

Präparative und analytische Trennung organischer Verbindungen durch Chromatographie an Polyamid

VON DR. H. ENDRES UND DR. H. HÖRMANN

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EIWEISS- UND LEDERFORSCHUNG, MÜNCHEN

Herrn Prof. Dr. Adolf Butenandt zum 60. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

Polyamidgefüllte Säulen eignen sich zur Chromatographie zahlreicher organischer Verbindungen, besonders von Phenolen, Carbonsäuren und aromatischen Nitroverbindungen. Das Verfahren hat sich auch bei der präparativen Isolierung von Naturstoffen bewährt. Die Affinität von Phenolen zu den Polyamiden beruht auf der Bildung von Wasserstoffbrücken zu den Peptidbindungen des Polyamids, während die aromatischen Nitroverbindungen durch die freien Aminogruppen des Polymeren zurückgehalten werden. Chinone reagieren irreversibel mit den freien Aminogruppen des Polyamids. Von acetyliertem Polyamid werden Chinone nicht zurückgehalten, wohl aber die Phenole.

Einleitung

Als Trägersubstanzen für chromatographische Systeme mit vergleichsweise hoher Kapazität eignen sich wenig vernetzte linearpolymeren Kunststoffe mit eingebauten, spezifisch wirksamen Haftgruppen. Ein Beispiel dafür sind die Ionenaustauscher [1], die aus einem inerten hochmolekularen Gerüst bestehen, in das saure oder basische Gruppen eingebaut sind. Die Harze müssen quellfähig sein, damit die zu trennenden Substanzen auch in das Innere des Austauschers eindringen können, wo sie vorübergehend festgehalten werden. Es wird somit an einer stationären Phase mit vielen chemisch identischen Haftzentren chromatographiert, die sich in ihrer Reaktionsfähigkeit höchstens auf Grund ihrer verschiedenen Lage im Netzwerk des Polymeren etwas unterscheiden, innerhalb enger Grenzen jedoch als gleichwertig anzusehen sind. Dem Austauscher entgegengesetzt geladene Ionen verteilen sich daher zwischen dem Inneren des Harzes und einer umgebenden Pufferlösung meist in einem über weite Bereiche von der Konzentration wenig abhängigen Verhältnis [2]. Das ist Voraussetzung dafür, daß die zu trennenden Substanzen auch in höheren Konzentrationen in scharfen symmetrischen Banden durch die Säule wandern [3].

An Stelle von sauren oder basischen Affinitätszentren kann man auch andere selektiv wirkende Haftgruppen in den Austauscher einbauen. Entsprechende Harze für die auswählende Adsorption anorganischer Ionen sind bereits bekannt, z. B. Polystyrolharze mit Dipikrylaminresten für Kalium-Ionen [4], Austauscher mit

Hydroxamsäuregruppen für Eisen-Ionen [5], mit Mercaptogruppen für Quecksilber-Ionen [6] oder mit komplexbildenden Gruppen für die Ionen einiger Übergangsmetalle [7].

Adsorption von Phenolen

Zwischen phenolischen Hydroxylgruppen und Amidbindungen bilden sich besonders starke Wasserstoffbindungen.

Auf diesen starken Nebenvalenzkräften beruht die Bildung von definierten Anlagerungsverbindungen, etwa zwischen Phenol und Harnstoff im Verhältnis 2:1 [8] oder zwischen Phenol und Diketopiperazin [9]. Weitere Hinweise für das Vorliegen solcher Bindungen wurden durch Aufnahme von IR-Spektren [10] und durch Messung der Dielektrizitätskonstanten [11] von Phenol-Amidgemischen erhalten. Flett [12] bestimmte die Energie der Wasserstoffbrücke zwischen Phenol und Dimethylformamid infrarotspektroskopisch zu 6,4 kcal/Mol. Wasserstoffbrücken zwischen phenolischen Gruppen und Peptidbindungen von Eiweißkörpern werden u. a. für die Affinität substantiver Farbstoffe gegenüber Wolle ver-

[5] J. P. Cornaz u. H. Deuel, *Experientia* 10, 137 (1954).

[6] US.-Pat. 2418497 (1947), E. I. DuPont de Nemours, Erf.: W. I. Burke; siehe auch [1] S. 39; H. P. Gregor, D. Dolar u. G. K. Hoeschele, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 3675 (1955).

[7] H. P. Gregor, M. Taifer, L. Citarel u. E. I. Becker, *Ind. Engng. Chem.* 44, 2834 (1952); E. Jenckel u. H. V. Lillin, *Kolloid-Z.* 146, 159 (1956); E. Blasius u. G. Olbrich, *Z. analyt. Chem.* 151, 81 (1956).

[8] H. Eckenroth, *Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges.* (3) 24, 623 (1886); siehe auch A. Baeyer u. V. Villiger, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 35, 1201 (1902); K. Freudenberg, *Collegium* 616, 353 (1921).

[9] P. Pfeiffer: *Organische Molekülverbindungen*. Verlag Thieme, Stuttgart 1927; P. Pfeiffer, O. Angern, L. Wang, R. Seydel u. K. Quehl, *J. prakt. Chem.* 126, 97 (1930).

[10] C. G. Cannon, *Mikrochim. Acta* 1955, 555.

[11] C. H. Giles, T. J. Rose u. D. G. M. Vallance, *J. chem. Soc. (London)* 1952, 3799; F. M. Arshid, C. H. Giles, S. K. Jain u. A. S. A. Hassan, *J. chem. Soc. (London)* 1956, 72.

[12] M. St. C. Flett, *J. Soc. Dyers Colourists* 68, 59 (1952).

[1] Zusammenfassende Darstellung siehe F. Helfferich: *Ionenaustauscher*. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1959, Bd. I.

[2] Siehe z. B. T. R. E. Kressman u. I. A. Kitchenner, *J. chem. Soc. (London)* 1949, 1190, 1201, 1208, 1211.

[3] A. J. P. Martin u. R. L. M. Synge, *Biochem. J.* 35, 1358 (1941).

[4] A. Skogseid, Dissertation, Universität Oslo 1948; US.-Pat. 2592350 (1952), Firma Norsk Hydro-Elektrisk kv., Erf.: A. Skogseid; siehe auch [1] S. 38.

antwortlich gemacht [13,14] und spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Gerbung von Haut mit pflanzlichen Gerbstoffen [15]. Die starke Affinität von Phenol zu Peptidbindungen wird bereits seit längerer Zeit zur Trennung von Eiweißkörpern und Nichtproteinverbindungen durch Ausschütteln mit Phenol ausgenutzt [16]. Schließlich sind phenolhaltige Lösungsmittel zur papierchromatographischen Trennung von Peptiden geeignet, denn nach Versuchen von *Grassmann* und *Deffner* [17] nimmt die Affinität der Peptide zu Phenol mit steigender Kettenlänge zu.

Auf Grund dieser Befunde sollten hochmolekulare Kunststoffe, welche Peptidbindungen enthalten, zur Trennung phenolischer Substanzen geeignet sein. Als handelsübliche Produkte bieten sich Polyamide vom Typ des Perlons (Polycaprolactam) und Nylons (Polyhexamethylendiamin-adipinat) an. Sie sind auf Grund ihrer Quervernetzungen durch Wasserstoffbrücken in den meisten Lösungsmitteln hinreichend schwer löslich, jedoch noch quellfähig. Eine thermodynamische Beziehung für die Aufnahme von Stoffen durch quellbare Hochpolymere, darunter auch von Phenol durch Polyamid, war bereits von *Huggins* [18] und von *Flory* [19] abgeleitet worden.

Die Aufnahme von Phenol durch Polycaprolactam aus wäßriger Lösung gehorcht über einen weiten Konzentrationsbereich (bis zu 0,2 M Phenol) einer linearen Verteilungsfunktion [20] (Abb. 1). Erst bei höheren Konzentrationen biegt die

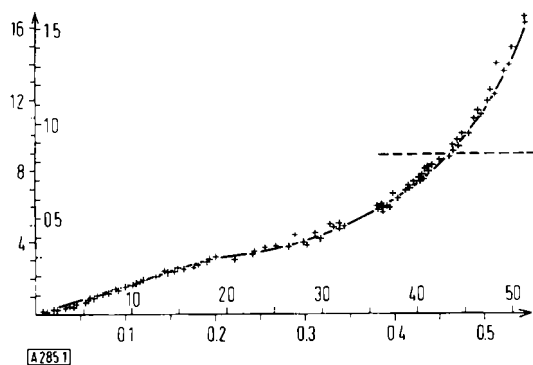


Abb. 1. Verteilung von Phenol zwischen Polycaprolactam und Wasser [20].

Die gestrichelte Linie bedeutet Aufnahme von 1 Mol Phenol pro Mol Amidbindung.

Ordinate: Phenolkonzentration im Polycaprolactam (linke Skala [mMol/g], rechte Skala [g/g]).

Abszisse: Phenolkonzentration in Wasser (obere Skala [mg/ml], untere Skala [mMol/ml]).

Sorptionsisotherme etwas nach unten um, was eine teilweise Absättigung bedeutet. Steigt die Phenolkonzentration weiter an, dann wendet sich die Isotherme nach oben, das Polyamid quillt, erweicht und geht schließlich ganz in Lösung. Die Phenolaufnahme ist vollkommen reversibel. Mit Wasser läßt sich

[13] J. Steinhardt, C. H. Fugitt u. M. Harris, J. Res. nat. Bur. Standards 25, 519 (1940); 26, 293 (1941); 30, 123 (1943); J. B. Spackman u. E. Stott, Trans. Faraday Soc. 31, 1425 (1935).

[14] Zur Entwicklung nichtionogener Farbstoffe siehe G. Otto, Leder 4, 1 (1953).

[15] W. Grassmann, H. Endres, M. Oppelt u. H. El Sissi, Leder 10, 149 (1959); dort weitere Literatur.

[16] Siehe z. B. O. Westphal, O. Lüderitz u. F. Bister, Z. Naturforsch. 7b, 148 (1952).

[17] W. Grassmann u. G. Deffner, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 293, 89 (1953).

[18] M. L. Huggins, Ann. N. Y. Acad. Sci. 43, 1 (1942).

[19] P. J. Flory, J. chem. Physics 10, 51 (1942).

[20] W. Grassmann, H. Hörmann u. A. Hartl, Makromolekulare

das Phenol wieder aus dem Polycaprolactam auswaschen, auch dann, wenn das Phenol längere Zeit an das Polyamid gebunden war [20].

Die Verteilungskurve von Phenol zwischen Polycaprolactam und Wasser ist so lange linear, bis etwa ein Drittel der Peptidbindungen des Polyamids abgesättigt ist (Abb. 1). Der Verteilungskoeffizient des Phenols, bezogen auf das Gewicht von Wasser und Polycaprolactam, beträgt in diesem Bereich 12,2. Für Wasser/Polyhexamethylendiamin-adipinat fanden *Forward* und *Palmer* [21] einen Wert von 14,3. Es ist wahrscheinlich, daß diese lineare Beziehung nur für die Aufnahme von Phenol in nichtkristalline Bereiche des Polyamids gilt. Tempert man Nylon längere Zeit bei 200–230 °C, so läßt sich röntgenographisch ein höherer Ordnungszustand nachweisen, und die Aufnahme von Phenol aus 2-proz. wäßriger Lösung wird geringer [21]. Die freie Energie beim Übergang des Phenols von der wäßrigen Phase in die Nylonphase wurde aus der Temperaturabhängigkeit des Verteilungskoeffizienten zu etwa 4 kcal/Mol ermittelt [21].

Chromatographie von Phenolen

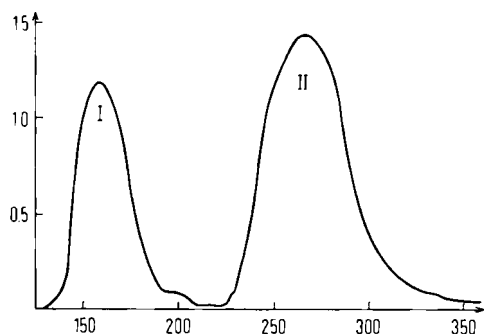
Der bis zu verhältnismäßig hohen Phenolkonzentrationen konstante Verteilungskoeffizient bildet eine ideale Voraussetzung für chromatographische Trennungen. Erste Versuche dazu wurden von *Carelli* et al. [22] angestellt. Sie führten eine heute weniger gebräuchliche Frontalanalyse eines Gemisches dreier isomerer Xylenol-derivate durch. *Grassmann*, *Hörmann* und *Hartl* [20] zeigten, daß einige Phenole durch Elutionschromatographie vollständig getrennt werden können. Beide Arbeitskreise wiesen darauf hin, daß die Kapazität der Polyamidsäulen im Vergleich zu anderen chromatographischen Anordnungen außerordentlich groß ist, so daß es möglich sein müßte, Substanzen auch in halbpräparativem Maßstab zu trennen. Bei den Versuchen von *Grassmann* et al. betrug z. B. die auf eine kleine Säule (15 cm lang, 0,9 cm Durchmesser, 3 g Perlonpulver) aufgebrauchte Menge der einzelnen phenolischen Substanzen bis zu 1/3 mMol, während bei den üblichen adsorptions- und verteilungschromatographischen Methoden meist nur wenige µMol auf eine Säule gleicher Größe ohne Überladung aufgebracht werden können. Diese Vorteile ergeben sich aus dem über einen weiten Konzentrationsbereich konstanten Verteilungskoeffizienten. Abb. 2 zeigt die Trennung von 20 mg Phenol und 40 mg m-Kresol an einer mit Polycaprolactam gefüllten Säule (48 cm Länge; 1,3 cm Durchmesser) mit Wasser als Elutionsmittel. Trotz der relativ großen aufgebrauchten Menge treten die beiden Verbindungen gut getrennt in symmetrischen Banden aus der Säule.

Für säulenchromatographische Trennungen eignet sich besonders gut Polycaprolactam, z.B. Ultramid BM 228 (Siebgröße 0,2 mm) der Badischen Anilin- und Sodafabrik. Es soll möglichst frei von Monomeren sein, denn sie wandern mit den zu trennenden Substanzen als Molekülverbindungen durch

[21] M. V. Forward u. H. J. Palmer, J. Textile Inst. 45, T 510 (1954).

[22] V. Carelli, A. M. Liquori u. A. Mele, Nature (London) 176

die Säule. Eventuell vorhandene Monomere können durch Waschen des Polyamids in der Säule mit Dimethylformamid oder einem Gemisch aus Dimethylformamid, Eisessig, Wasser und Äthanol im Verhältnis 5:10:30:20 entfernt werden. Im Eluat werden die Phenole am besten durch die Farbreaktion von *Folin* und *Denis* [23] bestimmt.



[A785.2]

Abb. 2. Trennung von 20 mg Phenol (I) und 40 mg m-Kresol (II) an Polycaprolactam (gefunden: 19,9 mg Phenol und 39,9 mg m-Kresol). Elutionsmittel: Wasser. Säule: 48 cm Länge, 1,3 cm Durchmesser. Ordinate: Extinktion bei 546 mμ nach der Farbreaktion mit Folin-Denis-Reagens. Abszisse: Zahl der Fraktionen zu je 1,45 ml.

In Tabelle 1 sind die R_F -Werte einiger niedriger Phenole zusammengestellt. In der Reihe Phenol, Resorcin, Phloroglucin nimmt die Affinität zum Polycaprolactam zu, dagegen sinkt sie in der Reihe Phenol, Brenzcatechin, Pyrogallol. Hydrochinon verhält sich ähnlich wie Resorcin. Eine zweite oder dritte Hydroxylgruppe am

Tabelle 1. R_F -Werte einiger niedriger Phenole an Polycaprolactam

	Lösungsmittel		
	Wasser	20-proz. Aceton	50-proz. Äthanol
Phenol	0,21	0,39	0,66
o-Kresol	0,24	0,42	0,69
m-Kresol	0,115	0,25	0,61
Brenzcatechin	0,30	0,46	0,62
Resorcin	0,16	0,40	0,58
Hydrochinon	0,18	0,39	0,55
Pyrogallol	0,36	0,53	0,66
Phloroglucin	0,07	0,20	0,49

aromatischen Kern erhöht in m- oder p-Stellung die Haftung am Polyamid, in o-Stellung beschleunigt sie dagegen eher die Wanderung. Im Resorcin und Hydrochinon können offenbar beide Hydroxylgruppen gleichzeitig mit verschiedenen Peptidbindungen des Polyamids in Wechselwirkung treten, so daß die Verbindungen fester als Phenol zurückgehalten werden. Die Hydroxylgruppen des Brenzcatechins müssen dagegen um die gleiche Peptidgruppe konkurrieren. Die zweite Hydroxylgruppe verstärkt die Affinität zum meist wäßrigen Elutionsmittel und erhöht dadurch die Wanderungsgeschwindigkeit. Auch wird man eine teilweise Absättigung durch intramolekulare Wasserstoffbrücken in Betracht ziehen müssen. Hydrophobe Gruppen, besonders größere aromatische Reste, verlangsamen die Wanderung [15]. Mehrkernige Phenole mit vielen Hydroxylgruppen werden vom Polyamid verhältnismäßig stark zurückgehalten, es sei denn, die Hydroxyl-

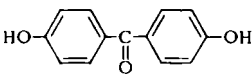
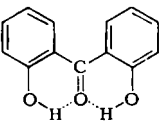
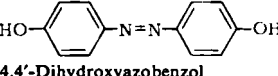
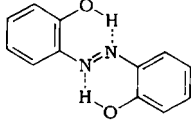
[23] O. Folin u. A. Denis, J. biol. Chemistry 22, 305 (1915).

gruppen sind intramolekular durch Wasserstoffbrücken abgesättigt [15,24,25] (Tabellen 2 und 3). Eigenartigerweise wird Tyrosin von Polycaprolactam nicht zurückgehalten [20]. Dieses anomale Verhalten wird bei zwitterionischen Verbindungen oft beobachtet (siehe unten).

Tabelle 2. Abnahme des R_F -Wertes von Phenolen bei zunehmendem aromatischem Anteil im Molekül. Lösungsmittel: 50-proz. Methanol.

Phenol	0,63	Hydrochinon	0,57
α-Naphthol	0,28	4,4'-Dihydroxydiphenyl	0,15
β-Naphthol	0,28	Resorcin	0,58
2-Hydroxydiphenyl	0,22	2,4-Dihydroxydiphenylmethan	0,16
4-Hydroxydiphenyl	0,21		

Tabelle 3. Beeinflussung der Affinität zum Polyamid durch intramolekulare Wasserstoffbrücken [24].

	R_F -Werte in			
	Methanol/Wasser (1:1)	Aceton/Wasser (1:1)	Methanol	Aceton
 4,4'-Dihydroxybenzophenon	0,16	0,62	0,76	0,78
 2,2'-Dihydroxybenzophenon	0,27	0,77	0,95	0,95
 4,4'-Dihydroxyazobenzol	0,18	0,51	0,72	0,78
 2,2'-Dihydroxyazobenzol	0,23	0,61	0,86	0,88

Bei der Elution beschleunigen Wasser, Methanol, Aceton und Dimethylformamid die Wanderung in zunehmendem Maße, indem sie selbst Wasserstoffbrücken bilden und die Phenole vom Polyamid ablösen. Mit verdünnter Natronlauge werden die Phenole sofort eluiert, da Phenolat-Ionen keine Wasserstoffbrücken mehr zum Polyamid bilden können.

Anwendungsbeispiele

Naturstoffe

Die Chromatographie phenolischer Verbindungen an Polyamid [26] wurde bei der Reindarstellung und Strukturaufklärung von Naturstoffen schon oft angewendet,

[24] H. Endres, Z. analyt. Chem. 181, 331 (1961).

[25] Vgl. dazu ähnliche Ergebnisse an anderen chromatographischen Systemen von H. Hoyer, Chem. Ber. 86, 1016 (1953); 89, 146 (1956); und von A. Kuntzel, H. Rosenbusch u. H. El Sissi, Leder 10, 133 (1959).

[26] DBP. 106383 (27. Apr. 1957), Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, Erf.: W. Grassmann, H. Hörmann u. H. Endres.

z. B. beim Fichtenrindengerbstoff [27,28], bei der Gewinnung von zwei Hydroxystilbenen aus *Eucalyptus wandoo* [29], von Gerbstoffen aus Sumach [30] oder mehreren aromatischen Hydroxycarbonsäuren aus *Acacia arabica* [31].

Das Verhalten vegetabilischer Gerbstoffvorstufen sowie anderer Polyhydroxyphenole gegenüber Polyamid kann man als einen Modellfall für wichtige Vorgänge bei der Gerbung ansehen [15]. Es bestätigt die Anschauung, daß unter anderem Wasserstoffbrücken zwischen phenolischen Hydroxylgruppen und den Peptidbindungen der Haut für die Bindung der Gerbstoffe verantwortlich sind. Die Aufnahme einiger Polyhydroxyphenole durch Polyamid geht z.B. der Gerbwirkung gegenüber Hautsubstanz parallel [15,32,33].

Hörhammer und Wagner [34–36] trennten mehrere pharmakologisch bedeutungsvolle Pflanzenextrakte. Als Beispiel sei die Trennung der Anthoxanthine aus Lindenblüten erwähnt [35], bei der neun Komponenten, meist Glykoside von Quercetin und Kämpferol, in kristalliner Form erhalten wurden. Von anderen Autoren wurden aus Sanddorn [37] und Holunderblütenextrakten [38] einheitliche Verbindungen gewonnen [39]. O. Th. Schmidt [40] trennte die Farbstoffe der roten Rübe, Weinges [41] die Inhaltsstoffe von Crataegusfrüchten präparativ an Polyamid. Als wesentlicher Vorteil der Polyamidchromatographie bei der Reindarstellung all dieser Verbindungen wird die glatte Abtrennung der in den Extrakten enthaltenen Gerbstoffe erwähnt, welche

die Kristallisation bisher so sehr erschwerten [36]. Von technischem Interesse ist die Entfernung von Gerbstoffen bei der Filtration von Bier durch eine Nylonpulverschicht, wodurch das Trübwerden verhindert wird [42].

Mit Erfolg wurde die Polyamidchromatographie von Butenandt et al. [43] für die Trennung von Ommochromen, den tierischen Augenpigmenten mit Phenoxazinskelett, verwendet. Xanthommatin, Rhodommatin und Ommatin D ließen sich an Polycaprolactam (Ultramid BM2 K 228 der BASF) trennen, wobei die zuerst genannte Verbindung mit $1/15$ M Phosphatpuffer, die beiden anderen anschließend mit 1 M bzw. 2 M Pyridin-Essigsäurepuffer von pH = 6,5 und 7,0 eluiert wurden. Die hohe Kapazität des Polycaprolactampulvers gestattet es, bis zu 1 g Roh-Ommatin an einer Säule von 50 cm Länge und 6 cm Durchmesser zu trennen. Brockmann et al. [44] trennten 200 mg eines Gemisches von ϵ -Rhodomycinon und ϵ -Isorhodomycinon an Polyamidsäulen von 60 cm Länge und 4,8 cm Durchmesser mit Methanol/7-proz. wäßrigem Pyridin (2:1) [45].

Auch durch Dünnschicht- und Papierchromatographie an Polyamid wurden phenolische Naturstoffe getrennt. Hörhammer und Mitarbeiter [46] arbeiteten ein Verfahren aus, das sich z. B. zur Unterscheidung einiger Glucosidtypen von Flavonolen eignet [47]. Martin et al. [48] imprägnierten Chromatographiepapier mit einer Lösung von Polyhexamethylen-adipamid (Nylon 66) in Ameisensäure. Sie trennten daran einige niedere Phenole, wobei sie als Entwicklungsgemische 10-proz. wäßrige Essigsäure oder 7-proz. Essigsäure in Cyclohexan verwendeten. Scharfe Flecken erhielten sie nur, wenn das Papier zu mehr als 7% seines Gewichtes, am besten 10–15%, mit Polyamid beladen war [49].

Carbonsäuren

Auch die Carboxylgruppe hat Affinität zum Polycaprolactam [22,50] (Tabelle 4). Sie ist bei Monocarbonsäuren noch wenig ausgeprägt; Dicarbonsäuren und aromatische Carbonsäuren haften dagegen fester, besonders, wenn der aromatische Teil des Moleküls größer ist (z. B. Naphthoesäure [50]). Der Unterschied zwischen Salicylsäure und p-Hydroxybenzoesäure läßt sich zwanglos

[27] W. Grassmann, H. Endres, W. Pauckner u. H. Mathes, Chem. Ber. 90, 1125 (1957); W. Grassmann, H. Endres u. W. Pauckner, Chem. Ber. 91, 134 (1958).

[28] Zur Trennung des Gerbstoffglucosidgemisches siehe H. Endres u. K. Merkle, Chem. Ber. 94, 431 (1961).

[29] D. E. Hathway u. J. W. T. Seakins, Biochem. J. 72, 369 (1959).

[30] R. D. Haworth, Vortrag auf dem Symposium on Current Chemical Research on Plant Phenolics, 22. Apr. 1960, Egham, Surrey (England).

[31] H. Endres u. M. Hilal, Phytochemistry, im Druck.

[32] H. Endres, Leder 12, 294 (1961).

[33] Siehe dazu die Chromatographie homologer Brenzcatechinkondensationsprodukte (Z. Kotásek, J. Strachota, M. Vavrová u. J. Spičková, Chem. Průmysl 10, 321 (1960)) und von aromatischen Synthanen an Polyamid [F. Stather, G. Reich u. S. Wünsch, Gesammelte Abh. dtsh. Lederinst. Freiberg/Sa. 15, 111 (1959)].

[34] L. Hörhammer, H. Wagner u. W. Leeb, Naturwissenschaften 44, 513 (1957); L. Hörhammer, H. Wagner u. H. J. Lene, Dtsch. Apotheker-Ztg. 99, 1043 (1959); L. Hörhammer, H. Wagner u. H. Grasmaier, Naturwissenschaften 45, 388 (1958); L. Hörhammer, H. Wagner, J. Izquierdo-Sorli u. H. Endres, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 291/63, 269 (1958); L. Hörhammer, H. Wagner u. O. Föcking, Pharmaz. Ztg. 104, 1183 (1959).

[35] L. Hörhammer, L. Stich u. H. Wagner, Naturwissenschaften 46, 358 (1959).

[36] Zusammenfassung der an Polyamid von L. Hörhammer et al. durchgeführten Trennungen siehe L. Hörhammer u. H. Wagner, Pharmaz. Ztg. 104, 783 (1959).

[37] J. Vrkoc, V. Herout u. F. Sorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. 24, 3938 (1958).

[38] J. Davidek, Nature (London) 189, 487 (1961); Nahrung 4, 660 (1960); Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 113, 272 (1960).

[39] Zur Chromatographie von Chalkonen u. Flavonon siehe R. Neu, Nature (London) 182, 660 (1958); Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 293, 169 (1959).

[40] O. Th. Schmidt u. W. Schönleben, Z. Naturforsch. 12b, 262 (1957); O. Th. Schmidt, P. Becher u. M. Hübner, Chem. Ber. 93, 1296 (1960); vgl. auch R. G. Petersen u. M. A. Joslyn, Food Res. 25, 429 (1960).

[41] K. Weinges, Chem. Ber. 94, 3032 (1961).

[42] G. Harris u. R. W. Ricketts, J. Inst. Brewing 1959, 41; 1960, 313.

[43] A. Butenandt, E. Biekert, H. Kübler u. B. Linzen, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 319, 238 (1960).

[44] H. Brockmann u. H. Brockmann jr., Chem. Ber. 94, 2681 (1961).

[45] Bezüglich der Chromatographie anderer phenolische Hydroxylgruppen tragender Antibiotika an Polyamid siehe DBP. 1116866 (8. Okt. 1960), Firma VEB Arzneimittelwerk, Dresden, Erf.: H. Tönjes u. H. Pötter.

[46] L. Hörhammer, H. Wagner u. W. Leeb, Dissertation W. Leeb, Univers. München 1959.

[47] K. Egger, Z. analyt. Chem. 182, 161 (1961).

[48] W. N. Martin u. R. M. Husband, Analytic. Chem. 33, 840 (1961).

[49] Siehe dazu die Trennung von Furochromen durch H. Friedrich u. C. Horstmann, Pharmazie 16, 319 (1961).

[50] H. Endres, W. Grassmann u. M. Oppelt, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 317, 21 (1959).

Tabelle 4. R_F -Werte einiger Carbonsäuren und Sulfonsäuren an Polycaprolactam [51].

	Elutionsmittel		
	Wasser	50-proz. Methanol	50-proz. Aceton
Propionsäure	1,00	1,00	—
Buttersäure	0,95	1,00	—
Capronsäure	0,92	0,96	—
Bernsteinsäure	0,86	1,00	0,96
Glutarsäure	0,71	0,88	0,74
Adipinsäure	0,67	0,83	0,69
Phenyllessigsäure	—	0,67	0,71
Benzoessäure	—	0,56	0,65
α -Naphthoesäure	—	0,27	0,32
Salicylsäure	—	0,60	0,58
p-Hydroxybenzoessäure	—	0,34	0,44
Benzolsulfonsäure	0,35	0,43	—
p-Toluolsulfonsäure	0,20	0,48	—
Naphthalin- β -sulfonsäure	0,08	0,15	—
Benzolsulfonamid	—	0,82	—
4-Sulfonamido-2',4'-diamino-azobenzol (Prontosil rubrum)	—	0,18	0,67

durch die Abschirmung der o-ständigen Hydroxylgruppe durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke erklären. Auch aromatische Sulfonsäuren und ihre Amide werden von Polyamid zurückgehalten.

Aromatische Nitroverbindungen

Starke Haftfestigkeit an Polyamid findet man bei zahlreichen aromatischen Nitroverbindungen [50]; besonders die höher nitrierten Derivate werden sehr fest gebunden. Sie können zwar mit stark wirksamen Elutionsmitteln wie Formamid, Dimethylformamid oder Pyridin eluiert werden, doch wandern sie dann in breiten verwaschenen Zonen. Scharfe Fraktionen erhält man dagegen, wenn man Gemische von Dimethylformamid, Eisessig, Wasser und Äthanol zur Elution verwendet [51,52].

Die Haftfestigkeit aromatischer Nitroverbindungen nimmt in der Reihe Nitrobenzol < 1.3-Dinitrobenzol < sym. Trinitrobenzol zu. Substituenten mit Elektronenpaar in p-Stellung zur Nitrogruppe schwächen die Affinität (Tabelle 5). Ausnahmen sind dann zu verzeichnen, wenn der Substituent sich nicht coplanar zum aromatischen Kern einstellen kann wie im 2.4-Dinitro-N,N-dimethylanilin [53], oder wenn er zusätzliche Affinitäten zum Polyamid beisteuert, etwa durch die Bildung von Wasserstoffbrücken (2.4-Dinitrophenol, 2.4-Dinitranilin) [52]. Die NH-Gruppen vom 2.4-Dinitro-N-methylanilin und 2.4-Dinitroacetanilid können schon aus sterischen Gründen nur intramolekulare H-Brücken zur o-Nitrogruppe bilden und sich nicht an einer Bindung an das Polyamid beteiligen [53]. Trinitrobenzol und andere höher nitrierte Aromaten haften an Polyamid außerordentlich fest und benötigen zur sauberen Elution komplizierte Lösungsmittelgemische [52] (Tabelle 5).

[51] H. Hörmann u. H.v. Portatius, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 315, 141 (1959).

[52] W. Grassmann, H. Hörmann u. H.v. Portatius, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 321, 120 (1960).

Tabelle 5. R_F -Werte einiger Nitroverbindungen an Polycaprolactam [52]

Dimethylformamid/Eisessig/Wasser/Äthanol (5:10:30:20)

Nitrobenzol	0,69
1.2-Dinitrobenzol	0,92
1.3-Dinitrobenzol	0,60
3-Nitro-N-dimethylanilin	0,80
4-Nitro-N-dimethylanilin	0,80
2.4-Dinitro-N-dimethylanilin	0,63
2.4-Dinitrothioanisol	0,92
2.4-Dinitro-N-methylanilin	0,92
2.4-Dinitroacetanilid	0,71
2.4-Dinitroanilin	0,43
2.4-Dinitrophenyl	0,42

Polyäthylenglykol/Formamid/Ameisensäure/Dimethylformamid/Eisessig/Wasser/Äthanol (40:20:15:30:50:35:50)

3.5-Dinitrosalicylsäure	0,56	Pikrolonsäure	0,39
Pikrinsäure	0,55	sym. Trinitrobenzol	0,39
Martiusgelb	0,48	Flaviansäure	0,21
Styphninsäure	0,46	® Amidoschwarz 10 B	0,00

2.4-Dinitrophenylaminosäuren, welche bei der Bestimmung der Aminoendgruppen von Peptiden und Proteinen mit Dinitrofluorbenzol [54] entstehen, können an polyamidgefüllten Säulen getrennt werden. Steuerle und Hille [55] verwenden als Säulenfüllung Nylonpulver, das sie durch Umfällen vom Monomeren befreien, und entwickeln mit $1/15$ M Phosphatpuffer (pH = 6,8). Die Säulen werden zur Erhöhung der Trennleistung auf 60 °C erwärmt. Hörmann und v. Portatius [51,52] arbeiteten bei Zimmertemperatur mit salzfreien Lösungsmittelgemischen aus Dimethylformamid, Eisessig, Wasser und Äthanol. R_F -Werte und Elutionsgemische sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Starke Unterschiede in der Haftfestigkeit ergeben sich zwischen Mono- und Bis-dinitrophenyl-aminosäuren. Letztere werden erheblich

Tabelle 6. R_F -Werte von DNP-Aminosäuren und DNP-Peptiden an Polycaprolactam [52].

Dimethylformamid/Eisessig/Wasser/Äthanol (5:10:30:20)

N(ε)-DNP-Lysin	0,92	DNP-Isoleucin	0,30
N(α)-DNP-Arginin	0,86	DNP-Glutaminsäure	0,27
DNP-Prolin	0,57	DNP-Phenylalanin	0,26
DNP-Threonin	0,40	DNP-Methionin	0,25
DNP-Valin	0,33	DNP-Asparaginsäure	0,24
DNP-Leucin	0,32	DNP-Glycin	0,23
DNP-Serin	0,32	DNP-Tryptophan	0,15
DNP-Alanin	0,31		

Dimethylformamid/Eisessig/Wasser/Äthanol (8:15:25:20)

N(α).N(Im)-Bis-DNP-Histidin	0,53
O.N-Bis-DNP-Tyrosin	0,48
N(α).N(δ)-Bis-DNP-Ornithin	0,21
N(α).N(ε)-Bis-DNP-Lysin	0,18

schwerer eluiert und erfordern die Anwendung eines stärker wirksamen Lösungsmittelgemisches als die Mono-DNP-Derivate [*]. Zwitterionische DNP-Aminosäuren wie DNP-Arginin oder ε-DNP-Lysin werden von Polycaprolactam eigenartigerweise nicht zurückgehalten (vgl. dazu das oben beschriebene Verhalten von Tyrosin).

[53] Vgl. dazu H. Hörmann u. H. Endres, Z. Naturforsch. 10b, 150 (1955); B. Franck, H. Hörmann u. S. Scheibe, Chem. Ber. 90, 330 (1957).

[54] F. Sanger, Biochem. J. 39, 507 (1945).

[55] H. Steuerle u. H. Hille, Biochem. Z. 331, 220 (1959).

[*] DNP = Dinitrophenyl.

Aufschluß über die Art der Affinitätskräfte zwischen aromatischen Nitroverbindungen und Polyamid gaben die Sorptionsisothermen in mehreren Lösungsmitteln [52]. Zwischen dem Lösungsmittelgemisch Dimethylformamid/Eisessig/Wasser/Äthanol (5:10:30:20) und Polycaprolactam verteilt sich DNP-Glycin über einen weiten Konzentrationsbereich entsprechend einem Kurvenzug, der einer Geraden nahekommt (Abb. 3, Kurve I). Man findet also wieder eine Verteilungsfunktion, die für chromatographische Trennungen optimale Verhältnisse anzeigt. Bei Verwendung von Äthanol als Lösungsmittel erhält man dagegen eine stark gekrümmte Sorptionsisotherme, deren aufsteigender Ast auf eine starke Affinität zwischen DNP-Glycin und Polycaprolactam hinweist (Abb. 3, Kurve II). Bald wird jedoch ein Sättigungswert erreicht. Die bis zur Sättigung aufgenommene Menge an DNP-Glycin (23,2 μ Mol/g Polycaprolactam) ist dem Ge-

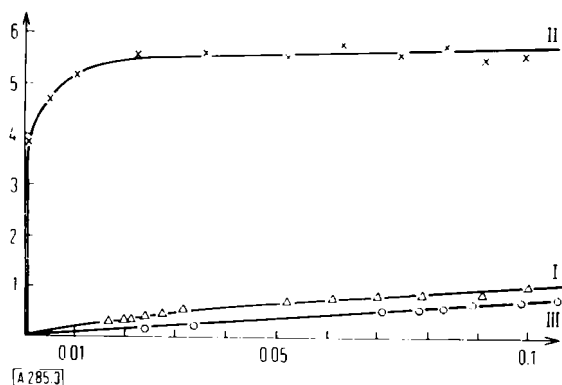


Abb. 3. Sorptionsisothermen von DNP-Glycin an Polycaprolactam und acetyliertem Polycaprolactam [52].

I. Polycaprolactam; Lösungsmittel:
Dimethylformamid/Eisessig/Wasser/Äthanol (5:10:30:20).

II. Polycaprolactam; Lösungsmittel: Äthanol.

III. Acetyliertes Polycaprolactam; Lösungsmittel: Äthanol.
Ordinate: Konzentration von DNP-Glycin in der festen Phase [mg/g].
Abszisse: Konzentration von DNP-Glycin in Lösung [mg/ml].

halt des Polymeren an freien Aminoendgruppen äquivalent. Die Vermutung, daß die freien Aminogruppen die Haftstellen für die Nitroverbindungen bilden, wird durch die Sorptionsisotherme von DNP-Glycin an acetyliertem Polycaprolactam bestätigt (Abb. 3, Kurve III). Aus alkoholischer Lösung wird DNP-Glycin nur noch schwach aufgenommen.

Sym. Trinitrobenzol wird von acetyliertem Polycaprolactam nicht mehr festgehalten. Auch einige DNP-Aminosäuren wandern an acetyliertem Polyamid erheblich schneller als an freiem [56]. Dagegen findet man die Wanderung der Phenole nach dem Acetylieren des Polycaprolactams nicht beeinträchtigt, wie man auf Grund der eingangs entwickelten Vorstellung von Affinitätskräften zwischen phenolischen Hydroxylgruppen und Peptidbindungen erwartet (Tabelle 7).

Die Tatsache, daß aromatische Nitroverbindungen mit Aminen zur Bildung von Molekülverbindungen neigen, ist bereits seit langem bekannt [57]. In einigen Fällen sind auch Assoziationskonstanten bestimmt worden [58]. Nach Vorstellungen von Weiss [59] und von Mulliken [60] findet ein Elektro-

[56] H. v. Portatius, Dissertation, Universität München, 1960.

[57] P. Hepp, Liebigs Ann. Chem. 215, 345 (1882); J. Meisenheimer, ibid. 323, 219 (1902); G. Briegleb u. G. Angerer, Angew. Chem. 64, 685 (1952); Naturwissenschaften 40, 107 (1953); D. E.

Tabelle 7. Vergleich der R_F -Werte von Nitroverbindungen und Phenolen an unbehandeltem und acetyliertem Polycaprolactam

Substanz	Elutionsmittel	R_F -Wert an	
		Polycaprolactam	Acetylpoly-caprolactam
s-Trinitrobenzol	Alkohol	0,00	0,81
O.N-Bis-DNP-tyrosin	Dimethylformamid/Eisessig/Wasser/Äthanol (5:10:30:20)	0,01	0,20
Pikrinsäure	Wasser	0,012	0,015 [*]
Styphninsäure	20-proz. Aceton	0,008 [**]	0,085 [**]
Phenol	50-proz. Methanol	0,20	0,20
Phloroglucin	50-proz. Methanol	0,20	0,22
2,4-Dihydroxybenzophenon	50-proz. Methanol	0,20	0,22
4,4'-Dihydroxystilben	50-proz. Methanol	0,20	0,19
4,4'-Dihydroxybenzophenon	50-proz. Methanol	0,17	0,22
Dihydroxycetanoll	50-proz. Methanol	0,11	0,10

[*] Starke Schwanzbildung. [**] Breite verwaschene Zone.

nenübergang vom Amin zur Nitroverbindung in der Art einer Säure-Basenreaktion statt. Die Bildung dieser Ladungsaustauschkomplexe ist mit einer Farbänderung verbunden und kann colorimetrisch verfolgt werden [61].

Die Anlagerung von Nitroverbindungen an Polyamid entspricht somit der Reaktion einer Lewis-Säure mit einer Base; deshalb können die Trennungen von Nitroverbindungen an Polycaprolactamsäulen als Ionenaustausch aufgefaßt werden. Eine Elution in scharfen Banden ist daher nur durch Lösungsmittel mit Puffereigenschaften möglich [52].

Chinone

Die Sorptionsisothermen an acetyliertem und freiem Polycaprolactam gaben auch eine Erklärung für das eigenartige Verhalten, welches Chinone bei der Chromatographie an Polyamid zeigen [24]. p-Benzochinon wandert mit Wasser oder wäßrigem Methanol sehr

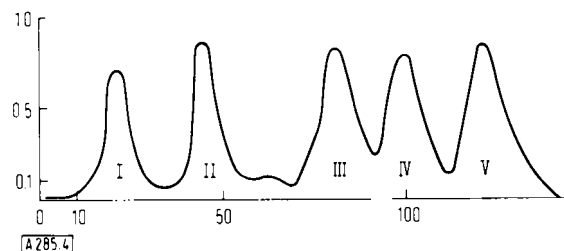


Abb. 4. Trennung von p-Benzochinon (I), 2-Hydroxy-5.6.7.8-tetrahydro-1.4-naphthochinon (II), 2,2'-Dihydroxyazobenzol (III), 2,4'-Dihydroxybenzophenon (IV) und 2,2'-Dihydroxy-5,5'-dimethyldiphenylmethan (V) an einer mit acetyliertem Polyamid gefüllten Säule [24]. Lösungsmittel: Methanol/Wasser (1:1).

Ordinate: Extinktion bei 546 m μ nach der Farbreaktion mit Folin-Denis-Reagens.

Abszisse: ml Eluat.

Laskowski u. W. C. McCrone, Analytic. Chem. 26, 1497 (1954); R. E. Miller u. W. F. K. Wynne-Jones, J. chem. Soc. (London) 1959, 2375; Nature (London) 186, 149 (1960).

[58] B. Dale, R. Foster u. D. L. Hammick, J. chem. Soc. (London) 1954, 3986.

[59] J. Weiss, J. chem. Soc. (London) 1942, 245.

[60] R. S. Mulliken, J. physic. Chem. 56, 801 (1952); J. Amer. chem. Soc. 74, 811 (1952).

[61] Zur Titration aromatischer Nitroverbindungen mit Aminen siehe H. Brockmann u. E. Meyer, Naturwissenschaften 40, 242 (1953); Chem. Ber. 87, 81 (1954); J. S. Fritz, A. J. Moye u. M. J. Richard, Analytic. Chem. 29, 1685 (1957).

rasch. Unterbricht man dagegen die Elution für einige Zeit, dann kann es auch mit stärker wirksamen Lösungsmitteln nicht mehr eluiert werden, sondern haftet irreversibel. Dieser Vorgang ist mit einer Farbänderung verbunden. Die Sorptionsisotherme von Benzochinon an Polycaprolactam läßt eine Sättigung des Polyamids

bei Reaktion von einem Mol Benzochinon mit zwei Mol freier Aminogruppen erkennen. An acetyliertem Polycaprolactam ist z. B. eine saubere Trennung von fünf chinoiden und phenolischen Substanzen erreicht worden [24] (Abb. 4).

Eingegangen am 27. September 1962 [A 285]

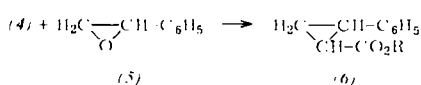
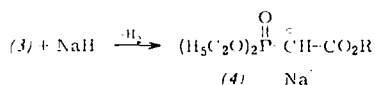
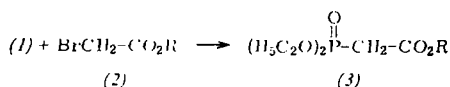
ZUSCHRIFTEN

Partiell asymmetrische Synthese der 2-Phenyl-cyclopropan-carbonsäure

Von Dipl.-Chem. István Tömösközi

Forschungslaboratorium für Stereochemie der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest (Ungarn)

Phosphor-ylene, Phosphonat-carbanionen und Phosphin-oxyl-carbanionen geben mit Epoxyden trans-Cyclopropan-Derivate neben Phosphinoxyden, Phosphat bzw. Phosphinat. Nach Wittig [1] ist der Reaktionsmechanismus ähnlich wie bei der Umsetzung von (-)-Menthoxycarbonylmethylphosphonsäure-diäthylester (3a) mit 4-Alkylcyclohexanon [2]. Zur Darstellung von Cyclopropan-Derivaten sind die Phosphonat-carbanionen am besten geeignet. Alkylphosphonsäure-ester mit einer elektronenanziehenden Gruppe (z. B. COOR) in α -Stellung können mit Alkoxyden oder Natriumhydrid leicht metalliert werden. (3a) und (-)-2-Octyl-oxycarbonylmethylphosphonsäure-diäthylester (3b) wurden in guter Ausbeute aus Triäthylphosphit (1) und den Bromessigestern (2a) bzw. (2b) hergestellt; ihre saure Hydrolyse lieferte die gleiche Phosphonoessigsäure ((3c), $C_2H_5=H$).



(a), R = (-)-Menthyl; (b), R = (-)-2-Octyl; (c), R = H.

(3a) und (3b) geben mit NaH in 1,2-Dimethoxyäthan die Carbanionen (4a) bzw. (4b). Sie liefern mit Styroloxyl (5) (4 h, 70°C) die Cyclopropan-Derivate (6a) bzw. (6b) mit 40–42% Ausbeute. Alkalische Verseifung führte in beiden Fällen zum (+) (6c).

Reaktion	(6c) [α] _D	optische Reinheit [3] [%]
(4a) + (5)	+ 16,5° + 17,5°	6,1 6,5
(4b) + (5)	+ 12,0° + 15,2°	4,45 5,07

Die (6a) und (6b) enthaltenden Reaktionsgemische wurden sogleich alkalisch verseift. Die Säuren (6c) zeigten fast die gleichen [α]_D-Werte wie die Säuren aus gereinigten Estern. Authentischer (\pm)trans-2-Phenyl-cyclopropan-carbonsäure-(-)-menthylester oder -(-)-2-octylester ist durch Acylierung von (-)-Menthol bzw. (-)-2-Octanol mit (\pm)trans-2-Phenyl-cyclopropan-carbonsäure-chlorid [4] in siedendem $CHCl_3$

leicht zugänglich. Alkalische Verseifung ergab optisch inaktives (6c). Somit kann eine partielle Verseifung, die für die Rotation verantwortlich wäre, ausgeschlossen werden (vgl. hierzu auch [3]).

Eingegangen am 28. Januar 1963 [Z 442]

[1] G. Wittig, W. Böll u. K.-H. Krück, Chem. Ber. 95, 2514 (1962).

[2] I. Tömösközi u. G. Jancsó, Chem. and Ind. 1961, 2085.

[3] I. Tömösközi, J. org. Chemistry, im Druck.

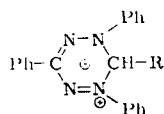
[4] R. S. Ratney u. J. English, jr., J. org. Chemistry 25, 2213 (1960).

Über auffallend stabile N-haltige Radikale

Von Prof. Dr. Richard Kuhn und H. Trischmann

Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg
Institut für Chemie

Durch Methylierung und gleichzeitige bzw. anschließende Dehydrierung (z. B. mit Luftsauerstoff) haben wir aus dem roten Triphenylformazan ein tief grünes paramagnetisches Radikal $C_{20}H_{17}N_4$ ((1), Ausb. 80%) erhalten, das metallisch glänzende, nahezu schwarze Prismen bildet. Das ESR-Spektrum (K. H. Hauser) zeigt neun Linien, wie es der Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit vier nahezu gleichwertigen N-Atomen entspricht. Mit Benzylbromid bzw. p-Brom-benzylbromid wurden (2) bzw. (3) erhalten (Ph = Phenyl):

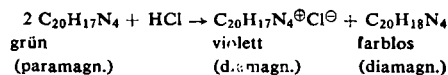


(1) (R = H): Fp = 142–143 °C

(2) (R = Phenyl): Fp = 180–181 °C

(3) (R = p-Brom-phenyl): Fp = 198–199 °C

Während vergleichbare cyclische Radikale schon durch Luft oder verd. Essigsäure in der Kälte zersetzt werden [1], kann (1) mit Mineralsäuren behandelt, mit Eisessig oder konz. Methylat-Lösung lange gekocht werden, ohne sich zu zersetzen. Mit H^+ erhält man die violetten Kationen ((1) ohne \ominus), die diamagnetisch sind:



Da die Leukoverbindung $C_{20}H_{18}N_4$ autoxydabel ist, steigt nach Ansäuern einer grünen Lösung des Radikals die Absorptionsbande der violetten Lösung bei Zutritt von Luft auf den doppelten Betrag an. Sofort und quantitativ entstehen die kristallisierenden violetten Salze, wenn man z. B. die grüne Lösung von (1) in Benzol mit Brom oder Jod versetzt.

Mit Valenzstrichen und der Oktett-Regel läßt sich, obwohl man verschiedene mesomere Formen schreiben kann, die hohe Stabilität und Bildungsfreudigkeit der grünen Radikale (Verdazyle) kaum erklären, da in jedem Fall die CH_2 -Gruppe von (1) eine „Unterbrechung der Konjugation“ be-