

CHROM. 14.773

## Note

### Zur Farbreaktion der Anisaldehyd-Schwefelsäure als Reagenz in der Dünnschicht-Chromatographie

EGON STAHL\* und A. GLATZ

*Pharmakognosie und Analytische Phytochemie, Universität des Saarlandes, D-6000 Saarbrücken (B.R.D.)*  
(Eingegangen am 28. Januar 1982)

Aldehyd-Säurereagenzien, insbesondere Anisaldehyd-Schwefelsäure, werden bei dünn-schicht-chromatographischen (DC) Untersuchungen häufig verwendet. Bei der Detektion von Alkoholen, Zuckern, Phenolen und Terpenoiden erhält man damit farblich gut differenzierte Zonen<sup>1</sup>. In der Regel liegen die erreichten Erfassungsgrenzen knapp unterhalb 1  $\mu\text{g}$  pro Zone. Allerdings sind die Detektionsfarben nur schlecht reproduzierbar; sie hängen von zahlreichen experimentellen Faktoren, insbesondere von der Detektionszeit und Detektionstemperatur, ab<sup>3</sup>. Quantitative Bestimmungen mit diesen Reagenzien liefern meist streuende Werte. Auf die Ursachen hierfür soll im folgenden am Beispiel von Steroiddetektionen eingegangen werden<sup>2</sup>.

#### EXPERIMENTELLES

Schichtmaterial: Selbstbeschichtete Glasplatten (Streichverfahren 1), des Formats 20 × 20 cm, TLC-Kieselgel 60 HF<sub>254</sub> mit einer mittleren Korngröße von 15  $\mu\text{m}$  (E. Merck, Darmstadt, B.R.D.) unter Zusatz von Acronal 250 D (BASF). Zusammensetzung der Suspension: 30 g Kieselgel + 98 ml Wasser + 1.8 ml Acronal-Dispersion; Mengenangabe für 5 DC-Platten. Nass-Schichtdicke 250  $\mu\text{m}$ .

Aldehyd-Säurereagenzien: Zu 100 ml eines Gemisches aus Methanol-Eisessig-Schwefelsäure (85:10:5) wurden jeweils zugesetzt: 0.5 ml Anisaldehyd; 0.5 g 2,4-Dimethoxybenzaldehyd; 0.5 g Vanillin; 0.3 g Benzaldehyd. Davon wurden 20 ml pro Schichtfläche von 20 × 20 cm aufgesprüht. Die Erwärmung der Schichten erfolgte bei 100°C auf einer Heizplatte vom Typ Thermoplate (Desaga, Heidelberg, B.R.D.).

Spektralphotometrische Messungen: Chromatogramm-Spektralphotometer PMQ II mit Kreuztisch (Zeiss, Oberkochen, B.R.D.); Monochromator-Spaltlänge 6 mm, Spaltbreite 0.7 mm.

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der primäre Schritt der Nachweisreaktion ist die Umsetzung der Steroide mit einer starken Mineralsäure. Dabei entstehen zahlreiche Produkte, die zum Teil farbig sind<sup>4-6</sup>. Einige davon kondensieren dann mit dem vorhandenen Aldehyd zu farbtensiven Verbindungen. Die dabei ablaufenden Vorgänge sind mehrfach untersucht worden<sup>7-10</sup>; dennoch ist der Reaktionsablauf ungeklärt. Je nach Reaktionsbedingun-

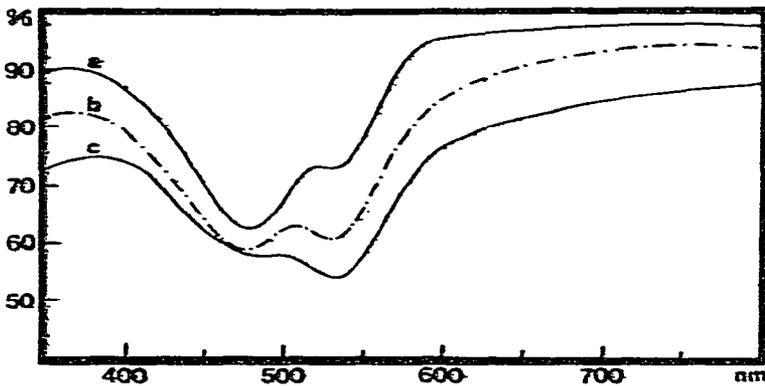


Fig. 1. Remissionsspektren von Östradiol nach Umsetzung mit einem Gemisch aus Methanol-Eisessig-Schwefelsäure (85:10:5), ohne Aldehydzusatz, 100°C, nach (a) 2 min, (b) 15 min, (c) 30 min.

gen wird eine Vielzahl von Produkten beobachtet. Allerdings scheint dem Auftreten von Cyclopentenylkationen zentrale Bedeutung zuzukommen<sup>11,12</sup>.

Im Gegensatz zu Versuchen mit einem Überschuss an Lösungsmitteln ändern sich die Reaktionsbedingungen auf der DC-Schicht während der Detektion ständig. Unter dem Temperatureinfluss verdunstet das Methanol —und zum Teil auch der Eisessig— der Detektionslösung. Dadurch erhöht sich die Schwefelsäurekonzentration kontinuierlich. Sie erreicht bei 100°C nach 10 min etwa 50–70%. Parallel dazu werden die Steroide zu farbigen Produkten umgelagert. Remissionsmessungen zeigen, dass die Ausprägung der Spektren von der Detektionsdauer abhängt (Fig. 1).

In der Regel verschiebt sich das Absorptionsmaximum bei längerer Temperatureinwirkung hin zu grösseren Wellenlängen. Es bleibt jedoch meist unter 500 nm, seltener werden auch 550 nm erreicht. Die visuell wahrgenommenen Zonenfärbungen sind somit gelb-orange, eventuell auch rot oder rot-violett.

Wird dieser Mischung ein aromatischer Aldehyd zugesetzt (Fig. 2), so tritt im

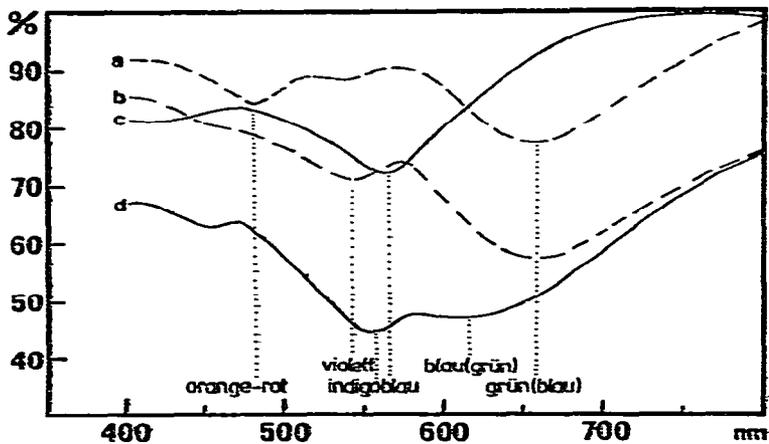


Fig. 2. Remissionsspektren von Östradiol nach Umsetzung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure bei 100°C, nach (a) 2 min, (b) 5–10 min, (c) Schichtfärbung nach 15 min, (d) Gesamtabsorption nach 15 min. a und b gegen benachbarte Schichtfläche gemessen, c und d gegen unveränderte Schichtfläche gemessen.

Spektrum eine zusätzliche Absorptionsbande auf. Diese zeigt hohe Intensität und wird stets oberhalb von 550 nm beobachtet. Gleichzeitig verschieben sich die relativen Intensitäten der säurebedingten Absorptionsmaxima. Sie bleiben jedoch auch nach längeren Detektionszeiten nachweisbar. Das zeigt, dass die Umsetzung mit der Säure tatsächlich die Produkte schafft, mit denen der Aldehyd reagiert. Es zeigt aber auch, dass die Umsetzung mit dem Aldehyd zumindest auf der DC-Schicht nur eine von mehreren Reaktionen ist und keinesfalls quantitativ verläuft.

Mit zunehmender Säurestärke tritt allmählich eine Untergrundverfärbung auf. Diese ist, wegen des normalerweise im Überschuss vorhandenen Aldehydes (0.25–0.5 mg/cm<sup>2</sup>) auch in der Zone selbst nachweisbar. Ursache hierfür ist eine Autokondensationsreaktion der aromatischen Aldehyde zu uneinheitlich polymeren Farbstoffen des Di- oder Triphenylmethantypes.

In ihrer Überlagerung bestimmen die drei beschriebenen Reaktionsabläufe den Farbton der detektierten Zonen. Alle drei laufen als Funktionen der Säurestärke, jedoch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ab. Deshalb verändert sich die beobachtete Färbung während der Detektion ständig. Im vorliegenden Beispiel von grau-braun über grün-blau hin zu violett. Dazu kommt noch, dass die Mengenverhältnisse der vorliegenden Reaktionspartner die verschiedenen Reaktionen in unterschiedlichem Masse begünstigen. Das wiederum verändert die Farbausprägung. In der Tabelle I sind einige Einflussgrößen und deren Auswirkungen aufgelistet.

TABELLE I

## EINFLUSSGRÖSSEN UND DEREN AUSWIRKUNGEN AUF DIE DETEKTIONSFARBEN BEI VERWENDUNG VON ALDEHYD-SÄUREREAGENZIIEN

<i>Einflussgrösse</i>	<i>Auswirkung</i>
Hohe Schwefelsäurekonzentration im Reagenz Grosse zu detektierende Substanzmenge Wenig Reagenz pro Schichtfläche Kurze Detektionszeiten Niedrige Detektionstemperatur	Hervortreten säurebedingter Färbungen
Geringe Schwefelsäurekonzentration im Reagenz Grosse Reagenzmenge pro Schichtfläche Niedrige Detektionstemperatur	Hervortreten der aldehydbedingten Färbungen
Hohe Schwefelsäurekonzentration im Reagenz Hohe Aldehydkonzentration im Reagenz Grosse Reagenzmenge pro Schichtfläche Hohe Detektionstemperatur Lange Detektionszeiten	Untergrund- und Zonenverfärbungen

Die Vielzahl der Einflussgrößen bedingt auch die geringe Eignung dieser Reagenzien für direkte quantitative, photometrische DC-Bestimmungen. Bei der photometrischen Auswertung wird stets nur ein Teil der Substanz erfasst. Standardabweichungen unter 10 oder 15 % lassen sich nur unter strengster Kontrolle aller Reaktionsbedingungen erreichen.

In der Praxis haben sich als Aldehydkomponenten neben Anisaldehyd insbesondere Vanillin und 2,4-Dimethoxybenzaldehyd bewährt<sup>13,14</sup>. Bei etwa gleichen Er-

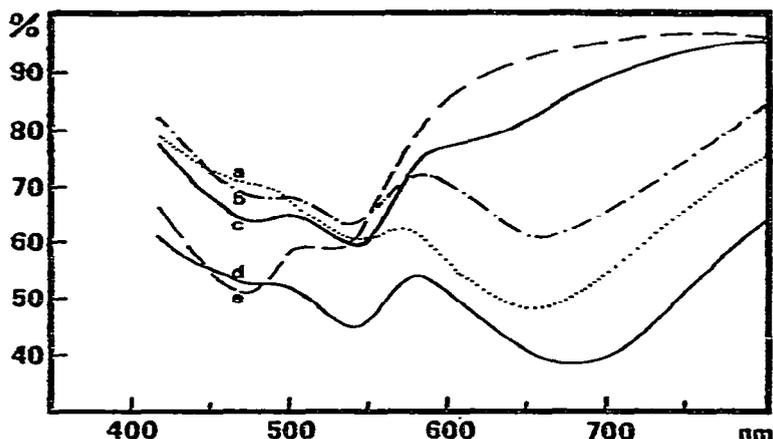


Fig. 3. Remissionsspektren von Östradiol nach Umsetzung mit verschiedenen Aldehyd-Säurereagenzien bei 100°C, nach 10 min. (a) Anisaldehyd-Schwefelsäure, (b) Vanillin-Schwefelsäure, (c) Benzaldehyd-Schwefelsäure, (d) 2,4-Dimethoxybenzaldehyd-Schwefelsäure, (e) aldehydfreies Reagenz. Messung gegen benachbarte Schichtfläche.

fassungsgrenzen werden zum Teil jedoch völlig verschiedene Färbungen beschrieben<sup>3</sup>. Fig. 3 zeigt, dass dies nicht auf einer Verschiebung der Absorptionsbanden, bedingt durch Art, Zahl und Anordnung der Chromophore beruht. Massgeblich sind zum geringeren Teil unterschiedliche Carbonylaktivitäten und Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Aldehyde. Stärker ist der Einfluss, den veränderte Konzentrationsverhältnisse im Reagenz oder geänderte Detektionstemperaturen oder Detektionszeiten ausüben. Unter konstanten Reaktionsbedingungen jedenfalls werden mit den drei Reagenzien, zeitlich etwas versetzt, sehr ähnlich Färbungen erhalten.

#### LITERATUR

- 1 E. Stahl, *Dünnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
- 2 A. Glatz, *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 1982.
- 3 B. P. Lisboa, *J. Chromatogr.*, 16 (1964) 136.
- 4 S. Bernstein und R. H. Lenhart, *J. Org. Chem.*, 18 (1953) 1146.
- 5 F. Bandow, *Biochem. Z.*, 301 (1939) 37.
- 6 B. Kakac und Z. J. Vejdeck, *Handbuch der Kolorimetrie*, Bd. 2, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1963.
- 7 K. Miescher und H. Kägi, *Helv. Chim. Acta*, 32 (1948) 761.
- 8 K. Miescher, *Helv. Chim. Acta*, 24 (1946) 743.
- 9 H. Schaltegger, *Helv. Chim. Acta*, 29 (1946) 285.
- 10 H. Schaltegger, *Experientia*, 2 (1946) 27.
- 11 H. Auterhoff und Cl.-J. Lang, *Arch. Pharm.*, 305 (1971) 845.
- 12 H. Auterhoff und H. Bertram, *Arch. Pharm.*, 307 (1974) 742.
- 13 L. Langenbahn, Staatsexamensarbeit, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 1978.
- 14 S. Katz, *Arch. Biochem. Biophys.*, 91 (1960) 54.