

## Die Papierelektrophorese von Phenolen

### 6. Mitteilung zur Kenntnis der Elektrophorese

Von

**H. Berbalk und I. Szabolcs**<sup>1</sup>

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Wien

(Eingegangen am 5. Februar 1959)

Es wird über die Papierelektrophorese ein- und mehrwertiger teilweise auch substituierter Phenole sowie einiger saurer Kuppelungskomponenten für Azofarbstoffe berichtet. Nachweismittel und Wanderungsweiten unter vergleichbaren Versuchsbedingungen werden angegeben, desgleichen wird versucht, Zusammenhänge zwischen Konstitution und Laufweite zu finden.

Über die Papierelektrophorese von Phenolen finden sich in der Literatur nur verhältnismäßig wenige Angaben, die zudem auch nicht immer unter vergleichbaren Bedingungen erhalten wurden<sup>2</sup>. Es wurde bereits früher<sup>3</sup> darauf hingewiesen, daß sich gerade die Papierelektrophorese zur raschen Untersuchung dieser Substanzklasse besonders eignen müsse. In dieser Arbeit konnten wir auch über zwei stark saure Phenole (Pikrinsäure und 2,4-Dinitrophenol) berichten. Als Laufmittel wurde verdünnte Ameisensäure vom pH 2 verwendet, und es zeigte sich, daß schon das Dinitrophenol unter diesen Versuchsbedingungen eine zu kleine Wanderungsweite hatte. Es war daher naheliegend, an Stelle von Ameisensäure einen alkalischen Puffer, eventuell auch nur verdünnte Natronlauge zu verwenden. Die ersten Versuche wurden daher zunächst mit n/10 NaOH durchgeführt, doch waren die erhaltenen Flecken ziemlich verwaschen, so daß schließlich mit n/20 NaOH gearbeitet wurde. Hierbei konnten sehr scharfe Flecken bei großer Wanderungsweite und gutem Trenneffekt erzielt werden. Lediglich für leicht oxydierbare Phenole, wie z. B. Pyro-

<sup>1</sup> Diplomarbeit *I. Szabolcs*, Techn. Hochschule, Wien 1959.

<sup>2</sup> Vgl. z. B. *H. Michl*, *J. Chromatogr.* **1**, 93 (1958).

<sup>3</sup> *H. Berbalk* und *O. Schier*, *Mh. Chem.* **86**, 146 (1955).

gallol, Phloroglucin, Hydroxyhydrochinon u. ä., ist verd. NaOH allein nicht geeignet. Die durch den Luftsauerstoff im alkalischen Bereich bedingte Oxydation und damit Streifenbildung läßt sich jedoch durch Zusatz von etwa 2% Natriumsulfit zur Natronlauge vollständig unterbinden. Eine Erhöhung der Natriumsulfitmenge ist wegen der größeren Ionenstärke des Laufmittels und dem damit verbundenen Anwachsen des Querstromes ungünstig, eine Verringerung führt fast immer zu teilweiser Oxydation der untersuchten Phenole. Unter Beachtung dieser Voraussetzungen lassen sich somit auch sehr luftempfindliche Phenole papierelektrophoretisch untersuchen. Es darf jedoch nicht vergessen werden, daß ein Sulfitzusatz das pH der Grundlösung verändert und sich damit auch die scheinbaren Ionenbeweglichkeiten gegenüber denen in reiner NaOH ändern. Die so erhaltenen Werte sind in Tab. 1 in Klammern gesetzt.

In der Annahme, daß bei Verwendung von  $n/10$  NaOH die verwaschenen Flecken durch Erhöhung der Viskosität des Laufmittels etwas schärfer würden, hatten wir auch versucht, diesem bis zu 50% Glycerin zuzusetzen, jedoch ohne besonderen Erfolg. Eine Änderung der Wanderungsweiten tritt durch diesen Zusatz ebenfalls nicht ein.

Um die Abhängigkeit der Laufweite vom pH zu untersuchen, was mit NaOH nur in sehr beschränktem Maße möglich gewesen wäre, verwendeten wir übliche Veronalpuffer verschiedenen pH-Wertes. Bei pH 6,9 sinkt die Wanderungswerte der meisten untersuchten Phenole fast auf den Wert 0, eine Trennung ist also nicht mehr möglich. Bei pH 8,0 ist die Dissoziation der Phenole noch immer stark zurückgedrängt, während die untersuchten Farbsäuren bereits gute und analytisch verwertbare Laufweiten zeigen. Diese Tatsache ist verständlich, da die in Tab. 2 angeführten Kupplungskomponenten durchweg über  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen verfügen, die eine hohe Dissoziation und damit große Wanderungswerte bedingen und auch im sauren pH-Bereich noch zur Bewegung im elektrischen Feld befähigt sind. Ein Puffer pH 8 eignet sich daher sehr gut zur Trennung dieser oder ähnlicher Farbsäuren von den weniger stark sauren Phenolen. Die in Tab. 2 für die einzelnen Puffer angeführten Werte täuschen eine Erhöhung der relativen Wanderungsweiten mit fallendem pH-Wert vor. In Wirklichkeit sinkt jedoch die Laufweite der Bezugssubstanz  $\alpha$ -Naphthol immer stärker ab, während die der entsprechenden Säure ziemlich unverändert bleibt, wodurch sich die ansteigenden Relativwerte erklären.

Um von den mitunter stark schwankenden absoluten Wanderungswerten, bedingt durch geringfügige Schwankungen vor allem der Streifen-temperatur und -feuchtigkeit, unabhängig zu werden, haben wir alle angegebenen Werte auf die Laufweite von  $\alpha$ -Naphthol = 100 umgerechnet, sie sind damit gut reproduzierbar geworden.

Der Nachweis der Substanzen nach der Elektrophorese erfolgte in

allen Fällen durch Besprühen der kurz an der Luft getrockneten Streifen mit diazotierter Sulfanilsäure. Dabei ist es zweckmäßig, diese Lösung mit HCl anzusäuern, so daß die Kupplung am Streifen annähernd neutral erfolgt; da im alkalischen Bereich (Zusatz von 10% Natriumcarbonat) fast immer diffuse Flecken erhalten werden. Phenol, Chlorphenol und andere nieder substituierte Phenole liefern mit diazotierter Sulfanilsäure allerdings nur schwach gefärbte (gelb bis gelborange) Flecken, so daß sich in diesen Fällen das Sprühen mit tetrazotiertem Dianisidin besser bewährt hat. Man erhält eine bathochrome Farbverschiebung (für Phenol z. B. von Gelb nach Rot) und damit bessere Sichtbarkeit der getrennten Phenole. Die Kupplung muß dann allerdings im alkalischen Milieu durchgeführt werden. Sollte die Färbung nicht intensiv genug sein, so kann man mit n/10 NaOH schwach nachsprühen. Die tetrazotierte Dianisidinlösung ist auch im Eisschrank nur kurze Zeit haltbar, sie soll deshalb stets frisch bereitet werden.

Es wäre naheliegend, die Phenole mit  $\text{FeCl}_3$ -Lösung sichtbar zu machen, doch versagt dieser Nachweis bei den niederen Gliedern dieser Reihe unter den Bedingungen, die am Papier nach der Elektrophorese vorliegen, desgleichen ist die Verwendung von *Millons* Reagens wegen der geringen Haltbarkeit der Färbung nicht geeignet. Nitrierte Phenole bzw. die eigentlich vorliegenden Phenolate zeigen meist eine gelbe Eigenfarbe, so daß sie auch ohne Sprühmittel erkennbar sind. Wo jedoch ihre Erkennung Schwierigkeiten macht, kann man die Streifen mit einer alkoholischen Lösung von Umbelliferon besprühen. Unter der UV-Lampe werden nitrierte Substanzen dann als dunkle Flecke auf bläulich leuchtendem Grund sichtbar, da Nitrogruppen bekanntlich die Fluoreszenz löschen. Damit ist auch eine Unterscheidung zwischen nitrierten und nicht nitrierten Phenolen möglich.

Während der Durchführung unserer Untersuchungen wurden uns zwei Arbeiten von *M. Vietti-Michelina*<sup>4</sup> bekannt, die sich ebenfalls mit der Trennung von Nitrophenolen beschäftigen. Die Trennung dreier Dinitrophenole wurde mit einem Citratpuffer bei pH 5,3 und guter Auftrennung durchgeführt, während o-, m- und p-Nitrophenol in einem Phosphatpuffer pH 7,8 untersucht wurden. Dabei konnte o-Nitrophenol nicht mehr nachgewiesen werden, es verschwand. Im Gegensatz zum oben genannten Verfasser konnten wir jedoch auch diese Substanz einwandfrei nachweisen. Eine papierelektrophoretische Trennung des bei der Nitrierung von Phenol<sup>5</sup> gebildeten o- und p-Nitrophenols verlief ebenfalls zufriedenstellend.

Auf Grund der früheren Ergebnisse bei Carbonsäuren<sup>3, 6</sup> haben

<sup>4</sup> *M. Vietti-Michelina*, Z. analyt. Chem. **157**, 266 und 267 (1957).

<sup>5</sup> Vgl. *L. Gattermann*, „Die Praxis des organischen Chemikers“.

<sup>6</sup> *H. Berbalk* und *O. Schier*, Mh. Chem. **88**, 1095 (1957).

wir auch für Phenole mit einem gewissen Zusammenhang zwischen der Dissoziationskonstante und der Wanderungsweite gerechnet. Aus

Tabelle 1. Relative Wanderungsweite, Dissoziationskonstante und Farbreaktion (mit diazotierter Sulfanilsäure) einiger Phenole

Substanz	$W_N^*$	$k_s$	°C	Farbe
Phenol .....	126	$1,28 \cdot 10^{-10}$	20	zitronengelb
o-Kresol .....	120	$6,3 \cdot 10^{-11}$	25	orangegelb
m-Kresol .....	101	$9,8 \cdot 10^{-11}$	25	goldgelb
p-Kresol .....	110	$6,7 \cdot 10^{-11}$	25	rosa
1,4,5-Xylenol .....	94	—	—	orange
1,3,5-Xylenol .....	98	—	—	goldgelb
1,2,5-Xylenol .....	96	—	—	orange
o-Nitrophenol .....	145	$6,8 \cdot 10^{-8}$	25	orangegelb (Eigenfarbe)
m-Nitrophenol .....	125	$5,3 \cdot 10^{-9}$	25	gelb (Eigenfarbe)
p-Nitrophenol .....	117	$7,0 \cdot 10^{-8}$	25	gelb (Eigenfarbe)
o-Chlorphenol .....	144	$3,6 \cdot 10^{-8}$	25	gelb
m-Chlorphenol .....	125	—	—	gelb
p-Chlorphenol .....	127	$2,1 \cdot 10^{-8}$	25	rosa
p-Bromphenol .....	122	—	—	gelborange
p-Jodphenol .....	112	—	—	gelb
Brenzcatechin .....	181	$1,4 \cdot 10^{-10}$	20	violett
Resorcin .....	189	$1,45 \cdot 10^{-10}$	25	gelb
Hydrochinon .....	161	$4,5 \cdot 10^{-11}$	20	braungelb
Pyrogallol .....	193 (221)	—	—	braun
Phloroglucin .....	233 (248)	—	—	gelbbraun
Hydroxyhydrochinon ...	204 (190)	—	—	braun
1-Naphthol .....	100	—	—	karmirrot
2-Naphthol .....	89	$2,5 \cdot 10^{-10}$	20	orange
2,3-Dihydroxynaphthalin	82	—	—	braun
2,6-Dihydroxynaphthalin	161	—	—	braun
2,7-Dihydroxynaphthalin	143	—	—	braunviolett
1-Hydroxyanthrachinon	44	—	—	rot
o-Hydroxydiphenyl ....	65	—	—	orange
o,o'-Dihydroxydiphenyl	107	—	—	gelb
Salicylalkohol .....	153	—	—	goldgelb
Salicylaldehyd .....	138	—	—	zitronengelb
Salicylsäure .....	162	—	—	violett
p-Thiokresol .....	160	—	—	gelb (mit Blei- acetat)
p-Nitrothiophenol .....	139	—	—	gelb (Eigenfarbe)

\* Wanderungsweiten (bezogen auf diejenige von 1-Naphthol = 100).

Tab. 1 läßt sich jedoch eine derartige Abhängigkeit nicht entnehmen. Wir haben aber in der oben erwähnten Arbeit schon darauf hingewiesen, daß sich Pikrinsäure und 2,4-Dinitrophenol wesentlich anders verhalten als Carbonsäuren. Die vorliegende Untersuchung zeigt nun, daß diese

Tabelle 2. Relative Wanderungsweiten saurer Kupplungskomponenten bei verschiedenen pH-Werten, bezogen auf 1-Naphthol = 100.

Substanz	n/20 NaOH	Veronalpuffer		Farbe
		pH 9,8	pH 6,9	
C-Säure 1-Hydroxynaphthalin-8-sulfonsäure .....	195	282	577	rot
Nevile-Winthersäure, 1-Hydroxynaphthalin-4-sulfosäure .....	201	305	600	rot
Schäffer-Säure, 2-Hydroxynaphthalin-6-sulfonsäure .....	192	257	580	orange
R-Säure 2-Hydroxynaphthalin-3,6-disulfosäure .....	211	344	1300	orangerot
G-Säure 2-Hydroxynaphthalin-6,8-disulfosäure .....	224	362	1660	orange-gelb
Chromotrop-Säure, 1,8-Dihydroxynaphthalin-3,6-disulfosäure .....	236	384	1920	purpur
J-Säure 5-Hydroxy-2-aminonaphthalin-7-sulfosäure .....	188	257		orange
γ-Säure 8-Hydroxy-2-aminonaphthalin-6-sulfosäure .....	197	261		braun
S-Säure 8-Hydroxy-1-aminonaphthalin-4-sulfosäure .....	211	281		blauviolett
H-Säure 8-Hydroxy-1-aminonaphthalin-3,6-disulfosäure .....	274	384		rotviolett
1-Naphthol .....	100	100	100	

beiden Phenole keinen Ausnahmefall darstellen. So nimmt z. B. die Wanderungsweite in der Reihe der Kresole von o- über p- nach m-Kresol ab, während die Abnahme der Dissoziationskonstanten von m- über p- nach o-Kresol verläuft. Auch der Vergleich von Phenol mit m-Nitrophenol, die beide die gleiche Laufweite aufweisen, zeigt keinerlei Übereinstimmung mit den zugehörigen Dissoziationskonstanten. Es scheinen jedoch die Dissoziationskonstanten, die der Literatur entnommen wurden, in manchen Fällen recht ungenau zu sein. So finden sich z. B. im *Landolt-Börnstein-Roth-Scheel*, „Physikal.-chem. Tabellen“, 5. Aufl., für p-Chlorphenol folgende Werte:  $2,1 \cdot 10^{-8}$  (25° C),  $3,5 \cdot 10^{-10}$  (18° C) und  $4 - 7 \cdot 10^{-10}$  (25° C), die Streuung beträgt also beinahe zwei Zehnerpotenzen. Ein Temperatureinfluß in diesen Größenordnungen ist mehr als unwahrscheinlich, wie die folgende Abhängigkeit der Dissoziationskonstante von der Temperatur bei Phenol zeigt:

10° C	$0,60 \cdot 10^{-10}$
15° C	$0,73 \cdot 10^{-10}$
25° C	$1,09 \cdot 10^{-10}$
40° C	$1,73 \cdot 10^{-10}$
50° C	$2,37 \cdot 10^{-10}$

Ein Fehler bei der Bestimmung der Laufweiten ist mit größter Sicherheit ebenfalls auszuschalten, da in allen Fällen die entsprechenden Substanzen nebeneinander, also unter streng vergleichbaren Bedingungen, am gleichen Streifen wanderten und sich hier die Unterschiede der Wanderungsweiten einwandfrei erkennen ließen. Es bliebe somit nur die Annahme einer verschieden starken Adsorption am Papier zur Erklärung dieses etwas unerwarteten Verhaltens der Phenole. Eine eindeutige Erklärung kann jedenfalls hier noch nicht gegeben werden.

Trotzdem lassen sich aber gewisse Schlüsse aus den Werten der Tab. 1 ziehen. Ist im Phenol ein aromatischer Wasserstoff durch Methyl oder Halogen ersetzt, so wandert das o-Substitutionsprodukt am schnellsten, gefolgt vom p-Derivat, während die m-Verbindung die kleinste Laufweite zeigt. Ist der Substituent eine Nitrogruppe, so läuft die m-Verbindung schneller als das entsprechende p-Derivat, aber immer noch langsamer als das o-Isomere. Dieser Befund würde sich mit der Wirkung von Substituenten erster und zweiter Ordnung decken. In der Reihe Brenzcatechin/Resorcin/Hydrochinon scheint jedoch die zweite OH-Gruppe wie ein Substituent zweiter Ordnung zu wirken, denn hier wandert die m-Verbindung nicht nur schneller als das p-Isomere, sondern sogar etwas rascher als das o-Derivat, wenngleich dieser Unterschied nicht erheblich ist und noch innerhalb der Fehlergrenze liegen dürfte. In der Reihe p-Chlorphenol/p-Bromphenol/p-Jodphenol ist der Abfall der Wanderungsweiten zu erwarten, da auch die Acidität in gleicher Weise fällt. Die Werte für Pyrogallol, Phloroglucin und Hydroxyhydrochinon in reiner n/20 NaOH weichen von denen in mit Sulfit versetzter Lauge nicht nur bezüglich ihrer Größe, sondern auch in der Reihenfolge etwas ab. Die Größenabweichung erklärt sich aus dem veränderten pH des Laufmittels, die scheinbare Verschiebung der ursprünglichen Reihe Phloroglucin/Hydroxyhydrochinon/Pyrogallol (nach fallenden relativen Laufweiten) zu Phloroglucin/Pyrogallol/Hydroxyhydrochinon bei Sulfitzusatz ist darin zu suchen, daß die entsprechenden Flecken in reiner Lauge sehr stark verwaschen sind und ihre Schwerpunkte deshalb nur ungenau ausgemessen werden können. Die in Tab. 1 in Klammern angeführten Werte sind daher als die richtigen anzusehen. Da für eine große Zahl untersuchter Phenole in der Literatur keine Dissoziationskonstanten gefunden werden konnten, erscheinen weitere Schlüsse über den Zusammenhang zwischen Laufweite und Struktur vorderhand nicht angebracht.

Die am Ende der Tab. 1 angeführten beiden Thiophenole zeigen einerseits, daß das hier beschriebene Analysenverfahren auch für diese Substanzklasse anwendbar ist, andererseits ergibt sich wieder eine Parallele mit der bekannten Tatsache, daß Thiophenole saurer sind als die entsprechenden O-Analogen, kenntlich an der größeren Wanderungsweite (p-Kresol 110, p-Thiokresol 160 und p-Nitrophenol 117 gegenüber p-

Nitrothiophenol 139). Der Nachweis der Thiophenole erfolgt, sofern sie nicht bereits über Eigenfarbe verfügen, durch Besprühen mit einer Bleiacetatlösung, wodurch sie als gelbe Flecken sichtbar werden.

Die Tab. 2 zeigt, daß die Papierelektrophorese ein ausgezeichnetes Analysenverfahren zur schnellen Trennung von Kupplungskomponenten für Azofarbstoffe darstellt. Auf das scheinbare Ansteigen der Laufweiten in annähernd neutralem Puffer wurde bereits früher hingewiesen. Diese hohen Werte sind nicht gut reproduzierbar und wahrscheinlich auch ungenau wegen des äußerst ungünstigen Laufweitenverhältnisses zur Bezugssubstanz  $\alpha$ -Naphthol (etwa 1:20!).  $\alpha$ -Naphthol wurde jedoch auch in diesem ungünstigen Falle verwendet, um wenigstens annähernd mit den anderen untersuchten Phenolen vergleichbare Werte zu erhalten. Für analytische Zwecke wird man besser eine andere Vergleichssubstanz wählen. Die Trennung eines Gemisches aus  $\alpha$ -Naphthol (100),  $\gamma$ -Säure (261), Nevile-Winther-Säure (305) und G-Säure (362) in einem Veronalpuffer pH 9,8 läßt sich in etwa 20 Min. ohne Schwierigkeiten durchführen. Das Gemisch wird zwecks besserer Trennung in Form eines Streifens aufgegeben. Einige weitere Trennungen verliefen ebenfalls zufriedenstellend.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Papierelektrophorese auch für Phenole ein geeignetes Schnellanalysenverfahren darstellt, wobei mit kleinen Substanzmengen und einer Arbeitsdauer von etwa 20—30 Min. bei einer Feldspannung von rund 25 V/cm das Auslangen gefunden werden kann. Der Zusammenhang zwischen Laufweite und Struktur scheint allerdings komplizierter zu sein als bei den früher untersuchten Carbonsäuren und konnte durch die vorliegende Untersuchung bisher nicht geklärt werden, wenngleich eine gewisse Abhängigkeit der Wanderungsweite von der Dissoziationskonstante festgestellt werden konnte.

### Experimenteller Teil

Alle untersuchten Phenole wurden in Form ihrer Natriumsalze (erhalten durch Lösen des entsprechenden Phenols in wenig verd. NaOH) auf Chromatographiepapierstreifen (S & S 2043 b)  $6 \times 30$  cm aufgebracht. Die Streifen wurden zunächst in das jeweils verwendete Laufmittel (NaOH mit und ohne Sulfitzusatz, Veronalpuffer) etwa 5 Min. lang eingelegt und dann zwischen zwei Gummiwalzen bei gleichbleibendem Anpreßdruck von der überschüssigen Flüssigkeit befreit. Die Ausführung der Elektrophorese erfolgte in der früher<sup>3</sup> angegebenen Apparatur. Die angelegte Spannung betrug etwa 20 bis 25 V/cm, die Analysendauer 20—30 Min. Nach beendeter Trennung werden die Streifen an der Luft kurz getrocknet und mit dem jeweiligen Reagens besprüht. Für diesen Zweck eignet sich diazotierte Sulfanilsäure, die jedoch nicht, wie üblich, in 10proz. Sodalösung, sondern schwach sauer (n/20 HCl) angewendet wird. Die Kupplung erfolgt also in annähernd neutraler Lösung, wodurch schärfere Flecken erhalten werden. Niedere Phenole liefern meist

nur schwach gelbe Färbungen, so daß man in diesen Fällen besser tetrazotiertes Dianisidin, diesmal jedoch in alkal. Lösung, benützt. Phenole, die zur Kupplung nicht befähigt sind, werden mit schwach salzsaurer Ferrichloridlösung nachgewiesen, wobei nach dem Sprühen die Streifen neutral sein sollen.

Zur Trennung von Gemischen werden die Proben am besten in Form von Streifen aufgetragen, weil dadurch eine besser sichtbare Trennung nach der Elektrophorese erreicht wird. Phenole mit einander ähnlichen Laufweiten lassen sich vielfach durch ihre verschiedenen Farbreaktionen voneinander unterscheiden.

Bei Anwesenheit von an der Luft leicht oxydierbaren Phenolen empfiehlt sich ein Zusatz von etwa 2% Natriumsulfit zum Laufmittel. Die dadurch bedingte pH-Verschiebung und damit verbundene Änderung der Wanderungswerte muß bei der Auswertung berücksichtigt werden.