

GEORG NEURATH, BARBARA PIRMANN und MICHAEL DÜNGER

**Identifizierung von
N-Nitroso-Verbindungen und asymmetrischen Hydrazinen als
5-Nitro-2-hydroxy-benzal-Derivate und Anwendung im
Mikromaßstab**

Aus dem Forschungslaboratorium der Firma H. F. & Ph. F. Reemtsma, Hamburg
(Eingegangen am 24. Dezember 1963)

Die Überführung der Nitrosamine in kristalline 5-Nitro-2-hydroxy-benzal-Derivate der ihnen entsprechenden unsymmetrischen Hydrazine im präparativen Maßstab und Mikromaßstab wird beschrieben. Die farbigen, gut kristallisierenden Derivate ermöglichen die Identifizierung der Nitrosamine und der sich von ihnen ableitenden, durch Reduktion mit Lithiumalanat gewonnenen unsymmetrischen Dialkylhydrazine durch Schmelzpunkt und R_F -Wert.

Die Identifizierung organischer N-Nitroso-Verbindungen in Gemischen unbekannter Zusammensetzung ist bisher noch nicht beschrieben worden. Es war erforderlich, hierfür eine Methode zu erarbeiten, zumal H. HERMANN¹⁾ in dem eßbaren Pilz *Clitocybe suaveolens* einen natürlichen Vertreter dieser Stoffklasse, den 4-[Nitroso-methylamino]-benzaldehyd, nachweisen konnte und darüber hinaus in den letzten Jahren das ubiquitäre Vorkommen der Nitrosamine von H. DRUCKREY und R. PREUSSMANN²⁾ diskutiert wird. Vertreter dieser Stoffklasse wirken außerdem cancerogen³⁻¹²⁾ und mutagen¹³⁾.

Für die N-Nitroso-Verbindungen wurden Anfärbemethoden für die Papierchromatographie sowie ein dünn-schichtchromatographisches Verfahren beschrieben^{14,15)}. Der Identifizierung durch kristalline Derivate, die zur chromatographischen Reinigung und

1) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **326**, 13 [1961].

2) Naturwissenschaften **49**, 498 [1962].

3) J. M. BARNES und P. N. MAGEE, Brit. J. ind. Med. **11**, 167 [1954]; Brit. J. Cancer **10**, 114 [1956].

4) H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, D. SCHMÄHL und M. MÜLLER, Naturwissenschaften **48**, 134 [1961].

5) H. DRUCKREY und D. STEINHOFF, Naturwissenschaften **49**, 497 [1962].

6) F. G. ZAK, J. H. HOLZNER, E. J. SINGER und H. POPPER, Cancer Res. **20**, 96 [1960].

7) H. DRUCKREY und R. PREUSSMANN, Naturwissenschaften **49**, 111, 166 [1962].

8) H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, D. SCHMÄHL und M. MÜLLER, Naturwissenschaften **48**, 165 [1961].

9) R. SCHOENTHAL und P. N. MAGEE, Brit. J. Cancer **16**, 92 [1962].

10) H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, G. BLUM und S. IVANKOVIC, Naturwissenschaften **50**, 100 [1963].

11) H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, D. SCHMÄHL und M. MÜLLER, Naturwissenschaften **49**, 19 [1962].

12) P. N. MAGEE und J. M. BARNES, J. Pathol. Bacteriol. **84**, 19 [1962].

13) L. PASTERNAK, Naturwissenschaften **49**, 16 [1962].

14) R. PREUSSMANN, D. DAIBER und H. HENGY, Nature [London] **201**, 502 [1964].

15) R. PREUSSMANN, G. NEURATH, G. WULF-LORENTZEN, D. DAIBER und H. HENGY, Z. analyt. Chem., im Druck.

Elementaranalyse geeignet sind, steht jedoch die ausgesprochene Reaktionsträgheit der *N*-Nitroso-Gruppe entgegen. Deshalb haben wir versucht, die bekannte Reduktion der Nitrosamine mit Lithiumalanat^{16,17)} zu den entsprechenden unsymmetrisch disubstituierten Hydrazinen zu nutzen, da sich diese leicht in kristalline Derivate umwandeln lassen.

Bei der Umwandlung der Hydrazine mit Reagenzien wie Acylchloriden und Arylhalogeniden können in Gemischen neben den Hydrazinen auch primäre und sekundäre Amine sowie Alkohole und Phenole reagieren. Deshalb erscheint von vornherein die Umsetzung mit aromatischen Aldehyden zu farbigen Azomethinen geeigneter, da dabei lediglich primäre Amine stören können.

Bei zum Vergleich durchgeführten Umsetzungen mit 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid¹⁸⁾, 2,4-Dinitro-chlorbenzol, 2,4-Dinitro-benzaldehyd, 4-Nitro-benzaldehyd und 5-Nitro-2-hydroxy-benzaldehyd (5-Nitro-salicylaldehyd) erwiesen sich die Derivate des letztgenannten Reagenzes als besonders geeignet.

Bei der Reaktion mit 2,4-Dinitro-chlorbenzol wurden neben der genannten Störung durch sekundäre Amine jeweils drei verschiedene Substanzen erhalten, die auf teilweise Spaltung der Hydrazine hindeuteten. Die Umsetzung mit 4-Nitro-benzaldehyd erfolgt glatt; jedoch schmelzen die Derivate relativ niedrig. Bei 2,4-Dinitro-benzaldehyd verläuft die Umsetzung nicht vollständig, so daß die Derivate säulenchromatographisch abgetrennt werden müssen (s. Tab. 1).

Tab. 1. Vergleich der Benzalderivate aus Hydrazinen und substituierten Benzaldehyden. UV-Absorptionen in Methanol bzw. unter Zugabe von einigen Tropfen 3-proz., methanol. Natriumhydroxydlösung

	2,4-Dinitro-benzaldehyd Schmp. 72°	4-Nitro-benzaldehyd Schmp. 106°	5-Nitro-2-hydroxy- benzaldehyd Schmp. 126°
	Schmp. 124–126.5°	Schmp. 112°	Schmp. 164–165°
(CH ₃) ₂ N–NH ₂	UV — : 242 420 nm UV ○—○: (242) 420 nm	UV — : 252 390 nm UV ○—○: 252 390 nm	UV — : 294 nm UV ○—○: 343 421 nm
	Schmp. 187–190°	Schmp. 132–134°	Schmp. 207–208°
(C ₆ H ₅) ₂ N–NH ₂	UV — : 246 447.5 nm UV ○—○: (246) 447.5 nm	UV — : 264 416 nm UV ○—○: 264 416 nm	UV — : 232 301 350 nm UV ○—○: 370 447 nm
	— (neutral)		
	○—○ (alkalisch)		

Die Umsetzung der asymmetrischen Hydrazine zu 5-Nitro-2-hydroxy-benzalderivaten verläuft in siedendem Äthanol dagegen fast quantitativ ohne Nebenprodukte. Die besseren Ausbeuten im Vergleich zu den anderen aromatischen Aldehyden führen wir in Analogie zu den Befunden von F. C. McINTIRE¹⁹⁾ an den Schiffischen Basen von Aminosäuren auf die Ausbildung einer stabilisierenden Wasserstoffbrücke vom Hydroxylproton zum Azomethinstickstoff zurück.

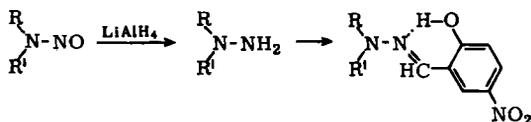
¹⁶⁾ J. LEICESTER und A. I. VOGEL, *Research* 3, 148 [1950].

¹⁷⁾ F. W. SCHUELER und C. HANNA, *J. Amer. chem. Soc.* 73, 4996 [1951].

¹⁸⁾ E. HECKER, *Chem. Ber.* 88, 1666 [1955].

¹⁹⁾ F. C. McINTIRE, *J. Amer. chem. Soc.* 69, 1377 [1947].

Sowohl die Reduktion der *N*-Nitroso-Verbindungen als auch die Umsetzung zu den Benzalderivaten lassen sich im Mikromaßstab durchführen.



Die Schmelzpunkte und UV-Absorptionsmaxima der Derivate sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tab. 2. Schmelzpunkte und Absorptionsmaxima *) der 5-Nitro-2-hydroxy-benzal-Derivate von unsymmetrisch disubstituierten Hydrazinen

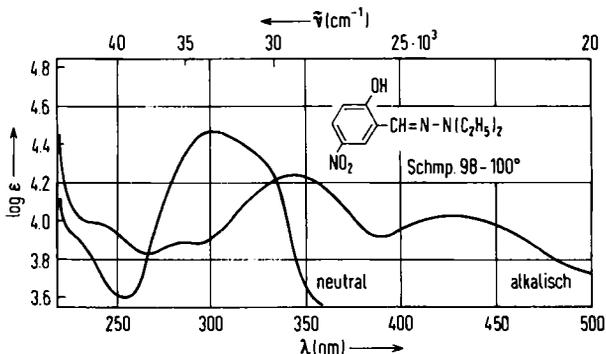
Benzalderivat von	Schmp.	λ_{max}	λ_{max}	Molare Extinktion	Extinktion
		(nm) neutral	(nm) alkalisch		
(5-Nitro-2-hydroxy-benzaldehyd	126°	234 312	247 358)
Dimethylhydrazin	164–165°	294	343 421	28 200	15 300
Diäthylhydrazin	98–100°	300	345 423	28 500	17 200 10 500
Di-n-propylhydrazin	35–37°	302	344 427	30 600	20 000 10 300
Di-n-butylhydrazin	39–40°	303	344 430	29 000	19 000 10 200
Di-n-pentylhydrazin	15–17°				
Di-n-hexylhydrazin	33–34°	303	344 428	29 300	19 400 10 300
Diisopropylhydrazin	79–80°	305	342 438	30 400	23 000 8 900
Diisobutylhydrazin	70–71°	304	344 436	29 500	20 900 10 000
Methyläthylhydrazin	118–119°	295	342 422	29 800	16 200 11 300
Methylbutylhydrazin	34–35°	297	342 426	29 800	17 400 10 600
Methylpentylhydrazin	49–50°	298	341 431	30 300	19 500 10 400
Äthylheptylhydrazin	24–25°	302	344 428	29 100	18 500 10 200
Diallylhydrazin	40–43°	296	343 425	29 400	17 500 11 900
Methylallylhydrazin	91.5–92.5°	299	350 420	29 600	16 500 11 800
1-Amino-pyrrolidin	145–146°	301	346 423	30 200	17 900 11 000
1-Amino-piperidin	174–175°	294	346 423	27 300	14 900 12 800

Tab. 2 (Fortsetzung)

Benzalderivat von	Schmp.	λ_{\max}	λ_{\max}	Molare Extinktion	
		(nm) neutral	(nm) alkalisch	neutral	alkalisch
4-Amino-morpholin	197–199°	290	347 417	27 500	14 200 13 300
4-Amino-1-methyl-piperazin	185–187°	290	347 416	28 000	14 100 13 400
Methylphenylhydrazin	178–180°	303 343	363 438	22 300 29 300	27 400 10 000
Äthylphenylhydrazin	182–184°	302 348	368 438	20 400 28 600	27 700 9 100
Diphenylhydrazin	207–208°	(232) 302 350	372 438	22 600 19 500 26 000	26 300 11 600
Methylbenzylhydrazin	125–126°	296	342 424	30 000	17 700 11 800
von Aminen und monosubstituierten Hydrazinen					
Methylamin	218–219°	257 348	398	19 300 12 700	15 400
Methylhydrazin	150–151°	287	345 416	27 200	13 000 12 700
Anilin	133.5–134°	232 307	400	15 600 11 700	18 900
Phenylhydrazin	196–198°	231 301 354	370 428	18 400 20 200 28 200	26 200 9 800

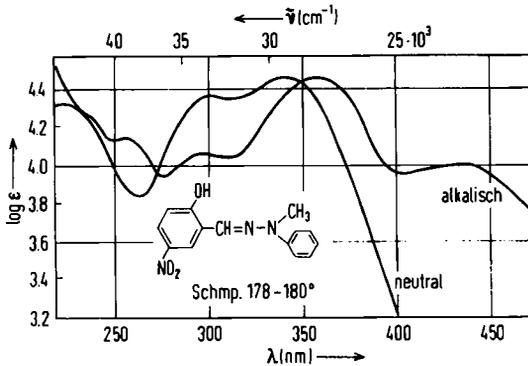
* Gemessen in Methanol bzw. nach Zusatz von 3 Tropfen 3-proz., methanol. Natriumhydroxydlösung.

Die rein aliphatischen Derivate absorbieren in geringem Maße konstitutionsabhängig im Bereich von 300 nm, während die Diaryl- und Alkylaryl-derivate ein Hauptmaximum bei 340–350 und nur ein Nebenmaximum bei 300 nm zeigen. Bei Alkalizusatz tritt bei allen Derivaten eine bathochrome Verschiebung ein. Die Dialkylderivate zeigen dann ein Hauptmaximum bei 340–350 nm und ein flaches Nebenmaximum bei 420 bis



Abbild. 1. Typisches UV-Spektrum des 2-Hydroxy-5-nitro-benzal-Derivates eines dialkyl-substituierten Hydrazins in Methanol

430 nm. Das Hauptmaximum liegt bei Diaryl- und Alkylarylderivaten in alkalischem Medium bei 370 nm, das schwache Nebenmaximum bei 438 nm (Abbild. 1, 2).

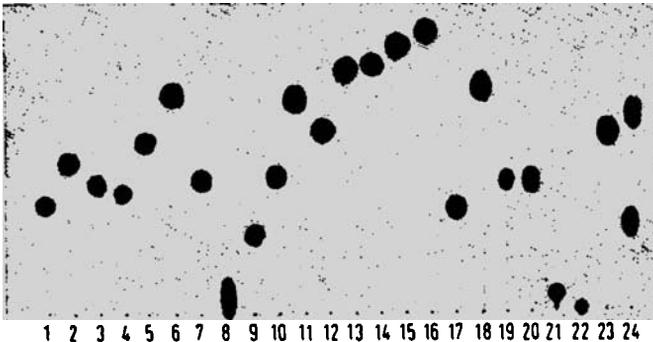


Abbild. 2. Typisches UV-Spektrum des 2-Hydroxy-5-nitro-benzal-Derivates eines alkylaryl-substituierten Hydrazins in Methanol

In den Spektren unterscheiden sich die Derivate der Hydrazine von denen der primären Amine deutlich durch die längerwellige Absorption (s. Tab. 2, unten).

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Die 5-Nitro-2-hydroxy-benzalhydrazine lassen sich ausgezeichnet auf Kieselgel dünn-schichtchromatographisch trennen. Für die meisten angegebenen Derivate ist das



Abbild. 3. Dünnschichtchromatogramme von Benzalderivaten unsymmetrischer Hydrazine, 20 γ, mit 3-proz. äthanol. Kaliumhydroxydlösung besprüht

- | | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| 1 Methyläthylhydrazin | 13 Di-n-butylhydrazin |
| 2 Methyl-n-butylhydrazin | 14 Diisobutylhydrazin |
| 3 Methylbenzylhydrazin | 15 Di-n-pentylhydrazin |
| 4 Methylallylhydrazin | 16 Di-n-hexylhydrazin |
| 5 Methyl-n-pentylhydrazin | 17 Methylphenylhydrazin |
| 6 Äthyl-n-heptylhydrazin | 18 Diphenylhydrazin |
| 7 Äthylphenylhydrazin | 19 1-Amino-pyrrolidin |
| 8 5-Nitro-2-hydroxy-benzaldehyd | 20 1-Amino-piperidin |
| 9 Dimethylhydrazin | 21 4-Amino-morpholin |
| 10 Diäthylhydrazin | 22 4-Amino-1-methyl-piperazin |
| 11 Di-n-propylhydrazin | 23 Diallylhydrazin |
| 12 Diisopropylhydrazin | 24 Testgemisch |

System Tetrachlorkohlenstoff/Äthylacetat (95 : 5) gut geeignet (Abbild. 3). Für Substanzen, die in diesem System am Startpunkt bleiben, eignet sich Chloroform/Methanol (95 : 5).

Beim Besprühen mit Alkali vertieft sich die gelbe Farbe der Flecken zu gelbbraun; die Intensität wird dabei so erhöht, daß noch 0.5 γ gut zu erkennen sind. Die Derivate der Amine werden auf der Platte durch Alkali nicht verfärbt.

Mit Kaliumhexacyanoferrat(III)²⁰⁾ färben sich die Benzalhydrazine auf der Platte intensiv blau; noch 0.05 γ sind deutlich zu erkennen.

Herrn Prof. H. DRUCKREY und Herrn Dipl.-Chem. R. PREUSSMANN, Freiburg, danken wir für die Überlassung einiger Nitrosamine.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Mikroanalysen wurden von der Firma ILSE BEETZ, vorm. Dr. Ing. A. SCHOELLER, Kronach/Oberfranken, durchgeführt. Alle Schmpp. wurden auf dem Kofler-Heizmikroskop bestimmt und sind unkorrigiert.

Reduktion der Nitrosamine

In einem 250-ccm-Rundkolben mit Magnetrührer, Kühler und Tropftrichter werden 2.1 g (55 mMol) $LiAlH_4$ in 125 ccm absol. Äther suspendiert und 50 mMol Nitrosamin in ca. 20 ccm absol. Äther innerhalb von 15 Min. zugetropft. Nach 1 Stde. Kochen, Abkühlen und Zusetzen von 4.0 ccm Wasser wird filtriert und der Äther abgedampft. Man destilliert den Rückstand bis einschließlich Dibutylhydrazin bei 760 Torr, die höheren Hydrazine i. Vak.

5-Nitro-2-hydroxy-benzal-Derivate

5 mMol unsymmetrisches Hydrazin werden zu einer Lösung von 0.84 g (5 mMol) 5-Nitro-2-hydroxy-benzaldehyd (Schuchardt, reinst) in 10 ccm Äthanol gegeben. Das Gemisch wird 5 Min. lang zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen (z. T. unter Eiskühlung) kristallisiert das 5-Nitro-2-hydroxy-benzalhydrazin aus. Die Ausbeute beträgt noch nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol 40–80%. Die Schmpp. und Spektren der Benzalhydrazine sind in Tab. 2, die Analysendaten in Tab. 3 zusammengefaßt.

Reduktion der Nitrosamine im Mikromaßstab

Eine Lösung von ca. 10 γ Nitrosamin in 5 ccm absol. Äther (oder auf Kieselgel nach l. c.^{14, 15)} vorgetrennte und mit Äther extrahierte Nitrosamine) werden in einem Reagenzglas mit 20–30 mg $LiAlH_4$ versetzt. Nach 1 Stde. bei Raumtemperatur wird überschüss. Reduktionsmittel durch Zugabe von einem Tropfen Wasser zersetzt. Man fügt zwei Tropfen Äthanol hinzu und filtriert. Das Filtrat wird unmittelbar zur Umsetzung in die Benzalderivate verwendet.

5-Nitro-2-hydroxy-benzal-Derivate im Mikromaßstab

Vorstehendes Filtrat wird nach Zusatz von 20 γ 5-Nitro-2-hydroxy-benzaldehyd in Äthanol solange im Wasserbad erhitzt, bis der Äther verdunstet ist. Die Lösung wird anschließend für die Dünnschichtchromatographie verwendet.

Dünnschichtchromatographie der Benzalhydrazine

Schicht: Kieselgel G, 250 μ , 2 Stdn. bei 110° aktiviert. Laufmittel: Tetrachlorkohlenstoff/Äthylacetat (95 : 5); für 4-Amino-1-methyl-piperazin und 4-Amino-morpholin Chloroform/Methanol (95 : 5).

²⁰⁾ A. MEHLITZ, K. GIERSCHNER und T. MINAS, Chemiker-Ztg. 87, 573 [1963].

Um die Flecke besser sichtbar zu machen, wird die Platte anschließend mit 3-proz., äthanol. Kaliumhydroxydlösung besprüht. Nachweisgrenze 0.5 γ. Noch intensiver, aber unspezifisch, ist die Blaufärbung der Benzalhydrazine mit 1-proz. Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung in 5-proz., wäbr. Salzsäure nach Erwärmen. Nachweisgrenze 0.05 γ.

Tab. 3. Analysendaten der dargestellten 5-Nitro-2-hydroxy-benzal-Derivate von Hydrazinen

Benzalderivat von	Summenformel (Mol.-Gew.)		C	H	N
Dimethylhydrazin	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₃ (209.2)	Ber.	51.72	5.31	20.11
		Gef.	51.84	4.95	19.84
Diäthylhydrazin	C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₃ (237.3)	Ber.	55.74	6.38	17.73
		Gef.	55.78	6.13	17.75
Di-n-propylhydrazin	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₃ (265.3)	Ber.	58.92	7.23	15.86
		Gef.	59.16	6.77	16.32
Di-n-butylhydrazin	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₃ (293.4)	Ber.	61.48	7.91	14.34
		Gef.	61.60	7.29	14.70
Di-n-pentylhydrazin	C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₃ (321.4)				
Di-n-hexylhydrazin	C ₁₉ H ₃₁ N ₃ O ₃ (349.3)	Ber.	65.38	8.95	12.04
		Gef.	65.60	8.45	12.26
Diisopropylhydrazin	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₃ (265.3)	Ber.	58.92	7.23	15.86
		Gef.	58.84	6.99	15.85
Diisobutylhydrazin	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₃ (293.4)	Ber.	61.48	7.91	14.34
		Gef.	61.36	7.93	14.71
Methyläthylhydrazin	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₃ (223.2)	Ber.	53.86	5.88	18.84
		Gef.	53.81	6.06	18.97
Methylbutylhydrazin	C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O ₃ (251.3)	Ber.	57.42	6.83	16.74
		Gef.	57.38	6.62	15.79
Methylpentylhydrazin	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₃ (265.3)	Ber.	58.92	7.23	15.86
		Gef.	59.28	6.84	15.70
Äthylheptylhydrazin	C ₁₆ H ₂₅ N ₃ O ₃ (307.4)				
Diallylhydrazin	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃ (261.3)	Ber.	59.82	5.79	16.10
		Gef.	59.64	5.49	16.00
Methylallylhydrazin	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ (235.3)	Ber.	56.22	5.58	17.88
		Gef.	55.96	5.75	18.01
1-Amino-pyrrolidin	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ (235.3)	Ber.	56.22	5.58	17.88
		Gef.	56.20	5.49	17.97
1-Amino-piperidin	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₃ (249.3)	Ber.	57.88	6.07	16.88
		Gef.	58.18	5.76	17.41
4-Amino-morpholin	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₄ (251.3)	Ber.	52.63	5.22	16.74
		Gef.	52.63	5.51	17.00
4-Amino-1-methyl-piperazin	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ O ₃ (264.3)	Ber.	54.59	6.11	21.22
		Gef.	54.62	6.38	20.64
Methylphenylhydrazin	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₃ (271.2)	Ber.	62.04	4.84	15.51
		Gef.	61.94	4.48	15.87
Äthylphenylhydrazin	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₃ (285.3)	Ber.	63.21	5.31	14.75
		Gef.	63.05	5.27	14.71
Diphenylhydrazin	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O ₃ (333.4)	Ber.	68.53	4.54	12.62
		Gef.	68.55	4.80	12.70

Tab. 3 (Fortsetzung)

Benzalderivat von	Summenformel (Mol.-Gew.)		C	H	N
Methylbenzylhydrazin	$C_{15}H_{15}N_3O_3$ (285.3)	Ber.	63.21	5.31	14.75
		Gef.	63.21	5.59	14.68
von Aminen und monosubstituierten Hydrazinen					
Methylamin	$C_8H_8N_2O_3$ (180.2)	Ber.	53.38	4.48	15.56
		Gef.	53.43	4.44	15.21
Methylhydrazin	$C_8H_9N_3O_3$ (195.2)	Ber.	49.27	4.65	21.55
		Gef.	49.20	5.01	21.00
Anilin	$C_{13}H_{10}N_2O_3$ (242.2)	Ber.	64.52	4.17	11.58
		Gef.	64.94	4.16	11.67
Phenylhydrazin	$C_{13}H_{11}N_3O_3$ (257.3)	Ber.	60.75	4.31	16.35
		Gef.	60.88	4.55	16.70