

# Konstitutionsfragen und Papierchromatographie, 1. Mitt.

Acetylierung auf der Startlinie

Von

**Friedrich Kuffner\*** und **Therese Kirchenmayer**

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

*(Eingegangen am 26. April 1961)*

Um kleinste Mengen sekundärer (oder primärer) Amine neben tertiären nachweisen zu können, wird auf dem Startpunkt des Chromatogramms acetyliert. Sekundäre (und primäre) Amine verschwinden aus dem Chromatogramm, dafür treten die Flecke ihrer Acetylierungsprodukte auf, welche in organischen Solventien schneller, in Elektrolytlösungen langsamer laufen.

Je nach dem zur Sichtbarmachung verwendeten Reagens bedeutet die Aussage „papierchromatographisch rein“ nichts anderes, als daß die untersuchte Probe frei von solchen Verunreinigungen ist, welche mit dem gewählten Reagens sichtbar gemacht werden könnten; eine darüber hinausgehende Aussage über die Reinheit ist also nicht möglich.

Jede Verwendung eines bestimmten Sprühreagens gibt zugleich einen Anhaltspunkt für die Konstitution einer sichtbar gemachten Substanz, z. B. wird man bei positiver *König*-reaktion<sup>1</sup> auf einen (nicht  $\alpha$ -substituierten) Pyridinring schließen können.

Bei Arbeiten über den mikrobiologischen Abbau des Nicotins fanden wir ein solches neues Pyridinderivat; um einen Anhaltspunkt über seinen Aufbau zu erhalten, war zunächst zu entscheiden, ob noch eine Seiten-Gruppe mit primärem, sekundärem oder tertiärem Stickstoff vorhanden ist. Zur Lösung dieser Frage stellten wir Modellversuche mit nicotin-ähnlichen Basen an, welche wir auf dem Startpunkt des Papierchromatogrammes mit Essigsäureanhydrid umsetzten. Dabei müßten die sekun-

\* Herrn Prof. Dr. *F. Feigl* zum 70. Geburtstag gewidmet!

<sup>1</sup> *W. König*, J. prakt. Chem. [2] **69**, 1, 105 (1904).

dären Basen (Nornicotin, Anabasin, Anatabin u. a.) von dem gewohnten Platz verschwinden, dafür war mit dem Auftreten ihrer Acetylierungsprodukte zu rechnen; für die Sichtbarmachung stand in den untersuchten Stoffen noch der Pyridinring, daher die *Königsche* Bromcyanreaktion, zur Verfügung.

Neben einer Anzahl der auf dem Gebiet der Tabakalkaloide bewährten Lösungsmittelsysteme<sup>2</sup> haben wir neue herangezogen, die bei der vorliegenden Arbeit Vorteile zeigten; einige davon laufen schnell (über Tag), andere brauchen zur Zurücklegung einer Laufstrecke von 20—24 cm etwa eine Nacht.

Für die Trennung von Myosmin, Nicotin und Nornicotin durch Acetylierung eignet sich (Abb. 1) das Solvenssystem K 3, mit dem man analog Nornicotin gut von Pseudooxynicotin, oder Anatabin von Nicotin und Nornicotin unterscheiden kann; in K 1 läßt sich Nicotin von Acetylanabasin gut trennen, mit S 1 Acetylanabasin von Acetylanatabin. In den Solventien L 5 und L 6 laufen die Acetylierungsprodukte schnell, u. zw. ungefähr gleich schnell, man wird also mit ihnen die sekundären Basen als Acetyl-derivate von den tertiären auf einer präparativen Cellulosesäule in einer „Gruppentrennung“ isolieren können.

Die (rote) Königreaktion des Acetylierungsproduktes des Myosmins ist intensiver als die (gelbe) der entsprechenden Menge freier Base, es erleichtert also den Nachweis des Myosmins. In allen Systemen ist es identisch mit dem Acetyl-pseudooxynicotin, was mit der für die beiden Verbindungen angenommenen konstitutionellen Verwandtschaft erklärt werden kann. Während Anabasin, Anatabin, Dihydro-m-nicotin und einige andere Alkaloide eine rote *Königreaktion* geben, erhält man bei den dazu gehörigen Acetylverbindungen violette Färbungen.

Beim Acetylieren unbekannter Amine kann eine Verkleinerung des ursprünglichen Fleckes der freien Base nebst Auftreten eines Acetyl-derivates auf folgende Weise gedeutet werden: Entweder war der unbekannte Stoff eine Mischung eines tertiären und primären (sekundären) Amins gleichen  $hR_f$ -Wertes, wobei durch die Acetylierung der Acetylfleck des primären (sekundären) Amins hinzukam und der des tertiären Amins unverändert blieb (Abb. 1); oder es handelte sich um reines sekundäres Amin, welches nicht vollständig acetyliert wurde. In diesem Fall muß eine „Verdünnungsreihe“ zur quantitativen Acetylierung führen.

Bei orientierenden Versuchen, auch Phenole auf dem Startpunkt von Papierchromatogrammen zu acetylieren, zeigte sich, daß mit Essigsäureanhydrid keine Gewähr für die Vollständigkeit der Acetylierung unter den gewählten Bedingungen gegeben ist (Abb. 2, Lauf 2); wohl aber, wenn man etwas Pyridin zusetzt. Während die Phenole mit *Millons*

<sup>2</sup> F. Kuffner, K. Schick und H. Bühn, Mh. Chem. 87, 751 (1956).

Reagens oder durch Kuppeln mit diazotierter Sulfanilsäure sichtbar gemacht werden können<sup>3</sup>, bereite der Nachweis der acetylierten Produkte anfangs Schwierigkeiten. Schließlich erwies sich der von *Feigl* empfohlene<sup>4</sup> *LeRosen-Test*<sup>5</sup> (auf aromatische Verbindungen) auch in der Papierchromatographie als gut verwendbar.

Dies bedeutet, daß die zahlreichen Farbreaktionen, welche in dem Medium konz. Schwefelsäure verlaufen, auch für eine papierchromato-

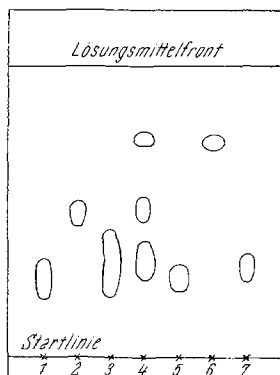


Abb. 1

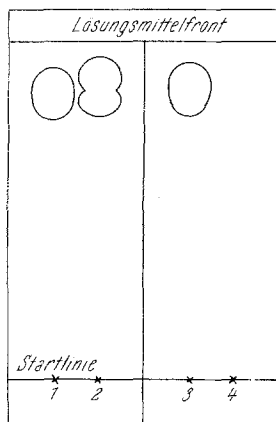


Abb. 2

Abb. 1. Lauf 1: Nornicotin, 2: Nornicotin +  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 3: Nornicotin + Nicotin + Myosmin, 4: Nornicotin + Nicotin + Myosmin +  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 5: Myosmin, 6: Myosmin +  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 7: Nicotin  
Solvens: K 3; Nachweis: 0,2proz. alkohol. Benzidinlösung und Bromcyan

Abb. 2. Lauf 1: Brenzcatechin, 2: Brenzcatechin +  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 3: Brenzcatechin, 4: Brenzcatechin +  $\text{Ac}_2\text{O}$  + Pyridin.

Solvens: K 3; Nachweis: schwefelsaure  $\text{KMnO}_4$ -Lösung

graphische Sichtbarmachung durchaus brauchbar sein können. Beim *LeRosen-Test* genügte es zum Nachweis acetylierter Phenole, nur sehr schwach zu besprühen, so daß keine nennenswerte Belästigung durch die konz. Schwefelsäure auftrat. Die Flecke kamen bei dieser Vorgangsweise allmählich heraus und zeigten nach 12—24 Stdn. intensive Färbung. Phenole und partiell acetylierte Polyphenole können auch mit  $\text{KMnO}_4$  gut sichtbar gemacht werden<sup>6</sup>; die voll acetylierten Produkte, welche also keine phenolische OH-Gruppe haben, entfärbten dagegen  $\text{KMnO}_4$  nicht, so daß das Verschwinden eines Fleckes beim Acetylieren auf acetylierbares Phenol hinweist, ohne aber vermutlich für Phenol spezifisch zu sein.

Der Austria Tabakwerke A. G. (Österr. Tabak-Regie) danken wir bestens für die Unterstützung dieser Arbeit.

<sup>3</sup> *F. Cramer*, Papierchromatographie, 4. Aufl., Weinheim 1958, S. 149.

<sup>4</sup> *F. Feigl*, Spot Tests in Organic Analysis, 6. Aufl., Amsterdam 1960.

<sup>5</sup> *A. L. LeRosen*, *R. T. Moravek* und *J. K. Carlton*, *Analyt. Chem.* **24**, 1335 (1952).

<sup>6</sup> *J. M. Hais* und *K. Macek*, Handbuch der Papierchromatographie, I., 735.

### Experimenteller Teil

#### A. Versuche mit Tabakalkaloiden

Unsere papierchromatographische Methodik stimmte mit den einfachen Verfahren von *Kuffner*, *Schick* und *Bühn*<sup>2</sup> überein; wir verzichteten also z. B. auf Klimatisierung und Sättigung des Gasraumes vor dem Chromatogra-

Tabelle 1.  $hR_f$ -Werte der untersuchten Pyridinderivate und ihrer Acetylverbindungen

	S 1	L 5	L 6	E 2	K 1	K 2	K 3	K 4
Nicotin	27	52	65*	86	41		35	58
nach Acetylierung	27	52	65	86	41		35	58
Nornicotin	23	10	17	88	38	57	26	43
nach Acetylierung	68	85	89	77	70	83	45	75
Anabasin	33	12*	25	80*	48	65	33	56
nach Acetylierung	33	88	94	68	78	85	53	80
Anatabin	29	20	42*	85	41	62	30	50
nach Acetylierung	76	86	93	67	77	85	58	74
m-Nicotin	26	09*	14	78*	35	69	09	35
nach Acetylierung	68	87	93	58	75	86	49	76
Dihydro-Metanicotin	16	09*	15	86	22	58	07	21
nach Acetylierung	70	88	93	70	66	87	43	77
Pseudooxynicotin	14	08	11	86	32	53	23	38
nach Acetylierung	70	83	91	65	77	83	73	80
Myosmin	60	85*	91	55*	52	86	26	66
nach Acetylierung	69	80	86	65	78	86	73	81
Nicotin-N-oxyd	29	32*	41*	81*	49	65	37	54
nach Acetylierung	69	80	86	63	80	83	72	79
Laufzeit (für 20—24 cm)								
Stdn.	10	7	4	4	11	11	11	11

Zusammensetzung der Solvenssysteme (verwendet wird bei den zwei-phasigen die Oberphase):

S 1: n-Butanol-(1):Benzol:Acetatpuffer (0,2 m, pH = 5,7) = 85:5:30, auf mit 0,2 m Ammonchlorid imprägniertem Papier.

L 5: Butanol-(1):Pyridin:Wasser = 3:1:3, auf mit 0,2 m Ammontartrat imprägniertem Papier.

L 6: Methanol:Isoamylalkohol:Benzol:Acetatpuffer (0,2 m, pH = 5,7) = 31:15:50:8\*\*, auf mit 0,2 m Ammontartrat imprägniertem Papier.

E 2: 2 m-Ammontartratlösung (auf ungepuffertem Papier).

K 1: Butanol-(1):Eisessig:Wasser = 10:1:8 (auf ungepuffertem Papier).

K 2: detto, auf mit Acetatpuffer (0,2 m, pH = 5,7) imprägniertem Papier.

K 3: Butanol-(1):Ameisensäure:Wasser = 10:1:8 (auf ungepuffertem Papier).

K 4: detto, auf mit Acetatpuffer (0,2 m, pH = 5,7) imprägniertem Papier.

\* Diese  $hR_f$ -Werte weichen stärker von den früher gefundenen<sup>2</sup> ab.

\*\* Zweckmäßig läßt man die beiden Phasen im Scheidetrichter 2 Tage stehen, ehe man sie trennt.

Tabelle 2.  $hR_f$ -Werte einiger Phenole und ihrer Acetyl-derivate im Solvenssystem K 3

Brenzcatechin . . . . .	86, -diacetat 93
Resorcin . . . . .	87, -diacetat 92, -monoacetat 86
Hydrochinon . . . . .	83, -diacetat 92
Pyrogallol . . . . .	68, 1,3-diacetat 87, -triacetat 92
$\beta$ -Naphthol . . . . .	93, -acetat 94

Wir verwendeten durchwegs das Papier 2043 b Mgl. von S & S.

phieren, so daß die  $hR_f$ -Werte<sup>7</sup> gewissen Schwankungen unterliegen, z. T. auch von den früher genannten nicht unerheblich abweichen. Dies bedeutet aber nicht, daß bei Verwendung von Vergleichssubstanzen nicht einwandfreie Resultate erzielt und sichere Aussagen gemacht werden können.

Wir bereiteten zunächst den Bogen so vor, daß wir in Abständen von 25 mm Startpunkte anzeichneten, aber zunächst nur auf jedem zweiten Startpunkt erst mit einer Pt-Drahtöse (Durchmesser 2 mm) die Lösung der Base auftrugen, dann mit der Öse Essigsäureanhydrid (0,02 ml) zufügten und den Bogen 4 Stdn. bei 60—70° über einem Infrarotstrahler („Elstein“-Rohr) trockneten. Erst dann wurden die frei gebliebenen Startpunkte mit den entsprechenden Basen beschickt und nach dem Trocknen die Bogen in das Lösungsmittelgemisch eingestellt (aufsteigende Chromatographie). Wenn man dagegen die Vergleichsbasen zugleich mit den zu acetylierenden Proben aufträgt und nur jede zweite Probe mit Essigsäureanhydrid behandelt, wirkt das Säureanhydrid diffundierend, oder vielleicht über die Gasphase, auch auf jene Basen ein, welche gar nicht acetyliert werden sollen.

Statt der freien Basen können auch die besser lagerfähigen Pikrate<sup>2</sup> verwendet werden; man zerlegt dann vor der Acetylierung (bzw. vor dem Lauf als Vergleichssubstanz) das Pikrat mit einem Tröpfchen Diisopropylamin.

In einem Falle (Anabasin) haben wir das Acetyl-derivat präparativ dargestellt, seine Eigenschaften mit den Literaturangaben<sup>8</sup> verglichen und das Acetylanabasin neben einer nach unserer Methodik auf dem Startfleck acetylierten Anabasinprobe laufen lassen; es ergab sich, wie erwartet, Übereinstimmung ( $n_D^{20} = 1,5510$ , Schmp. des Pikrates: 184—186°).

Die Königsche Reaktion wurde in der Weise ausgeführt, daß wir den an der Luft nach dem Lauf frei getrockneten Bogen mit 0,2proz. alkohol. Benzidinlösung besprühten, trocknen ließen und dann in einen Zylinder stellten, in welchem sich äther. Bromcyanlösung befand. Diese Lösung ist haltbarer als offene Packungen von Bromcyan.

## B. Phenole

Da, wie erwartet, die Acetylierung der Phenole nicht so leicht verläuft wie bei den Aminen, arbeiteten wir in diesem Fall mit der doppelten Menge an Acetanhydrid, dem 3% Pyridin zugesetzt war.

Mit *Millons* Reagens oder mit diazot. Sulfanilsäure in der bei *Cramer*<sup>3</sup> angeführten Ausführungsform reagierten die Phenole gut, einige Acetyl-derivate aber erst nach 24stdg. Stehen und mildem Erwärmen.

<sup>7</sup> F. Kuffner und N. Faderl, Mh. Chem. **86**, 999 (1955).

<sup>8</sup> O. S. Otroschtschenko und A. Ss. Ssadykow, J. obschtsch. Chem. **24** (86), 1884 (1954); Chem. Zbl. **1956**, 13708.

Um auch die voll acetylierten Phenole sichtbar machen zu können, haben wir den vertikal hängenden Bogen (über einer Unterlage zum Schutze des Tisches, welche aus mit festem  $\text{NaHCO}_3$  bestreutem Packpapier bestand) sehr dünn mit einer Lösung von 0,2 ml 37proz. Formaldehyd in 10 ml konz. Schwefelsäure besprüht, so, daß keinerlei Abtropfen der Sprühflüssigkeit eintrat. Bei mäßigem Erwärmen traten deutliche Flecken hervor, die ihr Intensitätsmaximum 12—24 Stdn. nach dem Sprühen erreichten. Die Acetate stimmten dabei in ihrer Färbung mit den freien Phenolen überein (Brenzcatechin: violett, Resorcin: rot, Hydrochinon: braun, Pyrogallol: rotbraun,  $\beta$ -Naphthol: rotbraun).

Mit verd.  $\text{KMnO}_4$ -Lösung (0,3 g in 100 ml 0,5proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) gaben Stoffe, welche phenolische OH-Gruppen enthielten, Entfärbung (weiße Flecke), die voll acetylierten Derivate reagierten aber nicht (so daß auf dem braunen Untergrund kein Fleck entstand).