Fraktionen. Die Alkylderivate werden als mehr oder weniger zusammenhängende Gruppe eluiert, wobei Homobrenzkatechin sich noch scharf von den übrigen absetzt. Isohomobrenzkatechin ist weniger gut von dem meist sehr geringen Rest der anderen Alkyl-Brenzkatechine getrennt.

Eine Verlängerung der aktiven Säulenlänge auf wenige Meter würde zweifellos eine völlige Auftrennung der Polyphenole, wie sie papierchromatographisch ohne Schwierigkeiten erreichbar ist, möglich machen. Die in den Schwelprodukten vorkommenden Alkyl-Polyphenole würden dadurch in substantiellen Mengen zugänglich und könnten leicht identifiziert werden. Für analytische Zwecke ist unseres Erachtens die vorliegende Auftrennung jedoch ausreichend, da die wichtigsten und in fast allen Wässern und Produkten vorkommenden Alkylderivate Homo- und Isohomobrenzkatechin sicher erfaßt werden. Für die Abtrennung des Brenzkatechins von seinen Derivaten ist eine wesentlich kürzere Säule ausreichend. Sie kann kleiner als 30 cm sein. Es ist mit einer kurzen Säule von etwa 10—20 cm möglich, in relativ kurzer Zeit die Derivate des Brenzkatechins vom Brenzkatechin selbst abzutrennen und dieses gesondert quantitativ zu bestimmen.

Die vorliegende Arbeit beschränkte sich auf die Trennung von Brenzkatechinen, wobei die Produktenanalyse besondere Berücksichtigung

find. Die Analyse wäßriger Produkte, z. B. Schwelwasser, gelang nicht, es sei denn, daß die Phenole durch Extraktion in eine geeignete organische Phase überführt werden. Für die Wasseranalyse bleibt die von uns entwickelte Papierchromatographie der Polyphenole die Methode der Wahl. In analoger Weise, wie oben beschrieben, werden sich die anderen Polyphenole, im wesentlichen handelt es sich um Resorcine und Alkyl-Resorcine, trennen und bestimmen lassen. Die vorgelegte Arbeitsvorschrift und die aufgeführten Analysen-Beispiele erlauben es, die Methode für spezielle analytische Probleme auf dem Gebiet der Polyphenolbestimmung in Produkten anzuwenden.

Leipzig, Institut für Verfahrenstechnik der organischen Chemie, Forschungsgemeinschaft der naturwiss., techn. und med. Institute der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin.

Bei der Redaktion eingegangen am 25. November 1959.