

## Konstitutionsfragen und Papierchromatographie, 3. Mitt.<sup>1</sup>:

Erkennung von Amino- und Hydroxysäuren sowie von Oxoverbindungen durch Reaktionen, welche auf der Startlinie durchgeführt werden

(Kurze Mitteilung)

Von

**Therese Kirchenmayer und Friedrich Kuffner**

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 11. September 1962)

Amino- und Hydroxysäuren werden auf der Startlinie eines Papierchromatogrammes mit Essigsäureanhydrid und Pyridin umgesetzt und ihre Derivate mit verschiedenen Reagentien, welche auf die COOH- bzw. auf die CO—NH-Gruppe ansprechen, nachgewiesen.

Aldehyde können mit *Girard*-Reagens P in die entsprechenden Derivate übergeführt werden, welche mittels *Dragendorffs* Reagens erkennbar sind.

Reindarstellung der Derivate ist nicht notwendig.

In Fortsetzung unserer Versuche<sup>1,2</sup>, die Methoden der qualitativen organischen Analyse auf die Papierchromatographie zu übertragen, indem wir durch Reaktionen auf der Startlinie auf das Vorhandensein bestimmter Atomgruppierungen in den Komponenten einer Stoffmischung prüfen, haben wir Amino- und Hydroxysäuren mit Essigsäureanhydrid behandelt. Ein Pyridinzusatz war zur vollständigen Umsetzung notwendig.

Die Acetylierungsmethode von *Fritz* und *Schenk*<sup>3</sup> (saure Katalyse durch Perchlorsäurezusatz) war für unser Verfahren nicht geeignet.

Daß die Umsetzung mit Essigsäureanhydrid nicht immer bzw. nicht ausschließlich einfach zum Acetylprodukt führt, zeigt das Auftreten meh-

<sup>1</sup> 2. Mitt.: *F. Kuffner* und *Th. Kirchenmayer*, Mh. Chem. **93**, 775 (1962).

<sup>2</sup> 1. Mitt.: *F. Kuffner* und *Th. Kirchenmayer*, Mh. Chem. **92**, 701 (1961).

<sup>3</sup> *J. S. Fritz* und *G. H. Schenk*, Analyt. Chem. **31**, 1808 (1959).

rerer Reaktionsprodukte, die wir nicht näher untersuchten, bei Monoamino- bzw. Monohydroxysäuren. Bei der  $\gamma$ -Aminobuttersäure jedoch konnten wir ein Reaktionsprodukt sehr einfach, durch Mitlaufenlassen von Pyrrolidon, als solches charakterisieren. Mit Wasserabspaltung und Estolidbildung (Lactylmilchsäure?) ist speziell bei den Hydroxysäuren zusätzlich zu rechnen.

Die Chromatographie der Aldehyde und Ketone, besonders der aliphatischen, bereitet nach wie vor Schwierigkeiten und erfolgt daher meistens über Derivate. Der dazu nötige Arbeitsaufwand kann vermindert werden durch Herstellung der *Girard-P*-Derivate auf dem Startpunkt. Während Acetaldehyd, wahrscheinlich wegen seiner Flüchtigkeit, nicht umgesetzt werden konnte, gelang die Reaktion ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen schon beim Propionaldehyd, aber auch bei aromatischen Aldehyden, Acetophenon und einigen anderen Ketonen, bisweilen auch (sehr schwach) bei Formaldehyd.

#### Allgemeine Gesichtspunkte bezüglich der Startlinienmethode

Die angewandte Reaktion soll spezifisch sein und bei Zimmertemperatur oder knapp darüber verlaufen. Das zuzusetzende Reagens, welches meist im Überschuß vorliegt, soll keine Reaktion mit dem Phasenträger (Papier) geben und beim Entwickeln des Chromatogrammes nicht stören, d. h. es muß entweder flüchtig sein (z. B. Essigsäureanhydrid, Pyridin), um vorher entfernt werden zu können, oder es soll im Chromatogramm einen extremen  $R_F$ -Wert haben (diazotierte Sulfanilsäure<sup>1</sup>, *Girard*-Reagens-P), oder aber mit dem zur Sichtbarmachung verwendeten Reagens nicht unter Färbung reagieren.

Einige hier angeführte Einschränkungen bei der Auswahl der Reaktionen (Reaktion mit dem Papier, Zimmertemp.), dürften beim Arbeiten auf der Dünnschichtplatte wegfallen; hier ist also der Anwendungsbereich beträchtlich breiter.

Die Reaktionen auf dem Startfleck müssen nicht immer quantitativ ausgeführt werden, so daß neben der umgesetzten Verbindung auch die unveränderte Substanz im gleichen Lauf durch ihren eigenen  $R_F$ -Wert weiter charakterisiert wird.

Für die Sichtbarmachung stehen sowohl die neu gebildete Atomgruppierung (z. B. Azofarbstoff<sup>1</sup>) oder deren Reaktionen zur Verfügung, als auch Reaktionen der im Molekül vorhandenen, an der Reaktion nicht teilnehmenden Gruppen, wobei es sich um Funktionen des zu untersuchenden Moleküls handeln kann (z. B. Pyridinring des Acetylanabasins<sup>2</sup>) oder um solche des zugesetzten Reagens (z. B. Pyridiniumring des *Girard*-Reagens P).

Wird von zwei Verbindungen, welche ähnliche  $R_F$ -Werte haben, nur eine auf dem Startfleck in ein Derivat übergeführt, so ist zu erwarten, daß sich die beiden Stoffe nunmehr gut voneinander trennen lassen.

Den Österreichischen Stickstoffwerken sowie der Austria Tabakwerke AG. danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil

Die Ausführung der Chromatogramme erfolgte auf Schleicher & Schüller Papier 2043b Mgl.

Für die *Amino-* und *Hydroxysäuren* wurde unser Laufmittel K 1 (n-Butanol—Eisessig—Wasser = 8:1:10) verwendet. Zur Acetylierung verwendeten wir Essigsäureanhydrid mit Zusatz von 3% Pyridin, wie bei unseren Versuchen mit Phenolen beschrieben<sup>2</sup>.

#### *Sichtbarmachung der Aminosäuren und ihrer Reaktionsprodukte*

1. 0,2 proz. alkohol. Ninhydrinlösung (Tab. 1, Spalte 1). Die Acetyl-derivate reagieren nicht mit Ninhydrin.

2. Reaktion auf die CO—NH-Gruppierung<sup>4, \*</sup>: Das vom Lösungsmittel (Eisessig) befreite Chromatogramm (2 Stdn. bei 60° C über einem 300 W Elsteinrohr [Infrarotstrahler] getrocknet) wurde 10 Min. in eine Chloratmosphäre gehängt (0,1proz.  $\text{KMnO}_4$ -Lsg. + 10proz. HCl, 1:1) und, nachdem das freie Chlor durch halbstdg. Trocknen vertrieben war, mit einem 1:1-Gemisch von 1proz. KJ- und 1proz. Stärkelsg. besprüht (Tab. 1, Spalte 2).

3. Reaktion auf die COOH-Gruppierung<sup>5</sup> (gilt daher auch für die Produkte, welche aus Hydroxysäuren entstehen): Das (wie schon unter 2. beschrieben) vom Eisessig befreite Chromatogramm wurde mit einem Gemisch gleicher Volumina 1proz. KJ-, 1proz.  $\text{KJO}_3$ - und 1proz. Stärkelsg. behandelt. Diese Methode ist einfacher und rascher als die unter 2. (Tab. 1, Spalte 3; Tab. 2, Spalte 2).

4. Besprühen mit Indikatoren. Gegenüber 1. und 2. weniger empfindlich, daher nicht in Betracht zu ziehen.

#### *Sichtbarmachung der Hydroxysäuren*

1. Besprühen mit 0,05proz. wäßriger Lösung von Bromphenolblau (Tab. 2, Spalte 1).

2. Verwendung des bei den Aminosäuren unter 3. angegebenen Jodid—Jodat—Stärke-Gemisches (Tab. 2, Spalte 2).

\* Modifikationen dieser Methode sind bekannt, wurden aber von uns nicht verwendet: *Th. Wieland* und *K. Dose*, *Angew. Chem.* **66**, 781 (1954); *F. Reindel* und *W. Hoppe*, *Naturwissensch.* **40**, 221 (1953); *Chem. Ber.* **87**, 1103 (1954).

<sup>4</sup> *J. M. Hais* und *K. Macek*, *Handb. d. Papierchromatogr.*, Jena 1960, I, 736, D 7a. *H. N. Rydon* und *P. W. G. Smith*, *Nature [London]* **169**, 922 (1952).

<sup>5</sup> *A. G. Lang*, *J. R. Quayle* und *R. J. Stedman*, *J. chem. Soc. [London]* **1951**, 2197.

Tabelle 1.  $hR_F$ -Werte\* der Aminosäuren und ihrer bei Einwirkung von Essigsäureanhydrid entstandenen Produkte

	1	2	3
Alanin .....	12	12	15
nach Acetylierung .....		75	73
Valin .....	29	29	29
nach Acetylierung .....		87	87
$\gamma$ -Aminobuttersäure .....	18	18	
„nach Acetylierung“ .....		66, 70	
Pyrrolidon .....		70	
Glutaminsäure .....	10	10	10
nach Acetylierung .....		44	45, 60
Leucin .....	40	38	41
nach Acetylierung .....		91	91
Norleucin .....	42	45	43
nach Acetylierung .....		93	88
Isoleucin .....	41	41	40
nach Acetylierung .....		88, 93	88
Lysinhydrochlorid .....	3	2	10
nach Acetylierung .....		17, 70	17, 72
Methionin .....	29	24	24
nach Acetylierung .....		30, 79	80
Phenylalanin .....	34	37	37
nach Acetylierung .....		88	86
Tryptophan .....	20	23	20
nach Acetylierung .....		83	83

Solvens: K 1.

Nachweis: 1. Ninhydrin, 2. Chlorierung, KJ und Stärke,  
3. KJ, KJO<sub>3</sub> und Stärke.

Wenn zwei  $hR_F$ -Werte angegeben sind, so stellt der fettgedruckte den Hauptfleck dar.

\* Der Kürze halber schreiben wir statt der  $R_F$ -Werte ihr Hundertfaches an. Wir<sup>6</sup> haben dafür die Bezeichnung Hekto- $R_F$ -Werte ( $hR_F$ -Werte) vorgeschlagen.

### Oxoverbindungen

Zum Nachweis der Aldehyde haben wir die aufgetragenen Oxoverbindungen auf dem Startpunkt mit 2 Tropfen einer Lösung von Girard-Reagens P in 10 ml Alkohol und 2 ml Eisessig versetzt und zur vollständigen Umsetzung 30 Min. bei ca. 60° C über dem Elsteinrohr getrocknet.

Als Laufmittel verwendeten wir Elektrolytlösungen<sup>7</sup>, z. B. 15proz. oder 0,2 m Natriumchlorid- oder 0,2 m Ammontartratlösung. Die  $hR_F$ -Werte einer bestimmten Verbindung sind in allen diesen Entwicklern ziemlich ähnlich (Tab. 3).

Das überschüssige Girard-Reagens stellt in diesen Lösungsmitteln einen Schnelläufer dar und stört somit den Nachweis der Hydrazone nicht. Die

<sup>6</sup> F. Kuffner und N. Faderl, Mh. Chem. **86**, 999 (1955).

<sup>7</sup> F. Kuffner, K. Schick und H. Bühn, Mh. Chem. **87**, 749 (1956).

Tabelle 2.  $hR_F$ -Werte der Hydroxysäuren und der bei der Einwirkung von Essigsäureanhydrid entstandenen Produkte

	1	2
Glykolsäure .....	56	56
nach „Acetylierung“ ....	76	76
Milchsäure .....	69, 76	70, 76
nach „Acetylierung“ ....	84	85, 73
Apfelsäure .....	45	44, 75
nach „Acetylierung“ ....	Start	Start, 88
Citronensäure .....	41	40
nach „Acetylierung“ ....	50, 24	50, 23
Gallussäure .....	57	56
nach Acetylierung .....	88	88

Solvens: K 1.

Nachweis: 1. Bromphenolblau, 2. Jodid—Jodat—Stärke.

Sichtbarmachung erfolgt mit *Dragendorffs* Reagens<sup>8</sup>, welches auf die Pyridin-Gruppe des *Girard*-Restes anspricht.

Die Hydrazone aliphatischer Ketone werden in unserem Solvens schlecht getrennt, sofern überhaupt Reaktion eintritt\*.

Tabelle 3.  $hR_F$ -Werte von *Girard*-P-Hydrazonen von Aldehyden und Ketonen

Propionaldehyd .....	72	m-Nitrobenzaldehyd .....	54
Isobutyraldehyd .....	87	$\beta$ -Acetylpyridin .....	81
n-Capronaldehyd .....	65	$\beta$ -Pyridyl-propylketon ....	73
2-Äthylhexaldehyd .....	73	Acetophenon .....	85
Pyrogallolaldehyd .....	30	Diisobutylketon .....	85
Resorcindialdehyd .....	17	Diisopropylketon .....	85
o-Nitrobenzaldehyd .....	63		

Solvens: 15proz. NaCl-Lösung.

\* *R. B. Seligmann, M. D. Edmonds, A. E. O'Keeffe* und *L. A. Lee*, Chem. & Ind. **1954**, 1195 geben für die Trennung der *Girard*-P-Hydrazone ein Lösungsmittel an, das sich aber für unsere Methode nicht eignet. Das überschüssige *Girard*-Reagens würde sich über zwei Drittel des Chromatogramms erstrecken und somit die Flecke der Hydrazone überdecken.

<sup>8</sup> *J. M. Hais* und *K. Macek*, l. c. 758, D 144a.