

Konstitutionsfragen und Papierchromatographie, 2. Mitt.¹:

Kupplung auf der Startlinie

Von

Friedrich Kuffner und **Therese Kirchenmayer**

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 22. Mai 1962)

Kuppelt man auf der Startlinie eines Papierchromatogramms Pyrrole, Phenole oder aromatische Amine mit einem Diazoniumsalz, so wird anschließend nicht die aufgetragene Substanz, sondern das zugehörige Kupplungsprodukt chromatographiert, das gegenüber dem Ausgangsmaterial einen veränderten R_f -Wert hat und infolge seiner Eigenfarbe keiner besonderen Sichtbarmachung bedarf. Hält man das Ausgangsmaterial im Überschuß, so kann man es neben dem Kupplungsprodukt durch seinen eigenen R_f -Wert und geeignete Sprühreagentien lokalisieren, d. h. in *einem* eindimensionalen Lauf durch zwei R_f -Werte charakterisieren.

Für das Studium des mikrobiologischen Abbaues des Nicotins² haben wir kürzlich eine Methode entwickelt, welche es ermöglicht, Acetylierungen auf dem Startfleck von Papierchromatogrammen durchzuführen¹. Wir berichten nun über die Kupplung mit Diazoniumverbindungen auf dem Startfleck.

Obwohl die Durchführung chemischer Reaktionen, vor allem von Farbreaktionen, auf dem Papier *nach* dem Lauf die Standardoperation der Papierchromatographie vorstellt, werden Reaktionen an Stoffen, welche sich zur Papierchromatographie z. B. wegen ihrer Flüchtigkeit nicht gut eignen, in der Regel vor dem Auftragen auf den Startfleck ausgeführt. Einige Arbeitskreise haben aber zu verschiedenen Zwecken auch direkt auf der Startlinie chemische Umsetzungen vorgenommen³. Unser Ziel war es vor allem, be-

¹ 1. Mitt.: *F. Kuffner* und *Th. Kirchenmayer*, Mh. Chem. **92**, 701 (1961).

² *F. Kuffner* und *D. Kallina*, Mh. Chem. **89**, 270 (1958).

³ *Z. B. H. P. Kaufmann*, *J. Budwig* und *C. W. Schmidt*, Fette, Seifen, Anstr. **54**, 73 (1952); *O. W. Thiele* und *H. Bergmann*, Z. physiol. Chem.

stimmte Verbindungen von den Begleitstoffen dadurch zu unterscheiden, daß wir eine bestimmte Atomgruppierung verändern und damit entweder den R_f -Wert oder die zur Erkennung dienende Farbreaktion beeinflussen, also diese Atomgruppierung in der betreffenden Verbindung nachweisen.

Da das Nicotyrin (I) neben dem kupplungsfähigen Pyrrolring noch den durch die *Königsche* Reaktion⁴ bequem und empfindlich nachweisbaren Pyridinring besitzt, stellte es das bevorzugte Objekt unserer Untersuchung vor, die dann noch auf Phenole und aromatische Amine ausgedehnt wurde; mit anderen Reaktionen der Diazoniumverbindungen (*Japp-Klingemann*, *Meerwein-Schuster*) haben wir uns nicht beschäftigt. Es scheint jedenfalls, daß die Forderung, an kleinsten Substanzmengen mit geringstem Aufwand neben dem üblichen chromatographischen Nachweis, der wegen der Spezifität der Sprühreagentien stets auch den Nachweis gewisser chemischer Gruppierungen einschließt, noch weitere Aussagen bezüglich des chemischen Aufbaues einer Verbindung, welche in einem *Substanzgemisch* enthalten ist, machen zu können, durch die Durchführung klassischer und selektiver Reaktionen auf dem Startfleck wenigstens teilweise erfüllt werden kann.

Die Kupplungsfähigkeit von Pyrrolen und N-Alkylpyrrolen haben *O. Fischer* und *E. Hepp* entdeckt; *Frank* und Mitarbeiter haben diesbezügliche Versuche mit dem Nicotyrin beschrieben⁵.

Wir versuchten also diese Reaktion auf dem Papier durchzuführen, und zwar bei Gegenwart von Fremdstoffen; deshalb benützten wir eine Stammlösung, welche außer dem Nicotyrin noch etwas Nicotinoylpropionsäure und Nicotin enthielt, also zwei Stoffe, welche keine kupplungsfähige Gruppe haben. Zur Kupplung verwendeten wir

a) frisch bereitete Lösungen, welche durch Diazotieren von p-Aminobenzoessäure, p-Nitranilin oder β -Naphthylamin hergestellt wurden,

b) Echtrot oder das Chlorid der diazotierten Sulfanilsäure^{6*}.

Schon beim Zufügen der Diazoniumlösung zu der auf dem Startpunkt eingetrockneten Stammlösung zeigte die Farbstoffbildung, daß eine kupplungsfähige Komponente vorhanden war. Das fertige Papier-

306, 192 (1957); *P. Decker*, Naturwiss. **44**, 305 (1957); *O. Mikeš* und *V. Holeyšovský*, Coll. Czechoslov. Chem. Communic. **23**, 524 (1958); *H. P. Kaufmann* und *D. K. Chowdhury*, Chem. Ber. **91**, 2117 (1960).

⁴ *W. König*, J. prakt. Chem. [2] **69**, 1, 105 (1904).

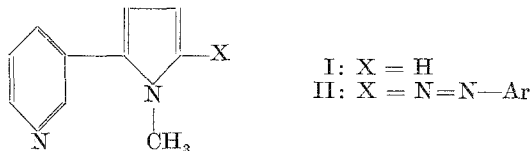
⁵ *O. Fischer* und *E. Hepp*, Ber. dtsch. chem. Ges. **19**, 2251 (1886); *R. L. Frank*, *R. W. Holley* und *D. M. Wikholm*, J. Amer. Chem. Soc. **64**, 2835 (1942).

⁶ *F. Cramer*, Papierchromatographie; 4. Aufl., S. 149 (Weinheim 1958).

* Das trockene Chlorid der diazotierten Sulfanilsäure ist keineswegs ungefährlich; beim Entnehmen von Proben jedenfalls kommen schwere Unfälle vor.

Wir haben deshalb das Präparat in feuchtem Zustand verwendet.

chromatogramm zeigte dann einen Farbstofffleck, den wir durch Mitlaufenlassen einer Vergleichsprobe als den erwarteten Nicotyrin-azofarbstoff (II) identifizieren konnten.



Um festzustellen, was mit den beiden anderen Komponenten unserer Stammlösung geschehen war, sprühten wir dasselbe Chromatogramm mit einem primären Amin (und zwar Benzidin); dabei kuppelte das im

Abb. 1. Stammlösung (Lauf 2), behandelt mit einer Lösung von frisch diazotiertem p-Nitranilin (Lauf 1, zweimal durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit zu zeigen; die überschüssigen Salze haben die R_f -Werte der nicht gekuppelten Stoffe stark verändert, die Flecke verzerrt)

Abb. 2. Stammlösung (Lauf 1), behandelt mit wenig (Lauf 2) bzw. viel (Lauf 3) einer Lösung von reinem Diazoniumsalz aus Sulfanilsäure. Die R_f -Werte der nicht gekuppelten Verbindungen bleiben unverändert; man beobachtet, daß im Lauf 2 der Fleck des Nicotyris durch die Bildung von (wenig) Farbstoff kaum verkleinert erscheint, wohl aber der des (überschüssigen) Diazoniumsalzes. In Lauf 3 liegen diese Verhältnisse umgekehrt

Bezeichnung der Flecken: A Nicotyrin (violett mit BrCN + Benzidin); B Nicotinylpropionsäure (rosa mit BrCN + Benzidin); C Nicotin (ebenso); D Azofarbstoff (Eigenfarbe); E überschüssiges Diazoniumsalz, kuppelt beim Besprühen mit Benzidin; F ungekuppelte Bestandteile der Stammlösung zeigen falsche R_f -Werte; G unbekannt, wurde mit Benzidin violett; H farbloser Salzleck, wird nach Königreaktion wahrnehmbar

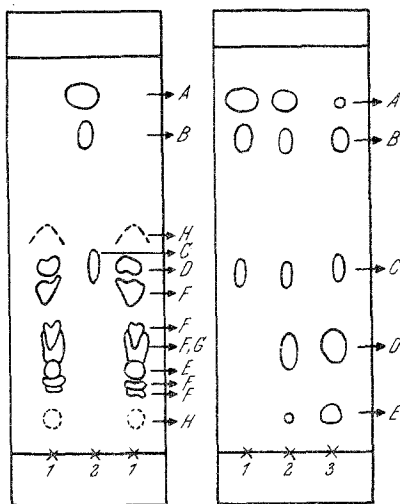


Abb. 1

Abb. 2

Überschuß angewandte, in unserem Lösungsmittelgemisch langsam laufende Diazoniumsalz (aus Sulfanilsäure) mit dem Benzidin zu einem grünbraunen Farbstoff. Nun wurde in eine Bromcyan-atmosphäre eingehängt, um die (in α -Stellung nicht substituierten) Pyridine sichtbar zu machen⁴; dabei ergaben sich folgende Befunde:

a) Verwendete man zur Kupplung die durch Umsetzen von Aminsalz mit Natriumnitrit hergestellte Lösung — also ohne Isolierung der Diazoniumverbindung —, so zeigte die Königreaktion, daß in unserem Beispiel die nicht kupplungsfähigen Stoffe (Nicotin und Nicotinylpropionsäure) durch die reichlich vorhandenen Salze im Laufe gehemmt werden, ja sogar niedrigere R_f -Werte zeigen können als der Azofarbstoff aus Nicotyrin. Es entstehen unübersichtliche Chromatogramme mit z. T. verzerrten, gabelförmigen Flecken (Abb. 1). Trotzdem kann auch ein solches Chromatogramm zur Charakterisierung einer kupplungsfähigen Substanz verwendet werden, wenn nämlich in entsprechender Weise

ein Vergleichswert gewonnen wird. Wir haben bei einigen Versuchen das kuppelnde System auf dem Startfleck mit 0,25 n Natriumcarbonat oder -acetatlösung gepuffert; bei der Na_2CO_3 -Behandlung verschwand der Fleck des Diazoniumsalzes aus dem Chromatogramm (Fleck E in Abb. 1).

b) Es dürfte sich jedenfalls empfehlen, mit Lösungen der reinen isolierten Diazoniumsalze zu arbeiten, wie sie uns im Echtrot und in der diazot. Sulfanilsäure (vgl.* S. 776) zur Verfügung standen. Dann zeigen nämlich auch die nicht kuppelnden Verbindungen ihre normalen R_f -Werte und werden daher, ebenso wie etwa vorhandenes überschüssiges Nicotyrin, an ihren gewohnten Plätzen gefunden, weil der störende Einfluß der Fremdsalze entfällt (Abb. 2). Mit Sulfanilsäure haben wir sowohl nach Methode a) als auch nach b) gearbeitet. Dabei zeigte der Farbstoff zwar dieselbe Nuance, aber verschiedene R_f -Werte, weil bei a) die überschüssigen Salze die Wanderungsgeschwindigkeit beeinflussen.

Unter den Phenolen und aromatischen Aminen, welche wir untersuchten, befanden sich Brenzcatechin, Resorcin, eine Anzahl Xylenole und Xylidine, Mono- und Dimethylanilin u. a. m. Beim Anilin entstand ein gelbes Reaktionsprodukt, offenbar das wohlbekannte Triazenderivat, bei tertiären aromatischen Aminen wies die Farbnuance auf die entsprechenden Azofarbstoffe hin. In manchen Fällen zeigten sich mehr als nur ein Farbfleck, was entweder auf isomere Kupplungsprodukte hinweist oder auf Kupplung mit mehr als nur einem Mol Diazoniumsalz; man könnte auch daran denken, daß in den (technischen) Aminen fremde kupplungsfähige Stoffe, z. B. Isomere, enthalten waren.

Für die Förderung unserer Arbeit haben wir der Austria-Tabakwerke A. G. (Österr. Tabakregie, Wien) und den Österr. Stickstoffwerken (Linz) bestens zu danken.

Experimenteller Teil

Es wurde auf Schleicher & Schüllpapier 2043 b Mgl gearbeitet.

Nach Auftragen der Diazoniumlösung wurde das Chromatogramm 30 Min. über einem Infrarotstrahler (*Elstein*-Rohr) bei etwa 60° getrocknet und anschließend aufsteigend entwickelt. Als Solvens verwendeten wir unser System K 1 (1-Butanol—Eisessig—Wasser = 8:1:10)¹.

Echtrot 3 Gl (Dr. Th. Schuchardt, München) wurde als 2proz. wäßrige Lösung angewandt, diazotierte Sulfanilsäure⁶ als ca. 1proz. Lösung in Alkohol—Wasser (1:1).

Zur Herstellung der übrigen Diazoniumlösungen (*ohne* Isolierung der Diazoniumsalze) wurden ca. 20 mg p-Nitranilin (bzw. p-Aminobenzoesäure oder β -Naphthylamin) mit 1 ml heißem Wasser versetzt, weiter kurz erwärmt, mit 5 Tropfen konz. Salzsäure versetzt, nochmals kurz erwärmt, dann auf 0° abgekühlt und langsam durch Zusatz von 5 Tropfen m NaNO_2 -Lösung diazotiert. 1 Tropfen dieses Gemisches wurde auf den Startfleck aufgebracht.

Wegen der geringen Menge dürfte jedoch Eiskühlung bei der Diazotierung nicht notwendig sein.

Unsere Versuche mit einer Stammlösung, enthaltend Nicotyrin, daneben kleine Mengen Nicotinoylpropionsäure und Nicotin, ergaben folgende hR_f -Werte für Nicotyrin und seine Kupplungsprodukte:

	hR_f	mit Benzidin	+ BrCN
Nicotyrin	90	—	violett
mit p-Aminobenzoesäure*	43 ± 1	braun	gelb
mit p-Nitranilin*	46 ± 2	orange	braun
mit β -Naphthylamin*	46 ± 1	braun	gelb
mit Sulfanilsäure*	14	gelb	unverändert
mit (isol.) diazot. Sulfanilsäure**	24	gelb	unverändert
mit Echtröt 3 Gl (Schuchardt)**	96	orange	grün

* Nach Methode a).

** Nach Methode b).

β -Naphthylamin kuppelt z. T. mit sich selbst und gibt daher einen zusätzlichen Farbstoffleck; es ist zu dessen Identifizierung zu empfehlen, eine Blindprobe mitlaufen zu lassen. Die aus der Tab. ersichtlichen Schwankungen des hR_f -Wertes sind darauf zurückzuführen, daß wir auf Klimatisierung und Sättigung der Chromatographierkammer verzichteten.

Von den verwendeten Phenolen gaben mit diazotierter Sulfanilsäure, Salicylsäure, Brenzcatechin, β -Naphthol, die 6 Xylenole und Menthol je einen Farbstoffleck, Resorcin zwei, α -Naphthol drei (mit den hR_f -Werten 7, violett; 30, orange; 40, rosa). Auch 2,3,5-Trimethylphenol gab ein Kupplungsprodukt.

Versuche mit dem 2- und 5-Amino-1,3-dimethylbenzol, dem Amino-p-xylyl und dem 3-Amino-o-xylyl zeigten, daß sich das angewandte Solvens K 1 für die Trennung bzw. Unterscheidung ihrer Kupplungsprodukte (mit diazot. Sulfanilsäure) wenig eignet, daß aber die genannten Xylidine auf dem Startleck kuppeln und zumeist mehr Flecke geben als erwartet (vielleicht nur bei Verwendung technischer Xylidine).