

CHROM. 4426

EINIGE NEUE REAGENZIEN ZUR CHROMATOGRAPHISCHEN IDENTIFIZIERUNG VON SÄUREN, ALKOHOLEN UND AMINEN

J. CHURÁČEK

Institut für Analytische Chemie, Chemische Hochschule, Pardubice (Tschechoslowakei)

SUMMARY

New reagents for the chromatographic identification of acids, alcohols and amines

Main reasons are given for the use of derivatives for the identification of substances by means of paper and thin-layer chromatography. A stress is put on the increase of detection sensitivity and a simple preparation of agents and derivatives. For the identification of acids, substituted benzyl and phenacyl esters were used; for that of alcohols and amines, N,N-dimethyl-*p*-aminobenzeneazobenzoyl chloride served as a reagent. The esters or amides produced are intensively coloured substances with good chromatographic properties.

Die Auswahl von Derivaten zur Identifizierung von organischen Stoffen durch Papier- und Dünnschichtchromatographie wird nach ganz anderen Regeln gerichtet als bei üblichen Identifizierungsmethoden der organischen Analyse. Nichtsdestoweniger ist es sehr gut und sogar erwünschenswert, im Zusammenhang mit chromatographischer Identifizierung auch diese in üblicher Weise durchzuführen. Es ist sehr günstig wenn es gelingt solche Derivate darzustellen, bei denen beide Identifizierungsweisen möglich sind.

Die Darstellung von Derivaten zu Zwecken der chromatographischen Analyse ist nicht selbstzweckmässig, sondern sie wird direkt durch die Notwendigkeit hervorgerufen und dabei immer ein bestimmtes Ziel verfolgt.

Bei Auswahl von neuen Reagenzien richteten wir uns nach den folgenden drei Hauptgründen:

- (1) Erhöhung der Empfindlichkeit oder der Selektivität der Detektion oder ihre Ermöglichung überhaupt,
- (2) Verhinderung der Flüchtigkeit von niedrigsiedenden organischen Stoffen, die chromatographisch auf Papier oder Schicht zu trennen sind und
- (3) Ermöglichung der Isolierung einer bestimmten Klasse von Stoffen aus komplizierten Gemischen.

Die nicht minder wichtige Bedingung, die wir stets bedingungslos einhielten, stellt die Möglichkeit der einfachen und raschen Darstellung von Derivaten dar, bestens durch allgemeine Reaktion der Funktionsgruppe. Die Reaktion soll gute

Ausbeute des Derivates gewähren und eindeutig verlaufen und sie soll nicht von Nebenreaktionen und von Bildung weiterer Produkte begleitet werden. Bei Darstellung von Derivaten zu chromatographischen Zwecken fällt die üblich dringlich durchgesetzte Hauptbedingung ab, die die scharfen Schmelzpunkte von Derivaten und ihre guten Kristallisationseigenschaften erfordert.

Bei Auswahl von neuen Reagenzien waren folglich diese Kriterien entscheidend:

(1) Zugänglichkeit des Reagens oder seine leichte Darstellung aus gebräuchlichen Rohstoffen,

(2) einfache und rasche Darstellung von Derivaten, die eindeutig und ohne Nebenreaktionen verläuft und die Arbeit im Mikromastab ermöglicht,

(3) rasche, sichere und empfindliche Detektion oder direkt die Möglichkeit der Darstellung von hochfarbigen Derivaten und

(4) die Anwendbarkeit von Derivaten ohne vorangehende Reinigung zur Papier- und Dünnschichtchromatographie, das heisst gute Löslichkeit in gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln.

Ein wichtiges Problem, mit dem bei Darstellung von Derivaten gerechnet werden muss, ist die ungleiche Reaktionsgeschwindigkeit einer bestimmten Reihe von Stoffen mit dem Reagens. Zu Zwecken der qualitativen Analyse ist diese Ermittlung minder wichtig, doch falls man die Derivate zur quantitativen Auswertung von Chromatogrammen ausnützen will, muss man diese Tatsache berücksichtigen, da sie wesentlich das Analysenergebnis beeinflussen kann. Die Verlässlichkeit der Methode ist nachher experimentell zu beweisen.

Ein besonderer Fall, den wir nicht oft treffen, ist die Möglichkeit der Anwendung von zwei Reagenzien zur Darstellung einer Reihe von Derivaten. So zum Beispiel die 3,5-Dinitrobenzoate können sowohl zur Identifizierung von Alkoholen als auch von Alkylhalogeniden angewendet werden, am besten von Bromiden und Jodiden. Bei Darstellung von Estern der Alkohole ist das Reagens das 3,5-Dinitrobenzoylchlorid während bei Darstellung von Estern aus Alkylhalogeniden das Silbersalz der 3,5-Dinitrobenzoesäure. Beide Reaktionen werden häufig zur Darstellung und zur chromatographischen Trennung von diesen Stoffen angewendet¹⁻³.

Einen analogen Fall stellt im Gegenteil die Anwendung eines Reagens zur Darstellung von Derivaten zweier verschiedenen Klassen von organischen Stoffen dar. Als Beispiel kann man das 2,4-Dinitrobenzylbromid anführen, das sowohl zur Darstellung von Derivaten von Säuren als auch zur Darstellung von Derivaten von Alkoholen anwendbar ist.

Im ersten Fall werden die 2,4-Dinitrobenzylester, im zweiten die 2,4-Dinitrobenzyläther gebildet. Beide wurden zur chromatographischen Trennung und Identifizierung von Säuren^{4,5} und Alkoholen⁶ angewendet. Zur gleichen Kategorie gehört auch das neu vorgeschlagene Reagens, das N,N-Dimethyl-*p*-aminobenzolazobenzoylchlorid, das sowohl zur Identifizierung von Alkoholen^{7,8} als auch von Phenolen und Aminen anwendbar ist. (Ausführlicher wird hierüber später berichtet.)

Bei dieser Gelegenheit möchte ich noch auf einige Typen von Alkoholderivaten aufmerksam machen, die zur chromatographischen Trennung überhaupt nicht taugen. Es sind solche Derivate, bei derer Darstellung die Reaktion in zweierlei Weise oder in zweierlei Grad verlaufen kann. Der erste Fall entspricht der Darstellung von Estern der 3-Nitrophthalsäure, wenn die Möglichkeit der Bildung von zwei Isomereestern gegeben ist:



Den zweiten Fall kann man mittels der Reaktion von Glykolen mit dem 3,5-Dinitrobenzoylchlorid demonstrieren. Beim Überschuss des Glykols im Reaktionsgemisch werden Monoester, beim Überschuss des Reagens Diester gebildet. Da die 3,5-Dinitrobenzoate polare Stoffe darstellen, übt folglich auf ihre Löslichkeit und dadurch auch auf ihr chromatographisches Verhalten die Gegenwart einer oder zweier 3,5-Dinitrobenzoylgruppen im Molekül des Derivates einen beträchtlichen Einfluss aus. Beide Reihen von Derivaten, sowohl Mono- als auch Diester werden bei Chromatographie nicht gegenseitig gestört. Erreicht man die Trennung von Estern einer Gruppe, so bleiben die Ester der zweiten am Start oder sie gehen mit der Front.

Ähnliche Eigenschaften, das heisst die Bildung von zwei oder mehreren Flecken eines Stoffes, weisen auch die von entsprechenden Alkoholen dargestellten Xanthogenate auf. Es handelt sich nämlich um die für das pH-Medium sehr empfindlichen Derivate. Falls das Bildungssystem nicht genügend alkalisch sein wird, kann es zu ihrer Spaltung und zu Nebenreaktionen kommen, was sich nachteilig an der Anzahl von gebildeten unbekanntem Flecken bemerkbar machen wird.

Ein bedeutendes Kapitel in der Chromatographie von Derivaten nehmen die Derivate ein, die direkt farbig sind und bei denen folglich die Detektion abfällt. Dieser Frage wird erst in den letzten Jahren Aufmerksamkeit gewidmet. Die Bedeutung von farbigen Derivaten beruht vor allem darauf, dass sie mit Erfolg zur quantitativen Analyse anwendbar sind, und ferner darauf, dass sie im wesentlichen die Gesamtdauer der Analyse zu verkürzen ermöglichen. Die Separation von Stoffen am Chromatogramm kann man direkt in der chromatographischen Kammer beobachten und falls in analysierter Probe nur ein oder zwei gesuchte Stoffe anwesend sind, ist es nicht notwendig das Chromatogramm in seiner ganzen Länge zu entwickeln und die Entwicklung kann in beliebigem günstigen Augenblick unterbrochen werden.

In die Kategorie von farbigen Alkohol- und Säurederivaten kann man einreihen: die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der *p*-Bromphenacylester von Fettsäuren⁹. Sehr gute Eigenschaft des 2,4-Dinitrophenylhydrazins als Reagens stellt seine Spezifität dar, da es mit keiner anderen als Carbonylgruppe reagiert, sodass es selektive Vortrennung der Phenacylester und anderer Carbonylverbindungen von anderen Stoffen ermöglicht. Ein gewisser Nachteil ist, dass die 2,4-Dinitrophenylhydrazone in *cis*- und *trans*-Form auftreten können, wobei jedes von diesen Isomeren unterschiedliche chromatographische Eigenschaften aufweist.

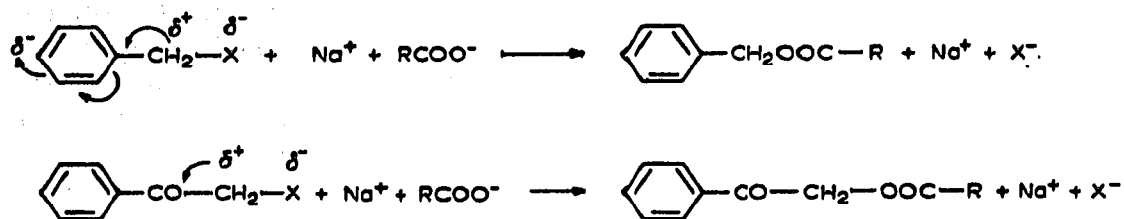
Den gleichen Nachteil hat auch das N,N-Dimethyl-*p*-aminobenzolazophenacylchlorid, das zur chromatographischen Identifizierung und Bestimmung von Carbonsäuren^{10,11} angewendet wurde.

Ich möchte Sie kurz mit den Ergebnissen unserer Arbeiten, die wir in den letzten Jahren auf diesem Gebiete durchgeführt haben, bekanntmachen. Zur Suche von neuen Weisen chromatographischer Identifizierung sowohl von Säuren als auch von Alkoholen und Aminen führte uns die Notwendigkeit die Nachweisempfindlichkeit zu erhöhen. In einem Falle wurden wir nämlich vor die Aufgabe gestellt in den Reaktions-

produkten nach Oxydation von Verbindungen mit höheren Alkylen an Kohlenstoff auch Spuren Mengen von niedrigeren und mittleren Fettsäuren zu finden. Die bisherigen Detektionsverfahren (durch acidobasische Indikatoren) oder die Darstellung von Hydroxamsäuren waren nicht genug empfindlich und verhinderten uns vorausgesetzte Spuren Mengen von einigen Säuren zu identifizieren, von derer Existenz im Reaktionsgemisch wir überzeugt waren.

Zur Identifizierung von Säuren schlugen wir vor und erprobten neue Reagenzien auf Benzylbromid- und Phenacylbromidbasis.

Die Leichtigkeit, mit der das Halogen in die Reaktion bei Esterifizierung eintritt ist durch die Struktur des Teiles des Moleküls gegeben, an dem das Halogen gebunden ist. Bei Esterifizierung des angeführten Typs handelt es sich um monomolekulare Reaktion und folglich wird die Reaktionsgeschwindigkeit nur von der Geschwindigkeit abhängig sein, mit welcher sie das gebundene Halogen abdissoziieren kann. Die Reaktivität bei dieser Reaktionsart sinkt in der Reihe $I > Br > Cl > F$. Eine bedeutende Rolle in der Reaktivität des Halogens spielt ferner auch die Anwesenheit von anderen Funktionsgruppen in seiner unmittelbaren Nähe. Allgemein kann man behaupten, dass die Existenz von negativen Gruppen an α -Kohlenstoff eine leichtere Abspaltung des gebundenen Halogens zur Folge hat. Theoretisch kann diese Behauptung auf Mechanismen von Elektronenverschiebungen im Molekülen des Reagens gestützt werden. Der negative Substituent oder Sauerstoff am α -Kohlenstoff übt eine polarisierende Wirkung auf das gebundene Halogen aus, das sich folglich viel leichter in Form des Anions X^- abspalten kann. Die Esterbildung ermöglicht weitere Dissoziation des Alkylhalogenids und verschiebt sehr das Reaktionsgleichgewicht zugute des gebildeten Esters. Der Esterifizierungsmechanismus kann folgendermassen dargestellt werden:



Mit diesem einfachen Mechanismus kann man die hohe Reaktivität von negativ substituierten Alkylhalogeniden erklären.

Die Reaktivität von den an Kohlenstoff gebundenen Halogenen—in unmittelbarer Nähe dessen die negative Gruppe anwesend ist—ist in Wirklichkeit viel grösser als bei den nichtsubstituierten Alkylhalogeniden, wie es sich aus den Geschwindigkeitskonstanten ergibt, die bei Reaktion von verschiedenartig substituierten Halogenverbindungen mit schwach basischen nukleophilen Reagenzien¹² ermittelt wurden.

Auf Grund von vorangehenden Betrachtungen wurden zur chromatographischen Identifizierung von Säuren die folgenden Reagenzien vorgeschlagen und überprüft: *p*-Nitrobenzylbromid¹³, 2,4-Dinitrobenzylbromid^{4,5}, *p*-Nitrophenacylbromid¹⁴, *m*-Nitrophenacylbromid¹³, und N,N-Dimethyl-*p*-aminobenzolazophenacylchlorid¹⁰.

Die Darstellung von Estern selbst ist sehr einfach und sie wurde im Mikromassstab in eingeschmolzenen Ampullen ausgearbeitet. Aus verdünnten wässrigen

BELLE I

PAPIERCHROMATOGRAPHIE DER SUBSTITUIERTE BENZYL- UND PHENACYLESTER

Ester	Lösungsmittelsystem und Papier	$R_F \times 100$ (Säure mit Anzahl C)									
		C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9	C_{10}
2,4-Dinitrobenzylester	50% Dimethylformamid/Cyklohexan-Benzol (25:1); Whatman Nr. 1; 23°	23	40	54	63	71					
2,4-Dinitrobenzylester	25% Formamid/Cyklohexan-Benzol (25:1); Whatman Nr. 1; 23°	0	13	33	56	72	81				
	70% Dimethylformamid/Cyklohexan-Petroleumäther (190-220°) (35:1); Whatman Nr. 1; 23°				22	28	35		45	51	56
2,4-Dinitrophenacyl-ester	20% Formamid/Cyklohexan-Benzol (10:1); Whatman Nr. 1; 23°	0	24	47	64	76	82				
2,4-Dinitrophenacyl-ester	30% Formamid/Cyklohexan-Benzol (12:1); Whatman Nr. 1; 22°	0	10	28	47	63	75				
N,N-Dimethyl- <i>p</i> -aminobenzolazophenacyl-ester	50% Dimethylformamid/Benzin-Toluol (5:1); Whatman Nr. 1; 22°	20	31	47	59	68	75				
	30% α -Bromnaphthalin/80% Essigsäure; Whatman Nr. 1; 22°	66	65	57	47	36	27				

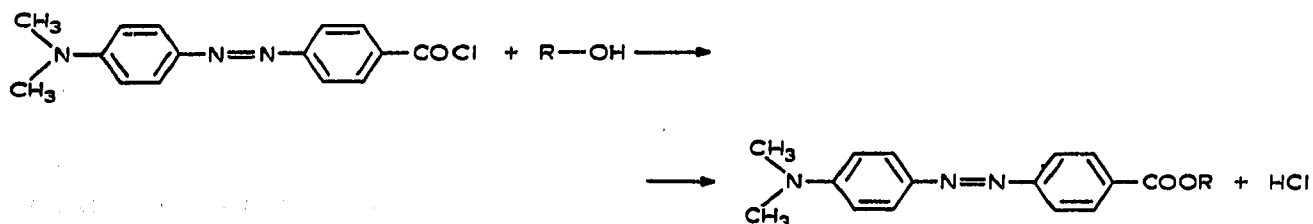
Lösungen werden die Fettsäuren durch Destillation mit Wasserdampf isoliert. Durch Neutralisation und Abdampfung von Wasser werden verhältnismässig reine Natriumsalze erhalten, die durch Auflösung mit dem entsprechenden Reagens in ternärem Gemisch (Wasser-Dioxan-Benzol) das entsprechende Ester durch Erwärmung 30 min lang in eingeschmolzener Ampulle bei 100° bieden werden, wobei das Ester meist direkt auf das Chromatogramm aufgetragen werden kann. Bei allen Estern kann die Detektion mit dem Ehrlich-Reagens durchgeführt werden, nach vorangehender Reduktion von Nitrogruppen mit Zinnchlorid oder bei *m*-Dinitroverbindungen durch die Janovský-Reaktion, das heisst durch Bespritzung des Chromatogramms mit Natriumäthanolatlösung in Aceton. Die Empfindlichkeit von beiden Weisen ist sehr gut. Bei der ersten Weise beträgt sie etwa 0.3–0.7 μg des Esters, bei der Janovský-Reaktion 0.5–1 μg des Esters im Fleck. Die papierchromatographische Trennung gelang bei allen Estertypen. Die besten Ergebnisse wurden bei 2,4-Dinitrobenzylestern erreicht (Tabelle I).

In allen Fällen der Papierchromatographie wurden die besten Ergebnisse mit dem mit Dimethylformamid, beziehungsweise bei farbigen Estern mit dem mit Paraffinöl imprägnierten Papier erreicht. Die Dünnschichtchromatographie gelingt bei 2,4-Dinitrobenzylestern auf Silikagelschicht mit Gips im System: Tetrachlormethan-Acetonitril (6:1).

Die farbigen N,N-Dimethyl-*p*-aminobenzolazophenacyl-ester können auch zur quantitativen Analyse¹¹ angewendet werden. Ein gewisser Nachteil dieser Weise stellt die Bildungsmöglichkeit von *cis*- und *trans*-Isomeren dar und folglich auch die Erhöhung der Anzahl von Flecken. Mit gut gewählten Reaktionsbedingungen ist es jedoch möglich die Bildung von *cis*-Derivaten zu eliminieren.

Gegenwärtig befassen wir uns mit der Identifizierung und Trennung von Alkoholen als Ester der substituierten Benzoesäure. Die bisher meist angewandte Chromatographiemethode von 3,5-Dinitrobenzoaten hat einen grossen Nachteil darin, dass das 3,5-Dinitrobenzoylchlorid wenig beständig ist. (Das frisch überdestillierte 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in eingeschliffener Flasche aufbewahrt unterliegt der Hydrolyse durch Luftfeuchte und erleidet rasch Reaktivitätsverluste.) Wir ermittelten, dass das *p*-Nitrobenzoylchlorid viel beständiger ist. Die Darstellung seiner Ester ist auch sehr leicht und die Ergebnisse der Papierchromatographie entsprechen allen Anforderungen guter Trennung und hoher Detektionsempfindlichkeit¹⁵.

Das weitere sehr reaktive Benzoylchlorid mit Hydroxylgruppe reagierend ist das N,N-Dimethyl-*p*-aminobenzolazobenzoylchlorid. Durch Luftfeuchte wird es nicht hydrolysiert, sodass man es in beliebiger Weise aufbewahren kann. Dieses Reagens ist so reaktiv, dass die Ester von niedrigeren Alkoholen fast gleich unter Labortemperatur gebildet werden. Die fast quantitative Esterifizierung kann nach Erwärmung 5 min lang auf 80° erreicht werden. Das Reagens reagiert sehr gut nicht nur mit den niedrigeren, sondern auch mit höheren Alkoholen und Glykolen.



Die Derivate sind kristallinische Stoffe hellrot gefärbt, die verhältnismässig scharfe Schmelzpunkte im breiten Temperaturbereich besitzen, sodass sie auch zur klassischen Identifizierungsweise⁷ angewendet werden können.

Chromatographische Eigenschaften von diesen farbigen Estern sind ausgezeichnet. Die Detektion fällt ab, da ihre Intensität der Färbung sogar bei kleinen auf das Chromatogramm aufgetragenen Mengen hoch ist. Man kann auch Mikrogrammmengen von Estern chromatographieren, wobei die Empfindlichkeit grösser ist als 1 μg . Da die Ester als acidobasische Indikatoren auftreten können, kann die Intensität von Flecken durch Bespritzung des Chromatogramms mit 0.01 *N* Schwefelsäurelösung ausdrücksvoller gemacht werden. Es gelang uns einige geeignete Systeme zur chromatographischen Trennung von Estern, Alkoholen und Glykolen auf Papier und Dünnschicht zu finden (z.B. Fig. 1).

Ein interessanter Fall kam vor, als wir die obenangeführten 2,4-Dinitrobenzylester von Säuren im Reaktionsgemisch darstellten, dessen Bestandteil anstelle des Dioxans Äthylalkohol war und das vor Chromatographie keiner weiteren Reinigung unterworfen wurde. Neben den Flecken der 2,4-Dinitrobenzylester von Säuren erschien uns ein weiterer Fleck, der bei allen Säureproben anwesend war. Dieser Fleck wurde endlich als das Äthyl-2,4-dinitrobenzyläther identifiziert. (Ursprünglich benutzten wir nämlich Äthylalkohol als Bestandteil des Reaktionsmediums. Die gebildeten Ester wurden gereinigt und erst dann ohne Schwierigkeiten chromatographiert⁴.) Das 2,4-Dinitrobenzylbromid reagiert nämlich verhältnismässig leicht mit

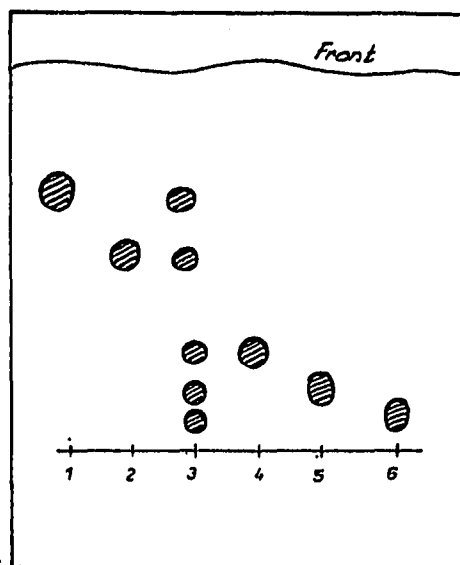


Fig. 1. *N,N*-Dimethyl-*p*-aminobenzoyl-esteren von Alkoholen. 1 = Amyl-, 2 = Hexyl-, 4 = Oktyl-, 5 = Nonyl-, 6 = Decyl-; 3 = Gemisch. Lösungsmittelsystem: Paraffinöl/Dimethylformamid-Methanol-Wasser (8:2:1).

niedrigeren Alkoholen (bis C_8) unter Bildung von entsprechenden 2,4-Dinitrobenzyläthern, die auch mit Erfolg chromatographiert⁶ werden können (Fig. 2).

Das *N,N*-Dimethyl-*p*-aminobenzoylchlorid kann auch zur Identifizierung einer weiteren Klasse von Stoffen gebraucht werden, und zwar von primären

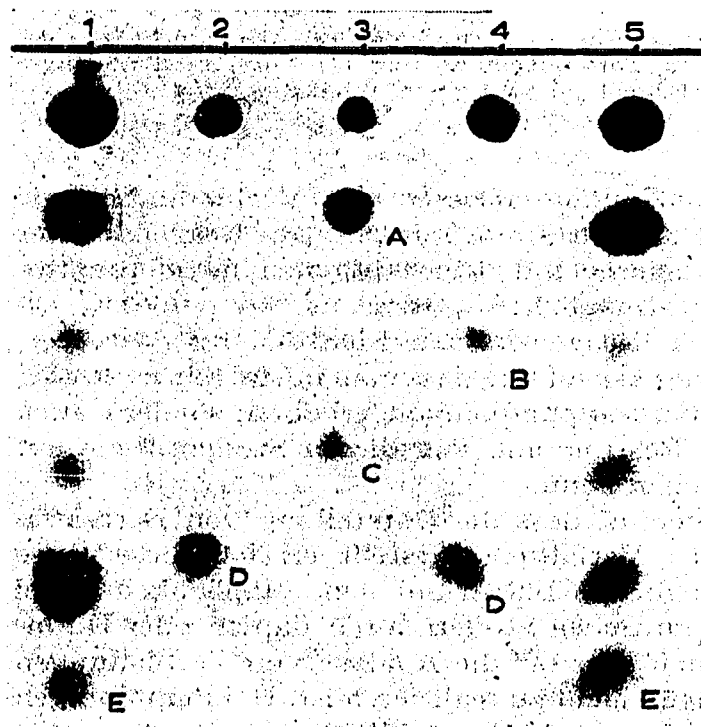


Fig. 2. Alkyl-2,4-dinitrobenzyläther. 1,5 = Gemisch von 2,4-Dinitrobenzyläther; 2,3,4 = stand. Äther. (A) Methyl-, (B) Äthyl-, (C) *n*-Propyl-, (D) *n*-Butyl-, (E) *n*-Amyl-2,4-dinitrobenzyläther. Lösungsmittelsystem: Dimethylformamid/Cyklohexan; Papier: Whatman Nr. 2.

und sekundären Aminen, sowie von aliphatischen als auch von aromatischen. Die Synthese von Amidinen ist wieder sehr einfach und rasch. Die Ausbeute ist gut und auch chromatographische Eigenschaften und die Möglichkeit der Trennung von homologen Reihen geben versprechende Ergebnisse.

Die Systeme zur chromatographischen Trennung dieser Klasse von Stoffen sind den vorangehenden Lösungsmitteln ähnlich (Fig. 3). Die Arbeit wurde bisher nicht

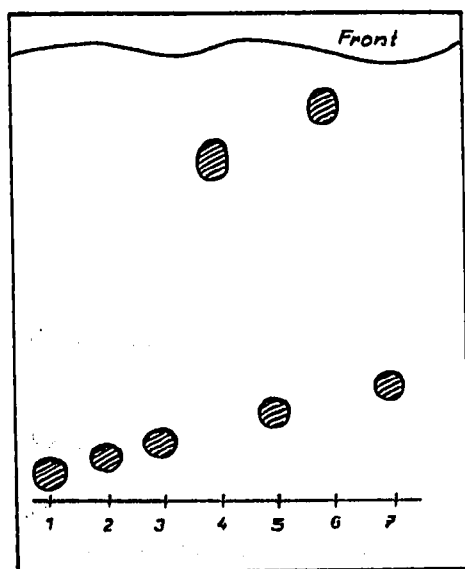


Fig. 3. N,N-Dimethyl-*p*-aminobenzolazobenzamide von (1) Methylamin, (2) Äthylamin, (3) Propylamin, (4) Dipropylamin, (5) Isobutylamin, (6) Diisobutylamin und (7) Amylamin. Lösungsmittelsystem: Dimethylformamid/Cyklohexan-Benzol (20:1); Papier: Whatman Nr. 1.

beendet. Es ist wahrscheinlich, dass auch andere Klassen von Verbindungen wie beispielsweise Phenole, Mercaptane und andere Stoffe mit diesem Reagens unter Bildung von entsprechenden Derivaten reagieren und gleichzeitig auch ihre chromatographische Trennung und Identifizierung ermöglichen werden.

Die angeführte Übersicht von neuen Reagenzien zur Identifizierung von verschiedensten Klassen organischer Stoffe wies darauf hin, dass man mittels eines günstig gewählten Reagens nicht nur die Detektionsempfindlichkeit erhöhen, sondern auch die Identifizierung, Trennung und auch Bestimmung von diesen Stoffen sowie auf Papier als auch auf Dünnschicht ermöglichen kann.

Obwohl es auf den ersten Blick scheint, dass die Darstellung von Derivaten eine gewisse Komplikation des analytischen Verfahrens darstellt, erreicht diese Weise immer grössere Wichtigkeit, da sie in manchen Fällen auf neue Möglichkeiten bei Trennung und auch Bestimmung von organischen Stoffen durch Papier- oder Dünnschichtchromatographie hinweist und auch sehr oft die Analyse von Verbindungen ermöglicht, die unter normalen Bedingungen nicht zu realisieren ist. Bei Bemühungen die Empfindlichkeit von einigen Methoden zu erhöhen, stellt die Chromatographie von Derivaten die einzige anwendbare Weise dar, die meist die erwarteten Ergebnisse erfüllt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Hauptgründe für die Anwendung von Derivaten zur Identifizierung von Stoffen mittels Papier- und Dünnschichtchromatographie sind angeführt. Eindrücklich betont wird vor allem die Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit und einfache Darstellung von Reagenzien und Derivaten. Zur Identifizierung von Säuren wurden substituierte Benzyl- und Phenacyl-ester angewendet, zur Identifizierung von Alkoholen und Aminen wurde N,N-Dimethyl-*p*-aminobenzolazobenzoylchlorid als Reagens benutzt. Die gebildeten Ester, event. Amide stellen intensiv farbige Stoffe mit guten chromatographischen Eigenschaften dar.

LITERATUR

- 1 R. G. RICE, G. J. KELLER UND J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 194.
- 2 J. BORECKÝ, J. GASPARIČ UND M. VEČEŘA, *Chem. Listy*, 52 (1958) 1283.
- 3 M. JUREČEK, M. HUBÍK UND M. VEČEŘA, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 25 (1960) 1458.
- 4 M. JUREČEK, J. CHURÁČEK UND V. ČERVINKA, *Mikrochim. Acta*, (1960) 102.
- 5 J. CHURÁČEK, *Mikrochim. Acta*, (1961) 65.
- 6 J. CHURÁČEK, V. VAŇÁSEK, K. KOMÁREK UND M. JUREČEK, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 33 (1968) 3876.
- 7 J. CHURÁČEK, J. ŘÍHA UND M. JUREČEK, *Z. Anal. Chem.*, im Druck.
- 8 J. CHURÁČEK, M. HUŠKOVÁ UND J. ŘÍHA, *J. Chromatog.*, im Druck.
- 9 Y. INOUE, O. HIRAYAMA UND M. NODA, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 20 (1956) 197.
- 10 J. CHURÁČEK, F. KOPEČNÝ, M. KULHAVÝ UND M. JUREČEK, *Z. Anal. Chem.*, 208 (1965) 102.
- 11 J. CHURÁČEK, H. PECHOVÁ UND V. RÁČEK, *Sci. Papers Inst. Chem. Technol. Pardubice*, im Druck.
- 12 R. G. PARSON, S. H. LANGER, F. V. WILLIAMS UND W. J. MCGUIRE, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5130.
- 13 J. CHURÁČEK UND J. HANOUSEK, *Sci. Papers Inst. Chem. Technol. Pardubice*, No. 1 (1961) 57.
- 14 J. CHURÁČEK, nicht publiziert.
- 15 K. KOMÁREK, V. VAŇÁSEK UND J. CHURÁČEK, *Sci. Papers Inst. Chem. Technol. Pardubice*, im Druck.

DISCUSSION

HUBER: 2,4-Dinitrobenzylbromid kann allergische, sehr langwierige Erscheinungen hervorrufen. Dies geschah trotz angewendeter Vorsichtsmassnahmen, da der Vorgang in der Literatur bekannt ist. Es sollte daher, trotz guter Trenneigenschaften der Derivate, vor der Benutzung gewarnt werden.

CHURÁČEK: Bisher haben wir mit 2,4-Dinitrobenzylbromid keine Schwierigkeiten gehabt.