

ALBERT HEESING

Zur Konstitution der Farbstoffe der Sakaguchi-Reaktion

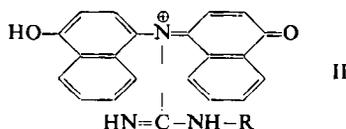
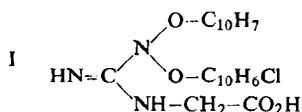
Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.)

(Eingegangen am 20. Juni 1962)

Die bei der Sakaguchi-Reaktion¹⁾ auf monosubstituierte Guanidine entstehenden Farbstoffe wurden mit Hilfe chromatographischer Verfahren in zwei Fällen erstmals in reiner Form isoliert. Im Gegensatz zu älteren Strukturvorschlägen handelt es sich um Hydroxy-naphthochinonimin-Derivate gleichartigen Aufbaus. In ihnen ist ein Ring unsubstituiert. Der andere trägt die beiden Sauerstoff-Funktionen, ein Bromatom und den monosubstituierten Guanidinrest. Art und Stellung der Substituenten am Chinon-Ring wurden insbesondere durch Abbaureaktionen untersucht.

S. SAKAGUCHI fand 1925, daß Arginin und einige andere Guanidine in alkalischer Lösung in Gegenwart von α -Naphthol und Hypochlorit eine intensive, aber instabile Rotviolett-Färbung geben, die beim Ansäuern nach Gelb umschlägt¹⁾. Die quantitative Anwendung dieser für monosubstituierte Guanidine spezifischen²⁾ Reaktion gelang C. J. WEBER³⁾, der das den Farbstoff schnell zerstörende überschüssige Hypohalogenit mit Harnstoff entfernte. Durch Festlegung der optimalen Bedingungen wurde eine verlässliche und genaue Bestimmungsmethode — insbesondere für Arginin — entwickelt⁴⁾.

Bei der Reaktion mit Guanidinoessigsäure isolierte SAKAGUCHI¹⁾ als Farbsäure ein braunes, amorphes Produkt der Bruttoformel $C_{23}H_{13}ClN_3O_4$. Als Struktur schlug er die Verknüpfung zweier α -Naphthol-Reste, von denen einer chloriert ist, über die phenolischen Hydroxylgruppen mit einem Stickstoffatom der Guanidinogruppe vor (I). Eine Bestätigung der stöchiometrischen Zusammensetzung schien zu sein, daß man eine maximale Farbentwicklung erhält, wenn zwei Moll. α -Naphthol pro Mol. Guanidin eingesetzt werden⁵⁾. Hierbei wurde nicht berücksichtigt, daß das α -Naphthol in erheblichem Umfang durch Nebenreaktionen verbraucht wird. Die zum Teil intensiv farbigen Nebenprodukte⁶⁾ erschweren die Isolierung der Farbstoffe.



¹⁾ S. SAKAGUCHI, J. Biochemistry [Tokyo] **5**, 25 [1925]; C. **1925** II, 1547.

²⁾ J. D. MOLD, J. M. LADINO und E. J. SCHANTZ, J. Amer. chem. Soc. **75**, 6321 [1953].

³⁾ J. biol. Chemistry **86**, 217 [1930].

⁴⁾ F. D. SNELL und C. T. SNELL, Colorimetric Methods of Analysis; 3. Aufl., Bd. IV, S. 155; D. van Nostrand Comp., New York 1954.

⁵⁾ H. KRAUT, E. VON SCHRADER-BEIELSTEIN und M. WEBER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **286**, 248 [1950].

⁶⁾ E. LEGER, Bull. Soc. chim. France [3] **17**, 546 [1897].

Spätere Versuche mit substituierten Phenolen^{5,7)} sprachen dafür, daß die Verknüpfung am Kern in der *p*-Stellung zur Hydroxylgruppe erfolgt.

Aus Arginin werden mindestens zwei Farbstoffe gebildet, wie H. KRAUT⁵⁾ chromatographisch zeigte. K. R. BHATTACHARYA isolierte ein dunkelbraunes, amorphes Produkt, für das er eine indophenolartige Struktur (II) annimmt^{8,9)}. Bei der Nacharbeitung dieser Vorschrift wurde kein einheitlicher Stoff erhalten.

Vorversuche zeigten, daß bei der Guanidinoessigsäure wie beim Arginin mehrere Farbstoffe gebildet werden; dagegen entstehen bei alkylsubstituierten Guanidinen einheitliche Produkte, die aber nicht identisch sind. Für die präparativen Arbeiten wurden Methyl- und *n*-Butyl-guanidin als Beispiele gewählt. Durch Variation der Versuchsbedingungen konnten die Nebenreaktionen eingeschränkt werden. Die Extraktion der Farbstoffe erfolgte mit *n*-Butanol aus der alkalischen Lösung. Das bisher übliche vorherige Ansäuern⁵⁾ erhöht zwar die Löslichkeit der Farbstoffe in Butanol, es werden dann aber viel mehr Nebenprodukte mitextrahiert. Aus der Butanollösung ließen sich 80% der gebildeten Farbstoffe als braune, amorphe Pulver isolieren. Die Nebenprodukte wurden daraus durch Chromatographie an Cellulose- und Kieselgur-Säulen abgetrennt.

Die bei der Sakaguchi-Reaktion auf Methyl- und *n*-Butylguanidin entstehenden Farbsäuren bilden hellgelbe Nadeln, die in den meisten Lösungsmitteln wenig löslich sind. In alkalischer Lösung zeigen beide Stoffe die auch in der Reaktionslösung beobachtete Bande bei 520 m μ und gleiche molare Extinktionskoeffizienten. Die Elementaranalysen lassen auf gleichartigen Aufbau schließen; sie erlauben eine Auftrennung in einen gemeinsamen Teil C₁₁H₇BrN₃O₂ und die jeweilige aliphatische Seitenkette (CH₃ bzw. C₄H₉). Molekulargewichtsbestimmungen bestätigen diese Bruttoformeln. Das Brom liegt nicht als Gegen-Ion zum Guanidin-Rest (vgl. I. c.⁸⁾), sondern homöopolar gebunden vor. Es sind somit nur je ein Mol. α -Naphthol und Guanidin unter Oxydation und Bromierung zusammengetreten. Damit ist eine Indophenol-Struktur ausgeschlossen.

Die aliphatische Seitenkette der Farbstoffe konnte nach saurer Hydrolyse durch die 2,4-Dinitro-phenyl-Derivate des Methyl- bzw. *n*-Butyl-amins nachgewiesen werden.

Beim Abbau mit Permanganat in neutraler Lösung entstehen nur unsubstituierte Phthalonsäure und Phthalsäure. Ein Ring des α -Naphthols bleibt also unverändert, während Versuche anderer Autoren auch eine Substitution dieses Ringes möglich erscheinen ließen^{5,10)}.

In alkalischer Lösung werden die Farbstoffe langsam zersetzt. In der Hitze tritt in wenigen Minuten Disproportionierung ein. Aus dem Gemisch wurde in guter Ausbeute 2-Brom-naphthol-(1) isoliert, womit die β -Stellung des Broms in dem Naphthalinsystem bewiesen ist. Diese Alkaliempfindlichkeit erklärt, weshalb die zahlreichen Anstrengungen, den Farbstoff in der Reaktionslösung durch restlose Zerstörung des Hypohalogenits zu stabilisieren^{4,11)} erfolglos bleiben mußten.

⁷⁾ K. R. BHATTACHARYA, J. DATTA und D. K. ROY, *J. org. Chemistry* **25**, 2035 [1960].

⁸⁾ K. R. BHATTACHARYA, *Ann. Biochem. exp. Med. [Calcutta]* **20**, 93 [1960]; *C.* **1962**, 3566.

⁹⁾ K. R. BHATTACHARYA, J. DATTA und D. K. ROY, *Arch. Biochem. Biophysics* **77**, 297 [1958].

¹⁰⁾ J. W. JANUS, *Nature [London]* **177**, 529 [1959].

¹¹⁾ K. R. BHATTACHARYA, *Ann. Biochem. exp. Med. [Calcutta]* **20**, 57 [1960]; *C.* **1962**, 3565.

Die einander sehr ähnlichen IR-Spektren der Farbstoffe (aufgenommen in KBr) zeigen mehrere Banden bei 1580–1690/cm, die auf ein chinoides System¹²⁾ und auf die Iminogruppe des Guanidins¹³⁾ zurückzuführen sind. Die NH-Bande ist relativ schwach; eine OH-Bande fehlt ganz, wie es von vielen hydroxylsubstituierten Chinonen bekannt ist¹²⁾.

Für ein chinoides System spricht auch die leichte Reduzierbarkeit. Bei der katalytischen Hydrierung führt die Aufnahme von einem Mol. Wasserstoff zum farblosen Hydrochinon-Derivat, aus dem das Chinon durch den Luftsauerstoff quantitativ zurückgebildet wird. Durch reduzierende Acetylierung mit Acetanhydrid und Zinkstaub bei 20° entsteht ein Monoacetat mit noch einer freien Hydroxylgruppe, dessen gute Löslichkeit eine genauere Molekulargewichtsbestimmung erlaubt als bei den Farbstoffen. Sie bestätigt die für die Farbsäuren angenommene Zusammensetzung. Durch Natronlauge in Gegenwart von Luftsauerstoff erfolgt sofort Verseifung und Dehydrierung unter Rückbildung des Farbstoffes.

Die bei der Sakaguchi-Reaktion auf monosubstituierte Guanidine gebildeten Farbstoffe sind somit Derivate eines Hydroxy-naphthochinon-imins, dessen zweiter Ring unsubstituiert ist. Das Brom nimmt eine β -, der Guanidin-Rest eine α -Stellung ein. Die endgültige Klärung der Anordnung der Substituenten wird auch auf synthetischem Wege angestrebt.

Ich danke der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für Sachbeihilfen. Die IR-Spektren wurden von den Herren Dipl.-Chem. V. HÜHNE und M. LORENZ auf einem Herrn Professor Dr. F. MICHEEL von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellten Spektrographen (Perkin-Elmer, Mod. 21) aufgenommen, wofür ich zu Dank verpflichtet bin.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Isolierung des Sakaguchi-Farbstoffes

a) aus *Methyl-guanidin*: Man löst 50 g NaOH, 12.5 g Harnstoff, 0.65 g *Methylguanidiniumsulfat*¹⁴⁾ und 1.5 g α -Naphthol p. a. in 250 ccm Wasser und setzt 250 g Eis zu. Unter starkem Rühren gibt man hierzu in einem Guß eine frisch hergestellte *Hypobromit*-Lösung aus 50 g NaOH, 200 ccm Wasser, 250 g Eis und 5.0 ccm Brom. Nach genau 3 Min. wird mit 500 ccm *n*-Butanol, dann sofort erneut mit 200 ccm Butanol extrahiert. Die vereinigten Lösungen werden mit verd. Salzsäure schwach angesäuert. Aus ihnen scheiden sich nach starkem Einengen i. Vak. und längerem Aufbewahren bei 0° etwa 0.5 g eines dunkelbraunen, amorphen Rohproduktes ab. Dies sind etwa 80% des gebildeten Farbstoffes (gemessen in alkalischer Lösung bei 520 $m\mu$), die rund 25% des eingesetzten Guanidinstickstoffs enthalten. Eine teilweise Reinigung erreicht man durch mehrmalige Extraktion mit Methanol.

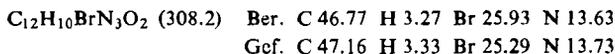
Der rohe Farbstoff wird in viel Butanol unter Zusatz von etwas verd. Natronlauge gelöst, die getrocknete Lösung mit je einem Drittel Volumen Pyridin und Wasser versetzt und an einer großen Cellulosesäule mit dem gleichen Gemisch chromatographiert, wobei mehrere gelbe und braune Zonen auftreten. Beim langsamen Einengen des Eluats der breiten gelben Zone scheiden sich hellgelbe Nadeln ab, die aus viel Methanol umkristallisiert werden.

12) W. FLAIG und J.-C. SALFELD, Liebigs Ann. Chem. **626**, 215 [1959]; H. MUSSO und J. SEEGER, Chem. Ber. **93**, 796 [1960].

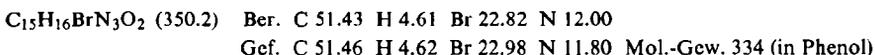
13) T. GOTO, K. NAKANISHI und M. OHASHI, Bull. chem. Soc. Japan **30**, 723 [1957]; C. **1960**, 5433.

14) T. L. DAVIS und R. C. ELDERFIELD, J. Amer. chem. Soc. **54**, 1499 [1932].

Ausb. 0.3 g; Zers.-P. 262°. Wenig löslich in den meisten Lösungsmitteln, besser in Dimethylsulfoxyd, verd. Natronlauge und konz. Schwefelsäure zu wenig beständigen Lösungen. Absorptionsmaxima: a) in Methanol: 405 m μ (log ϵ = 4.24); b) in 0.01 *n* NaOCH₃: 520 m μ (log ϵ = 4.62); c) in konz. Schwefelsäure: 490 m μ (log ϵ = 3.36). Der Farbumschlag erfolgt in wäßriger Lösung bei pH 9.1–9.7.



b) aus *n*-Butyl-guanidin: Nach der obigen Vorschrift wird 1.0 g *n*-Butyl-guanidinsulfat¹⁴⁾ umgesetzt. Das Rohprodukt wird in Dimethylformamid gelöst und an einer großen Kieselgurssäule mit dem Gemisch Benzol/Tetrahydrofuran/Dimethylformamid = 2 : 3 : 1 chromatographiert. Nach dem Umkristallisieren aus Aceton hellgelbe Nadeln; Ausb. 0.3–0.4 g; Zers.-P. 255–257°. Besser löslich als das Methylderivat. Absorptionsmaximum in 0.01 *n* NaOCH₃: 520 m μ (log ϵ = 4.63).



Hydrierung: 0.20 g feinverriebener Farbstoff aus *n*-Butylguanidin werden in 30 ccm Methanol suspendiert und nach Zugabe von 0.02 g PtO₂ hydriert. Nach Aufnahme von 1 Mol. Wasserstoff hat sich alles unter Entfärbung gelöst. An der Luft scheidet sich der Ausgangsstoff schnell quantitativ wieder ab. Die weitere langsame Hydrierung führt unter Abspaltung von Brom zu uneinheitlichen Produkten.

Abbau mit Schwefelsäure: 2.0 g Farbstoff aus *n*-Butyl-guanidin werden in 80 ccm 8 *n* H₂SO₄ 7 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Aus der mit Natronlauge versetzten wäßrigen Lösung werden Ammoniak und *n*-Butylamin mit Wasserdampf in verd. Salzsäure destilliert. Das Butylamin·HCl wird durch Lösen in absol. Äthanol vom NH₄Cl getrennt. Ausb. an rohem Hydrochlorid 0.63 g (75% d. Th.). Das hieraus durch Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitro-benzol erhaltene *N-n*-Butyl-2,4-dinitro-anilin ist nach der chromatographischen Reinigung in Benzol an einer Al₂O₃-Säule mit authent. Material identisch. — Entsprechend wird aus dem anderen Farbstoff das *N-Methyl-2,4-dinitro-anilin* erhalten.

Abbau mit Permanganat: 2.0 g Farbstoff aus Methylguanidin werden in 300 ccm Wasser von 90° suspendiert und unter heftigem Rühren mit dem Gemisch von je 16 g KMnO₄ und MgSO₄·7 H₂O oxydiert. Nach Entfernen von KMnO₄ und MnO₂ wird die Lösung i. Vak. stark eingeeengt und nach dem Ansäuern mit Äther erschöpfend extrahiert. Ausb. 0.87 g Säuregemisch (etwa 75% d. Th.). Die zu etwa 65% vorliegende Phthalonsäure wird mit wenig Wasser herausgelöst und durch Umsetzung mit Phenylhydrazin·HCl als 2-Phenyl-phthalazon-carbonsäure-(4)¹⁵⁾ identifiziert. Die zurückbleibende Phthalsäure wird als Imid nachgewiesen. Kernsubstituierte Säuren entstehen nicht. — Der Abbau führt beim Farbstoff aus *n*-Butyl-guanidin zum selben Ergebnis.

Abbau mit Natronlauge: 2.0 g Farbstoff aus Methylguanidin werden in 400 ccm siedende 1 *n* NaOH eingetragen und etwa 10 Min. unter Rückfluß erhitzt, wobei die Farbe von Rotviolett nach Braun umschlägt. Die Lösung wird angesäuert und mit Wasserdampf destilliert. Durch Ausäthern des Destillats erhält man 0.73 g (50% d. Th., bezogen auf eingesetztes Brom) 2-Brom-naphthol-(1), das nach der Vakuumdestillation auf Grund von Misch-Schmp. und IR-Spektrum mit authent. Material¹⁶⁾ identisch ist. — Auch beim alkalischen Abbau des Farbstoffes aus *n*-Butyl-guanidin wird 2-Brom-naphthol-(1) gebildet.

¹⁵⁾ R. HERINQUES, Ber. dtsh. chem. Ges. 21, 1607 [1888].

¹⁶⁾ H. H. HODGSON und D. E. HATHWAY, J. chem. Soc. [London] 1944, 538.

Reduzierende Acetylierung: 2.0 g Farbstoff aus n-Butyl-guanidin werden mit 1.5 g Zinkstaub, 0.2 g wasserfreiem Natriumacetat und 10 ccm Acetanhydrid 2 Std. geschüttelt. Der Farbstoff löst sich unter Entfärbung. Die filtrierte Lösung wird in Eiswasser eingerührt, aus dem das Acetylderivat mit Chloroform extrahiert wird. Nach der üblichen Aufarbeitung werden aus Äthanol 2.0 g (89% d. Th.) fast farblose Kristalle erhalten, die sich an der Luft langsam verfärben. Schmp. 195°.

$C_{17}H_{20}BrN_3O_3$ (394.3) Ber. C 51.78 H 5.12 Br 20.27 N 10.66 Acetyl 10.92
Gef. C 51.45 H 4.99 Br 19.82 N 10.39 Acetyl 11.2*)
Mol.-Gew. 388 (in Eisessig).

*) Verseifung mit kalter konz. Schwefelsäure; in der Hitze sowie mit Natronlauge entstehen flüchtige, gefärbte Nebenprodukte.
