

# Spektrographische Bestimmung der Dissoziationskonstanten von o-Aminophenol\*.

Von

E. Schauenstein und G. M. Perko.

Aus dem Institut für theoretische und physikalische Chemie der Universität Graz.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 10. April 1954.)

Die ultravioletten Absorptionsspektren von o-Aminophenol in wäßriger Lösung bei verschiedenen pH-Werten lassen die Anwesenheit zweier Umwandlungsgleichgewichte erkennen, die zwischen dem positiv, dem negativ geladenen Ion und der undissoziierten Form bestehen. Die quantitative Auswertung der gemessenen Spektren führt zur Aufstellung der basischen und der sauren Dissoziationskurve der Substanz und zur Ermittlung der Werte für die entsprechenden Dissoziationskonstanten.

Weder der Verlauf der Absorptionskurven, noch die Lage der Dissoziationskurven geben einen Anhaltspunkt für die Anwesenheit einer intramolekularen H-Brücke zwischen der  $\text{NH}_2$ - und der OH-Gruppe in wäßrigem Medium.

## Einleitung.

Die optische Bestimmung von Dissoziationskonstanten absorbierender Stoffe ist heute ein schon vielfach bewährtes Anwendungsgebiet der Absorptionsspektrographie geworden. Außer den bereits sehr zahlreichen Messungen an niedermolekularen Substanzen, wie etwa l-Tyrosin<sup>1</sup>,

---

\* Herrn Prof. Dr. L. Ebert zum 60. Geburtstage mit den besten Wünschen gewidmet.

<sup>1</sup> N. Kretschmer und R. Taylor, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 3291 (1950).

<sup>2</sup> E. Bruigom, Diss. Univ. Leiden (1950). — C. Fromageot und G. Schnek, Biochim. Biophys. Acta **6**, 113 (1950). — E. Schauenstein, Melliand Textilber. **33**, 591 (1952). — G. H. Beaven und E. R. Holiday, Adv. Protein Chem. **7**, 319 (1952).

Tyrosinderivaten<sup>2</sup>, Dioximen<sup>3</sup>, Ascorbinsäure<sup>4</sup>, Dinitrophenolen<sup>5</sup> und Harnsäuren<sup>6</sup>, wird diese Methodik in letzter Zeit in steigendem Maße auch auf das Gebiet der Hochmolekularen angewendet. Abgesehen von der Ermittlung neuen Zahlenmaterials liefert die Untersuchung hochmolekularer Stoffe bisher nicht zugängliche Einblicke in die Struktur dieser Körper und läßt neue Zusammenhänge zwischen Konstitution und chemischen Eigenschaften erkennen<sup>7</sup>.

Es erschien nun von Interesse, zu versuchen, ob die Methodik auch die Bestimmung der sauren und der basischen Dissoziationskonstanten an einem amphoteren Körper ermöglicht. Wir zogen zur Beantwortung dieser Frage das o-Aminophenol heran, von dessen Untersuchung wir uns weiters Aufschlüsse hinsichtlich der Existenz einer eventuell auch in wäßrigem Medium bestehenden intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoffatom der Aminogruppe und der phenolischen OH-Gruppe erwarten durften.

#### Präparatives und Meßmethodik.

Das uns zur Verfügung stehende Präparat wurde durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Wasser mit Zusatz von Tierkohle gereinigt. Die große Empfindlichkeit insbesondere der feuchten Substanz dem Luftsauerstoff gegenüber äußerte sich in der immer sehr rasch erfolgenden Gelbfärbung der Mutterlauge, weshalb bei den 3 letzten Umkristallisationen unter einer Schutzatmosphäre (CO<sub>2</sub>) gearbeitet wurde. Nach dem Trocknen über konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hatte die Substanz einen Schmp. von 174 bis 175° (Literatur 174°). Das auf diese Weise auf optische Konstanz gebrachte Produkt lieferte in 0,1 n HCl ein Absorptionsspektrum mit folgenden Daten (Tabelle 1).

Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, bestehen mit den Werten der Literatur<sup>8</sup> gewisse Diskrepanzen, die sicher außerhalb der Meßfehler liegen. In Anbetracht der optischen Konstanz unserer Substanz und der begründeten Annahme, daß diese Diskrepanzen die Ergebnisse keinesfalls wesentlich beeinflussen könnten, hielten wir es für zulässig, die Substanz für die eigentlichen Messungen zu verwenden.

Wir stellten nun Lösungen in Konzentrationen von  $\sim 10^{-3}$  Mol/l in Wasser her, deren pH zwischen den Werten 1,0 und 13,0 variiert wurde. Für die Grenz-pH-Werte wurden 0,1 n HCl und 0,1 n NaOH, für die Zwischen-

Tabelle 1. o-Aminophenol  
in wäßriger Lösung,  
pH  $\sim$  1,0.

	$\nu'$	log $\epsilon$
Max. . . . . .	3720	3,24
Min. . . . . .	4260	1,76
Nach <sup>8</sup> Max. . .	3710	3,30

<sup>3</sup> Ch. Banks und A. Carlson, *Analyt. Chim. Acta* **7**, 291 (1952).

<sup>4</sup> E. Schauenstein, *Mh. Chem.* **79**, 487 (1948).

<sup>5</sup> C. H. Judson und M. Kilpatrick, *J. Amer. Chem. Soc.* **71**, 3110 (1949).

<sup>6</sup> F. Fischer und W. Neumann, *Ann. Chem.* **572**, 230 (1951).

<sup>7</sup> J. Crammer und A. Neuberger, *Biochemic. J.* **37**, 302 (1943). — G. Beaven, zit. unter Anm. 2. — E. Schauenstein und M. Hochenegger, *Z. Naturforsch.* **8 b**, 473 (1953). — E. Schauenstein, O. Kratky und O. Gold, *Melliand Textilber.* **35**, 375 (1954).

pH-Werte entsprechende Pufferlösungen verwendet. Die Überprüfung des jeweiligen pH-Wertes erfolgte elektrometrisch mittels Glaselektrode mit dem *Lautenschläger*-Ultra-Ionographen. Sämtliche Lösungen mit einem  $\text{pH} > 7,0$  wurden durch Zugabe von  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (4 g/100 ml) dem oxydierenden Einfluß des Luftsauerstoffes gegenüber stabilisiert<sup>8</sup>. Zum Füllen der Vergleichsküvetten wurde stets die entsprechende Pufferlösung mit gleichem  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -Zusatz verwendet. Wir benutzten für die Messungen der UV-

Spektren einen *Zeiß*-Chemiker-spektrographen  $9 \times 12$  cm. Die Meßmethodik mit rotierenden Sektorblenden und Doppelspektren findet sich bereits in der Literatur<sup>9</sup> ausführlich beschrieben. Der tatsächliche Meßfehler beträgt  $\pm 0,02$  in  $\log \epsilon$ -Einheiten.

### Ergebnisse.

Die Kurven der Abb. 1 bringen die erhaltenen Ergebnisse. Wir entnehmen daraus eindeutig die Anwesenheit zweier Umwandlungsgleichgewichte: Das erste, gekennzeichnet durch die beiden isosbetschen Schnittpunkte (Pfeile in der Abb. 1), im pH-Bereiche 1,0 bis 7,0, das zweite im anschließenden pH-Bereiche 7,0 bis 13,0. Demnach liegt das o-Aminophenol, wie auch nicht anders zu erwarten war, zwischen pH 1,0 und 13,0 in drei verschiedenen absorbierenden Formen I, II und III vor, die untereinander durch die Gleichgewichtsbeziehungen

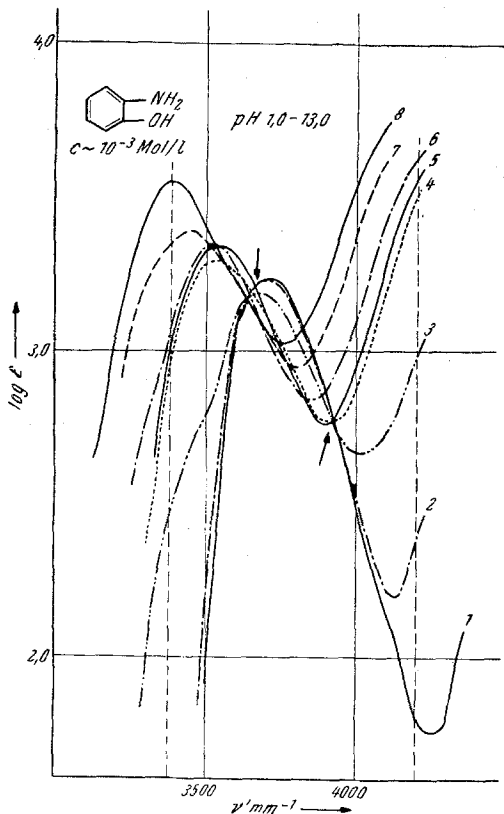
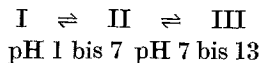


Abb. 1. o-Aminophenol in wässriger Lösung bei verschiedenen pH-Werten. 1 1,00; 2 2,70; 3 4,25; 4 5,70; 5 7,00; 6 8,85; 7 10,00; 8 11,65, 13,00.

in Verbindung stehen.

Zur quantitativen Auswertung entnehmen wir den Kurven 1 bis 5 der Abb. 1 bei einer Wellenzahl von  $4200 \text{ mm}^{-1}$  die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  (vgl. Tabelle 2). Setzen wir den von Kurve 1 gleich 100% I, den

<sup>8</sup> M. Pestemer und H. Flaschka, Mh. Chem. 71, 325 (1938).

<sup>9</sup> H. v. Halban, G. Kortüm und B. Szigethi, Z. Elektrochem. 42, 628 (1936).

von Kurve 5 gleich 0% I (bzw. 100% II), so ergeben sich aus den  $\epsilon$ -Werten der Kurven 2 bis 4 unmittelbar die Prozente von I, deren Abhängigkeit vom pH in Kurve 1 der Abb. 2 graphisch wiedergegeben ist. Zur Kontrolle kann natürlich auch ein  $\epsilon$ -Wert bei einer anderen passenden Wellen-

Tabelle 2. Basische Dissoziation von o-Aminophenol.

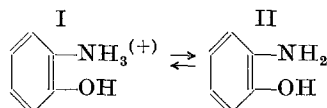
$\nu'$	pH	log $\epsilon$	$\epsilon$	%-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
4200	1,00	1,81	64	100,0
4200	2,70	2,40	252	96,75
4200	4,25	2,99	978	74,3
4200	5,70	3,52	3320	9,0
4200	7,00	3,58	3640	0,0
3500	7,00	3,33	2140	0,0
3500	4,25	2,80	631	70,5

Tabelle 3. Phenolische Dissoziation von o-Aminophenol.

$\nu'$	pH	log $\epsilon$	$\epsilon$	%-O <sup>-</sup> (-)
4000	7,00	2,97	934	0,0
4000	8,85	3,09	1230	10,1
4000	10,00	3,36	2295	47,5
4000	10,65	3,55	3560	91,5
4000	11,65	3,58	3810	100,0
4000	13,00	3,58	3810	100,0
3380	13,00	3,55	3560	100,0
3380	10,00	3,35	2240	48,0
3380	7,00	3,01	1025	0,0

zahl herangezogen werden, etwa bei 3500 mm<sup>-1</sup>, der Kurve 3 entnommen wurde. Hierbei wurde wiederum der bei dieser Wellenzahl resultierende  $\epsilon$ -Wert aus Kurve 5 100% II entsprechend angenommen. Der resultierende Meßpunkt ist in Kurve 1, Abb. 2, besonders gekennzeichnet eingetragen und fügt sich in die Kurve ausgezeichnet ein. Die Kurve 1 der Abb. 2 ist offensichtlich der graphische Ausdruck eines Dissoziationsvorganges. Unterlegt man der Kurve das Massenwirkungsgesetz, so müßte aus dem pH-Wert, der dem Punkte der Wendetangente entspricht, der Wert für den negativen Logarithmus der Dissoziationskonstanten gemäß (pK<sub>w</sub> - pH) zu bestimmen sein. Die diesbezügliche Auswertung der Kurve ergab für pH bei  $\alpha = 0,5$  einen Wert von 4,70, was einem pK<sub>I, II</sub> von 9,3 bzw. einem K<sub>I, II</sub> von  $5,0 \cdot 10^{-10}$  entspricht.

Zieht man die Dissoziationskonstanten aromatischer Amine zum Vergleich heran, z. B. für Anilin  $K = 4,0 \cdot 10^{-10}$  bei 20°<sup>10</sup>, so ergibt sich klar, daß in unserem Falle das Gleichgewicht



spektrographisch vermessen wurde. Daraus folgt, daß Kurve 1, Abb. 1, der Form I, also dem Kation I zuzuordnen ist, während Kurve 5, Abb. 1, der reinen Form II, also dem undissoziierten Molekül entspricht.

<sup>10</sup> F. L. Hahn und R. Klockmann, Z. physik. Chem., Abt. A 146, 389 (1930).

Die gleichen Überlegungen kann man nun auch auf die Kurven 5 bis 8 der Abb. 1 anwenden. Hier wurde bei einer Wellenzahl von  $4000 \text{ mm}^{-1}$  der Extinktionskoeffizient entnommen (vgl. Tabelle 3), wobei der  $\varepsilon$ -Wert der Kurve 5 gleich 0% III und der von Kurve 8 gleich 100% III gesetzt wurden. Die graphische Abhängigkeit vom pH bringt Kurve 2, Abb. 2, und wir ersehen daraus, daß es sich hier zweifellos um den Ausdruck der phenolischen Dissoziation des o-Aminophenols handelt. In diesem Falle liefert der pH-Wert im Punkte der Wendetangente unmittel-

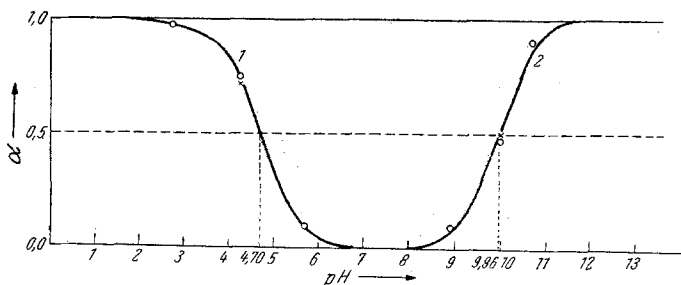
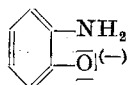


Abb. 2. Dissoziationskurve von o-Aminophenol. 1 basische Dissoziation  $-\text{NH}_3^{(+)} \rightleftharpoons -\text{NH}_2$ , 2 phenolische Dissoziation  $-\text{OH} \rightleftharpoons -\text{O}^{-}$ . Die mit  $x$  bezeichneten Meßpunkte sind in Kurve 1 bei  $3500 \text{ mm}^{-1}$ , in Kurve 2 bei  $3380 \text{ mm}^{-1}$  ermittelt.

bar den negativen Logarithmus der Dissoziationskonstante. Wir erhielten für pH einen Wert von 9,96 und damit für  $K_{\text{II, III}}$  einen Wert von  $1,1 \cdot 10^{-10}$ . Zum Vergleich kann die Dissoziationskonstante des Phenols herangezogen werden,  $K = 1,05 \cdot 10^{-10}$  bei  $20^\circ$ . Wir dürfen somit die Kurve 8, Abb. 1, der reinen Form III, also dem Phenolatanion



zuordnen.

#### Diskussion.

Das auf spektralem Weg ermittelte Dissoziationsdiagramm der Abb. 2 repräsentiert in befriedigender Weise die Dissoziation eines Ampholyten, dessen Konstanten weit auseinander liegen. Wir erkennen das isoelektrische Gebiet zwischen den pH-Werten 6,5 und 8,5, innerhalb dessen die Konzentrationen der Ionenformen definitionsgemäß ein Minimum bzw. die Konzentration der undissoziierten Molekel II ein Maximum durchlaufen. Im vorliegenden speziellen Falle werden die Konzentrationen der Ionenformen I und III in diesem Gebiete praktisch

<sup>11</sup> F. L. Hahn und R. Klockmann, Z. physik. Chem., A 157, 206 (1931).

Null sein, was durch den großen Unterschied zwischen den beiden Dissoziationskonstanten bedingt ist. Das Produkt der beiden Werte beträgt größenordnungsmäßig  $10^{-20}$  und nach *Michaelis* werden die Ionenkonzentrationen im isoelektrischen Bereich erst von einem Werte von  $10^{-18}$  für  $K_A \cdot K_B$  an von praktischem Belang.

Die in dieser Arbeit aufgezeigten spektralen Möglichkeiten auf das Gebiet der Eiweißkörper anzuwenden, erschiene sicher reizvoll. Es ist aber zu bedenken, daß einem solchen Vorhaben gewisse Grenzen gesetzt

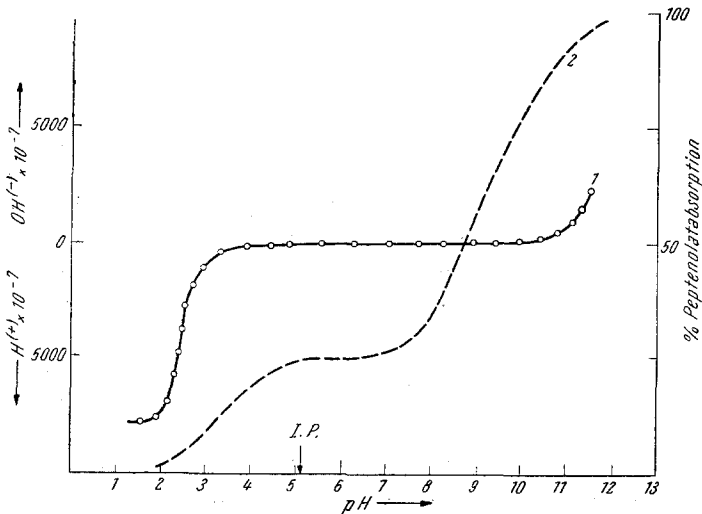


Abb. 3. Titrationskurve (1) und Peptenolatabsorption (2) von menschlichem Sehnenkollagen nach *Schauenstein* und *Stanke*<sup>8</sup>.

sind: Die spektrographische Bestimmung der Tyrosindissoziation wird natürlich in den allermeisten Fällen ohne besondere Schwierigkeiten möglich sein und ist auch schon vielfach mit Erfolg ausgeführt worden<sup>7</sup>. Die optische I. P.-Bestimmung an einem Protein begegnet aber der prinzipiellen Schwierigkeit, daß hier verschiedenartige ionisierende Gruppen ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $>\text{NH}$ ) vorliegen, deren Eigenabsorptionen fast durchwegs von den um Größenordnungen intensiveren Aromatenbanden des Tyroins und Tryptophans vollständig überdeckt werden.

Eine Möglichkeit, hier weiterzukommen, scheint die Messung der dH-abhängigen, sogenannten „Peptenolatabsorption“ zu bieten. Es ist dies die spezielle Eigenabsorption der H-gebundenen Peptidgruppe, die sich auch neben der Aromatenabsorption beobachten läßt. Die pH-Abhängigkeit dieser Peptenolatbanden geht aller Wahrscheinlichkeit nach darauf zurück, daß es in Säure bzw. Lauge zu einer Verschiebung der

Doppelbindungen im Sinne einer Keto-Enolatverschiebung kommt. Diese Verschiebung dürfte aber wohl auch durch die ionisierbaren Gruppen in der Seitenkette der zugehörigen Aminosäure beeinflusst werden, wodurch deren Ionisation indirekt erfaßt würde.

Ein erster, erfolgversprechender Versuch in dieser Richtung wurde beim Aktomyosin<sup>12</sup> und Sehnenkollagen<sup>13</sup> angestellt (vgl. Abb. 3).

Die gemessenen Dissoziationskurven des o-Aminophenols lassen erkennen, daß eine Behinderung dieser Dissoziationen, wie sie etwa bei Bestehen einer intramolekularen phenolischen H-Brücke zu erwarten wäre, nicht besteht. Somit ist die Existenz einer solchen H-Brücke im wäßrigen Medium auf Grund der UV-spektrographischen Messung praktisch auszuschließen. Für die Existenz solcher H-Brücken in wäßrigen Lösungen von Eiweißmolekülen, wo sie sich sowohl als interpeptidische, als auch als phenolische H-Brücken UV-spektrographisch deutlich zu erkennen geben<sup>7</sup>, sind demnach wohl die entscheidend anderen strukturellen Faktoren des hochmolekularen Systems verantwortlich zu machen.

Es besteht demnach wenig Aussicht, die beim Eiweiß erhobenen Befunde, wie z. B. die teilweise Blockierung der phenolischen Tyrosin-dissoziation<sup>7</sup>, im Modellversuch mit niedermolekularen Stoffen wiederzufinden.

Schließlich soll noch kurz darauf hingewiesen werden, daß die optische Ermittlung der basischen neben der sauren Dissoziationskonstanten beim o-Aminophenol nur auf Grund ganz bestimmter konstitutiver Gegebenheiten des Moleküls möglich wird: Wir müssen ja bedenken, daß weder die  $\text{—}\overline{\text{N}}\text{H}_2\text{—}$  noch die  $\text{—}\text{NH}_3^{(+)}$ -Gruppe im Gebiete unterhalb von  $4000\text{ mm}^{-1}$  eine charakteristische und neben der Aromatenbande ins Gewicht fallende Eigenabsorption zeigen. Die spektralen Unterschiede zwischen den Formen I und II, nämlich die Rotverschiebung und Extinktionserhöhung,

Tabelle 4. Vergleich der Absorptionsdaten von o-Aminophenol und Phenol.

pH		o-Aminophenol c: $\sim 10^{-3}$ Mol/l		Phenol c: $\sim 10^{-3}$ Mol/l	
		$\nu'$	log $\epsilon$	$\nu'$	log $\epsilon$
1,0	Max. ....	3720	3,24	3720	3,09
	Min. ....	4260	1,76	4220	1,76
13,0	Max. ....	3380	3,55	3480	3,34
	Min. ....	3760	3,03	3860	2,74

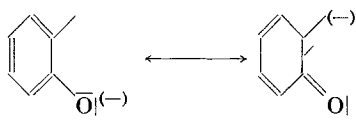
werden vielmehr dadurch bedingt, daß bei II das einsame Elektronenpaar des Stickstoffes in die Mesomerie des aromatischen Ringes miteinbezogen wird, was bei I durch die Donatorbindung, die das einsame Elektronenpaar in saurer Lösung mit dem Proton eingeht, nicht möglich ist. Daher ist es auch verständlich,

<sup>12</sup> E. Treiber, Diss. Univ. Graz (1948). — E. Bürgermeister und E. Schauenstein, Mh. Chem. 80, 310 (1949).

<sup>13</sup> E. Schauenstein und D. Stanke, Makromol. Chem. 5, 262 (1951).

daß die Absorption von I sich nicht mehr wesentlich von der des Phenols in saurer Lösung unterscheidet, wie die Tabelle 4 zeigt. Demnach wirkt sich die  $-\text{NH}_3^{(+)}$ -Gruppe bei Einführung in den Ring praktisch kaum mehr aus. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten seinerzeit auch *Pestemer* und *Flaschka*<sup>8</sup>.

Die saure Dissoziation wird spektral erfaßbar durch die Mesomerie



wobei die Absorption des Phenolatanions durch die Beteiligung des Elektronenpaares der  $-\text{NH}_2$ -Gruppe natürlich wiederum beträchtlich langwelliger und intensiver ist als beim Phenol (vgl. Tabelle 4).

Wir sind dem Vorstand des med.-chem. Institutes der Grazer Universität, Herrn Prof. Dr. *H. Lieb*, sowie der *Rockefeller-Foundation* für die Bereitstellung von Apparaturen sehr zu Dank verpflichtet.