

Trennung einiger Phenole und Phenolcarbonsäuren durch Dünnschicht-Chromatographie an Cellulose

Mehrere Autoren haben die Trennung von phenolischen Substanzen durch Dünnschicht-Chromatographie (DC) an Kieselgel beschrieben: SEEBOTH UND GÖRSCH¹, SEEBOTH², HILLER³, FRANKENFELD⁴, PIFFERI⁵, SCHMID *et al.*⁶, MCGREGOR UND KHAN⁷, STROBACH⁸. ROSEIRA UND GUEDES⁹ kuppelten die Phenole zunächst zu Farbstoffen und trennten diese dann durch DC an Kieselgel. WAKSMUNDZKI UND MAŃKO¹⁰ benutzten mit Formamid imprägniertes Kieselgel zur DC von Phenolen. CRABTREE UND MCGILL¹¹ verwendeten neben Kieselgel, Aluminiumoxyd und Polyamid auch mit Formamid und mit Dimethylformamid imprägniertes Kieselgel für die DC von Phenolen. BARK UND GRAHAM^{12,13} trennten Phenole durch DC an Aluminiumoxyd. BARK UND GRAHAM berichteten auch über DC von Phenolen an Cellulose, die mit Äthyloleat¹⁴⁻¹⁶ oder mit Polyamid¹⁷⁻¹⁹ imprägniert wurde. An reinem Polyamid trennten WANG²⁰, ENDRES UND HÖRMANN²¹, BHANDARI²² sowie SEGURA-CARDONA UND SOEHRING²³ einige phenolische Substanzen mittels DC. BIRKOFER, *et al.*²⁴, führten die DC von Polyphenolen und auch Phenolcarbonsäuren an Polyacrylnitril-Perlon durch. GRAU UND ENDRES²⁵ trennten Phenole an acetyliertem Polyamid.

Demgegenüber wurde Cellulose bisher nur selten für die DC phenolischer Verbindungen verwendet: VAN SUMERE *et al.*²⁶ nahmen Kieselgel G und Cellulose im Verhältnis 1:1 gemischt. AUDETTE *et al.*²⁷ mischten für die Trennung phenolischer Glykoside durch DC Polyamid mit Cellulose im Verhältnis 2:1. BARTON²⁸ trennte phenolische Holzbestandteile durch DC an Kieselgel und auch an mikrokristalliner Cellulose. MOHR²⁹ konnte einige aromatische Polyhydroxy-Verbindungen an Cellulose MN 300 trennen. POTTER, VOCHTEN UND DE SCHAEPPDRYVER³⁰ benutzen MN 300 für die DC von Katecholaminen und einigen ihrer Stoffwechselprodukte. GRANT UND WHETTER³¹ versuchten die Trennung phenolischer Pflanzenbestandteile durch DC, sie hatten jedoch mit Kieselgel-Schichten bedeutend bessere Trennungen als mit Cellulose oder Polyamid. DITTMANN³² nahm MN 300 zum Nachweis erhöhter Urin-Ausscheidungen von 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure durch DC. LEHMANN, HAHN UND MARTINOD³³ wiesen Chlorogensäure durch DC von Pflanzenextrakten an MN 300-Cellulose nach.

Ziel unserer Untersuchungen war die Trennung einer grösseren Zahl von Phenolen und Phenolcarbonsäuren durch DC an Cellulose. Einige Indol-Derivate — von GLOMBITZA^{34,35} bereits mit Erfolg an Kieselgel-Schichten chromatographiert — mit Bedeutung in der klinischen Chemie wurden ebenfalls chromatographiert.

Material

Streichgerät für konstante Schichtdicke und DC-Grundausrüstung Fa. Desaga, Heidelberg; Cellulosepulver MN 300 Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren; Essigsäure-äthylester p.A., *n*-Propanol p.A., wässr. NH₃-Lösung, 25 %, p.A., Amylalkohol zur Fettbestimmung nach GERBER, Ameisensäure, 98-100 %, p.A., *n*-Heptan, Methanol p.A., Tetrachlorkohlenstoff reinst, alles E. Merck AG, Darmstadt.

Methode

Beschichtung

15 g MN 300 wurden in einem Mixgerät 30 Sek. mit 90 ml Wasser verrührt und

anschliessend auf 5 sorgfältig entfettete (Soda-Lösung) und gewaschene Glasplatten von $20 \times 20 \text{ cm}^2$ Grösse aufgetragen. Für die Beschichtung 5 weiterer Platten mit dem inzwischen nicht gesäuberten Streichgerät genügt die Suspension von 10 g Cellulose in 60 ml Wasser. Die Platten werden zunächst 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und dann 4 Stunden auf 105° erwärmt. Abkühlung und Aufbewahrung im Exsikkator über Silikagel³⁶.

Entwicklung

Es wird nur eindimensional gearbeitet, weil bei zweidimensionaler DC der Phenole die Flecke stark verlaufen.

System I. Essigsäureäthylester-*n*-Propanol-25 %ig. NH_3 (30:50:20, v/v/v)³². Entwicklung zweimal 10 cm mit 30 Min. Zwischentrocknung, keine Kammersättigung.

System II. Amylalkohol-Ameisensäure-Wasser (40:40:2, v/v/v)³⁷. Entwicklung einmal 12 cm ohne Kammersättigung.

System III. *n*-Propanol-Wasser (65:35, v/v). Entwicklung einmal 15 cm ohne Kammersättigung.

System IV. *n*-Heptan-Tetrachlorkohlenstoff-Methanol (70:40:30, v/v/v). Vor dem Auftragen der Proben Vorwäsche der Cellulose-Schicht durch Laufenlassen einmal 15 cm mit Kammersättigung (Entwicklerrog rundum 15 cm hoch mit Filterpapier ausgelegt, Papier vor Beginn der Entwicklung durch Schwenken des Troges mit Lösung getränkt); spätere Entwicklung ebenfalls einmal 15 cm mit Kammersättigung, gleiches Gefäss, doch frisches Lösungsmittel.

Nachweise

*Diazotiertes p-Nitroanilin*³⁸. Lösung A: 1.9 g *p*-Nitroanilinhydrochlorid in 45 ml konz. HCl + 950 ml Wasser gelöst. Lösung B: 5 %ige Lösung von NaNO_2 in Wasser. Lösung C: 10 %ige Lösung von Na_2CO_3 in Wasser.

Unmittelbar vor Gebrauch werden 10 Vol. kalter Lösung A zu 0.2 Vol. frischer Lösung B gegeben, nach Entfärbung werden 10 Vol. Lösung C zugefügt.

*Diazotierte Sulfanilsäure*³⁸. Lösung A: 9 g Sulfanilsäure in 90 ml konz. HCl + 900 ml Wasser gelöst. Lösung B: wie bei vorstehendem Reagenz. Lösung C: wie bei vorstehendem Reagenz.

*Ninhydrin-Reagenz*³⁶. 250 mg Ninhydrin werden in 95 ml Methanol + 5 ml 2,4,6-Collidin gelöst, nach Besprühen wird die Platte *ca.* 30 Min. auf 70° erwärmt.

Ehrlich-Reagenz. 2 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd werden in 100 ml 20 %iger HCl gelöst; 1 Vol. dieser Lösung wird mit 1 Vol. Äthanol verdünnt.

Ergebnis

Über die R_F -Werte in den vier Entwickler-Systemen unterrichtet die Tabelle I. Hinter den mittleren R_F -Werten ist jeweils die Standardabweichung ($n = 4$ bis 16) angegeben. Die R_F -Werte wurden im Laufe längerer Zeit mit verschiedenen Chargen MN 300 ermittelt. Um aus der Tabelle I abzulesen, ob sich zwei Substanzen mit einem Entwickler-System trennen lassen, darf man nicht nach den Methoden der Statistik vorgehen, weil die Differenz der R_F -Werte innerhalb homologer Reihen von Substanzen viel weniger schwankt als die R_F -Werte selbst. Beispielsweise lassen sich *o*- und *m*-Kresol mit System IV trennen, obwohl die Differenz der R_F -Werte kleiner ist als die Summe der Standardabweichungen. Allgemein lassen sich zwei Substanzen

TABELLE I

MIT DIAZOTIERTEM *p*-NITROANILIN NACHGEWIESENE MENGEN DER SUBSTANZEN UND R_F -WERTE IN DEN VERSCHIEDENEN ENTWICKLER-SYSTEMEN

Substanz	Menge (μg)	System I	System II	System III	System IV
Phenol	0.2	I	I	I	0.38 ± 0.03
<i>o</i> -Kresol	0.2	I	I	I	0.48 ± 0.03
<i>m</i> -Kresol	0.1	I	I	I	0.43 ± 0.03
<i>p</i> -Kresol	I	I	I	I	0.42 ± 0.04
Thymol (3-Methyl-6-isopropylphenol)	0.5	I	I	I	0.69 ± 0.05
Brenzkatechin (1,2-Dihydroxybenzol)	0.2	I	0.82 ± 0.06	0.95 ± 0.02	0.29 ± 0.01
Resorcin (1,3-Dihydroxybenzol)	0.04	I	0.76 ± 0.02	0.97 ± 0.02	0.28 ± 0.02
Hydrochinon (1,4-Dihydroxybenzol)	1.3	Zers.	0.76 ± 0.03	0.96 ± 0.03	0.28 ± 0.02
Orcin (5-Methyl-1,3-dihydroxybenzol)	0.1	I	0.81 ± 0.03	0.96 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Pyrogallol (1,2,3-Trihydroxybenzol)	1.0	0.31 ± 0.03	0.60 ± 0.04	0.88 ± 0.01	0.22 ± 0.02
Phloroglucin (1,3,5-Trihydroxybenzol)	0.1	0.15 ± 0.02	0.46 ± 0.04	0.89 ± 0.02	0.19 ± 0.01
<i>m</i> -Hydroxybenzoesäure	0.1	0.51 ± 0.04	0.84 ± 0.04	0.97 ± 0.02	0.25 ± 0.04
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	0.1	0.24 ± 0.02	0.83 ± 0.03	I	0.28 ± 0.04
Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure)	0.5	0.01 ± 0.01	0.66 ± 0.04	0.80 ± 0.12	0.20 ± 0.03
Vanillinsäure (4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure)	0.1	0.17 ± 0.03	0.85 ± 0.02	0.97 ± 0.05	0.28 ± 0.05
α -Resorcyllsäure (3,5-Dihydroxybenzoesäure)	0.05	0.15 ± 0.04	0.61 ± 0.04	0.89 ± 0.04	0.21 ± 0.03
β -Resorcyllsäure (2,4-Dihydroxybenzoesäure)	0.05	0.27 ± 0.06	0.80 ± 0.03	0.88 ± 0.07	0.13 ± 0.02
<i>o</i> -Hydroxyphenylelessigsäure	0.05	0.88 ± 0.05	0.84 ± 0.02	I	0.26 ± 0.04
<i>m</i> -Hydroxyphenylelessigsäure	0.05	0.51 ± 0.09	0.82 ± 0.02	I	0.24 ± 0.04
<i>p</i> -Hydroxyphenylelessigsäure	0.2	0.50 ± 0.06	0.82 ± 0.02	I	0.26 ± 0.03
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	0.2	0.02 ± 0.02	0.64 ± 0.04	0.70 ± 0.12	0.16 ± 0.04
Homovanillinsäure (4-Hydroxy-3-methoxyphenylelessigsäure)	0.2	0.45 ± 0.09	0.83 ± 0.02	I	0.25 ± 0.01
Homogentisinsäure (2,5-Dihydroxyphenylelessigsäure)	0.5	Zers.	0.63 ± 0.03	0.92 ± 0.07	0.16 ± 0.03
3,4-Dihydroxymandelsäure	0.2	Zers.	0.48 ± 0.05	0.54 ± 0.04	0.05 ± 0.01
3-Hydroxy-4-methoxymandelsäure	0.05	0.28 ± 0.04	0.69 ± 0.03	0.61 ± 0.03	langgezogen
4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure ("Vanillinmandelsäure")	0.05	0.27 ± 0.05	0.69 ± 0.03	0.69 ± 0.13	langgezogen
γ -(<i>p</i> -Hydroxy)-phenylpropionsäure	0.1	0.64 ± 0.09	0.83 ± 0.09	I	0.25 ± 0.04
<i>p</i> -Hydroxyphenylmilchsäure	0.05	0.46 ± 0.04	0.71 ± 0.04	0.87 ± 0.08	0.11 ± 0.04
<i>p</i> -Cumarsäure (<i>trans-p</i> -Hydroxyzimtsäure)	0.05	0.32 ± 0.07	0.84 ± 0.05	0.95 ± 0.07	0.27 ± 0.03
Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure)	0.2	0.21 ± 0.04	0.85 ± 0.04	0.98 ± 0.03	0.25 ± 0.02

(Fortsetzung S. 767)

TABELLE I (Fortsetzung)

Substanz	Menge (μg)	System I	System II	System III	System IV
L-Adrenalin (L-Suprarenin)	0.1	Zers.	Zers.	0.60 ± 0.05	0.13 ± 0.01
Noradrenalin (Arterenol)	0.1	Zers.	Zers.	0.56 ± 0.04	0.08 ± 0.01
Homoveratrylamin (3,4-Dimethoxyphenyläthylamin)		flüchtig	0.86 ± 0.02	0.79 ± 0.04	0.12 ± 0.02 (langgezogen)
Histidin	0.5	0.19 ± 0.02	0.52 ± 0.08	0.21 ± 0.04	0
Phenylalanin		0.69 ± 0.03	0.79 ± 0.03	0.72 ± 0.03	verlaufen
Tyrosin	0.1	0.33 ± 0.03	0.65 ± 0.05	0.59 ± 0.03	0.04 ± 0.02 (langgezogen)
DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanin)	0.4	Zers.	0.50 ± 0.05	0.39 ± 0.03	0.02 ± 0.02
Tryptophan	0.4 *	0.56 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.62 ± 0.02	langgezogen
Indolyl-3-essigsäure	0.3 *	0.63 ± 0.04	0.87 ± 0.03	I	0.27 ± 0.03
5-Hydroxyindolyl-3-essigsäure	0.2 *	0.39 ± 0.07	0.63 ± 0.03	I	0.16 ± 0.03
3-Indoxylschwefelsaures Kalium (Harnindikan)	0.5 *	0.80 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.82 ± 0.05 Nebenfleck:	0.33 ± 0.02 0.16 ± 0.03
Harnstoff	0.3 *	0.64 ± 0.03	0.67 ± 0.04	0.67 ± 0.04	0.08 ± 0.01

* Die Indol-Derivate und Harnstoff wurden mit Ehrlich-Reagenz nachgewiesen.

voneinander trennen, wenn die Differenz der R_F -Werte *ca.* 0.04 beträgt. Die wirksamsten Trennungen erreicht man mit den Systemen I und II. Das System III ist für die Trennung von phenolischen Verbindungen nicht gut brauchbar; es bewährt sich aber sehr bei der DC der Aminosäuren und Amine, die einigen Phenolen stoffwechselfähig verwandt sind. Auch das System IV ist nicht universell anwendbar; es bietet aber die Möglichkeit, die einwertigen Phenole von allen anderen Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit chromatographiert wurden, abzutrennen. DC einwertiger Phenole an nicht-imprägnierter Cellulose war bisher nicht möglich.

In der Spalte "Menge" ist jeweils die Menge einer Substanz angegeben, die mit diazotiertem *p*-Nitroanilin nachgewiesen wurde. Diese Menge beträgt jeweils etwa das Doppelte der minimal nachweisbaren Menge. Mit diazotierter Sulfanilsäure sind etwa die gleichen Mengen nachweisbar; in einigen Fällen ist allerdings der Nachweis mit letzterem Reagenz etwas weniger empfindlich.

Bei *p*-Kresol, Homoveratrylamin und Phenylalanin sind in der Tabelle I keine Mengen angegeben, weil diese drei Substanzen nicht mit diazotiertem *p*-Nitroanilin zu einem Farbstoff reagieren. *p*-Kresol (0.2 μg) wurde mit diazotierter Sulfanilsäure nachgewiesen, Homoveratrylamin (0.1 μg) und Phenylalanin (0.3 μg) mit Ninhydrin-Reagenz. Brenzkatechin lieferte mit diazotierter Sulfanilsäure keinen Farbstoff. Anwendung von Ninhydrin-Reagenz steigert die Empfindlichkeit der Nachweise von Histidin und DOPA wesentlich gegenüber den in der Tabelle angegebenen Mengen.

Allgemein wird man dadurch zusätzliche Möglichkeiten der Unterscheidung und Identifizierung getrennter Substanzen schaffen, dass man eine Analysenlösung

mehrmals mit dem gleichen System entwickelt, aber jede Platte mit einem anderen Reagenz besprüht. Zu erwähnen sind hier 2,6-Dichlorchinonchlorimid³⁹, α,α' -Dipyridyl⁴⁰ und Chlor/*o*-Tolidin-Reagenz⁴¹. Zur weiteren Orientierung sei besonders hingewiesen auf das von STAHL⁴² herausgegebene Handbuch.

Neurochirurgische Klinik, Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar (Deutschland)

JÜRGEN DITTMANN*

- 1 H. SEEBOTH UND H. GÖRSCH, *Chem. Tech. (Berlin)*, 15 (1963) 294.
- 2 H. SEEBOTH, *Fortschr. Wasserchem.*, 65 (1965) 128.
- 3 K. HILLER, *Pharmazie*, 20 (1965) 353.
- 4 J. W. FRANKENFELD, *J. Chromatog.*, 18 (1965) 179.
- 5 P. G. PIFFERI, *Vitis*, 5 (1965) 24.
- 6 E. SCHMID, B. LAUDI, J. KRAUTHEIM UND N. A. TAUTZ, *Z. Klin. Chem.*, 4 (1966) 250.
- 7 R. F. MCGREGOR UND M. KHAN, *Clin. Chim. Acta*, 14 (1966) 844.
- 8 H. STROBACH, *Z. Klin. Chem.*, 5 (1967) 77.
- 9 A. N. ROSEIRA UND L. C. GUEDES, *J. Chromatog.*, 23 (1966) 483.
- 10 A. WAKSMUNDZKI UND R. MAŃKO, in K. MACEK UND I. M. HAIS (Herausgeber), *Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography*, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, and Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1965, S. 221.
- 11 A. N. CRABTREE UND A. E. J. MCGILL, *Mikrochim. Acta*, (1967) 85.
- 12 L. S. BARK UND R. J. T. GRAHAM, *J. Chromatog.*, 23 (1966) 120.
- 13 L. S. BARK UND R. J. T. GRAHAM, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 347.
- 14 L. S. BARK UND R. J. T. GRAHAM, *Talanta*, 13 (1966) 1281.
- 15 L. S. BARK UND R. J. T. GRAHAM, *J. Chromatog.*, 23 (1966) 417.
- 16 L. S. BARK UND R. J. T. GRAHAM, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 357.
- 17 L. S. BARK UND R. J. T. GRAHAM, *J. Chromatog.*, 27 (1967) 109.
- 18 L. S. BARK UND R. J. T. GRAHAM, *J. Chromatog.*, 27 (1967) 116.
- 19 L. S. BARK UND R. J. T. GRAHAM, *J. Chromatog.*, 27 (1967) 131.
- 20 K. T. WANG, *J. Chinese Chem. Soc., Ser. II*, 8 (1961) 241 (zitiert nach Referat in: *Angew. Chem.*, 75 (1963) 109).
- 21 H. ENDRES UND L. HÖRMANN, *Angew. Chem.*, 75 (1963) 288.
- 22 P. R. BHANDARI, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 130.
- 23 R. SEGURA-CARDONA UND K. SOEHRING, *Med. Exptl.*, 10 (1964) 251.
- 24 L. BIRKOFER, C. KAISER, H. A. MEYER-STOLL UND F. SUPPAN, *Z. Naturforsch.*, 17b (1962) 352.
- 25 W. GRAU UND H. ENDRES, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 585.
- 26 C. F. VAN SUMERE, G. WOLF, H. TEUCHY UND J. KINT, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 48.
- 27 R. C. S. AUDETTE, G. BLUNDEN, J. W. STEELE UND C. S. C. WONG, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 367.
- 28 G. M. BARTON, *J. Chromatog.*, 26 (1967) 320.
- 29 W. MOHR, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 64 (1962) 739, 831.
- 30 W. P. DE POTTER, R. F. VOCHTEN UND A. F. DE SCHAEPPDRYVER, *Experientia*, 21 (1965) 482.
- 31 W. F. GRANT UND J. M. WHETTER, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 247.
- 32 J. DITTMANN, *Z. Klin. Chem.*, 4 (1966) 265.
- 33 G. LEHMANN, H.-G. HAHN UND P. MARTINOD, Mitarbeit O. LUZURIAGA, *Deut. Lebensm.-Rundschau*, 63 (1967) 144.
- 34 K.-W. GLOMBITZA, *J. Chromatog.*, 19 (1965) 320.
- 35 K.-W. GLOMBITZA, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 87.
- 36 J. DITTMANN, *Z. Klin. Chem.*, 1 (1963) 190.
- 37 A. SCHWEIGER, *Z. Lebensm.-Untersuch. Forsch.*, 124 (1963) 20.
- 38 I. SMITH, *Chromatographic Techniques*, Heinemann, London, 1958, S. 194-195.
- 39 E. MERCK AG, *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, Vorschrift Nr. 59*.
- 40 G. M. BARTON, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 189.
- 41 S. H. WEBER UND A. LANGEMANN, *Helv. Chim. Acta*, 48 (1965) 1.
- 42 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie, Ein Laboratoriumshandbuch*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 1967, S. 813.

Eingegangen den 6. September 1967

* Mit technischer Assistenz von G. LIEM UND M. WÖLK.