

ALBERT HEESING

Zur Konstitution der Farbstoffe der Sakaguchi-Reaktion, II¹⁾**Synthesen neuer Farbstoffe des Sakaguchi-Typs**

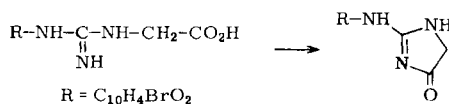
Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.)

(Eingegangen am 16. März 1963)

Der Farbstoff aus Guanidinoessigsäure hat nicht die in der Literatur²⁾ angegebene Bruttoformel und Struktur; er entspricht vielmehr den früher untersuchten Derivaten aus monoalkylsubstituierten Guanidinen¹⁾. Bei der Umsetzung mit L-Arginin entsteht ein Gemisch, aus dem die beiden Hauptkomponenten isoliert wurden; eine von ihnen ist unter oxydativem Abbau des Arginins gebildet worden. Alle Stoffe sind im Gegensatz zu den Angaben anderer Autoren Hydroxy-naphthochinonimin-Derivate. — Weiterhin wurden substituierte Naphthole und Naphthochinone anstelle des α -Naphthols eingesetzt und aus ihrem Verhalten Schlüsse auf den Reaktionsverlauf gezogen.

Während bei der Sakaguchi-Reaktion²⁾ mit monoalkylsubstituierten Guanidinen jeweils nur *ein* Farbstoff entsteht¹⁾, wurde schon früher gezeigt^{1,3)}, daß bei der Guanidinoessigsäure und besonders beim L-Arginin, zu deren Bestimmung man diese Reaktion meist verwendet, mehrere Farbstoffe gebildet werden. Zusammensetzung und Struktur der Verbindungen aus Methyl- und n-Butylguanidin, die als Modellsubstanzen gewählt wurden, stehen im Widerspruch zu den Angaben anderer Autoren. Da diese aber die Derivate der Guanidinoessigsäure und des L-Arginins untersucht hatten, war die Frage zu prüfen, ob auch hier Farbstoffe eines anderen Typs auftreten.

Es zeigte sich, daß unter den gewählten Bedingungen bei der Guanidinoessigsäure nur ein Farbstoff, erkenntlich an dem typischen Farbumschlag im schwach alkalischen Gebiet¹⁾, nachgewiesen werden kann. Er wird von anderen farbigen, gut alkalilöslichen Substanzen begleitet, deren Abtrennung schwieriger ist als bei den früher untersuchten Beispielen, da der Farbstoff infolge seiner Carboxylgruppe nicht mehr wie die Alkylderivate aus alkalischer Lösung extrahierbar ist. Nach der chromatographischen Reinigung erhält man beim Umkristallisieren aus Tetrahydrofuran — Methanol ist weniger geeignet, da langsam Veresterung stattfindet — ein gut kristallisierendes Addukt im Molverhältnis 1:1. Dies gibt beim Erhitzen auf 100° das Tetrahydrofuran ab, doch bildet sich in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer



¹⁾ I. Mitteil.: A. HEESING, Chem. Ber. **95**, 3008 [1962].

²⁾ S. SAKAGUCHI, J. Biochemistry [Tokyo] **5**, 25 [1925]; C. **1925** II, 1547.

³⁾ H. KRAUT, E. VON SCHRADER-BEIELSTEIN und M. WEBER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **286**, 248 [1950].

eine Nebenkomponente. Es liegt nahe, einen Ringschluß zum Glykocyamidin-Derivat anzunehmen. Diese Substanz ist chromatographisch im Rohprodukt nachweisbar, nicht aber in der Lösung unmittelbar nach der Herstellung; sie entsteht erst sekundär.

Der Farbstoff aus Guanidinoessigsäure hat die Bruttoformel $C_{13}H_{10}BrN_3O_4$, während S. SAKAGUCHI²⁾ für das Chlorderivat $C_{23}H_{13}ClN_3O_4$ fand. Die Disproportionierung durch Alkali führte zum 2-Brom-naphthol-(1). Nach Hydrolyse und Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitro-benzol wurde die Seitenkette als 2,4-Dinitrophenylglycin nachgewiesen. Damit entspricht der Aufbau völlig dem der aus alkyl-substituierten Guanidinen erhaltenen Produkte.

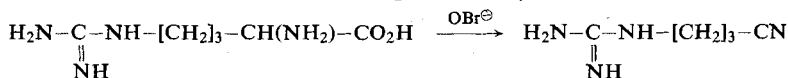
Durch Umsetzung mit n-Butanol/HCl wurde der Butylester hergestellt. In ihm ist die Struktur noch voll erhalten, da bei Abbaureaktionen dieselben Stoffe entstehen wie beim Farbstoff selbst und auch das IR-Spektrum große Ähnlichkeit mit dem Ausgangsprodukt zeigt. Seine Bruttoformel, insbesondere die Butoxyl-Bestimmung bestätigen erneut die für die Farbstoffe angenommene Zusammensetzung aus je einem Mol. Naphthol und Guanidin.

Guanidinoessigsäure gibt bei der Sakaguchi-Reaktion nur etwa 70% der Farbintensität äquimolarer Mengen anderer Guanidine⁴⁾. Da der isolierte Farbstoff in alkalischer Lösung fast die gleichen Werte für die Lage des Absorptionsmaximums und die molare Extinktion wie die Methyl- und n-Butyl-derivate zeigt, ist dies auf eine geringere Bildungstendenz zurückzuführen.

Bei der Reaktion mit L-Arginin entstehen unter den gewählten Bedingungen zwei Hauptkomponenten. Ihre Isolierung und Reinigung stieß auf dieselben Schwierigkeiten wie bei der Guanidinoessigsäure. Die in größerer Menge gebildete Substanz wurde rein dargestellt. Ihre Bruttoformel $C_{15}H_{13}BrN_4O_2$ ist mit dem Einbau eines intakten Arginin-Moleküls nicht zu vereinbaren.

Veränderungen des Arginins durch Oxydationsmittel in neutraler und alkalischer Lösung wurden von J. ROCHE, M. MOURGUE und R. DOKHAN⁵⁾ untersucht. Sie fanden zahlreiche Stoffe mit unveränderter Guanidinogruppe, darunter Aldehyde, α -Ketosäuren und Carbonsäuren, die sich durch Dehydrierung und Decarboxylierung gebildet hatten.

Das IR-Spektrum des Farbstoffes zeigt jedoch eine Nitrilbande bei 2250/cm. Ihre Intensität ist gering, wie es von vielen Nitrilen mit negativen Substituenten bekannt ist⁶⁾. Dies deutet auf einen Abbau des Arginins zum γ -Guanidino-butyronitril hin.



Dieser Stoff wurde zwar von den obigen Autoren nicht beobachtet; bei einigen anderen Aminosäuren erfolgt aber in neutraler bis schwach alkalischer Hypohalogenitlösung ($\leq 0.1\text{ n NaOH}$) eine analoge Reaktion^{7,8)}.

⁴⁾ M. MOURGUE, Bull. Soc. chim. France, Sér. 5, **15**, 181 [1948].

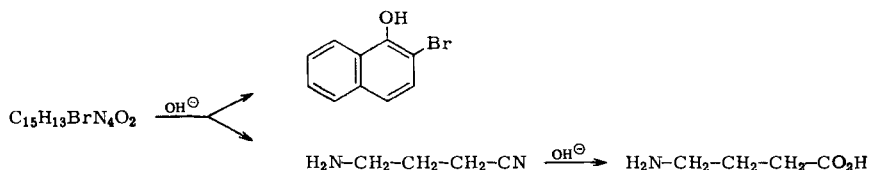
⁵⁾ M. MOURGUE und R. DOKHAN, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **239**, 1518 [1954]; J. ROCHE, M. MOURGUE und R. DOKHAN, Bull. Soc. Chim. biol. **37**, 55 [1955].

⁶⁾ R. E. KITSON und N. E. GRIFFITH, Analytic. Chem. **24**, 334 [1952].

⁷⁾ H. D. DAKIN, Biochem. J. **10**, 319 [1916]; C. **1916** II, 1142.

⁸⁾ A. H. FRIEDMANN und S. MORGULIS, J. Amer. chem. Soc. **58**, 909 [1936].

Die Butyronitrilkette konnte durch Abbau des Farbstoffes nachgewiesen werden: Bei der Behandlung mit Natronlauge erfolgten Disproportionierung und Hydrolyse zu 2-Brom-naphthol-(1) und γ -Amino-butyronitril, das dabei teilweise weiter verseift wurde zur γ -Amino-buttersäure. Die beiden letzten Substanzen wurden als 2,4-Dinitrophenyl-Derivate durch präparative Dünnschichtchromatographie isoliert und durch ihre IR-Spektren identifiziert.



Der sonst in stärker alkalischer Hypobromitlösung vorherrschende Abbau der Aminosäuren zum Aldehyd anstelle des Nitrils⁸⁾ scheint hier, obwohl in etwa 1,5*n* NaOH gearbeitet wurde, durch die kurze Einwirkungszeit von Hypobromit und Alkali zurückgedrängt zu sein.

Die zweite Komponente des Farbstoffgemisches aus L-Arginin, die zu etwa einem Drittel entsteht, konnte noch nicht in reiner Form gewonnen werden. Sie zeigt dasselbe chromatographische Verhalten wie die Hauptkomponente des Gemisches, dargestellt nach der Vorschrift von K. R. BHATTACHARYA⁹⁾, der das Butyronitril-Derivat nicht findet, da es infolge seiner höheren Löslichkeit bei der Aufarbeitung entfernt wird. Die Analyse entspricht in etwa einem Sakaguchi-Farbstoff, der bei gleichem Bauprinzip wie die bisher besprochenen Stoffe eine intakte Arginin-Seitenkette trägt, deren Aminogruppe als Hydrochlorid vorliegt. Hierzu paßt, daß nach dem alkalischen Abbau 2-Brom-naphthol-(1) und Bis-2,4-dinitro-phenyl-ornithin chromatographisch identifiziert wurden und daß das Chlor ionogen gebunden vorliegt.

Damit ist gezeigt, daß auch die bei der Sakaguchi-Reaktion mit Guanidinoessigsäure und L-Arginin als Hauptprodukte gebildeten Farbstoffe gleichartig aufgebaut sind wie die früher untersuchten Derivate des Methyl- und *n*-Butylguanidins. Die mehrfach vorgeschlagene Indamin-Struktur¹⁰⁾ konnte dagegen nicht bestätigt werden.

Um Aufschlüsse über den Reaktionsverlauf sowie auf die Stellung der Substituenten zu erhalten, wurde die Sakaguchi-Reaktion am Beispiel des *n*-Butylguanidins mit verschiedenen substituierten α -Naphthol-Derivaten durchgeführt. Mehrere ältere Arbeiten^{3,10)} hatten nur qualitative Ergebnisse gebracht, da nicht gezeigt wurde, ob stets derselbe Farbstoff oder aber verschiedene Produkte ähnlicher Struktur gebildet wurden. Lediglich im Falle der Naphthol-(1)-sulfonsäure-(2)³⁾ ist aus der hohen Wasserlöslichkeit des Farbstoffes zu schließen, daß die Sulfonsäure-Gruppe erhalten bleibt.

Zunächst wurde in qualitativen Versuchen geprüft, durch welche Substituenten im α -Naphthol die Sakaguchi-Reaktion unterbunden wird (Tab. 1, A). Da in den Farbstoffen ein Ring des Naphthochinon-Systems vollständig substituiert wird, während der zweite unverändert bleibt¹⁾, wurden nur Substanzen mit Substituenten in 1- bis 4-Stellung verwendet.

⁹⁾ Ann. Biochem. exp. Med. [Calcutta] 20, 93 [1960]; C. 1962, 3566.

¹⁰⁾ K. R. BHATTACHARYA, J. DATTA und D. K. ROY, J. org. Chemistry 25, 2035 [1960].

2-Äthyl-naphthol-(1) erwies sich als ungeeignet, da die Oxydation zum Diäthyl-dinaphthon¹¹⁾ schneller erfolgt als die Sakaguchi-Reaktion.

Dagegen war der Farbstest mit 2-Acetyl-naphthol-(1), das in alkalischer Lösung nur langsam oxydiert wird¹²⁾, sowie bei den in 2-Stellung halogenierten Derivaten positiv. Dies entspricht dem Befund bei der α -Naphthol-sulfonsäure-(2)³⁾; der Substituent in 2-Stellung scheint also erhalten zu bleiben¹³⁾. Jedoch verhindert die stark elektronenziehende Nitrogruppe die Reaktion.

Tab. 1. Ergebnisse der Sakaguchi-Reaktion bei Verwendung verschiedener Naphthalinderivate

A. α -Naphthol-Derivate		B. Naphthochinon-(1.4)-Derivate	
2-Brom-	+ (S)	2-Hydroxy-	—
4-Chlor-	+ (S)	2-Brom-	—
4-Chlor-2-brom-	+ (S)	2-Brom-3-hydroxy-	—
2.4-Dibrom-	+		
2-Nitro-	—	C. Naphthochinon-(1.2)-Derivate	
4-Nitro-	—	3-Brom-	—
3-Sulfonsäure	—	3.4-Dibrom-	—
3-Hydroxy-	—		
2-Äthyl-	*)		
2-Acetyl-	+		
2-Brom-4-hydroxy-	—		
3-Brom-2-hydroxy-	—		
3.4-Dibrom-2-hydroxy-	—		
2.4-Dihydroxy-	—		
3-Brom-2.4-dihydroxy-	—		

+ bzw. —: Sakaguchi-Reaktion positiv bzw. negativ.

(S): Farbstoff in Substanz isoliert.

*) siehe Text oben.

Wenn C-3 besetzt ist, unterbleibt die Farbstoffbildung, wie die Blockierung durch die Hydroxyl- oder die Sulfonsäuregruppe zeigt. Diese Stelle darf also erst im Laufe der Sakaguchi-Reaktion substituiert werden.

Von der 4-Stellung war schon bekannt³⁾, daß eine Sulfurierung die Reaktion verhindert, eine Halogenierung sich aber — auch durch Verringerung der Nebenreaktionen — günstig auswirkt. An mehreren Beispielen zeigte es sich nun, daß die Einführung einer Hydroxylgruppe an dieser Stelle die Farbreaktion ausschließt; ebenso wirkt hier die Nitrogruppe. Nur das leicht substituierbare Halogen ist somit in *p*-Stellung zum Hydroxyl erlaubt.

Weiterhin wurden verschiedene Naphthochinon-Derivate (Tab. 1, B und C) untersucht, von denen bekannt ist, daß sie mit Aminen unter Addition, Substitution oder Kondensation reagieren können, und die als Zwischenstufen denkbar wären. Weil sie zum Teil in alkalischer Lösung wenig beständig sind, wurden sie in weiteren Versuchen vorher mit alkalischer Dithionitlösung in die Hydroxylderivate übergeführt. Da die Lösungen der durch das Hypobromit zurückgebildeten Chinone gefärbt sind, wurde chromatographisch geprüft, ob ein Sakaguchi-Farbstoff gebildet worden war.

¹¹⁾ K. FRIES und W. LOHMANN, Ber. dtsch. chem. Ges. **54**, 2915 Anm. 1 [1921].

¹²⁾ K. FRIES und H. LEUE, Ber. dtsch. chem. Ges. **55**, 753 [1922].

¹³⁾ Eine Abspaltung der Acetylgruppe ist aber nicht ausgeschlossen: im 1-Acetyl-naphthol-(2) läßt sie sich durch Brom substituieren¹⁴⁾.

¹⁴⁾ K. FRIES, Ber. dtsch. chem. Ges. **54**, 709 [1921].

Dieser konnte jedoch in keinem Falle nachgewiesen werden, so daß ein Verlauf der Reaktion über Chinon-Zwischenstufen unwahrscheinlich geworden ist.

Um schließlich die Frage zu klären, wie weit die Substituenten in 2- und 4-Stellung bei der Reaktion tatsächlich unverändert bleiben, wurden verschiedene halogenierte Naphthole im präparativen Maßstab mit *n*-Butylguanidin umgesetzt, und zwar 2-Brom-naphthol-(1)¹⁵, 4-Chlor-naphthol-(1) und 4-Chlor-2-brom-naphthol-(1). Zunächst wurde wie üblich mit Hypobromit gearbeitet. In allen Fällen konnte unter Abspaltung des Chlors derselbe bromhaltige Farbstoff isoliert werden, der auch bei der Umsetzung mit α -Naphthol entsteht. Hierdurch wurde aber noch nicht ausgeschlossen, daß das Brom aus der 2-Stellung intermediär entfernt und — eventuell an anderer Stelle — wieder eingebaut wird. Deshalb wurde 2-Brom-naphthol-(1) noch mit *n*-Butylguanidin und Hypochlorit umgesetzt. Wie schon aus analytischen Untersuchungen bekannt¹⁷, ist hier die Ausbeute an Farbstoff geringer, die Bildung von gefärbten Nebenprodukten deutlich größer. Das chromatographisch gereinigte Reaktionsprodukt ist wiederum mit den Farbstoffen identisch, die aus α -Naphthol und seinen Halogen-Derivaten bei der Verwendung von Hypobromit gebildet werden.

Dies zeigt, daß Substituenten aus der 4-Stellung entfernt werden. Ist dies nicht möglich, wie bei der Nitro-, Hydroxyl- oder Sulfonsäuregruppe, tritt keine Reaktion ein. Dagegen ist die Substitution des C-2 mit Ausnahme der Nitrogruppe ohne Belang; der Substituent bleibt erhalten. Daß es einerseits nicht gelang, Chinone als potentielle Zwischenstufen in die Reaktion einzusetzen und daß andererseits halogenierte Naphthole höhere Ausbeuten an Farbstoffen geben, spricht dafür, daß letztere in dem oxydierenden, alkalischen Milieu mit dem Guanidin zum Farbstoff reagieren.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT bin ich für Sachhilfen zu Dank verpflichtet. Ferner danke ich für die Aufnahme der IR-Spektren durch Herrn Dipl.-Chem. M. LORENZ an einem Herrn Professor Dr. F. MICHEEL von der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT zur Verfügung gestellten Spektrographen (Perkin-Elmer, Mod. 21).

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Isolierung des Sakaguchi-Farbstoffes aus Guanidinoessigsäure: Zur Lösung von 50 g NaOH, 12,5 g Harnstoff und 1,5 g α -Naphthol p. a. in 1000 ccm Wasser gibt man 250 g Eis und 0,7 g Guanidinoessigsäure, die kurz vorher in 15 ccm 2*n* HCl gelöst wurden. Nach etwa einer Min. setzt man unter starkem Rühren eine Hypobromit-Lösung aus 50 g NaOH, 200 ccm Wasser, 150 g Eis und 5,0 ccm Brom hinzu. Nach 3 Min. extrahiert man mit 300 ccm *n*-Butanol, das verworfen wird. Man säuert mit konz. Salzsäure unter Zusatz von Eis an und extrahiert mit 250 ccm *n*-Butanol. Diese Lösung wird zur Entfernung der Säure mehrfach mit Wasser ausgeschüttelt und durch Wasserdampfdestillation i. Vak. stark eingeeengt. Nach längerem Stehenlassen bei 0° entsteht eine gelbbraune Fällung. Diese wird an einer Cellulose-Säule mit Benzol/Cyclohexan/Dimethylformamid (3 : 6 : 1) getrennt. Die langsamlaufende Hauptzone

¹⁵) 2-Brom-naphthol-(1) läßt sich in guter Ausbeute durch Abspalten von schwefliger Säure aus 2-Brom-tetralon-(1)-sulfonsäure-(3) in alkalischer Lösung¹⁶) gewinnen. Da schon bei mäßig erhöhter Temperatur und Konzentration bis zu 50% α -Naphthol entstehen, ist es erforderlich, unterhalb von 0° und in verdünnter Lösung zu arbeiten, wodurch die Bildung des α -Naphthols fast völlig unterdrückt werden kann.

¹⁶) A. RIECHE und H. SEEBOTH, Liebigs Ann. Chem. **638**, 43 f. [1960].

¹⁷) C. J. WEBER, J. biol. Chemistry **86**, 217 [1930].

wird mit Dimethylformamid/Aceton eluiert. Man bringt die Lösung zur Trockne und extrahiert den Rückstand mit Methanol. Er ist noch durch 2 Stoffe in geringer Menge verunreinigt, von denen einer der Methylester zu sein scheint (OCH_3 : etwa 0.6%). Ausb. 0.05 bis 0.1 g; Zers.-P. 238°.

Absorptionsmaximum in 0.01 *n* NaOCH_3 : 520 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 4.70$).

$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{O}_4$ (352.2) Ber. C 44.34 H 2.86 Br 22.96 N 11.93

Gef. C 43.71 H 3.27 Br 21.50 N 10.75

Der Farbstoff kann aus peroxydfreiem Tetrahydrofuran umkristallisiert werden, mit dem er ein Addukt im Verhältnis 1:1 bildet. Das Tetrahydrofuran wird bei 100° i. Vak. abgegeben (Gewichtsabnahme ber. 17.01%; gef. 15.86%), langsam auch schon an der Luft, und beim Aufbewahren über Tetrahydrofuran wieder aufgenommen (Gewichtszunahme ber. 20.47%; gef. 19.68%). Gelbe, verfilzte Nadeln, Zers.-P. 243°.

$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{O}_4 \cdot \text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ (424.3) Ber. C 48.12 H 4.28 Br 18.84 N 9.91

Gef. C 48.54 H 4.01 Br 19.40 N 10.04

n-Butylester des Sakaguchi-Farbstoffes aus Guanidinoessigsäure: 0.20 g Farbstoff werden in 300 ccm *n*-Butanol unter Zusatz von 2*n* NaOH gelöst. Man versetzt mit überschüss. verd. Salzsäure und engt i. Vak. bei etwa 50° langsam ein. Etwa die Hälfte setzt sich zum Ester um. Die Trennung erfolgt durch Chromatographie, wie beim Farbstoff beschrieben. Der Ester wandert fast an der Front. Er wird aus Tetrahydrofuran umkristallisiert. Gelbe Nadeln, Zers.-P. 254°.

$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrN}_3\text{O}_4$ (408.3) Ber. C 50.01 H 4.45 Br 19.58 N 10.29 $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}$ 17.91

Gef. C 50.18 H 4.21 Br 19.57 N 10.60 $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}$ 18.39

Abbau des Farbstoffes aus Guanidinoessigsäure und seines *n*-Butylesters: Jeweils 40 mg werden in 8 ccm 2*n* NaOH 10 Min. zum Sieden erhitzt. Die erkaltete Lösung wird angesäuert und mit Äther extrahiert. Das in der Ätherlösung enthaltene 2-Brom-naphthol-(1) (etwa 8 mg) wird durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel-G; 0.25 mm; Cyclohexan/Benzol/Pyridin = 7.5:2:0.5) sowie durch sein IR-Spektrum identifiziert. Die wäbr. Lösung wird in der üblichen Art mit 1-Fluor-2,4-dinitro-benzol umgesetzt. Man reinigt das 2,4-Dinitrophenylglycin (9 mg) durch präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel-G; 0.35 mm; Chloroform/Methanol/Eisessig = 9.5:0.5:0.1¹⁸⁾) und identifiziert es durch sein IR-Spektrum (Karte No. 6052 der DMS-Kartei¹⁹⁾).

Isolierung der ersten Komponente des Sakaguchi-Farbstoffes aus *L*-Arginin: Die Umsetzung von 1.25 g *L*-Arginin-hydrochlorid erfolgt wie bei der Guanidinoessigsäure, jedoch müssen beide Butanolösungen aufgearbeitet werden. Die chromatographische Trennung gelingt an Kieselgel mit dem Gemisch Benzol/Tetrahydrofuran/Dimethylformamid (2:3:1), wobei diese Komponente fast an der Front wandert. Gereinigt wird durch Extraktion mit Methanol und anschließendes Umkristallisieren aus Tetrahydrofuran. Gelbe Nadeln vom Zers.-P. 248°. Ausb. etwa 0.1 g. Im IR-Spektrum (in KBr) tritt eine schwache Nitrilbande bei 2250/cm auf.

$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{O}_2$ (361.2) Ber. C 49.87 H 3.63 Br 22.13 N 15.51

Gef. C 49.86 H 3.67 Br 23.17 N 14.82

Isolierung der zweiten Komponente des Sakaguchi-Farbstoffes aus *L*-Arginin: Bei der chromatographischen Abtrennung der ersten Komponente wandert eine zweite Zone nur sehr langsam. Sie wird durch mehrfaches Extrahieren mit Methanol gereinigt, ist aber auch dann

¹⁸⁾ M. BRENNER, A. NIEDERWIESER und G. PATAKI, *Experientia* [Basel] 17, 145 [1961].

¹⁹⁾ Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., und Butterworth Scientific Publications, London WC 2.

noch nicht chromatographisch einheitlich, sondern von Nebenprodukten mit sehr ähnlichem Verhalten begleitet. Ausb. etwa 0.05 g. Zers.-P. 212—215°.

$C_{16}H_{13}BrClN_4O_4$ (445.7) Ber. C 43.12 H 4.08 Br 17.93 Cl 7.96 N 12.57
Gef. C 44.39 H 4.14 Br 16.57 Cl 7.32 N 11.43

Das Chlor liegt ionogen gebunden vor: man suspendiert den in Wasser fast unlöslichen Farbstoff in verd. Natronlauge und extrahiert ihn mit Benzol. In der wäßr. Phase wird das Chlor potentiometrisch ermittelt.

Abbau der ersten Farbstoffkomponente aus L-Arginin: Die Alkalibehandlung und die Isolierung des 2-Brom-naphthols-(1) erfolgen wie beim Derivat der Guanidinoessigsäure. Die wäßr. Lösung wird mit 1-Fluor-2,4-dinitro-benzol unter Zusatz von Aceton und $NaHCO_3$ umgesetzt. Nach dem Abdampfen des Acetons wird ausgeäthert. Die wäßr. Phase enthält 4-[2,4-Dinitro-anilino]-buttersäure, die — wie für das Glycinderivat beschrieben — isoliert und durch Vergleich mit authent. Material²⁰⁾ identifiziert wird. Die Ätherlösung wird eingeeengt, der Rückstand in Wasser/Aceton aufgenommen und zur Entfernung des überschüss. 1-Fluor-2,4-dinitro-benzols mit Glycin in Gegenwart von $NaHCO_3$ umgesetzt. Das Aceton wird i. Vak. entfernt, das 4-[2,4-Dinitro-anilino]-butyronitril in Äther aufgenommen und durch präparative Dünnschichtchromatographie vom mitentstandenen 2,4-Dinitro-anilin getrennt. Die Identifizierung durch das IR-Spektrum erfolgte in $CHCl_3$ -Lösung, da das Nitril in Kristallmodifikationen mit etwas verschiedenen Spektren kristallisiert.

Abbau der zweiten Farbstoffkomponente aus L-Arginin: Alkalibehandlung von 10 mg Farbstoff und Aufarbeiten werden durchgeführt, wie mehrfach beschrieben. 2-Brom-naphthol-(1) und Bis-[2,4-dinitro-phenyl]-ornithin werden durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Systemen¹⁸⁾ identifiziert.

4-[2,4-Dinitro-anilino]-butyronitril: 0.5 g γ -Amino-butyronitril-hydrochlorid²¹⁾ werden in Aceton/Wasser mit der berechneten Menge 1-Fluor-2,4-dinitro-benzol wie üblich umgesetzt. Das bald ausfallende Reaktionsprodukt kristallisiert aus Aceton in derben Prismen; Schmp. 120°. Aus übersätt. Ätherlösung kristallisiert es in verfilzten Nadeln.

$C_{10}H_{10}N_4O_4$ (250.2) Ber. C 48.00 H 4.03 N 22.39 Gef. C 47.99 H 4.41 N 23.09

2-Brom-naphthol-(1)^{15,16)}: Zur Lösung von 10 g Natriumsalz der 2-Brom-tetralon-(1)-sulfonsäure-(3) in 150 ccm Wasser und 150 g Eis gibt man unter gutem Rühren schnell die Lösung von 20 g NaOH in 100 ccm Wasser und 100 g Eis. Nach 2 Min. wird mit halbkonz. Säure unter Zusatz von Eis angesäuert. 5.1 g (75% d. Th.) eines Rohproduktes fallen aus, das nur Spuren an α -Naphthol enthält. Es wird durch Umkristallisieren aus Petroläther rein erhalten. Schmp. 48° (Lit. 22): 45°).

Sakaguchi-Farbstoff aus substituierten Naphtholen und n-Butylguanidin: Die Ansätze werden, wie für α -Naphthol beschrieben¹⁾, mit äquimolaren Mengen seiner Derivate durchgeführt. Die Farbstoffe werden aus Tetrahydrofuran umkristallisiert. Die aus 2-Brom-naphthol-(1), 4-Chlor-naphthol-(1) und 4-Chlor-2-brom-naphthol-(1) gebildeten Produkte sind nach Chromatogramm und IR-Spektren mit dem Farbstoff aus α -Naphthol identisch.

Die Reaktion von 2-Brom-naphthol-(1) mit Butylguanidin und Hypochlorit wird entsprechend ausgeführt. Um zu starke Verharzung zu vermeiden, muß die Hypochloritlösung

²⁰⁾ K. R. RAO und H. A. SOBER, J. Amer. chem. Soc. 76, 1328 [1954].

²¹⁾ A. A. GOLDBERG und W. KELLY, J. chem. Soc. [London] 1947, 1369; A. F. MCKAY und Mitarbb., J. Amer. chem. Soc. 81, 4328 [1959].

²²⁾ H. H. HODGSON und D. E. HATHWAY, J. chem. Soc. [London] 1944, 538.

(90 ccm mit 7.7% aktivem Chlor) in zwei Anteilen im Abstand von 3 Min. zugesetzt werden. Ausb. an tiefbraunem Rohprodukt 0.17 g; nach Reinigung 0.06 g. Der Stoff ist identisch mit den obigen Substanzen.

Qualitative Farbtaste mit substituierten Naphtholen und Naphthochinonen (Tab. I): 1 ccm 2*n* NaOH, 0.5 ccm 5-proz. Harnstofflösung und 0.5 ccm einer *n*-Butylguanidinlösung, die 50 mg des Sulfats in 100 ccm Wasser enthält, werden gemischt. Hierzu gibt man unter Schütteln 0.5 ccm einer 0.2-proz. methanol. Lösung der zu untersuchenden Substanz und spritzt 1 ccm einer Hypobromitlösung ein, hergestellt durch Auflösen von 5 g KOH und 0.6 ccm Brom in 100 ccm Wasser. Nach einigen Min. extrahiert man mit wenig Butanol. Eine Gegenprobe ohne Butylguanidin wird ebenso bearbeitet.

Die Naphthochinone werden außerdem in reduziertem Zustand untersucht: Kurz bevor sie zugegeben werden, setzt man der alkalischen Harnstofflösung wenig mehr Dithionit zu, als zur Reduktion erforderlich ist. Überschüss. Dithionit in kleinen Mengen stört die Sakaguchi-Reaktion nicht.

Falls kein Unterschied zwischen Probe und Gegenprobe zu erkennen war, wurden diese zusätzlich durch Dünnschichtchromatographie untersucht.
