

EIN NEUER ABER FARBIGER NACHWEIS VON ALKALOIDEN UND ORGANISCHEN BASEN MIT TETRAPHENYLBORNATRIUM*

RICHARD NEU

*Chemisches Forschungslaboratorium der Firma Dr. Willmar Schwabe G.m.b.H.,
Karlsruhe-Durlach (Deutschland)*

(Eingegangen den 16. Juli 1962)

Das von WITTIG¹ synthetisierte TPBNa** hat als Reagenz eine weitgehende Bedeutung erlangt². Der Vorteil liegt in der Erfassung von Kalium-, Ammonium-, Rubidium-, Cäsium- und Thallium-Ionen. Ferner können einwertige Metallkomplexe, Onium-Verbindungen und organische Basen, wie Alkaloide, biogene Amine, basische Aminosäuren und bestimmte synthetische Arzneimittel, nicht nur quantitativ, sondern auch in geringen Mengen genau ermittelt werden³.

Der Anwendungsbereich von TPBNa wurde von NEU erweitert. Dazu gehört die getrennte Bestimmung von zwei aber gemeinsam mit TPBNa fällbaren Verbindungen, wie Kalium und Triäthanolamin⁴. Ferner der Nachweis und die quantitative Bestimmung der α,ω -Dihydroxypolyäthylenoxyde (PAeO) und der sich davon ableitenden Polyoxyaethylen(POAe)-Sorbitanfettsäureester^{5***}, unter Verwendung von TPBNa und Barium-Ionen.

Obwohl das TPBNa als ausgezeichnetes Fällungsmittel für Alkaloide brauchbar ist, sind die damit erhaltenen Niederschläge weiss. Für den papierchromatographischen Nachweis oder den Tüpfel-Test von Alkaloiden konnte das TPBNa deshalb bisher nicht herangezogen werden, weil im Gegensatz zu anderen Alkaloid-Reagentien, z.B. dem DRAGENDORFF-Reagenz, keine Farbreaktion eintritt, die eine Lokalisation der Substanz anzeigt.

In vorliegender Arbeit wird beschrieben, dass TPBNa als farbiger Nachweis für die Feststellung und Lokalisierung von Alkaloiden nach papierchromatographischer Trennung und im Tüpfel-Test verwendet werden kann.

Das Auffinden des Nachweises hat sich aus folgenden Arbeiten entwickelt. In einer vorangegangenen Arbeit hat NEU⁶ gezeigt, dass mit dem von demselben Autor zuerst synthetisierten Diphenylborinsäureanhydrid⁷ der Nachweis von quartären Ammonium-Verbindungen, wie z.B. Cholin, Acetylcholin, aber auch langkettigen oberflächenaktiven Verbindungen, wie z.B. Pendiomid[®], Quartamon[®], Bradosol[®], Zephirol[®], Trypaflavin[®], Eulan NK[®], Antrenyl[®] und Triphenyl-dodecylphosphoniumbromid durch die gleichzeitige Verwendung von Flavon-3-olen als charakteristisch gefärbte Niederschläge möglich ist. In dem Zusammenhang hat NEU⁹ ferner gezeigt, dass eine Unterscheidung der mit dem Anhydrid der Diphenylborinsäure und quartären Ammonium-Verbindungen bzw. Aminsalzen entstehenden

* Herrn Prof. Dr. FRITZ FEIGL zum 70. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

** Tetraphenylbornatrium, als Kalignost[®] im Handel, Heyl u.Co. Berlin-Steglitz.

*** Tweene[®].

Fällungen auf einfache Weise durchführbar ist. Die Differenzierung der mit Diphenylborinsäureanhydrid, Flavon-3-olen und niederen bzw. höhermolekularen quartären Ammonium-Verbindungen entstehenden roten bis rotorangen Niederschläge ist durch ihr Verhalten gegenüber Ammoniak gegeben. Die Farbe bleibt bei den Niederschlägen mit vierbindigem Stickstoff erhalten, während die mit Aminen und ampholytaktiven capillarwirksamen Substanzen erhaltenen Färbungen gegenüber Ammoniak instabil sind.

Das Verhalten von Diarylborinsäureanhydriden als Reagenz in der analytischen Chemie hat NEU¹⁰ zusammenfassend beschrieben.

Vor einiger Zeit hat Verfasser die Frage zu klären unternommen, ob das bei der Umsetzung von POAe und TPBNa verwendete Barium-Ion auch durch andere Substanzen ersetzt werden kann. So wurde beispielsweise geprüft, ob sich Flavonoide dafür eignen und damit zunächst ein qualitativer Nachweis möglich ist. Das Ergebnis zeigte bereits, dass mit der Modifikation der Methode gleichzeitig ein Weg gegeben ist, um Flavonoide im Niederschlag abzuscheiden. Das weitere überraschende Ergebnis war aber die Feststellung, dass für die entstehenden Niederschläge im U.V.-Licht eine aussergewöhnlich starke Fluoreszenz charakteristisch ist. Durch die Verwendung verschieden substituierter Flavonoide traten verschiedene Fluoreszenzfarben auf. Der Farbton liess eine Abhängigkeit von der Konstitution erkennen. Eine Auswertung der Fluoreszenzfarben im Zusammenhang mit der Konstitution wurde schon durchgeführt, über die am angeführten Orte berichtet wird.

Die Übertragung der Reaktion für eine papierchromatographische Prüfung der POAe und Tweene[®] ergab einen neuen Nachweis, der beschrieben wurde¹¹.

Auf Grund des Verhaltens der POAe kann angenommen werden, dass sie durch die verwendeten Reagentien ein Verhalten wie Onium-Verbindungen aufweisen.

Bei der Prüfung des Verhaltens von Polyhydroxy-Verbindungen gegenüber den gleichen Reagentien im Tüpfel-Test und durch Chromatographie zeigte sich, dass die Reaktion darauf ebenfalls anspricht. Die Beschreibung erfolgt in dieser Zeitschrift¹².

Für die Papierchromatographie von Alkaloiden und organischen Basen sind eine Anzahl von Fließmitteln bekannt¹³. Da der Zweck vorliegender Arbeit nicht eine Trennung, sondern einen Nachweis zum Gegenstand hat, ist für die Versuche nur ein Lösungsmittel verwendet worden (siehe Tabelle I).

Das Chromatogramm wurde nach dem Trocknen mit einer 1 %igen Lösung vom TPBNa in mit Wasser gesättigtem Butanon gesprüht, das Lösungsmittel durch Trocknen entfernt und dann mit einer 0.015 %igen Lösung eines Flavon-3-ols oder seiner Glykoside in Methanol gesprüht, bzw. durchgezogen und an der Luft getrocknet.

Von den zahlreichen Flavonolen konnte für die vorliegende Beschreibung nur eine Auswahl getroffen werden. Sie beschränkt sich auf ein Flavon-3-ol mit einer Hydroxyl-Gruppe in 5-Stellung, Quercetin (3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavon), seine beiden Glykoside Quercetin-3-galaktosid (Hyperin) und Quercetin-3-rhamnoglucosid (Rutin) sowie auf ein Flavon-3-ol mit einer in 5-Stellung fehlendem Hydroxyl-Gruppe das Fisetin (3,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon).

Der Vergleich der Eignung der genannten Flavon-3-ole ergibt die absteigende Reihenfolge: Fisetin, Quercetin, Hyperin, Rutin.

Die in 3-Stellung befindliche Hydroxyl-Gruppe hat für den Nachweis anscheinend eine wesentliche Bedeutung, wobei angenommen wird, dass die $-C(=O)-C(OH)=C-O-$ Gruppierung des γ -Pyronringes an dem Ausfall der Reaktion beteiligt ist. Die

Verwendung des nicht substituierten 3-Hydroxy-phenyl-benzo- γ -pyrons wird im Zusammenhang mit einer folgenden Arbeit beschrieben.

In Anbetracht der grossen Anzahl von Alkaloiden wurde zur Feststellung der generellen Brauchbarkeit der Methode eine Auswahl getroffen. Die aufgetragene Menge betrug 20 μg pro Alkaloid. Die Anzeige, ob Stickstoff in einer Substanz in primärer, sekundärer, tertiärer oder in quartärer Bindung vorliegt, ist durch das Auftreten einer charakteristischen Farbreaktion gekennzeichnet. Der Nachweis ist zunächst schnell im Tüpfel-Test zu führen. Damit zeigt sich wieder die Bedeutung des Tüpfel-Testes als allgemeine Voraussetzung für qualitative Nachweise und besonders für papierchromatographische. Die schnelle Durchführung des Tüpfel-Testes, der vor der Papierchromatographie vorgenommen wird, sagt zweierlei aus:

- (1) ob die Substanz durch ein Reagenz angezeigt wird und,
- (2) kann bereits die für das Papierchromatogramm geeignete Menge vorher festgestellt werden.

Die Farbtöne sind orange, orangefarben und rot. Wegen der genauen Charakterisierung des Farbtones, wie diese objektiv anzugeben ist, wird auf die Arbeit von NEU¹⁴ hingewiesen. Das Reagenz entspricht vergleichsweise dem nach DRAGENDORFF.

Von allgemeinem Interesse ist eine Entscheidung in welcher Bindungsform das Stickstoff-Atom vorliegt. Eine Differenzierung, ob ein tertiäres oder ein quartäres Stickstoff-Atom vorliegt, ist unter Verwendung des hier beschriebenen Nachweises möglich. Das Verfahren zur Unterscheidung der Stickstoff-Bindung wird in dieser Zeitschrift beschrieben¹⁵.

VERSUCHSTEIL

Papier: Schleicher u. Schüll 2043 b.

Fließmittel: *n*-Butanol-Salzsäure-Wasser = 100 ml + 26 ml (25 %ig) + 39 ml.

Reagentien: (a) 1 %ige Lösung von Tetraphenylbornatrium in mit Wasser gesättigtem Butanon.

(b) Das gebrauchsfertige Reagenz wird aus 1 ml 0.1 %iger Fisetin Lösung in Methanol nach Zugabe von 6 ml Methanol bereitet.

TABELLE I

<i>Alkaloid</i>	<i>R_F-Wert</i>	<i>Alkaloid</i>	<i>R_F-Wert</i>
Yohimbin	0.73	Harman	0.81; 0.75
Papaverin	0.72	Histamin	—
Arecolin	0.59	Noscapin	0.74
Novocain	0.26	Eserin	0.70
Atropin*	0.74	Codein	0.58
Chinin	0.59; 0.67	Coniin	0.82
Preocarpin	0.43	Colchicin	0.96
Scopolamin	0.53	Bruцин	0.57
Strychnin	0.61	Sparteин	0.38
Tetrahydroharman	0.81; 0.77	Cholin	0.20**
Harmalin	0.79; 0.73	Acetylcholin	0.36**

* In gleicher Weise ist das Alkaloid Atropin in einer Tinktur aus *Atropa belladonna* nachweisbar.

** Flecken werden erst nach einigen Stunden sichtbar.

Bei allen Substanzen handelt es sich um Präparate des Handels.

ZUSAMMENFASSUNG

Das zum Nachweis von Alkaloiden vorgeschlagene Tetraphenylborosodium ist wegen der Bildung weisser Niederschläge nicht im Tüpfel-Test oder im Papierchromatogramm geeignet.

In vorliegender Arbeit wird gezeigt, dass aus Alkaloiden und anderen organischen Basen mit Tetraphenylborosodium entstehende Niederschläge durch charakteristische kräftige Farbtöne im Tageslicht sichtbar gemacht werden können.

Die Bildung der Farbtöne wird durch zusätzliche Verwendung vom 3-Hydroxyphenyl-benzo- γ -pyronen bewirkt. Besonders geeignet sind, unabhängig vom weiterer Substitution durch Hydroxyl-Gruppen, solche Phenyl-benzo- γ -pyrone, die in 5-Stellung keine Hydroxyl-Gruppe als Substituenten enthalten.

Das Verhalten der Reagentien wird an einer Anzahl von Modell-Substanzen untersucht und die Brauchbarkeit der Methode festgestellt.

Die auftretenden Farbtöne liegen im orangen, orangerothem und roten Bereich. Die Farben sind im Tageslicht und im U.V.-Licht zu erkennen.

Das Verfahren ist sowohl in der Papierchromatographie als auch im Tüpfel-Test anwendbar.

Für das Tetraphenylborosodium wird mit vorliegender Arbeit ein weiterer neuer Verwendungszweck beschrieben: Die farbige Kennzeichnung der bisher nur weissen Tetraphenylborate von Alkaloiden.

SUMMARY

Tetraphenylborosodium, which has been recommended as a reagent for the detection of alkaloids, is not suitable for spot tests or for use in paper chromatography, because white precipitates are formed.

In this paper it is shown that the precipitates formed when alkaloids and other organic bases react with tetraphenylborosodium can be made visible in daylight, characteristic strong colours being obtained.

These colours are obtained by the subsequent addition of 3-hydroxyphenyl-benzo- γ -pyrones. Especially suitable are such phenyl-benzo- γ -pyrones that have no hydroxyl group at position 5, irrespective of further substitution by hydroxyl groups.

The behaviour of the reagents was investigated with a number of model substances and the applicability of the method determined.

The colours obtained fall within the range orange, orange-red and red, and can be observed in daylight and U.V. light.

The method can be used in paper chromatography as well as for spot tests.

In this paper a new application of tetraphenylborosodium is described: the characterization by means of colours of tetraphenylborates of alkaloids, which hitherto have only been obtained as white precipitates.

LITERATUR

- ¹ G. WITTIG, G. KEICHER, A. RUECKERT UND IP. RAFF, *Ann.*, 573 (1949) 114; 573 (1950) 195; *Angew. Chem.*, 62 (1950) 231.
² A. J. BARNARD JR., *Chemist-Analyst*, 44 (1955) 104; 45 (1956) 110; A. J. BARNARD JR. UND H. BUECHL, *ebenda*, 46 (1957) 16; 47 (1958) 46; 48 (1959) 44; A. J. BARNARD JR. UND W. W. WENDLANDT, *Rev. Soc. Quim. Mex.*, 3 (1959) 269.

- ³ O. E. SCHULTZ UND G. MAYER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 99 (1952) 21, 358.
- ⁴ R. NEU, *Z. Anal. Chem.*, 143 (1954) 254.
- ⁵ R. NEU, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 59 (1957) 823; *Seifen-Oele-Fette-Wachse*, 84 (1958) 167; *Arzneimittel-Forsch.*, 9 (1959) 585.
- ⁶ R. NEU, *Z. Anal. Chem.*, 143 (1954) 30.
- ⁷ R. NEU, *Chem. Ber.*, 87 (1954) 802; 88 (1955) 1761.
- ⁸ H. STOETTER, *Angew. Chem.*, 59A (1947) 145.
- ⁹ R. NEU, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 57 (1955) 568.
- ¹⁰ R. NEU, *Chemist-Analyst*, 47 (1958) 106.
- ¹¹ R. NEU, *Seifen-Oele-Fette-Wachse*, 87 (1961) 657.
- ¹² R. NEU, *J. Chromatog.*, vorgesehen z. Druck.
- ¹³ Vgl. I. M. HAIS UND K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, Bd. I, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1958, S. 545; H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, Springer, Berlin, 1955.
- ¹⁴ R. NEU, *Mikrochim. Acta*, (1961) 206.
- ¹⁵ Vorgesehen z. Druck in *J. Chromatog.*

J. Chromatog., 11 (1963) 364-368