

CHROM. 4454

STUDIUM DER STABILITÄT DES KOMPLEXES ZWISCHEN JOD UND
DEM TERTIÄREN STICKSTOFF DER DÜNNSCHICHT-
CHROMATOGRAPHISCH GETRENNNTEN STOFFE MITTELS INFRAROTER
SPEKTROSKOPIE

M. ŠARŠÚNOVÁ, B. KAKÁČ UND L. KRASNEC

Laboratorium für Arzneimittelanalyse, Bratislava; Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie, Prag und Pharmazeutische Fakultät, Bratislava (Tschechoslowakei)

SUMMARY

Study of the stability of iodine and tertiary-bound nitrogen complexes in substances separated by thin-layer chromatography, by means of infrared spectroscopy

In our experimental work we have studied, by infrared spectroscopy, the influence of iodine used for detection of substances separated on thin layers. We examined the stability of the complexes formed by addition of iodine on the tertiary-bound nitrogen in the molecule of the substances detected in this way. We also examined complexes formed by this detection procedure in the case of strychnos and opium alkaloids, pyrazolone and phenothiazine derivatives, sulphonamides and other compounds. The results of this study were in agreement with the results obtained after quantitative estimation of substances separated on thin layers.

EINLEITUNG

Bei quantitativer Bestimmung der dünnenschichtchromatographisch getrennten Substanzen gibt es mehrere Faktoren, welche die exakte Reproduzierbarkeit und Ausbeute dieser Methode beeinflussen.

Wenn auch viele Erfahrungen von quantitativer Auswertung der mittels Papierchromatographie getrennten Stoffe auch auf die quantitative Bestimmung der dünnenschichtchromatographisch getrennten Stoffe übertragen werden können, muss man dennoch die unterschiedlichen Eigenschaften des Papiers und des in Dünnenschichtchromatographie benützten Sorbenten in Betracht nehmen. Einer der wichtigsten Faktoren, welche die Genauigkeit und Ausbeute nach chromatographischer Trennung beeinflusst, ist die erwählte Art von Detektion. Am vorteilhaftesten ist der Beweis der isolierten Stoffe mittels ihrer eigenen Färbung oder Fluoreszenz. Aus den Detektionsreagentien, welche zu diesem Zwecke verwendet werden, sind nur diejenigen zur quantitativen Auswertung der so sichtbargemachten Substanzen geeignet, die keine Änderung oder Destruktion der Stoffe verursachen.

In der Praxis werden oft Joddämpfe als Detektionsmittel benutzt. Zur Bestimmung der entstandenen gelben Flecke nach mechanischer Bezeichnung wird das Jod aus den Schichten durch Sublimation bei erhöhter Temperatur beseitigt.

Diese Art des Nachweises mit darauf folgender quantitativer Auswertung benützten mehrere Autoren¹⁻⁹. Die Resultate dieser Bestimmungen waren nicht eindeutig, jedenfalls wurden die Fehler der Bestimmungen dem üblichen Fehler der Mikromethoden und nicht der erwählten Art von Detektion zugeschrieben.

In unseren Arbeiten, die sich mit quantitativer photometrischer¹⁰⁻¹³, spektralphotometrischer oder radiometrischer¹⁴ Bestimmung der Stoffe nach ihrer Trennung auf losen Aluminiumoxidschichten befassten, haben wir diese durch Joddämpfe oder mittels angesäuerte Jod-Jodidlösung, bzw. im UV Licht sichtbar gemacht. Der Einfluss der Detektion auf Reproduzierbarkeit der Resultate, wie auch auf ihre Ausbeute, wurde experimentell untersucht.

In dieser Arbeit haben wir uns dem Studium der Stabilität der Additionsverbindungen der Stoffe, die mittels Joddämpfe sichtbar gemacht wurden, wie auch der Beeinflussung der Molekül der von uns untersuchten Stoffe mit verwandter chemischer Struktur, gewidmet. Wir studierten mittels IR Spektroskopie den Einfluss der sterischen Verhältnisse in der Molekül dieser Stoffe auf die Stabilität der so entstehenden Additionsverbindungen. Zu dieser Untersuchung wählten wir strukturell ähnliche Stoffe um aus unseren Experimenten allgemein gültige Folgerungen ziehen zu können.

EXPERIMENTELLER TEIL

Chemikalien und Reagentien

Es wurde Aluminiumoxid p.a. Lachema ČSN 685131, Kerngrösse 0.075 mm, pH Wert 8.6, benutzt. Die R_F -Werte der Azofarbstoffe waren: Azobenzol, 0.70; β -Methoxyazobenzol, 0.45; Sudangelb, 0.17; Sudanrot, 0.08. Chemikalien und Lösungsmittel waren von p.a. Qualität. Das benutzte Äthanol war 99.5%, das Chloroform war wasser- und alkoholfrei.

Apparatur und Einrichtungen

Wir haben die bei Dünnschichtchromatographie auf losen Aluminiumoxidschichten üblich gebrauchten Einrichtungen^{15,16} benutzt.

Die Detektion wird durch Joddämpfe, angesäuerte Jod-Jodidlösung oder im UV-Lichte bei 254 nm unter der Desaga UVIS-Lampe durchgeführt. Die IR-Spektroskopie wurde mit dem Gerät UR-10, VEB Carl Zeiss, Jena, durchgeführt.

Arbeitsweise

Dünnschichtchromatographie. Dünnschichtchromatographie wurde auf übliche Weise durchgeführt^{15,16}.

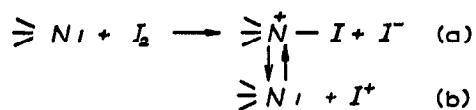
Infrarote Spektroskopie. 150 µg der zu untersuchenden Substanzen in äthanolischer Lösung wurden mittels Mikropipetten auf die losen, auf übliche Weise¹⁵⁻¹⁷ hergestellten Aluminiumoxidschichten, aufgetragen.

Opium- und Strychnosalkaloide wurden im System Äther-Äthanol (97:3), Pyrazolonderivate im System Chloroform-Äthanol (80:20), Sulfonamide im Elutionssystem Chloroform-Äthanol (80:15) und Phenothiazinderivate im System

Chloroform-Äthanol (95:5) getrennt. Die Detektion wurde im UV-Lichte, oder durch Joddämpfe durchgeführt. Die Flecken wurden mechanisch bezeichnet. Nach Jodabköpfung aus Schichten wurden die bezeichneten Flecke des Adsorbenten, die den analysierten Stoff enthielten, quantitativ aus den Schichten auf ein Glasmikrofilter Jena G₃ gebracht, mit Äthanol in einen Messkolben von 10 ml eluiert und genau auf 10 ml mit Äthanol aufgefüllt. Die äthanolische Lösung wurde in Vakuum auf einem Wasserbade eingedichtet, mit Kaliumbromid vermischt, abgedampft und zur Tablette gepresst.

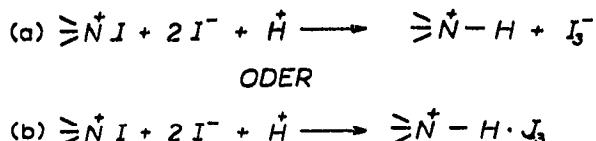
Ähnlich wurde die Bestimmung der durch UV-Licht sichtbargemachten Stoffe durchgeführt. Um die Art der Jodaddition auf dem tertiären Stickstoff der von uns studierten Stoffe feststellen zu können, wie auch eventuelle Änderungen in den Molekülen der untersuchten Stoffe, haben wir gleichzeitig auch das IR Spektrum dieser Stoffe ohne chromatographische Trennung gemessen.

Der Anfangsverlauf von jeder Reaktion des tertiären Stickstoffes mit dem Jod wird wie folgt wiedergegeben:



Die Gleichung (a) zeigt, dass bei dieser Reaktion ein $n-\sigma$ Komplex entsteht. Gleichung (b), welche eine mögliche weitere Nebenreaktion veranschaulicht, zeigt ein stark reaktives Jodkation, welches ausser oxidativen auch elektrophile Substitutionsreaktionen auf aromatischen Systemen hervorrufen kann.

Im sauren Medium, das heißt nach Detektion der dünnssichtchromatographisch getrennten Stoffe mittels angesäuerter Jod-Jodid-Lösung, ist der Verlauf der Reaktion des Jodes unterschiedlich:

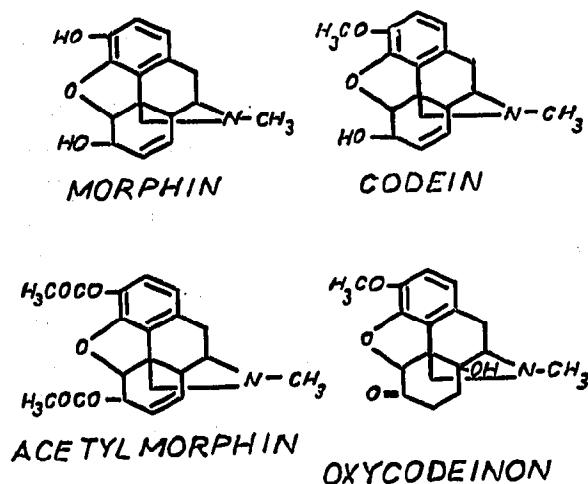


Nach Gleichung (b) kann ein Perjodidkomplex entstehen. Die Möglichkeit einer Nebenreaktion, falls I^+ gebildet wird, kann auch hier nicht ausgeschlossen werden.

Bei den so entstehenden Verbindungen, wie aus den Gleichungen folgt, kann das Jodkation I^+ frei werden. Es handelt sich um ein stark reaktives Reagenz, durch dessen Einwirkung es zu Änderungen von möglicherweise oxidativem Charakter im Molekül der so sichtbargemachten Stoffe kommen kann. Das Jodanion I^- ist weniger reaktiv, sowie auch das Komplex $\equiv N^+ - H \cdot I_3$ und deshalb kommt es bei dieser zweiten Art von Reaktionen zu keinen Änderungen im Molekül der so sichtbargemachten Stoffe, wie auch nicht bei der Bildung von stabilen Additionsverbindungen.

Opiumalkaloid

Bei den von uns studierten Opiumalkaloiden, Morphin, Codein, Acetylmorphin und Oxycodeinon, kommt es bei der Sichtbarmachung in Joddämpfen zur irreversiblen Jodaddition auf dem tertiären Stickstoff.



Bei Morphin entstehen nach Joddetektion mit Joddämpfen Änderungen im Gebiete der phenolischen Hydroxyle und zwar bei 1230 cm^{-1} , wie auch eine Abschwächung im Gebiete des alkoholischen Hydroxyls, das heisst bei 1410 cm^{-1} und bei 3600 cm^{-1} (siehe Fig. 1).

Das Codein bindet sich irreversibel mit dem Jod durch Wirkung seiner freien Elektronen. Die Spektren dieses Stoffes weisen nach der Detektion sichtbare Änderungen im Gebiete von $800\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, das heisst im Gebiete wo unter anderem auch die $\text{N}-\text{CH}_3$ Bindungen liegen, auf. Merkbar sind auch Änderungen im Gebiete der Doppelbindungen im aromatischen Zyklus.

Acetylmorphin weist deutlich Änderungen im Gebiete der Carbonyl-maxima, das heisst bei 1280 und 1720 cm^{-1} . Diese Änderungen werden wahrscheinlich durch Desacetylierung mittels Jodeinwirkung verursacht.

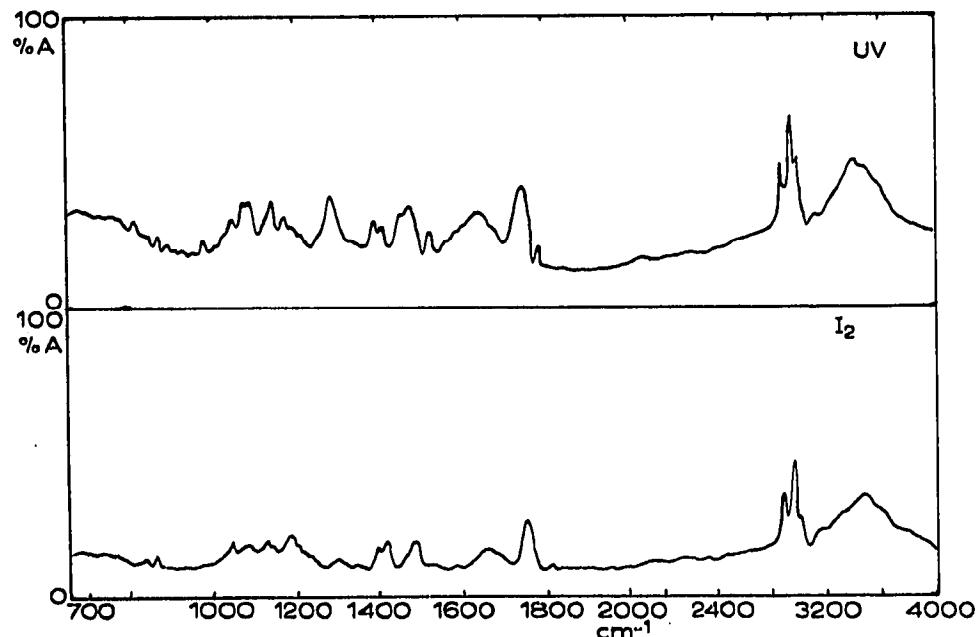


Fig. 1. IR Spektrum des Morphins. Oben: nach Sichtbarmachung im UV-Lichte; unten: nach Joddetektion.

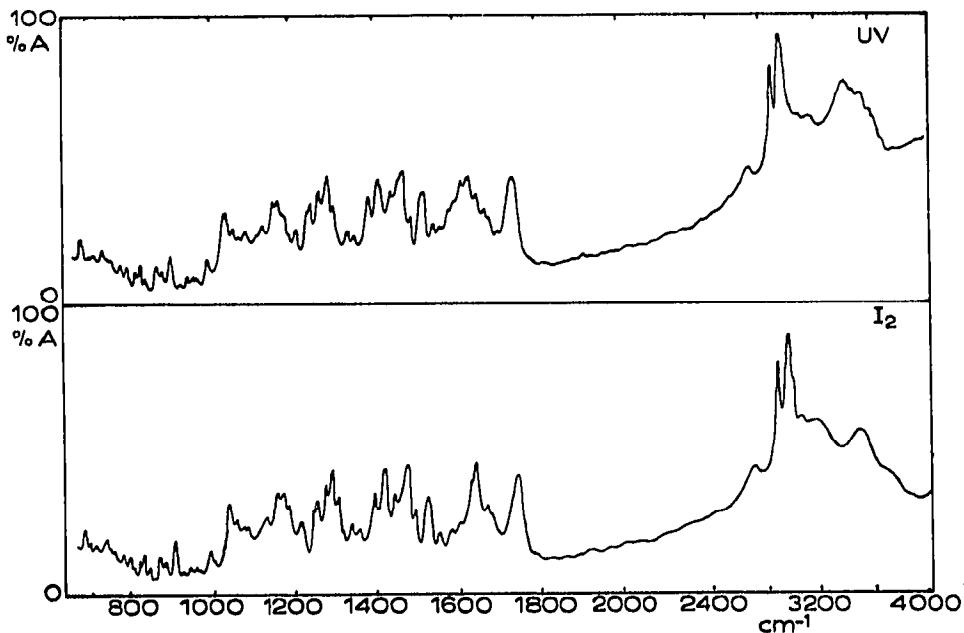


Fig. 2. Spektrum des Papaverins. Oben: nach Sichtbarmachung in UV-Lichte; Unten: nach Joddetektion.

Oxycodeinon zeigt Änderungen im Gebiete der $-\text{OH}$ Gruppe bei 1410 und 3600 cm^{-1} . Die Änderungen im Frequenzbereich $1480\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ weisen auf Änderungen des aromatischen Systems hin.

Strychninalkaloide

Strychnin zeigt reversible Jodaddition. Sein IR-Spektrum bleibt nach Joddetektion ohne Änderungen.

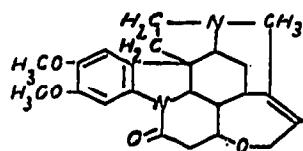
Brucin weist nach Joddetektion Änderungen im Bereich der CH- und $-\text{OCH}_3$ -Gruppen aus, was zu Änderungen bei $1100\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ führt. Das Jod bindet sich dabei wahrscheinlich auf den Sauerstoff in den $-\text{OCH}_3$ Gruppen und durch seine oxydative Einwirkung entsteht ein *o*-Chinonderivat: Ähnlich ist dies auch beim Papaverin (Fig. 2), dessen Spektrum wir wegen des Feststellens der Beeinflussung der $-\text{OCH}_3$ Gruppen studierten.

Pyrazolon- und Pyrazolidinderivate

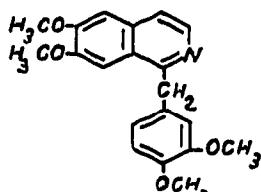
Aus dieser Gruppe haben wir den Einfluss der Joddetektion bei Amidopyrin, Antipyrin, Ketazon, Phenylbutazon und Trimethazon untersucht.

Amidopyrin und Antipyrin. Bei Amidopyrin und Antipyrin ist der Einfluss der Joddetektion bedeutungslos. Bei Amidopyrin wurde eine kleine Änderung bei $1300\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ merkbar. Diese kann auf Quaternisierung des Stickstoffes in seinem Molekül zurückgeführt werden.

Bei Antipyrin sind nur kleine, durch teilweise Jodaddition an die Doppelbindung verursachte Änderungen bei 1000 cm^{-1} merkbar. Bei diesen beiden Stoffen bleibt das Pyrazolonzyklus unberührt.



BRUCIN



PAPAVERIN

Phenylbutazon, Ketazon und Trimethazon. Diese Stoffe zeigten nach Joddetektion bedeutende Änderungen im Gebiete der amidischen Carbonyle, das heisst bei $1700-1760\text{ cm}^{-1}$. Der Pyrazolidinring kann wahrscheinlich nach vorläufiger Jodaddition auf die Carbonylgruppe durch oxidative Einwirkung gespaltet werden (siehe Fig. 3).

Sulfonamide

Aus der Reihe der Sulfonamide haben wir den Einfluss der Joddetektion bei Sulfacetamid, Sulfathiazol, Sulfaguanidin und Sulfamethoxydin untersucht. Bei allen studierten Sulfonamiden war die Addition des Jodes reversibel¹⁵. Im Spektrum

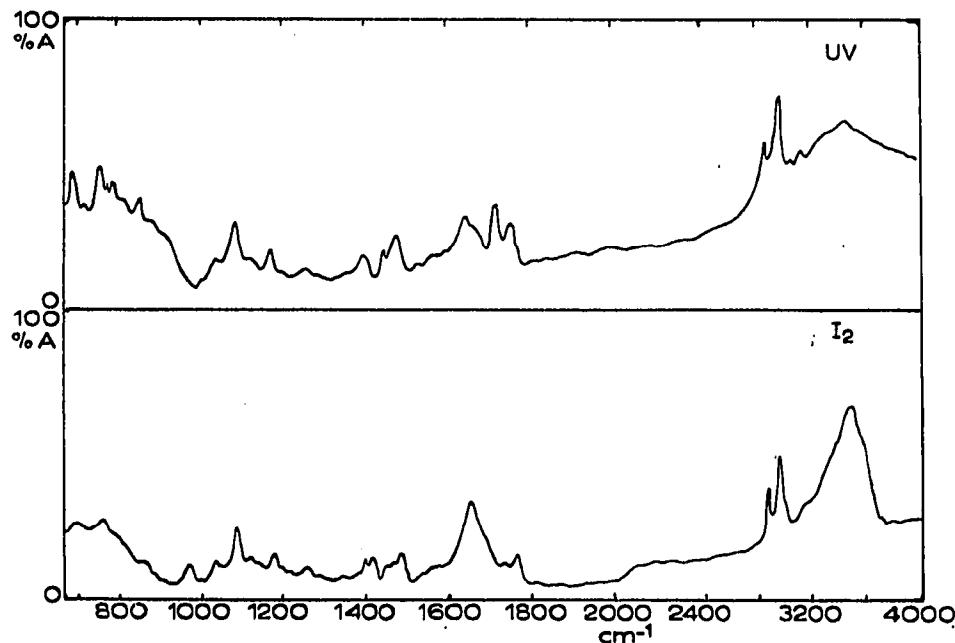
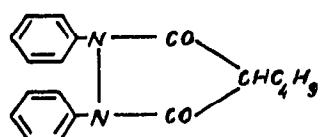
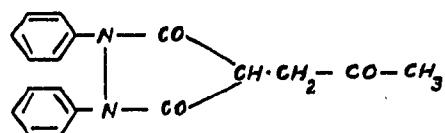


Fig. 3. Spektrum des Ketazons. Oben: nach Sichtbarmachung im UV-Lichte; unten: nach Joddetektion.



PHENYLBUTAZON



KETAZON

des Sulfathiazols sind nur kleine Änderungen sichtbar, deren Erklärung noch nicht ganz eindeutig ist (Fig. 4).

Phenothiazinderivate

Zum Abschluss studierten wir die Spektren des Chlorpromazins, Dichlorpromazins und Promethazins. Nur beim Promethazin kam es nach Joddetektion zur Änderung in seinem Molekül¹⁷. Durch Einfluss der verzweigten Methylgruppe in der Seitenkette des Promethazins kommt es zu Deformationen und dadurch zur Veränderung der sterischen Zugänglichkeit des Stickstoffes im Heterozyklus.

Es entsteht nicht nur eine irreversibele Bindung des Jodes auf den Stickstoff im Heterozyklus, sondern es kommt auch zu einem tiefen Eingriff in sein Molekül. Die

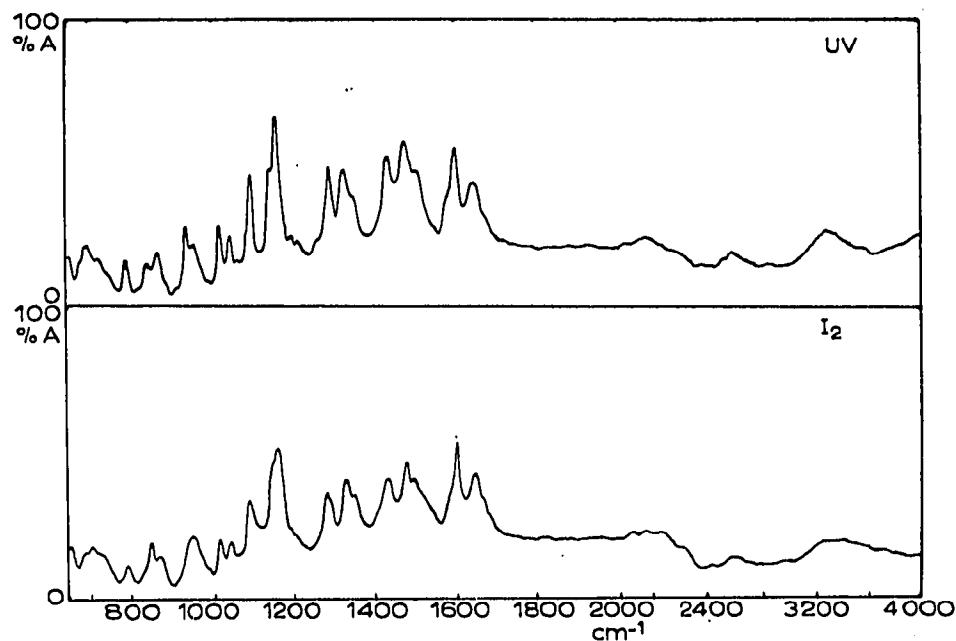
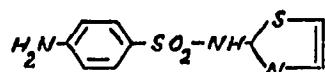
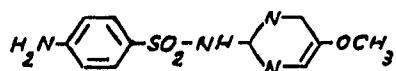


Fig. 4. Spektrum des Sulfathiazols. Oben: nach Sichtbarmachung im UV-Lichte; unten: nach Joddetektion.



SULFATHIAZOL



SULFAMETHOXYDIN

Änderungen sind im Gebiete von 900–1600 cm⁻¹, wie schon früher beschrieben wurde⁶. Ähnliche Änderungen zeigt das Spektrum dieses Stoffes bei Aufbewahrung einer wässrigen Lösung in geschlossenem Reagensglas im Tageslicht und bei Zimmertemperatur, was durch oxidative Einwirkung erklärt wurde (siehe Fig. 4).

DISKUSSION

In unserer Arbeit wurde der Einfluss des Jodes auf die durch Dünnschichtchromatographie getrennten und in Joddämpfen sichtbarmgemachten Stoffe mittels IR Spektroskopie studiert.

Es wurde die Stabilität der Additionskomplexe zwischen Jod und dem tertiären Stickstoff, bei den Stoffen von verwandter chemischer Struktur und zwar den Opiumalkaloiden, Strychninalkaloiden, Pyrazolon- und Pyrazolidin-Derivaten, Sulfonamiden und Phenothiazinderivaten, wie auch weiteren in unseren früheren Arbeiten angeführten Verbindungen, untersucht. Bei Joddetektion kommt es bei Stoffen mit aromatischem Charakter zu elektrophilen, bzw. oxidativen Reaktionen. Bei Stoffen mit aromatischen Methoxygruppen, wie z.B. Codein, Brucin usw. bindet sich das Jod irreversibel und es kommt durch oxidative Reaktion zur Entstehung von chinoiden Verbindungen. Der Einfluss des Schwefels in Heterozyklus, oder sterische Einflüsse, welche durch verzweigte Seitenkette der aromatischen Stoffe in Betracht kommen, erhöhen die Wahrscheinlichkeit von irreversibler Addition des Jodes auf den Stickstoff, da das Jod nicht nur den Stickstoff, aber auch den Schwefel in Heterosystem, wie das beim Promethazin und wahrscheinlich auch Sulfathiazol usw. ist, binden kann.

Diese Resultate, welche wir mittels der IR Spektroskopie der Stoffe nach chromatographischer Trennung und Joddetektion oder Sichtbarmachung im UV-Lichte erhalten haben, sind in Übereinstimmung mit den Schlüssen die wir nach quantitativer Auswertung dieser Stoffe gemacht haben.

Unsere Feststellungen in Fortsetzung einen früheren Untersuchung führten zur Erklärung der Unterschiede, die bei der Auswertung dieser Stoffe erzielt wurden.

ZUSAMMENFASSUNG

In unserer Arbeit wurde der Einfluss des Jodes nach Detektion der durch

Dünnschichtchromatographie getrennten und in Joddämpfen sichtbargemachten Verbindungen mittels infraroter Spektroskopie, studiert. Es wurde die Stabilität der Additionskomplexe zwischen Jod und dem tertiären Stickstoffe der auf diese Weise sichtbargemachten Verbindungen von verwandter chemischer Struktur und zwar der Opiumalkaloide, der Strychnosalkaloide, der Sulfonamide, Pyrazolon-, Pyrazolidin- und den Phenothiazinderivate, wie auch anderer studiert.

Bei Joddetektion kommt es bei Verbindungen mit aromatischem Charakter zu elektrophilen Substitutions-, respektive Oxidationsreaktionen. Bei Verbindungen mit Methoxygruppen am aromatischen Zyklus, wie dies beim Codein, Brucin, Papaverin und so weiter ist, bindet sich das Jod irreversibel und infolge oxidativer Reaktionen kommt es zur Entstehung von Bindungen chinoiden Charakters. Der Einfluss des Schwefels oder sterischer Verhältnisse, wie zum Beispiel einer verzweigten Seitenkette am aromatischen Ringe, erhöht die weitere Möglichkeit der irreversiblen Jodaddition, da das Jod ausser an den Stickstoff, sich auch an den Schwefel im Heterosystem, wie dies beim Promethazin, Sulfathiazol, usw. ist, binden kann.

Die Resultate dieser Studie sind im Einklang mit den Resultaten, welche wir bei den Verbindungen nach ihrer chromatographischen Trennung und quantitativen Auswertung erhielten.

LITERATUR

- 1 W. HEIDBRINK, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 66 (1964) 569.
- 2 R. P. A. SIMS UND J. A. G. LAROSE, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 39 (1962) 232.
- 3 H. GÄNSHIRT, *Arch. Pharm.*, 296 (1965) 129.
- 4 H. GÄNSHIRT UND J. POLDERRMAN, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 510.
- 5 J. S. MATTHEWS, A. L. PEREDA V. UND A. AGUILERA P., *J. Chromatog.*, 9 (1962) 331.
- 6 M. L. NICHAMAN, C. C. SWETTLEY, N. M. OLDHAM UND R. E. OLSON, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 484.
- 7 D. ABRAMSON UND M. BLECHER, *J. Lipid Res.*, 5 (1964) 628.
- 8 L. S. DE BOHNER, E. F. SOTO UND T. DE COHAN, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 513.
- 9 V. P. SKIPSKI, R. F. PETERSON UND M. BARCLAY, *Biochem. J.*, 80 (1964) 374.
- 10 M. ŠARŠÚNOVÁ UND NGUYEN KIM CHI, *Česk. Farm.*, 15 (1966) 522.
- 11 M. ŠARŠÚNOVÁ, V. SCHWARZ, E. FEKETEOVÁ UND M. PROTIVA, *Pharmazie*, 21 (1966) 219.
- 12 M. ŠARŠÚNOVÁ, B. KAKÁČ, V. MALÝ UND V. SCHWARZ, *Pharmazie*, 22 (1967) 752.
- 13 B. KAKÁČ, M. ŠARŠÚNOVÁ, TRAN-THI HOANG-BA UND J. VACHEK, *Pharmazie*, 5 (1967) 202.
- 14 M. ŠARŠÚNOVÁ, J. TÖLGYESY UND M. HRADIL, *Pharmazie*, 19 (1964) 336.
- 15 M. ŠARŠÚNOVÁ UND V. SCHWARZ, *Pharmazie*, 17 (1962) 527.
- 16 M. ŠARŠÚNOVÁ UND V. SCHWARZ, *Pharmazie*, 18 (1963) 34.
- 17 M. ŠARŠÚNOVÁ UND B. KAKÁČ, *Z. Anal. Chem.*, 245 (1969) 154.