

Note

Praktische Erfahrungen über Nachweis und dünnschichtchromatographische Trennung von Phenolen im Hinblick auf eine quantitative Analyse

R. KLAUS*

Fichtestrasse 25, D-6100 Darmstadt (B.R.D.)

und

W. FISCHER und H. BAYER

E. Merck, Postfach 4119, D-6100 Darmstadt (B.R.D.)

(Eingegangen am 16. März 1987)

In den letzten Jahren fanden phenolische Substanzen als Schadstoffe zunehmend Beachtung. Neben der Gas- und Hochdruckflüssigchromatographie ist hierbei die Dünnschichtchromatographie fester Bestandteil bei qualitativen und quantitativen Analysen. Die seit jeher sehr umfangreichen Literaturangaben zu dünnschichtchromatographischen Analysenmöglichkeiten versuchen u.a. in ein- und zweidimensionalen Lageplänen die Vielzahl von phenolischen Verbindungen zu fixieren¹⁻⁸. Ein nicht unwesentlicher Faktor für die Übertragbarkeit solcher Netzarten ist die Reproduzierbarkeit der R_F -Werte. So sehr Einkomponentenfließmittel¹⁻⁸ dieser Forderung entgegenkommen, beschränken sie doch auf der anderen Seite die geometrische Selektivität. Es zählt zu den Vorteilen der Dünnschichtchromatographie, durch *in situ*-Reaktionen substanzspezifische Anfärbungen^{1,3,5,9-15} zu erreichen und auf diese Weise den Informationsgehalt der Methode zu erhöhen.

Unter diesem Gesichtspunkt sind hier *in situ*-Derivatisierungen mit Vanadinpentoxyd bzw. Dichlorfluorescein beschrieben, zwei Reaktionen, deren Anwendung in der Phenolanalytik bisher nicht mitgeteilt ist.

An Hand einiger Polaroidaufnahmen werden mit diesen dünnschichtchromatographische Trennmöglichkeiten für eine begrenzte Anzahl¹ von in der Natur häufiger vorkommenden oder von der Industrie produzierten bzw. verwendeten, sowie in industriellen Abwässern nachweisbaren phenolischen Verbindungen veranschaulicht. So werden z.B. Trennungen von Hydroxybenzolen, Chlorphenolen, Methyl- und Dimethylphenolen sowohl auf Kieselgel-Schichten als auch auf RP-Schichten vorgestellt.

ÜBER DEN NACHWEIS VON PHENOLEN

Aus dem Bereich der rein spektroskopischen Nachweisverfahren bieten sich für die Analyse von Phenolen zunächst die UV-Absorption^{16,17} und Fluoreszenz¹⁸ an. Beide Detektionen finden allerdings in der Dünnschichtchromatographie und hier besonders bei *in situ*-Techniken relativ wenig Anwendung, obwohl sie nicht selten

über die chromatographische Trennung hinausgehende Differenzierungen zwischen den Komponenten erlauben. Fig. 1 veranschaulicht photometrische Möglichkeiten mit den UV-Absorptionskurven einer chromatographischen Trennung von 13 Phenolen im Wellenlängenbereich $238 \text{ nm} < \lambda < 313 \text{ nm}$. Bezüglich der aus den Registrierungen abschätzbaren Empfindlichkeiten sei eine in der Legende vorgenommene Umrechnung der Auftragungsmengen beachtet.

Von den erprobten älteren Reaktionen ist sehr effektiv die Umsetzung mit Dichlorchinonchlorimid. Diese wird mit Fig. 2 den beiden bereits erwähnten *in situ*-Derivatisierungen mit Vanadinpentoxyd bzw. Dichlorfluorescein gegenüberge-

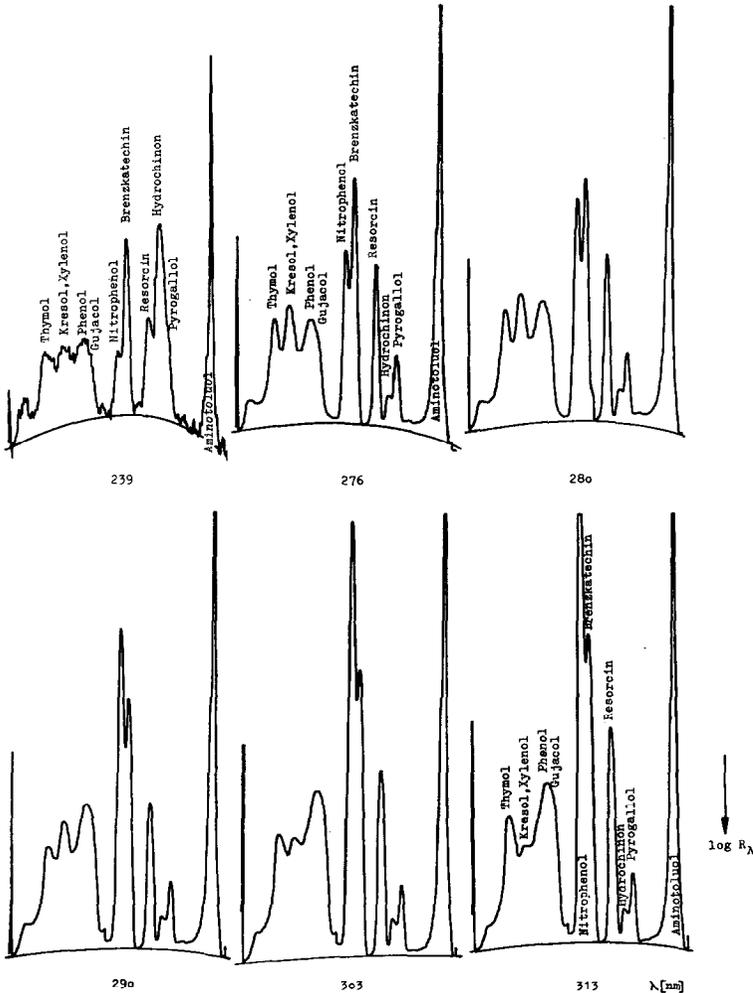


Fig. 1. UV-Absorptionsphotometrischer Nachweis der chromatographischen Trennung von 13 Phenolen von Fig. 2, jedoch ohne Derivatisierung, Bahn 2, Auftragungsmengen $5 \mu\text{l}$ je $1 \mu\text{g}$ bzw. umgerechnet entsprechend dem Verhältnis Bandlänge/Photometerspalthöhe von $18 \text{ mm}/7 \text{ mm}$ je 400 ng . Chromatogrammspektrophotometer, Messfläche $0,1 \times 7 \text{ mm}$, Registriergeschwindigkeit von Chromatogramm und Papier $30 \text{ mm}/\text{min}$. Schreibermessbereich 200 mV .

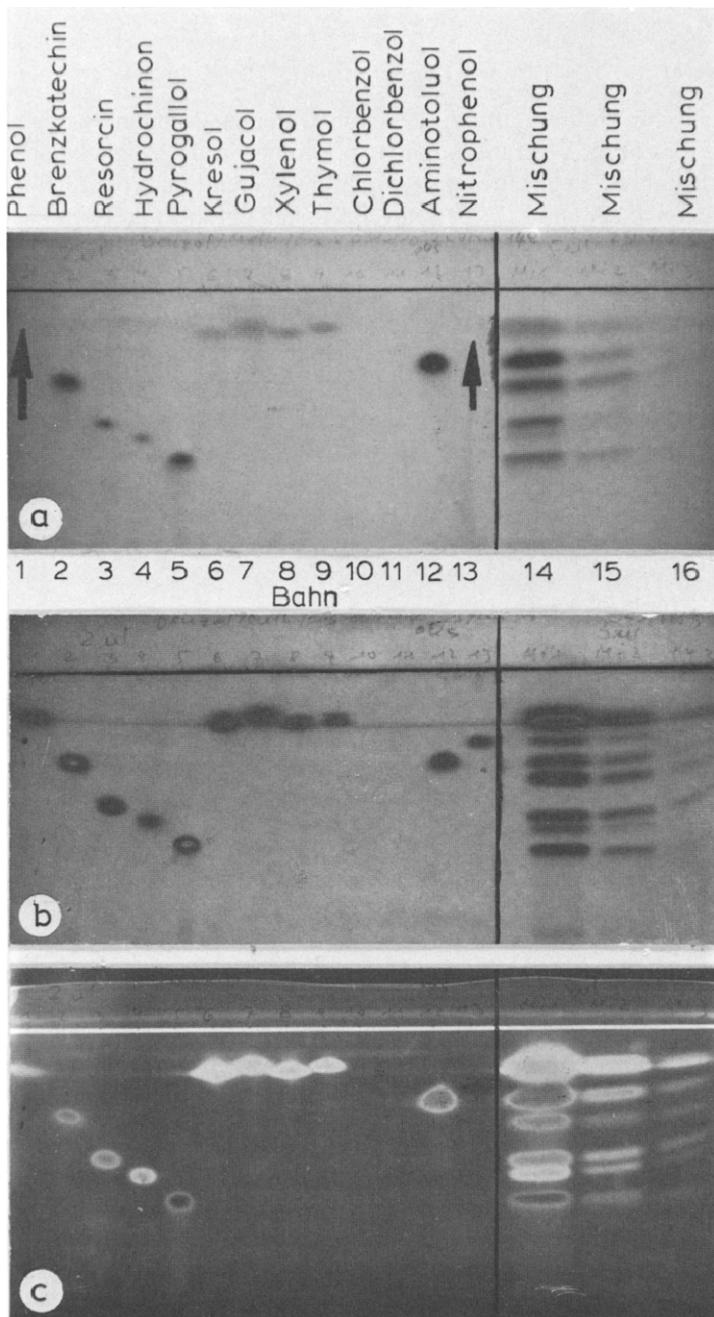


Fig. 2. Gegenüberstellung von drei *in situ*-Reaktionen zum Nachweis von Phenolen mit HPTLC-Chromatogrammen. Schicht: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 10 × 20 cm; Fließmittel: Benzol-Methanol-Eisessig (80:10:10); Normalkammer ohne Kammersättigung, Steighöhe 2 × 7 cm. Derivatisierung *in situ*: (a) Tauchlösung: Dichlorchinonchlorimid 1%ig in Äthanol, Tauchzeit ca. 10 s. Nachweis: Absorption. (b) Sprühhlösung: 18 g Vanadinpentoxyd in 300 ml 1 M Natriumcarbonatlösung unter Erwärmen lösen, abkühlen, 460 ml 2,5 M Schwefelsäure hinzufügen, mischen und auf 1 l auffüllen. Nachbehandlung: Heizplatte ~ca. 100°C bis Farbentwicklung. Nachweis: Absorption. (c) Tauchlösung: Dichlorfluorescein 0,5%ig in Äthanol, Bleitetraacetat gesättigte Lösung in Eisessig je 5 ml mit Toluol auf 200 ml auffüllen. Tauchzeit ca. 10 s. Nachbehandlung: Heizplatte ca. 100°C, 1–2 min. Nachweis: Fluoreszenz. Auftragung: Bahn 1 = Phenol; 2 = Brenzkatechin; 3 = Resorcin; 4 = Hydrochinon; 5 = Pyrogallol; 6 = Kresol; 7 = Gujacol; 8 = 2,4-Xylenol; 9 = Thymol; 10 = Chlorbenzol; 11 = 1,3-Chlorbenzol; 12 = 2-Aminotuluol; 13 = 4-Nitrophenol. Bahn 14–16: Mischungen von Bahn 1–13. Auftragungsmengen: Bahn 1–13: 2 µl (ca. 4 µg); Bahn 14: 5 µl (je ca. 5 µg); Bahn 15: 5 µl (je ca. 1 µg); Bahn 16: 5 µl (je ca. 0.2 µg).

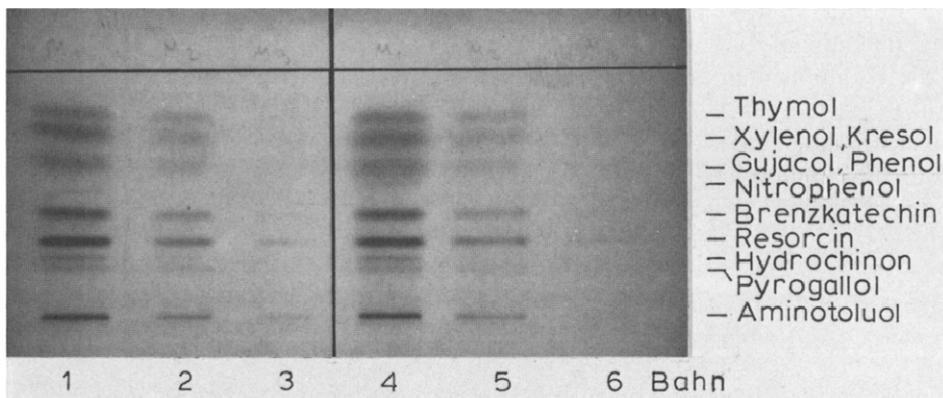


Fig. 3. Chromatographische Trennung von Mischungen der 13 Phenole der Fig. 2. Auftragungsmengen (Band): Bahn 1 und 4; 5 μ l (je ca. 5 μ g); Bahn 2 und 5, 5 μ l (je ca. 1 μ g); Bahn 3 und 6, 5 μ l (je ca. 0,2 μ g). Schicht: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 10 × 20 cm. Konzentrierung *in situ*: Äthanol-Wasser-Eisessig (40:5:5). Vorgang: Nach der Auftragung mit dem Konzentrierungsfließmittel bis einige mm über den Auftragungspunkt entwickeln. Fließmittel: Petroläther-Diäthyläther-Ameisensäure (70:25:5). Normalkammer ohne Kammersättigung, Steighöhe 1 × 7 cm Derivatisierung und Nachweis analog Fig. 2a.

stellt. Während die Reaktion mit Dichlorchinonchlorimid zu verschiedenen gefärbten Indophenolverbindungen führt, resultieren aus der Vanadinpentoxyd-Reaktion¹⁹ blaue Farbstoffe, aus der Dichlorfluorescein-Reaktion^{20,21} fluoreszierende Verbindungen, mit zum Teil deutlichen Unterschieden einiger Nachweisbarkeiten. Die bei dem Chromatogramm der Fig. 4 angewandte Variante der Dichlorchinonchlorimid-Reaktion (Fig. 2 und 3) bietet gegenüber dieser verbesserte Nachweismöglichkeiten für alle Verbindungen. Es sei allerdings erwähnt, dass sich bedingt durch die Löslichkeit der Verbindungen in der Reaktionslösung in diesem Falle selbst die Sprühtechnik als äusserst kritisch erweist.

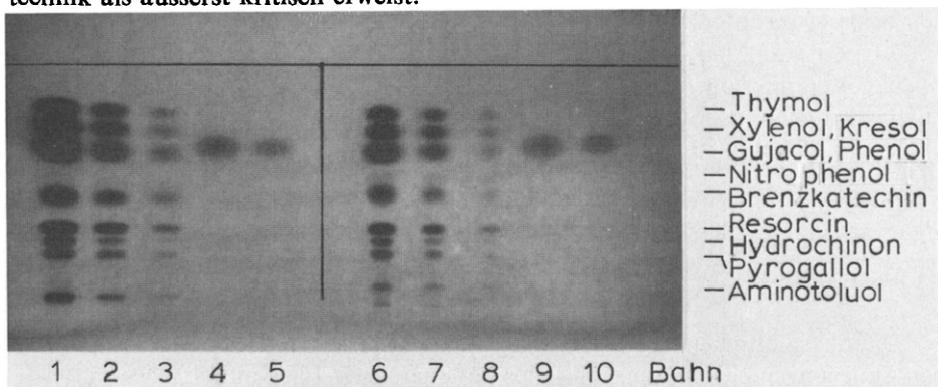


Fig. 4. Chromatogramm analog Fig. 3, jedoch Auftragungsmengen (Punkt): Bahn 1 = Mischung, 5 μ l (je ca. 5 μ g); Bahn 2 = Mischung, 5 μ l (je ca. 1 μ g); Bahn 3 = Mischung, 5 μ l (je ca. 0,2 μ g); Bahn 4 = Phenol, 5 μ l (10 μ g); Bahn 5 = Phenol, 5 μ l (4 μ g); Bahn 6 = Mischung, 2 μ l (je ca. 2 μ g); Bahn 7 = Mischung, 2 μ l (je ca. 0,4 μ g); Bahn 8 = Mischung, 2 μ l (je ca. 0,08 μ g). Schicht, Konzentrierung und Fließmittel wie bei Fig. 3. Derivatisierung: *in situ*. Sprühlösungen (nach Gibbs): I = Dibromchinonchlorimid 0,4%ig in Methanol; II = Natriumkarbonat wasserfrei 5%ig; 5 g mit 60 ml Wasser lösen, 40 ml Methanol zugeben. Mit I ca. 45 s anschliessend mit II bis zur Pergamenttransparenz ansprühen. Nachweis: Absorption.

Für quantitative photometrische *in situ*-Analysen sind Chromatogramme mit Vanadinpentoxyd- bzw. Dichlorfluorescein-Derivatisierung bevorzugt geeignet: Die für die Komponenten annähernd gleichen Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektren erlauben im Gegensatz zur Dichlorchinonchlorimid-Reaktion Registrierungen der einzelnen Bahnen unter gleichen photometrischen Bedingungen. Auf eine analytische Ausnutzung unterschiedlicher Nachweisbarkeiten sei hier lediglich im Zusammenhang mit Spurenuntersuchungen z.B. zur Reduzierung von Matrixeffekten hingewiesen.

CHROMATOGRAPHIE UND NACHWEIS PHENOLISCHER VERBINDUNGEN ALS BESTANDTEILE VON DESINFEKTIONSMITTELN

Eine Anwendung der für einfache Phenole getesteten *in situ*-Reaktionen auf phenolische Verbindungen mit Strukturen wie sie zum Teil in Desinfektionsmitteln Verwendung finden, soll weitere Nachweismöglichkeiten vorstellen. Auslösend für den Versuch war nicht zuletzt ein Haltbarkeitstest eines im Handel erhältlichen Präparates.

Von dem drei phenolische Wirkstoffe enthaltenden Konzentrat sind Chargen aus den Jahren 1979 und 1986 neben den entsprechenden Vergleichen—diese in den deklarierten Mengen der Konzentrate— mit den Chromatogrammen der Fig. 5 gegenüber gestellt.

Eine visuelle Beurteilung der Chromatogramme nach den einzelnen *in situ*-Derivatisierungen lässt die Überlegenheit der zu fluoreszierenden Verbindungen führenden Dichlorfluorescein-Reaktion sowohl gegenüber der Dibromchinonchlorimid-Reaktion als auch gegenüber der Vanadinpentoxyd-Reaktion erkennen. So führt die im Falle Dibromchinonchlorimid allein anwendbare Sprühtechnik bei geringer Ansprühung zu einem sommersprossenartigen Untergrund, bei nur wenig stärkerer Ansprühung bereits zu einem Migrationseffekt. Der relativ geringe Spielraum zwischen diesen beiden Varianten lässt diese Reaktion trotz ihres guten Nachweiseffektes für quantitative *in situ*-Analysen weniger geeignet erscheinen. Die aufgrund einer starken farblichen Veränderung der Charge 1979 vermutete Zersetzung des Konzentrates konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch eine visuelle Abschätzung der Komponenten von Charge 1979-Charge 1986-Vergleiche liess keine Mengenunterschiede erkennen.

CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON PHENOLEN IN EINEM REVERSED-PHASE-SYSTEM RP-18-BENZOL

Die physikalischen Eigenschaften von Kieselgelschichten erweisen sich gegenüber Änderungen chromatographischer Parameter wie Fließmittel, Fließmittelmischzusammensetzungen, hier im Besonderen Derivatisierungen und thermische Aktivierungen als optimal. So sind auch für die Chromatogramme Figs. 1–5 HPTLC Fertigplatten Kieselgel 60 verwendet. Die Universalität von RP-Schichten ist demgegenüber zwar eingeschränkt, sie bieten jedoch aufgrund ihrer weniger polaren Eigenschaften mit geeigneten Fließmitteln zusätzliche Möglichkeiten bei der Stofftrennung^{5–6,7}. Fig. 6 zeigt eine solche Anwendung von RP-Schichten bei der Trennung von 20 Phenolen. Als Fließmittel dient Benzol. Die Interpretation des Chromato-

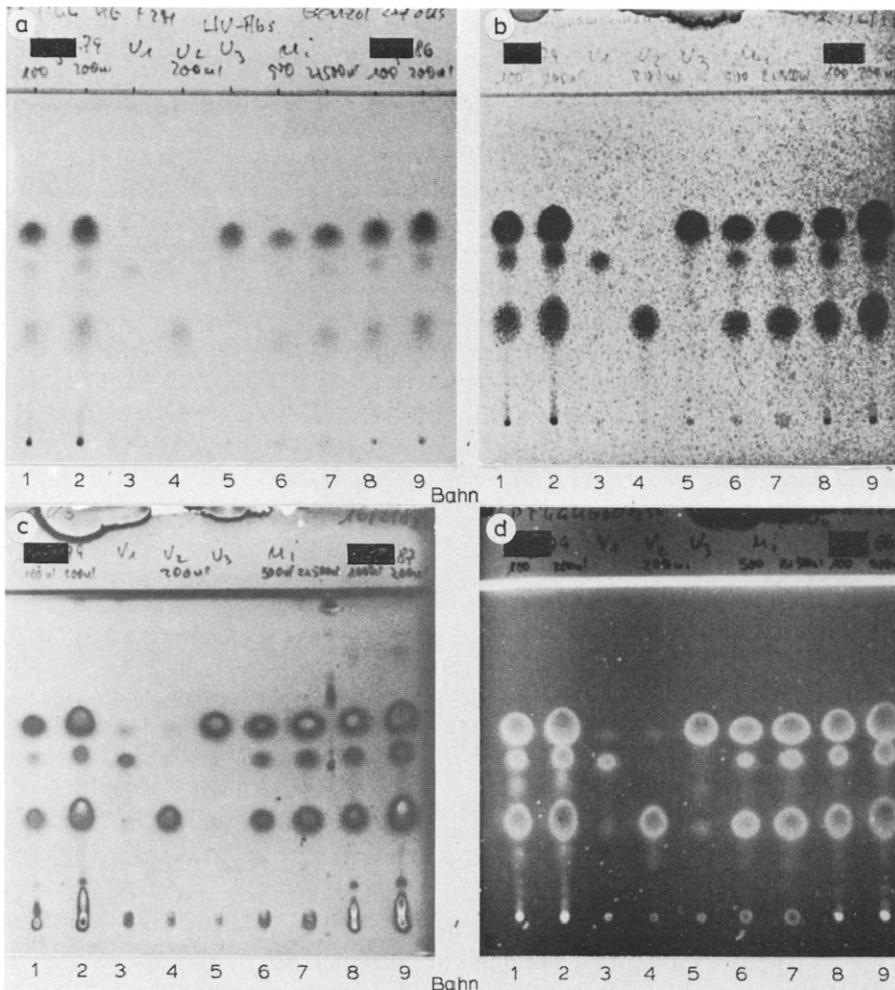


Fig. 5. Analyse eines phenolischen Desinfektionsmittels. Schicht: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 10 × 20 cm. Fließmittel: Benzol, Normalkammer ohne Kamersättigung, Steighöhe 2 × 7 cm. Derivatisierung: *in situ*. (a) Ohne Derivatisierung, Nachweis UV-Absorption (Fluoreszenzminderung). (b) Wie bei Fig. 4 (Dibromchinonchlorimid), Nachweis Absorption. (c) Wie bei Fig. 2b (Vanadinpentoxyd), Nachweis Absorption. (d) Wie bei Fig. 2c (Dichlorfluorescein), Nachweis Fluoreszenz. Auftragung: Bahn 1 = Probe 1979, Auftragungsvolumen 100 nl; Auftragungsmengen entsprechend der Deklaration des Herstellers: 2-Benzyl-4-Chlorphenol 1 µg; 4-Chlor-3-Methylphenol 4,5 µg; 2-Phenylphenol 7 µg; Bahn 2 = Probe 1979, 200 nl; Bahn 3 = 2-Benzyl-4-Chlorphenol, 200 nl (1 µg); Bahn 4 = 4-Chlor-3-Methylphenol, 200 nl (4,5 µg); Bahn 5 = 2-Phenylphenol, 200 nl (7 µg); Bahn 6 = Mischung von 2-Benzyl-4-Chlorphenol, 4-Chlor-3-Methylphenol und 2-Phenylphenol, 500 nl (0,5 µg, 2,25 µg und 3,5 µg); Bahn 7 = analog Bahn 6 jedoch 1 µl = (1 µg, 4,5 µg und 7 µg); Bahn 8 = Probe 1986, Auftragungsvolumen 100 nl; Bahn 9 = Probe 1986, 200 nl.

grammes lässt neben einer Systematik der R_f -Werte eine farbliche Zuordnung erkennen: So sind die verschiedenen Hydroxybenzole neben Nitrophenol und Aminophenol verschiedenfarbig im R_f -Bereich $< 0,5$ nachzuweisen. Im R_f -Bereich $> 0,5$ liegen die Methyl-Dimethylphenole sowie Phenol als einheitlich blaue Flecken.

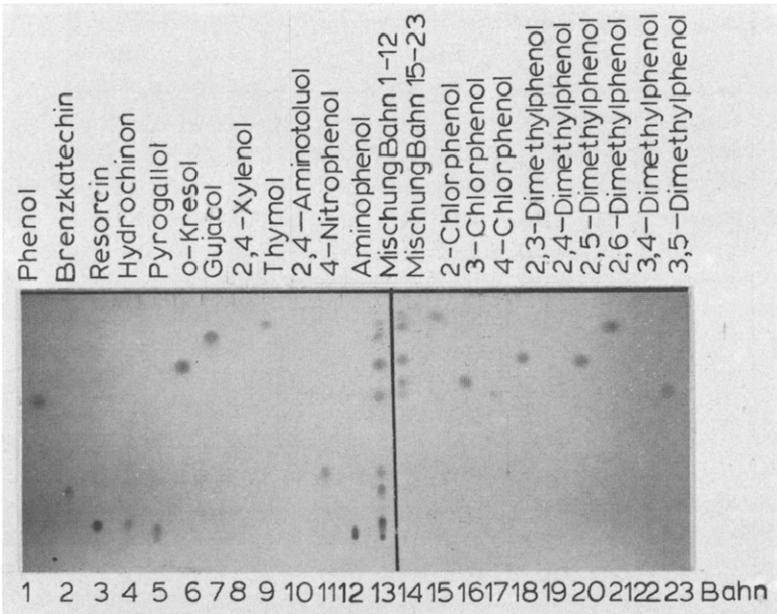


Fig. 6. Versuch zur chromatographischen Trennung von 21 Phenolen mit einem Einkomponenten-Fließmittel im Hinblick auf die Ermittlung von Wiederfindungsraten bei Anreicherungsversuchen. Schicht: DC-Fertigplatten RP-18 F₂₅₄₈, 10 × 20 cm. Fließmittel: Benzol, Normalkammer ohne Kammersättigung, Steighöhe 2 × 7 cm. Derivatisierung analog Fig. 4, jedoch Dibromchinonchlorimid 0,2%ig. Auftragung: Bahn 1-12, je 200 nl (ca. 200 ng); Bahn 13, Mischung Bahn 1-12, 200 nl (je ca. 200 ng); Bahn 14, Mischung Bahn 15-23, 200 nl je ca. 200 ng; Bahn 15-23, je 200 nl (ca. 200 ng).

PHENOLE IN WASSER, ANREICHERUNG UND TRENNUNG-QUALITATIVER VERSUCH

Mit einem Versuch aus dem Bereich der eingangs erwähnten Schadstoffanalytik^{22,23} soll Anreicherung und Trennung von Phenolen aus Trinkwasser skizziert werden. Die gute Reproduzierbarkeit bei Wiederholungschromatogrammen der mit Fig. 6 beschriebenen Technik gab Veranlassung, diese auch hier einzusetzen. Ausgehend von den beiden verwendeten Phenolmischungen dienten als Proben zwei Modellwasser P₁ und P₂ enthaltend jeweils eine dieser Mischungen in Mengen von ca 0,5 mg je Komponente im Liter.

Da ein direkter chromatographischer Nachweis von Phenolmengen dieser Größenordnung nicht möglich ist, sind Vortrennungen bzw. Anreicherungsstufen erforderlich. Von den sich anbietenden Techniken ist hier eine neuerdings öfter erwähnte Säulen-Extraktionsmethode²³ zur Anwendung gekommen. Sowohl für das verwendete Adsorbens —es handelt sich um ein chemisch modifiziertes Kieselgel RP 18— als auch für weitere modifizierte Phasen sind in der Literatur Wiederfindungsraten für verschiedene Phenole mitgeteilt²³. Sie liegen, abhängig von den Sorbentien, zwischen 5% und 100%.

Da mit diesen Angaben nur die Skizzierung eines Versuches zur Optimierung von Extraktionsverfahren beabsichtigt ist, sei auch das mit Fig. 7 wiedergegebene Chromatogramm lediglich visuell bewertet: Von den in Probe 1 enthaltenen Kom-

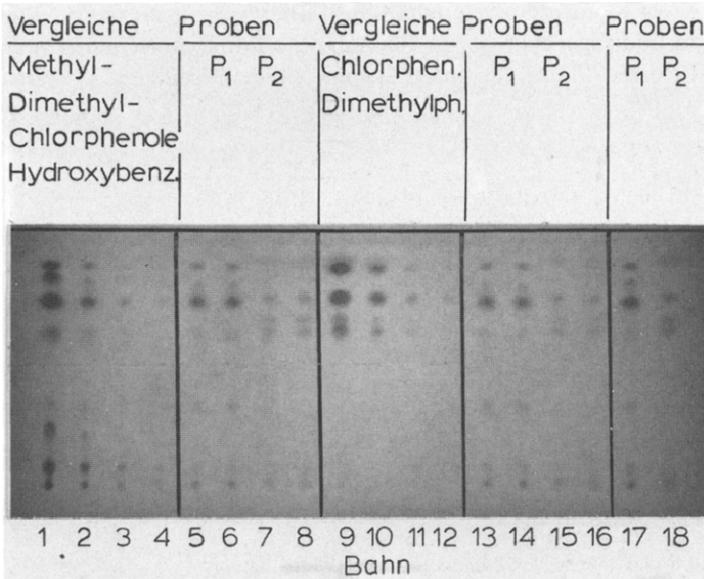


Fig. 7. Anreicherungsversuch mit zwei Modellwässern enthaltend je ca. 300 $\mu\text{g}/500$ ml der beiden Phenolmischungen Bahn 13 und 14 von Chromatogramm Fig. 6. Schicht, Fließmittel und Derivatisierung wie bei Fig. 6. Anreicherung: Säule, Extrelut® 3, Sorptionsmittel, LiChroprep RP-18, Korngrösse 15–25 μm (Art.-Nr. 13901), ca. 3 g. Säulenvorbereitung: Sorbent einfüllen, unter Vakuum nacheinander 5 ml 0,01 M Salpetersäure, 5 ml Acetonitril und 2×5 ml bidest. Wasser durchsaugen. Wasserprobe unter Vakuum über die Säule saugen, mit 10 ml 1 M Salpetersäure nachwaschen und trocken saugen. Elution: 2 ml Acetonitril auf die Säule geben, einrühren, absitzen lassen und in einen 10-ml-Messkolben saugen, zweimal mit 1,5 ml Acetonitril nachsaugen, Wasser durchsaugen, und auffüllen. Auftragung: Bahn 1–4 = Mischung Bahn 13 (Fig. 6): je 400 ng, je 80 ng, je 16 ng, je 8 ng/500 nl; Bahn 9–12 = analog, jedoch Mischung Bahn 14 (Fig. 6). Bahn 5, 6, 13 und 14 = mit Phenolmischung Bahn 13 (Fig. 6): je ca. 65 ng/2 μl angereicherte Wasserprobe. Bahn 7, 8, 15 und 16 = mit Phenolmischung Bahn 14 (Fig. 6) je 65 ng/2 μl angereicherte Wasserprobe. Chromatographie und Nachweis, siehe Fig. 5.

ponenten sind Phenol, *o*-Kresol, Guajacol, Thymol und 4-Nitrophenol nahezu 100%ig von der Säule extrahierbar, während Brenzkatechin, Resorcin, Hydrochinon, Pyrogallol und Aminophenol nur vermindert extrahiert werden. Von den Phenolen in Probe 2, es sind dies drei Chlorphenole und sechs Dimethylphenole werden 2,3- sowie 2,5- und 2,6-Dimethylphenol nicht quantitativ extrahiert.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Mit einer Auswahl von Phenolen wurden verschiedene Nachweismöglichkeiten gegenübergestellt: Neben der UV-Absorption sowie einer in der Routine erprobten *in situ*-Reaktion sind zwei im Zusammenhang mit der Phenolanalytik in der Literatur bisher nicht erwähnte *in situ*-Reaktionen beschrieben. Mit der Analyse phenolischer Verbindungen in einem Desinfektionsmittel wird eine gewisse Überlegenheit der zu fluoreszierenden Verbindungen führenden Dichlorfluorescein-Reaktion demonstriert. In dieser Arbeit nicht behandelte Versuche zeigen weitere Vorteile dieser Reaktion. So ergeben sich, abweichend von den beiden übrigen Derivatisierungen, für die 6 isomeren Dimethylphenole annähernd gleiche spezifische Fluoreszenzen, ein

Vorteil der auch bei R_f -Wert Koinzidenzen noch quantitative Aussagen erlaubt. Mit einem qualitativen Wiederfindungsversuch von Phenolen in Trinkwasser wurde auf die Möglichkeiten der Reversed-Phase-Chromatographie hingewiesen.

LITERATUR

- 1 F. Dietz, J. Traud, P. Koppe und Ch. Rübelt, *Chromatographia*, 8 (1976) 380.
- 2 L. Lepri, P. G. Desideri, M. Landini und G. Tanturli, *J. Chromatogr.*, 129 (1976) 239.
- 3 J. Gasparič und D. Svobodová, *J. Chromatogr.*, 153 (1978) 153.
- 4 L. Lepri, P. G. Desideri und D. Heimler, *J. Chromatogr.*, 195 (1980) 339.
- 5 S. Sherma und B. P. Sieckman, *High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 4 (1981) 557.
- 6 L. Lepri, P. G. Desideri und D. Heimler, *J. Chromatogr.*, 248 (1982) 308.
- 7 U. A. T. Brinkman und G. de Vries, *J. Chromatogr.*, 258 (1983) 43.
- 8 C. B. Airaud, A. Gayte-Sorbier, P. Laurent und R. Creusevau, *J. Chromatogr.*, 314 (1984) 349.
- 9 G. Tadema und P. H. Batelaan, *J. Chromatogr.*, 33 (1968) 460.
- 10 S. S. Timofeeva und L. Stom, *Sh. Anal. Khim.*, 31 (1976) 198.
- 11 H. Thielemann, *Z. Gesamte Hygiene Ihre Grenzgeb.*, 22 (1976) 169.
- 12 H. Thielemann, *Z. Gesamte Hygiene Ihre Grenzgeb.*, 22 (1976) 176.
- 13 K. L. Bajaj und Y. K. Arora, *J. Chromatogr.*, 196 (1980) 309.
- 14 H. Thielemann, *Pharmazie*, 36 (1981) 387.
- 15 H. Kumar, A. Sharma und S. S. Chibber, *J. Chromatogr.*, 245 (1982) 126.
- 16 N. Mosescu, G. Kalmutschi und V. J. Pop, *Rev. Chim. (Bucharest)*, 27 (1976) 897.
- 17 J. Disinger und S. E. Manahan, *Anal. Lett.*, 15 (1982) 1017.
- 18 R. M. Carlson, T. A. Swanson, A. R. Oyler, M. T. Lukaseqycz, R. L. Linkkonen und K. S. Voelkner, *J. Chromatogr. Sci.*, 22 (1984) 272.
- 19 K. M. Haldorsen, *J. Chromatogr.*, 134 (1977) 467.
- 20 H. Tanner, *Z. Obst.-Weinbau*, 103 (1967) 610.
- 21 H. Tanner und M. Duperrex, *Fruchtsaft-Ind.*, 13 (1968) 98.
- 22 P. Koppe und J. Traud, *Gewässerschutz, Wasser Abwasser*, 10 (1973) 345.
- 23 B. Rössner und G. Schwedt, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 315 (1983) 610.