

212. El Sayed Amin und Erich Hecker: Charakterisierung von Fettsäuren durch ihre *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylester und deren chromatographische Trennung

[Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie und dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen]

(Eingegangen am 6. März 1956)

Die Darstellung des *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylbromids und seine Anwendung zur Charakterisierung von Fettsäuren in Form ihrer *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylester wird beschrieben. Die Ester zeichnen sich durch hohen Schmelzpunkt, gute Kristallisationsfähigkeit und intensive Eigenfarbe aus. Sie können durch Verteilungschromatographie getrennt werden. Geeignete Systeme werden angegeben.

Zur Charakterisierung von Fettsäuren werden häufig ihre Ester mit Phenacyl-alkoholen herangezogen. Gebräuchlich waren bisher insbesondere die Ester mit Phenacyl-, *p*-Halogen-phenacyl- und *p*-Phenyl-phenacyl-alkohol¹⁾. Sie sind alle farblos und schmelzen verhältnismäßig niedrig. Diese Eigenschaften schränken die Verwendung der Ester zur Isolierung und Charakterisierung von Fettsäuren ein. Es sind deshalb in neuerer Zeit Phenacylester mit günstigeren Eigenschaften gesucht worden^{2,3)}. Den vergleichsweise hochschmelzenden *p*-[4-Nitro-phenyl]-phenacylestern²⁾ mangelt jedoch die Eigenfarbe und den farbigen *p*-Phenyl-azo-phenacylestern^{3,4)} der hohe Schmelzpunkt. Ausgehend von den günstigen Erfahrungen mit dem 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-Rest bei der Charakterisierung und Isolierung von Alkoholen^{5,6)}, haben wir das *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylbromid (III) dargestellt, das mit Fettsäuren gut kristallisierende und hochschmelzende Ester mit intensiver Eigenfarbe bildet.

p-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylbromid (III) kann durch Bromieren von *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-acetophenon (I) in ω -Stellung in ähnlicher Weise gewonnen werden, wie das *p*-Phenyl-azo-phenacylbromid^{3,4)}. Die Darstellung des Ketons (I) gelingt in guter Ausbeute durch Kondensation von *p*-Aminoacetophenon mit 4-Nitro-nitrosobenzol in Eisessig. Begrenzende Faktoren dieses Synthesewegs hinsichtlich der Gesamtausbeute an Bromid (III) ist die verhältnismäßig mühsame Bereitung des 4-Nitro-nitrosobenzols⁵⁾.

Leichter zugänglich ist das *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylbromid (III), wenn man aus 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid mittels Diazomethans das Diazoketon (II) herstellt und dieses mit HBr zerlegt. Das 4'-

¹⁾ R. L. Shriner u. R. C. Fuson, Identification of Organic Compounds, 3. Aufl., Wiley Sons Inc., New York 1948. ²⁾ P. Clarke, Chem. and Ind. 1952, 450.

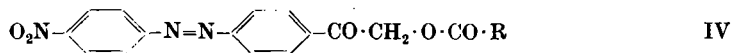
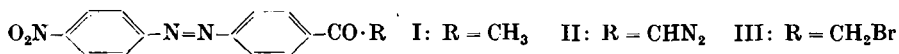
³⁾ S. Masuyama, J. chem. Soc. Japan, pure Chem. Sect. [Nippon Kagaku Zassi] 71, 402 [1950]; C. A. 45, 6400i [1951].

⁴⁾ N. Sugiyama, R. Harada, T. Mita u. T. Ueno, J. chem. Soc. Japan, pure Chem. Sect. [Nippon Kagaku Zassi] 72, 152 [1951]; C. A. 46, 3448a [1952].

⁵⁾ E. Hecker, Chem. Ber. 88, 1666 [1955].

⁶⁾ A. Butenandt, Naturwiss. Rdsch. 8, 457 [1955]; H. Rembold, Dissertat. Tübingen 1956.

Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid kann aus rohem 4-Nitroso-benzoesäure-äthylester und 4-Nitranilin auch in größeren Mengen hergestellt werden⁵⁾.



Durch Umsetzen des *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylbromids mit den Nalzen von Fettsäuren in einem Dioxan-Tetrahydrofuran-Gemisch oder in Äthanol werden die intensiv roten *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylester (IV) der Fettsäuren erhalten. Sie lassen sich durch Umkristallisieren aus Benzol, Alkohol oder Aceton reinigen. Die Schmelzpunkte und Extinktionen der dargestellten Ester zeigt Tafel 2 (Versuchsteil).

Es liegt nahe, zur Gewinnung der Derivate (IV) das Diazoketon (II) mit den freien Säuren umzusetzen. Das Diazoketon ist jedoch recht reaktionsträge und liefert beim Kochen mit Carbonsäuren mit und ohne Lösungsmittel Reaktionsprodukte, aus denen sich die reinen Ester (IV) nur in schlechten Ausbeuten gewinnen lassen. Das Diazoketon kann auf Aluminiumoxyd chromatographiert und aus Methylenchlorid-Benzol umkristallisiert werden.

Die Schmelzpunkte der *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylester (Tafel 2) liegen verhältnismäßig hoch. Bei den Derivaten der unverzweigten, homologen Fettsäuren können hinsichtlich der Schmelzpunkte zwei Gruppen unterschieden werden. Die Derivate der Säuren bis C₅ schmelzen um 150°, diejenigen der Säuren bis C₁₈ um 130°. Ein gewisser Mangel ist, daß sich die Schmelzpunkte der Derivate verschiedener Säuren innerhalb einer Gruppe nicht sehr stark unterscheiden. Auch die Misch-Schmelzpunkte dieser Derivate sind nur um wenige Grad erniedrigt, doch scheint dies ebenso wie die geringen Schmelzpunktunterschiede eine Eigenschaft zu sein, die Phenacylestern allgemein zukommt⁷⁾. Unsere Derivate lassen sich trotzdem identifizieren, und zwar entweder auf spektroskopischem Weg durch Messung des Äquivalentgewichts oder chromatographisch durch Messung und Vergleich der Retentionsvolumina. Die Extinktionen der Ester liegen mit einem Mittelwert von $\epsilon = 32130$ und einem mittleren Fehler der Einzelmessung von ± 817 Einheiten durchschnittlich etwas höher als die Extinktionen der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester von Alkoholen⁸⁾.

Interessant ist der nicht unerhebliche Unterschied zwischen einigen physikalischen Eigenschaften der *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylester von Fettsäuren und der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester von Alkoholen mit gleichem aliphatischem Rest R. Die Schmelzpunkte der Derivate der Fettsäuren liegen um 10–20° höher, ihre Löslichkeit in Kohlenwasserstoffen ist kleiner, und ihre Verteilungskoeffizienten liegen niedriger.

Die Trennung der Säurederivate durch Verteilungschromatographie wurde in verschiedenen Lösungsmittelsystemen (Tafel 1) untersucht. Unter Anwendung der im wesentlichen bereits früher beschriebenen Technik⁸⁾ diente Kieselsäure als Träger für die stationäre Phase. Durch Adsorptionschromatographie

⁷⁾ K. S. Markley, *Fatty acids*, Interscience Publishers Inc., New York 1947. S. 625.

⁸⁾ El Sayed Amin u. E. Hecker, *Chem. Ber.* 89, 695 [1956].

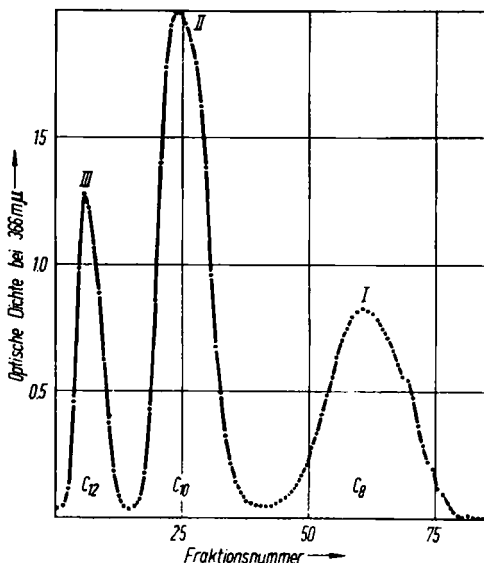
an neutralem Aluminiumoxyd verschiedener Aktivitätsstufen konnten – besonders bei Mischungen der Ester höherer Fettsäuren – keine befriedigenden Trenneffekte erzielt werden (vergl. dazu auch l. c.^{3,9)}.

Tafel 1. Lösungsmittelsysteme zur Verteilungschromatographie

System Nr.	Zusammensetzung ^{*)}
1	Cyclohexan (200), Di- <i>n</i> -butyl-äther (20), Nitromethan (40)
2	Cyclohexan (150), Nitromethan (30)
3	Cyclohexan (150), Dimethylformamid (30)
4	Cyclohexan (150), Dimethylformamid (30), Nitromethan (10)
5	Octan (150), Dimethylformamid (30), Nitromethan (10)
6	Decan (150), Dimethylformamid (30), Nitromethan (10)

^{*)} Die Zahlenangaben bedeuten „Volumina reiner Lösungsmittel“.

Die *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacyl-ester von Fettsäuren mittlerer Kettenlänge lassen sich in System 1 (Tafel 1) quantitativ trennen, wenn sie sich um 2 oder mehr CH₂-Gruppen unterscheiden (Abbild. 1). Die systematische

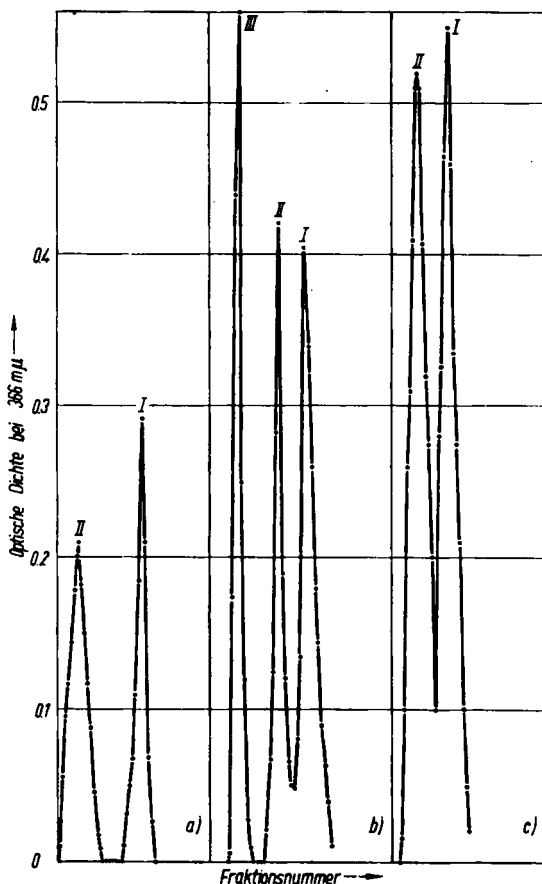


Abbild. 1. Trennung der Ester der Capryl-(1.2 mg, I), Caprin-(1.8 mg, II) und der Laurinsäure (0.6 mg, III) in System 1 (Tafel 1) auf einer Säule aus 10 g Kieselgur (7.5 cm Höhe, 2 cm Durchm.). Volumen der Fraktionen 2 ccm

Untersuchung der Trennwirkung der Systeme 2–6 (Tafel 2) mit einem Testgemisch aus je 1 mg Capron-, Capryl- und Laurinsäureester zeigt, daß System 6 am wirksamsten ist. Der Trenneffekt nimmt mit steigendem Mol.-Gewicht der mobilen Phase zu. Beispiele für Trennung einiger Estergemische in System 6 findet man in Abbild. 2, a–c.

Herrn Prof. Butenandt danken wir herzlich für das fördernde Interesse an dieser Arbeit, sowie für finanzielle Unterstützung des einen (El S. A.) von uns.

⁹⁾ R. M. Ikeda, A. D. Webb u. R. E. Kepner, *Analytic. Chem.* **26**, 1223 [1954].



Abbild. 2. Trennung von Gemischen aus je 1 mg Ester in System 6 (Tafel 1) auf einer Säule aus 10 g Kieselgur (8.3 cm Höhe, 2 cm Durchm.). Volumen der Fraktionen 20 ccm. a) Buttersäure-(I) und Caprylsäure-ester (II); b) Capronsäure-(I), Caprylsäure-(II) und Laurinsäure-ester (III); c) Myristinsäure-(I) und Stearinsäure-ester (II)

Beschreibung der Versuche

Sämtliche Schmelzpunkte sind unter dem Kofler-Heizmikroskop bestimmt. Die Mikroanalysen wurden von Dr. A. Schoeller, Kronach/Oberfranken, und von A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr, ausgeführt. Als Aluminiumoxyd wurde stets „Woelm neutral“ verwendet, alle Aktivitätsangaben nach H. Brockmann und H. Schodder¹⁰⁾.

p-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylbromid (III) aus *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-acetophenon (I)

p-[4-Nitro-phenyl-azo]-acetophenon (I): 15.2 g 4-Nitro-nitrosobenzol¹⁰⁾ und 13.5 g 4-Amino-acetophenon werden in getrennten Gefäßen in jeweils der 10-fachen Menge Eisessig auf 60° erwärmt. Beim Vereinigen der Lösungen tritt Dunkelfärbung ein und *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-acetophenon scheidet sich ab. Das Reaktionsgemisch wird noch 3 Stdn. auf 60° gehalten und dann aufgearbeitet. Aus der

¹⁰⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 73 [1941].

Tafel 2. Schmelzpunkte, Extinktionen und Analysen einiger *p*-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacyl-ester
Die Schmp. wurden unter dem Kofler-Heizmikroskop, die Extinktionen in alkoholischer Lösung im Beckman-Quarzspektrophotometer, Modell DU, gemessen*)

Ester von	Schmp. °C	ϵ	Bruttoformel	Mol.-Gew.	Analyse
Essigsäure	182	31700	$C_{10}H_{13}O_3N_3$	327.3	Ber. C 58.71 H 4.00 N 12.84 Gef. C 58.74 H 4.09 N 13.18
Propionsäure	158	31150	$C_{17}H_{19}O_3N_3$	341.3	Ber. C 59.82 H 4.43 N 12.31 Gef. C 59.73 H 4.45 N 12.25
Buttersäure	154	32200	$C_{18}H_{19}O_3N_3$	355.3	Ber. C 60.84 H 4.32 N 11.82 Gef. C 61.08 H 4.97 N 11.86
Isobuttersäure	164–166	33200	$C_{18}H_{19}O_3N_3$	355.3	nicht analysiert
Valeriansäure	158	31400	$C_{19}H_{21}O_3N_3$	369.4	Ber. C 61.78 H 5.18 N 11.38 Gef. C 61.95 H 5.30 N 11.24
Isovaleriansäure	158–160	33000	$C_{19}H_{21}O_3N_3$	369.4	nicht analysiert
Capronsäure	135	33000	$C_{20}H_{21}O_3N_3$	383.4	Ber. C 62.65 H 5.52 Gef. C 62.70 H 5.43
Önanthensäure	134	32800	$C_{21}H_{23}O_3N_3$	397.4	Ber. C 63.46 H 5.83 N 10.57 Gef. C 63.38 H 5.87 N 10.83
Caprylsäure	134	32400	$C_{22}H_{25}O_3N_3$	411.4	Ber. C 64.22 H 6.13 Gef. C 64.20 H 6.26
Pelargonsäure	134	33200	$C_{23}H_{27}O_3N_3$	425.5	Ber. C 64.91 H 6.40 Gef. C 65.26 H 6.58
Caprinsäure	134	32600	$C_{24}H_{29}O_3N_3$	439.5	Ber. C 65.57 H 6.65 Gef. C 65.45 H 6.86
Laurinsäure	133	32900	$C_{26}H_{33}O_3N_3$	467.5	Ber. C 66.79 H 7.11 N 8.98 Gef. C 66.87 H 7.08 N 9.01

*) Frl. G. Schild haben wir für die Ausführung der Messungen zu danken.

Myristinsäure	132	30900	$C_{28}H_{47}O_9N_3$	495.6	Ber. C 67.85 H 7.53 N 8.48 Gef. C 67.98 H 7.65 N 8.69
Palmitinsäure	132	32400	$C_{30}H_{49}O_9N_3$	523.7	Ber. C 68.80 H 7.89 N 8.02 Gef. C 68.90 H 7.90 N 8.06
Stearinsäure	132	31200	$C_{32}H_{45}O_9N_3$	551.7	Ber. C 69.65 H 8.22 Gef. C 69.38 H 7.93
2,3-Dimethyl-butan- carbonsäure-(2)	140	32400	$C_{21}H_{33}O_9N_3$	397.4	Ber. C 63.46 H 5.83 N 10.57 Gef. C 63.47 H 5.79 N 10.76
2,4-Dimethyl-pentansäure-(1)	138	30600	$C_{21}H_{33}O_9N_3$	397.4	Ber. C 63.46 H 5.83 N 10.57 Gef. C 63.40 H 5.87 N 10.65
Δ^1 -Isoheptensäure	164	31600	$C_{21}H_{31}O_9N_3$	395.4	Ber. C 63.78 H 5.35 Gef. C 63.71 H 5.45
Sorbinsäure	220	..	$C_{20}H_{27}O_9N_3$	379.4	Ber. C 63.31 H 4.52 N 11.08 Gef. C 63.36 H 4.52 N 11.64

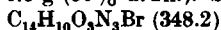
Mutterlauge kann durch Eingießen in viel Wasser noch etwas rohes Keton gewonnen werden. Das Rohprodukt wird aus benzolischer Lösung über 100 g Aluminiumoxyd (Akt. III) filtriert. Ausb. 24 g (89% d.Th.). Schmp. 175° nach Umkristallisieren aus Äthanol.



Ber. C 62.44 H 4.12 N 15.60

Gef. C 62.63 H 4.12 N 15.76

p-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacyl-bromid (III): 5.6 g des Ketons I werden in 4 l Eisessig in der Wärme gelöst. Nach dem Abkühlen läßt man in diese Lösung innerhalb $\frac{1}{2}$ Stde. 3.3 g Brom, gelöst in 25 ccm Eisessig, eintropfen. Das Gemisch wird dann noch 3 Stdn. auf 60° gehalten und anschließend in 10 l Wasser gegossen. Das Rohprodukt wird durch Filtrieren der benzolischen Lösung über 100 g Aluminiumoxyd (Akt. III) und Umkristallisieren aus Äthanol gereinigt. Ausb. 6.5 g (90% d.Th.). Schmp. 182°.



Ber. C 48.29 H 2.89 N 12.07 Br 22.95

Gef. C 48.73 H 3.17 N 12.33 Br 22.68

p-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylbromid (III) aus 4'-Nitro-4-diazoacetylazobenzol (II)

4'-Nitro-4-diazoacetylazobenzol (II): Durch Eintragen von 7 g Nitrosomethylharnstoff in kalte, 40-proz. Kalilauge, die mit einem Gemisch aus 80 ccm Cyclohexan und 30 ccm Methylenchlorid überschichtet ist, wird eine Diazomethan-Lösung in bekannter Weise hergestellt. Zu der mit KOH getrockneten Lösung gibt man bei 0° unter kräftigem Schütteln die Lösung von 2 g 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid⁵⁾ in 50 ccm Methylenchlorid. Das Diazoketon beginnt bald auszufallen, und nach Stehenlassen des Ansatzes über Nacht wird die Hauptmenge des Methylenchlorids ohne zu erwärmen entfernt¹¹⁾. Nach Absaugen des Niederschlags werden 1.7–1.9 g Diazoketon (85–94% d.Th.) erhalten. Zur weiteren Umsetzung mit HBr kann dieses rohe Diazoketon verwendet werden.

Zur Reinigung wird das rohe Diazoketon aus benzolischer Lösung über Aluminiumoxyd (Akt. II/III) filtriert und das Filtrat bei Zimmertemperatur eingedampft¹¹⁾. Dabei schei-

¹¹⁾ E. Hecker u. P. Karlson, *Chemie-Ing.-Techn.* 25, 397 [1953].

den sich mattglänzende, kupferrote Blättchen ab, die sich nach einmaligem Umkristallisieren aus Methylenchlorid-Benzol 5 : 1 bei 184° zersetzen.

Das Diazoketon löst sich gut in Methylenchlorid, Tetrahydrofuran, Chloroform und Dimethylformamid, mäßig in Dioxan, Essigester und Benzol, schlecht in gesättigten Kohlenwasserstoffen, Acetonitril, Nitromethan, Methyl-butyl-äther.

$C_{14}H_9O_3N_5$ (295.3) Ber. C 56.95 H 3.07 N 23.72 Gef. C 56.51 H 3.24 N 23.69

Umsetzungen des Diazoketons mit Essigsäure, Isobuttersäure, Valeriansäure und Capronsäure in siedendem Benzol, von Propionsäure und Buttersäure in siedendem Toluol, sowie von Essigsäure und Valeriansäure ohne Lösungsmittel führten zu Produkten, die sich nur unter großen Verlusten reinigen ließen.

p-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylbromid (III): 2 g Diazoketon II werden unter schwachem Erwärmen in 84 ccm Tetrahydrofuran gelöst. Die noch warme Lösung wird auf einmal zu 60 ccm 4 *n* HBr gegeben. Die Temperatur steigt schwach an, und unter Stickstoffentwicklung tritt Farbumschlag nach Tiefrot ein. Der Ansatz wird auf dem Wasserbad ins Sieden gebracht und dann erkalten gelassen. Das Bromid III scheidet sich in tiefroten Nadeln, manchmal auch in Blättchen ab. Ausb. 1.92 g (81% d.Th.). Nach Umkristallisieren aus Aceton, Benzol oder Alkohol: Schmp. 182°, $\epsilon = 31900$, λ_{\max} 332 m μ . — Es kann nicht empfohlen werden, das Diazoketon ohne Isolierung in einem Eintopfansatz ins Bromid überzuführen. Das anfallende Phenacylbromid ist stark verunreinigt und schwer in reiner Form zu gewinnen.

$C_{14}H_{10}O_3N_3Br$ (348.2) Ber. C 48.29 H 2.89 N 12.07 Br 22.95

Gef. C 48.86 H 3.07 N 12.02 Br 22.75

p-[4-Nitro-phenyl-azo]-phenacylester von Fettsäuren

Die im folgenden für das Beispiel der Caprylsäure gegebene Vorschrift gilt sinngemäß auch für die Darstellung der Ester aller anderen in Tafel 2 aufgeführten Fettsäuren.

433 mg Caprylsäure (3 mMol) werden in einem Gemisch aus je 5 ccm Dioxan und Tetrahydrofuran gelöst und mit 2 ccm 1 *n* NaOH versetzt. Nach Zugabe von 696 mg (2 mMol) Phenacylbromid III wird 2 Stdn. unter Rückfluß erwärmt. Die Umsetzung kann auch durch 3stdg. Kochen der Komponenten in 300 ccm 80-proz. Äthanol vorgenommen werden. Nach Erkalten des Ansatzes nimmt man in Chloroform auf und schüttelt mit Hydrogencarbonatlösung und Wasser. Das Rohprodukt wird aus benzolischer Lösung über 20 g Aluminiumoxyd (Akt. II/III) filtriert. Ausb. 0.67 g (82% d.Th., bezogen auf neutralisierte Säure); bei Δ^1 -Heptensäure und Sorbinsäure sind die Ausbeuten schlechter. Zum Umkristallisieren eignen sich Aceton, Alkohol und Benzol.

In Tafel 2 sind die Analysen, Schmelzpunkte und Extinktionen der Ester aufgeführt.

Die Trennungen von Estergemischen durch Verteilungschromatographie wurden ohne wesentliche Änderung der bereits beschriebenen experimentellen Anordnung durchgeführt⁸). Um bei Reihenversuchen die Elutionszeit zu verkürzen, wurden teilweise verhältnismäßig große Fraktionen (20 ccm, Abbild. 2) unter schwachem Saugen mit der Wasserstrahlpumpe eluiert.