

Die Fraktionen 11–13 wurden mit den Mutterlaugen der Fraktionen 4–10 vereinigt und fraktioniert aus wenig Äther krystallisiert. Die erste Krystallfraktion gab nach einmaligem Umkrystallisieren aus Äther-Petroläther dünne Lamellen der α -Form vom Smp. 162–170° (Sintern ab 145°). Das zweite Krystallisat lieferte nach einmaligem Umkrystallisieren aus Äther-Petroläther dicke Plättchen vom Smp. 179–183°, welche die β -Form darstellten. Diese wurden mit den analogen Krystallen aus den Fraktionen 4–10 vereinigt, zweimal aus wenig Äther umkrystallisiert und mit Petroläther gewaschen. Es resultierten 12 mg farblose Plättchen vom Smp. 182–184° (Sintern ab 180°). Die spez. Drehung betrug $[\alpha]_D^{15} = +26,5^{\circ} \pm 3^{\circ}$ ($c = 0,981$ in Chloroform).

9,858 mg Subst. zu 1,0052 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{15} = +0,26^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$

Zur Analyse wurde 1 Stunde im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

3,628 mg Subst. gaben 9,17 mg CO₂ und 2,82 mg H₂O

C₂₅H₃₈O₆ (434,54) Ber. C 69,10 H 8,80%

Gef. „ 68,98 „ 8,70%

Die Mischprobe mit 3 α ,11 α -Diacetoxy-ätiocolensäure-methylester (II) schmolz bei 147–166°.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

115. Stabilisierte Diazoniumsalze als Reagenzien zur Bestimmung von Dioxybenzolderivaten.

I. Darstellung und Eigenschaften einiger naphthalinsulfosaurer Diazoniumsalze

von P. Heinrich und W. Schuler.

(27. III. 47)

Zur kolorimetrischen Bestimmung biochemisch interessierender Dioxybenzolderivate kamen bisher einerseits oxydierende Reagenzien, wie Phosphorwolframsäure¹⁾ und Arsenmolybdänsäure²⁾, andererseits einfach gebaute, meist in Parastellung substituierte Phenyl-diazoniumsalze³⁾ zur Anwendung.

Phosphorwolframsäure und Arsenmolybdänsäure reagieren zwar sehr empfindlich auf Dioxybenzolderivate und gestatten, solche noch in einer Konzentration von 20 bzw. 2 γ % quantitativ zu erfassen; doch ist die Spezifität des *Folin*'schen Reagens gering⁴⁾, ein Einwand, der auch gegen Arsenmolybdänsäure, selbst in der verbesserten Anwendungsweise von *Shaw*⁵⁾, gemacht wurde⁶⁾. Die

¹⁾ O. *Folin*, W. B. *Cannon* und W. *Denis*, J. Biol. Chem. **13**, 477 (1912).

²⁾ J. C. *Whitehorn*, J. Biol. Chem. **108**, 633 (1935).

³⁾ Vgl. A. A. *Hymans van den Bergh* und P. *Müller*, Bioch. Z. **77**, 90 (1916); H. *Friend*, J. Biol. Chem. **57**, 497 (1923); R. C. *Theis* u. S. R. *Benedict*, J. Biol. Chem. **61**, 67 (1924).

⁴⁾ H. *Fujiwara* und E. *Kataoka*, Z. physiol. Ch. **216**, 133 (1933).

⁵⁾ F. H. *Shaw*, Biochem. J. **32**, 19 (1938).

⁶⁾ W. R. *Bloor* und S. S. *Bullen*, J. Biol. Chem. **138**, 727 (1941).

bisher gebrauchten Diazoniumverbindungen, wie diazotierte Sulfanilsäure¹⁾, 4-Nitro-1-diazo-benzol¹⁾, 2,5-Dichlor-1-diazo-benzol²⁾ und 4-Acetyl-1-diazo-benzol³⁾, geben mit konstitutionell recht verschiedenen Phenolen und Imidazolderivaten Azofarbstoffe bzw. Farbreaktionen sehr ähnlicher Farbnuance, lassen also, bei relativ geringer Empfindlichkeit, ebenfalls eine befriedigende Spezifität vermissen.

Oxydierende Reagenzien von grösserer Spezifität zu finden, schien uns von vorneherein wenig aussichtsreich. Wir suchten daher nach Diazoniumverbindungen mit grösserer Spezifität, besonders gegenüber biologisch wichtigen Oxy- und Dioxybenzolen, unter besonderer Beachtung der Eigenschaften sowohl der interessierenden Substrate als auch der Reagenzien.

Dioxybenzolderivate sind bekanntlich in alkalischer Lösung häufig schon gegen Luftsauerstoff sehr empfindlich, weshalb wir eine Kupplungsreaktion in alkalischem Milieu zu umgehen suchten. Wir fanden in der älteren Literatur Belege dafür, dass die erwähnten Körper auch in mineralsaurem Milieu mit geeigneten Diazoniumsalzen reagieren können⁴⁾. Daher prüften wir zahlreiche diazotierte Amine auf ihre Eignung zum Nachweis und zur kolorimetrischen Bestimmung interessierender Dioxybenzole in mineralsaurer Lösung.

Aber auch in saurer Lösung können die genannten Substrate wie Reagenzien durch Oxydationsmittel, wie salpetrige Säure, in unkontrollierbarer Weise oxydiert werden; ein Überschuss an Nitrit musste daher ausgeschlossen werden. Dies konnte aber nicht durch die naheliegende Verwendung eines Überschusses an Amin erfolgen, da ein solcher durch Kupplung des Diazoniumsalzes mit nicht umgesetzter Base einen grossen, oft auch zeitlich veränderlichen Blindwert verursachen würde.

Aus den genannten Gründen haben wir die diazotierten Amine nicht als solche auf ihre Eignung geprüft, sondern in Form ihrer naphthalinsulfosauren Salze. Diese Naphthalinsulfonate können nach einer erstmals von *P. Becker*⁵⁾ beschriebenen Methode isoliert und absolut nitrit- und aminfrei gewonnen werden, sind sehr stabil gegen Wärme und andere die Zersetzung fördernde Einflüsse, im Dunkel fast unbegrenzt haltbar und ausserdem genau dosierbar.

Unter zahlreichen Naphthalinsulfonaten, welche wir auf ihre Reaktionsfähigkeit mit verschiedenen Phenolen und Aminosäuren in mineralsaurer Lösung geprüft haben, fanden sich einige, welche als

¹⁾ Vgl. *A. A. Hymans van den Bergh* und *P. Müller*, *Bioch. Z.* **77**, 90 (1916); *H. Friend*, *J. Biol. Chem.* **57**, 497 (1923); *R. C. Theis* u. *S. R. Benedict*, *J. Biol. Chem.* **61**, 67 (1924).

²⁾ *L. Hermanns* und *P. Sachs*, *Z. physiol. Ch.* **114**, 79 (1921).

³⁾ *H. J. Prebluda* und *E. V. McCollum*, *J. Biol. Chem.* **127**, 495 (1939).

⁴⁾ *K. J. P. Orton* und *R. W. Eweratt*, *Soc.* **93**, 1021 (1908).

⁵⁾ *P. Becker*, D.R.P. 81 039, 86 367, 92 237, 94 280, 89 998, 88 949. Vgl. auch D.R.P. 92 169 und 93 305, *Frld.* **4**, 678—686.

Reagenzien zur Bestimmung biochemisch wichtiger Dioxybenzole geeignet sein dürften, wie wir bereits kurz mitteilten¹⁾. Es sind dies, ausser dem schon bekannten α -naphthalinsulfosauren 4-Nitro-1-diazobenzol²⁾, die α -Naphthalinsulfonate des 4-Nitro-2-chlor-1-diazobenzols und des 4-Nitro-2-methoxy-1-diazobenzols und die β -Naphthalinsulfonate des 4-Nitro-2-chlor-1-diazobenzols, des 4-Methyl-2-nitro-6-brom-1-diazobenzols und des 4-Nitro-2-methoxy-5-chlor-1-diazobenzols. Ihre Darstellung und Eigenschaften werden im experimentellen Teile beschrieben, über ihre Verwendung als Reagenzien werden wir später berichten.

Herrn Prof. *H. de Diesbach*, Direktor des chem. Instituts der Universität Fribourg, danken wir für freundliche Beratung.

Experimenteller Teil.

1. α -Naphthalinsulfosaures 4-Nitro-1-diazobenzol.

Zur Reindarstellung dieses bereits bekannten Salzes³⁾ in kleinerem Maßstab werden am besten 13,8 g 4-Nitro-1-amino-benzol in der üblichen Weise diazotiert⁴⁾. Zu der filtrierten, auf 0° abgekühlten Diazoniumlösung werden 25 g α -Naphthalinsulfosäure, in 70 cm³ Wasser gelöst, zugegeben. Der sich bildende Niederschlag wird scharf abgesaugt, 2-mal in 100 cm³ 5-proz. Salzsäure und 5-mal in 100 cm³ Wasser aufgeschlämmt, jedesmal abgesaugt, schliesslich in 100 cm³ Wasser suspendiert, 2 Stunden in einem dunklen Ort stehen gelassen und abermals abgesaugt. Schliesslich wird im Vakuumexsikkator getrocknet.

Die sorgfältig gepulverte Substanz wird jetzt zweimal mit 100 cm³ Methanol verührt, je 10 Minuten stehen gelassen, filtriert und im Exsikkator getrocknet. Man erhält so 15 g sehr reinen Diazoniumsalzes. Durch Lösen in Wasser von 35° und nachfolgendes Einengen unter vermindertem Druck erhält man den Körper in schönen gelben Nadeln. Das nur gewaschene, wie auch das kristallisierte Produkt schmelzen bei langsamem Erhitzen zwischen 134 und 136° (Zers.).

Für den von uns angestrebten Zweck ist das Umkrystallisieren eher ein Nachteil, da sich die Substanz im ursprünglichen feinkörnigen Zustand schneller löst und bereits hinreichend rein ist, wie die nachfolgenden Stickstoffbestimmungen zeigen:

4,47; 3,02 mg Subst. gaben 0,469; 0,314 cm³ N₂ (27°, 737 mm; 27°, 738 mm)

C₁₆H₁₁O₅N₃S Ber. N 11,76 Gef. N 11,53; 11,49%

Die so gereinigte Verbindung ist in der Kälte mässig löslich in Eisessig, schwerer in Wasser, Methanol und Äthanol, kaum löslich in Benzol, Chloroform und Äther. Pyridin bewirkt Zersetzung, ebenso Kalium-jodid, -cyanid und -rhodanidlösungen.

Mit Phenolen und zwei biologisch wichtigen Imidazolderivaten gibt das Diazoniumsalz folgende Farbreaktionen⁵⁾:

¹⁾ *W. Schuler* und *P. Heinrich*, Exper. 1, 235 (1945.)

²⁾ *P. Becker*, D.R.P. 92237, Frdl. 4, 679.

³⁾ *P. Becker*, siehe Fussnote ²⁾.

⁴⁾ *L. Gattermann* und *H. Wieland*, Praxis des org. Chemikers, Berlin 1943, Verlag de Gruyter, 30. Aufl. S. 282.

⁵⁾ Die Farbreaktionen wurden wie folgt ausgeführt: Zu 10 cm³ 1 mg-proz. Lösung des zu untersuchenden Körpers in 0,1-n. Salzsäure wurden 2 cm³ 100 mg-proz. Lösung des Diazoniumsalzes, ebenfalls in 0,1-n. Salzsäure, gegeben. Die Färbung wird nach einstündigem Stehen in saurem Medium beobachtet, dann 1 cm³ gesättigter Natriumacetatlösung und 2 cm³ 2-n. Natronlauge zugefügt und die Farbtonung in alkalischem Medium beobachtet.

Substrat	Färbung		Substrat	Färbung	
	sauer	alkalisiert		sauer	alkalisiert
Phenol	fbf.	orange	Histidin	fbf.	orange
Brenzcatechin	blassgelb	rotbraun	Histamin	fbf.	orange
Resorcin	gelb	violett	Adrenalin	blassgelb	gelb
Hydrochinon	gelb	ziegelrot	Dioxyphenylalanin	gelb	rotbraun
Tyrosin	fbf.	rötl.-braun	Leerversuch	fbf.	gelb
Tyramin	fbf.	gelbbraun			

2. α -Naphthalinsulfosaures 4-Nitro-2-chlor-1-diazo-benzol.

17,3 g 4-Nitro-2-chlor-1-amino-benzol (*Eastman-Kodak*) werden mit 100 cm³ Salzsäure D. 1,19 und 50 cm³ Wasser übergossen und die Suspension einige Minuten zum Sieden erhitzt. Alsdann giesst man das Gemisch auf 100 g feingepulvertes Eis und sorgt gleichzeitig für äussere Kühlung. Unter kräftiger mechanischer Rührung wird während einer halben Stunde tropfenweise eine Lösung von 7 g Natriumnitrit in 50 cm³ Wasser zu der Suspension zugefügt. Von etwas unverändertem Amin wird abfiltriert, das Filtrat auf -5° gekühlt und mit 25 g α -Naphthalinsulfosäure, gelöst in 100 cm³ Wasser, versetzt. Sollte sich die Bildung des festen Salzes etwas verzögern, so genügt meist schon kurzes Reiben an der Wand des Reaktionsgefässes, um ein fast augenblickliches Ausfallen und Gestehen der tiefroten Lösung zu einem orangeroten Brei zu bewirken. Es wird abgesaugt und im übrigen zwecks weiterer Reinigung genau wie beim 4-Nitro-1-diazo-benzol angeben verfahren. Nach dem Waschen mit Methanol und Trocknen im Vakuumexsikkator erhält man 18–20 g sehr reines Diazoniumsalz.

Bereits das mehrmals mit Wasser gewaschene Salz ist analysenrein. Zum Zweck der Verwendung als Reagens ist die Behandlung mit Methanol aber trotzdem von Nutzen, da sie ein sehr lockeres, leicht lösliches Pulver liefert, welches bei langsamem Erhitzen zwischen 138–140° schmilzt und sich in seinen Eigenschaften wenig vom α -naphthalinsulfosauren 4-Nitro-1-diazo-benzol unterscheidet.

2,91; 3,88 mg Subst. gaben 0,280; 0,376 cm³ N₂ (24°, 741 mm; 24°, 737 mm)

4,189; 4,490 mg Subst. gaben 1,534; 1,585 mg AgCl

C₁₆H₁₀O₃N₃ClS Ber. N 10,73 Cl 9,05%
Gef. „ 10,77; 10,80 „ 9,06; 8,73%

Substrat	Färbung		Substrat	Färbung	
	sauer	alkalisiert		sauer	alkalisiert
Phenol	fbf.	rotorange	Histidin	fbf.	orange
Brenzcatechin	gelb	violettbraun	Histamin	fbf.	orange
Resorcin	tieforange	violett	Adrenalin	gelb	grüngelb
Hydrochinon	gelborange	orange	Dioxyphenylalanin	orange	braunrot
Tyrosin	fbf.	blauviolett	Leerversuch	fbf.	gelb
Tyramin	fbf.	blassviolett			

3. α -Naphthalinsulfosaures 4-Nitro-2-methoxy-1-diazo-benzol.

16,8 g 1-Amino-4-nitro-2-methoxy-benzol¹⁾ werden in einer Mischung von 50 cm³ Salzsäure und 50 cm³ Wasser zum Sieden erhitzt und das Ganze hierauf auf 100 g Eis

¹⁾ *Griesheim*-Elektron, D.R.P. 228357, Frdl. 10, 134.

gegeben, wobei man gleichzeitig von aussen kühlt. Die Diazotierung und Weiterbehandlung des Diazoniumsalzes erfolgt wie beim α -naphthalinsulfosauren 4-Nitro-1-diazo-benzol beschrieben, mit dem Unterschied, dass zum Aufschlemmen mit Wasser und Methanol jeweils nur 50 cm³ verwendet werden. Das mit Methanol gewaschene dunkelgelbe, mikrokrystallinische Pulver schmilzt, langsam erhitzt, bei 146–148° unter Zersetzung.

4,119; 5,628 mg Subst. gaben 7,95; 10,84 mg CO₂ und 1,29; 1,76 mg H₂O
3,30; 3,77 mg Subst. gaben 0,325; 0,357 cm³ N₂ (25°, 744 mm; 24°, 744 mm)

C₁₇H₁₃O₆N₃S Ber. C 52,71 H 3,38 N 10,85%
Gef. „ 52,69; 52,58 „ 3,50; 3,50 „ 11,04; 10,65%

Das Sulfonat ist leicht löslich in Eisessig, löslich in Wasser und Methanol, mässig löslich in Äthanol, Aceton, Benzol und Chloroform.

Substrat	Färbung		Substrat	Färbung	
	sauer	alkalisiert		sauer	alkalisiert
Phenol	blassgelb	rötl.-orange	Histidin	blassgelb	orange
Brenzcatechin	orange	tieforange	Histamin	blassgelb	orange
Resorcin	blassgelb	braunviolett	Adrenalin	gelb	gelbgrün
Hydrochinon	gelb	orange	Dioxyphenylalanin	gelb	orange
Tyrosin	blassgelb	braun	Leerversuch	blassgelb	gelb
Tyramin	blassgelb	bräunlich			

4. β -Naphthalinsulfosaures 4-Nitro-2-chlor-1-diazo-benzol.

Die Darstellung und Reinigung dieses Körpers erfolgt in analoger Weise wie beim α -Naphthalinsulfonat beschrieben. Das ziegelrotgefärbte Diazoniumsalz schmolz bei langsamem Erhitzen zwischen 148 und 150° und gab bei der Analyse die folgenden Werte:

2,24; 3,62 mg Subst. gaben 0,218; 0,351 cm³ N₂ (25°, 743 mm; 24°, 744 mm)
6,072 mg Subst. gaben 2,240 mg AgCl

C₁₆H₁₀O₃N₃ClS Ber. N 10,73 Cl 9,05%
Gef. „ 10,90; 10,91 „ 9,13%

Eigenschaften und Farbreaktionen unterscheiden sich kaum von denen des α -naphthalinsulfosauren Salzes.

5. β -Naphthalinsulfosaures-4-Methyl-2-nitro-6-brom-1-diazo-benzol.

2,31 g 4-Methyl-2-nitro-6-brom-1-amino-benzol¹⁾ werden in 20 cm³ Eisessig gelöst, mit einer Lösung von 3 g Naphthalinsulfosäure in 10 cm³ Eisessig versetzt und 1,2 cm³ Amylnitrit tropfenweise zugefügt, wobei die Temperatur nicht über 10° steigen soll. Nach einiger Zeit beginnt sich das Diazoniumsalz krystallin abzusecheiden. Es wird abgesaugt und mit 10 cm³ Eisessig gewaschen. Die Substanz wird 6-mal mit 20 cm³ Wasser verrührt, eine Viertelstunde stehen gelassen, abgesaugt und getrocknet. Man verreibt noch dreimal mit je 5 cm³ Methanol, filtriert und trocknet abermals. Die Substanz stellt ein orange-gelbes Pulver dar mit einem Schmelzpunkt von 132–134° unter Zersetzung. Sie ist mässig löslich in Eisessig, Alkohol und Methanol, wenig in Aceton und Wasser, kaum löslich in Äther, Benzol und Chloroform. Sie konnte infolge ihrer grossen Zersetzlichkeit nicht völlig analysenrein erhalten werden.

4,380; 4,919 mg Subst. gaben 7,17; 8,02 mg CO₂ und 1,08; 1,28 mg H₂O
3,87 mg Subst. gaben 0,308 cm³ N₂ (23°, 739 mm)

C₁₇H₁₂O₃N₃BrS Ber. C 45,34 H 2,69 N 9,33%
Gef. „ 44,67; 44,49 „ 2,76; 2,91 „ 8,92%

¹⁾ J. B. Cohen u. P. K. Dutt, Soc. 105, 510 (1911).

Substrat	Färbung		Substrat	Färbung	
	sauer	alkalisiert		sauer	alkalisiert
Phenol	blassviolett	orange	Histidin	blassviolett	gelborange
Brenzcatechin	gelbgrün	braun	Histamin	blassviolett	gelborange
Resorcin	gelb	rotorange	Adrenalin	orange	orange
Hydrochinon	gelbgrün	orange	Dioxyphenylalanin	gelbgrün	orange
Tyrosin	blassviolett	orange	Leerversuch	blassviolett	blassgelb
Tyramin	blassviolett	orange			

6. β -Naphthalinsulfosaures 4-Nitro-2-methoxy-5-chlor-1-diazo-benzol.

20,25 g 4-Nitro-2-methoxy-5-chlor-1-amino-benzol¹⁾ werden in 150 cm³ Salzsäure und 75 cm³ Wasser suspendiert, kurze Zeit erhitzt und die Mischung hierauf auf 120 g feingestossenes Eis gegeben. Gleichzeitig wird für äussere Kühlung Sorge getragen. Die Diazotierung erfolgt wie bei den andern Aminen, ebenso die weitere Behandlung des Naphthalinsulfonates. Nur wird das Aufschlemmen in Wasser und in Methanol jeweils bloss mit 50 cm³ Wasser und Methanol vorgenommen. Man erhält nach dem Waschen mit Methanol 15–16 g des Sulfonates in Form eines hellbraunen, mikrokristallinen Pulvers, das, langsam erhitzt, zwischen 150 und 153° unter Zersetzung schmilzt.

3,800 mg Subst. gaben 0,350 cm³ N₂ (24°, 744 mm)

6,510; 5,148 mg Subst. gaben 2,218; 1,729 mg AgCl

C₁₇H₁₂O₆N₃ClS Ber. N 9,96 Cl 8,41%

Gef. „ 10,07 „ 8,43; 8,31%

Das β -naphthalinsulfosaure 4-Nitro-2-methoxy-5-chlor-1-diazo-benzol ist leicht löslich in Eisessig, löslich in Wasser und Methanol, wenig löslich in Äthanol, Benzol und Chloroform und kaum löslich in Aceton und Äther.

Substrat	Färbung		Substrat	Färbung	
	sauer	alkalisiert		sauer	alkalisiert
Phenol	gelb	orangerot	Histidin	gelb	orange
Brenzcatechin	gelb	orangebraun	Histamin	gelb	orange
Resorcin	gelb	purpur	Adrenalin	gelb	grün
Hydrochinon	gelb	orange	Dioxyphenylalanin	gelb	orangebraun
Tyrosin	gelb	gelbbraun	Leerversuch	gelb	gelb
Tyramin	gelb	bräunlich			

Die Analysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium der CIBA-Aktiengesellschaft, Basel, unter Leitung von Herrn Dr. Gysel.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Fribourg.

¹⁾ *Agfa*, D.R.P. 137956, Frdl. 6, 1299.