

Über die Synthese von radioaktiv markiertem Echtgelb (1-¹⁴C-4-aminoazobenzol-3,4'-disulfonsaurem Natrium).

Von

O. Hromatka, L. Stentzel und E. Broda.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 31. Dezember 1954.)

Es wird die Herstellung von Echtgelb aus 1-¹⁴C-Anilin-HCl nach einer für das Verarbeiten kleiner Substanzmengen geeigneten Methode beschrieben.

In einer Abhandlung von *Zischka, Hromatka und Broda*¹ wurde über Stoffwechselversuche mit dem radioaktiv markierten Cancerogen Buttergelb² berichtet. Es erschien nun interessant, an Stelle dieses fettlöslichen Farbstoffes das wasserlösliche Echtgelb zu untersuchen, also das Natriumsalz der 4-Aminoazobenzol-3,4'-disulfonsäure. Echtgelb wird zu den nicht krebserregenden Farbstoffen gezählt und wird z. B. in Westdeutschland zur künstlichen Gelbfärbung von Lebensmitteln empfohlen. Um das Schicksal dieses Farbstoffes im tierischen Organismus zu verfolgen, wurde auch hier eine Markierung mit radioaktivem Kohlenstoff in einem der Benzolkerne für zweckmäßig gehalten. Dementsprechend wird in der vorliegenden Arbeit über die Herstellung von Echtgelb aus 1-¹⁴C-Anilinhydrochlorid berichtet. Das Ausgangsmaterial war mit einer Aktivität von 0,1 Millicurie pro 34,6 mg von der Firma *Tracerlab* bezogen worden.

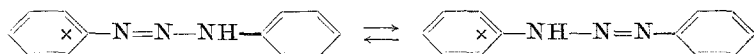
Wenn man Echtgelb in der üblichen, z. B. im Lehrbuch von *Fierz-David* und *Blangey*³ beschriebenen Weise herstellt, muß bei der Kupplung des aus C¹⁴-Anilin hergestellten Diazoniumsalzes mit nicht markiertem

¹ *W. Zischka, K. Karrer, O. Hromatka und E. Broda*, Mh. Chem. **85**, 856 (1954).

² *O. Hromatka und L. Schlager*, Mh. Chem. **85**, 29 (1954).

³ *H. E. Fierz-David und E. Blangey*, Grundlegende Operationen der Farbenchemie, 6. Aufl., S. 255—257. Wien: Springer-Verlag. 1946.

Anilin zunächst ein Diazoaminobenzol entstehen, das in einem prototropen Tautomeriegleichgewicht folgender Art steht⁴:



Wird nun die Umlagerung des Diazoaminobenzols in Aminoazobenzol in Gegenwart von Anilinhydrochlorid und Anilin vorgenommen, so tritt ein teilweiser Austausch von ¹⁴C-markiertem Anilin, das durch Acidolyse des Diazoaminobenzols entsteht, gegen nicht markiertes Anilin ein. Dies bedeutet einen wesentlichen Aktivitätsverlust während der Stufe der Umlagerung des Diazoaminobenzols⁵. Da es uns in diesem Falle nicht so sehr darauf ankam, ein Echtgelb von bestimmter und möglichst hoher Aktivität zu erhalten, als darauf, überhaupt aktiv markiertes Echtgelb, jedoch in Ansatzgrößen von zirka 25 mg Anilin, zu erhalten, gingen wir von der gebräuchlichen Umlagerungsmethode nicht ab und verwendeten bei der Umlagerung sogar wesentlich mehr Anilin als Lösungsmittel, als es für Ansätze in Grammengen in der Literatur beschrieben wird. Unsere Arbeitsweise bestand also in folgenden Reaktionsschritten, die im experimentellen Teile genau beschrieben werden:

Die Diazotierung eines Gemisches der Hydrochloride von ¹⁴C-Anilin und gewöhnlichem Anilin erfolgte nach der Vorschrift von *Hromatka* und *Schlager*². Zur Lösung des Diazoniumsalzes wurde nicht markiertes Anilinhydrochlorid und Natriumacetat zugefügt und das ausgefällte Diazoaminobenzol durch Extraktion mit Petroläther isoliert. Seine Umlagerung erfolgte mit nicht markiertem Anilinhydrochlorid in Anilin. Das Aminoazobenzol wurde als schwerlösliches Hydrochlorid abgeschieden, der Niederschlag in Alkohol gelöst und nach dem Eindampfen gewogen.

Die Ausbeuten von mehreren Parallelversuchen gleicher Ansatzgröße mit inaktivem Material lagen zwischen 88 und 92% d. Th., bezogen auf das zur Diazotierung eingesetzte Anilin · HCl. In Vorversuchen war aus diesem Hydrochlorid auch die Base hergestellt worden, die ohne weitere Reinigung den richtigen Schmp. und Mischschmp. zeigte.

Die Überführung des 4-Aminoazobenzols in seine 3,4'-Disulfonsäure wurde in mehreren Modellversuchen studiert. Es bewährte sich für die Ansatzgröße die Verwendung von 1,0 g 25%igem Oleum und Sulfurieren bei 40°. Die Abtrennung der Disulfonsäure von den großen Mengen Schwefelsäure gelang nicht durch chromatographische Trennung. Es wanderte zwar in langen, mit Cellulosepulver gefüllten Säulen die rote

⁴ Literatur bei *C. K. Ingold*, *Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, S. 544. New York: Cornell University Press, Ithaca, New York. 1953.

⁵ Literatur über die *Friswell-Green-* bzw. *Goldschmidt-Umlagerung* siehe *Ingold*, 1. c., S. 610ff.

Disulfonsäure etwas langsamer als die Schwefelsäure, aber für eine scharfe Trennung reichten die Adsorptionsunterschiede nicht aus. Gleiches Verhalten zeigten die mit Soda neutralisierten Lösungen.

Dagegen ließ sich auf der unterschiedlichen Löslichkeit des Natriumsalzes der Disulfonsäure und des Natriumsulfates in heißem absol. Alkohol eine ausreichende Trennung aufbauen. Die Extraktion erfolgte im *Soxhlet*-Apparat mit Glassintertiegel, da die Papierhülsen durch Adsorption des Farbstoffes Verluste verursachten. Nach dem Abdampfen des Alkohols wurde der Extraktionsrückstand in Wasser gelöst und auf Cellulosepulver chromatographiert. Dadurch wurde eine geringe Menge von aminoazobenzol-monosulfonsaurem Natrium am oberen Ende der Säule adsorbiert, während das Echtgelb, das nur mehr mit geringen Mengen Natriumsulfat verunreinigt war, beim Eluieren mit Wasser im Durchlaufchromatogramm isoliert wurde.

Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte kolorimetrisch im *Zeiss*-Stufenphotometer mit Filter S 47. Die Eichkurve wurde mit einem sehr reinen Echtgelb von bekanntem Gehalt an 4-aminoazobenzol-3,4'-disulfonsaurem Natrium aufgestellt. Für die freundliche Überlassung dieses Präparats haben wir der Direktion der Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, herzlich zu danken.

Im Versuch mit radioaktivem Anilinhydrochlorid betrug die Ausbeute 69,3% d. Th., gerechnet über die gesamte Dreistufenreaktion. Die Untersuchung der Radioaktivität, die nach nasser Verbrennung der Verbindung zu $^{14}\text{CO}_2$ im Gaszählrohr vorgenommen worden war⁶, gab $1,09 \cdot 10^{16}$ Zerfälle/Min., entsprechend einer Aktivität von 0,49 Mikrocurie. Wäre bei der Umlagerung von Diazoaminobenzol in Aminoazobenzol kein Aktivitätsverlust eingetreten, müßte das Endprodukt eine Aktivität von 6,22 Mikrocurie aufweisen. Der Aktivitätsverlust bei der Umlagerung beträgt somit zirka 92%.

Experimenteller Teil.

1. Diazoaminobenzol.

3,102 mg 1- ^{14}C -Anilin · HCl und 21,886 mg inaktives Anilin · HCl wurden nebeneinander auf einer Polythefolie eingewogen, diese zur Tüte gedreht, auf einen *Emich*-Becher aufgesetzt und die Salze mit 1 ml 2 n HCl nachgespült. Unter magnetischem Rühren und Kühlung auf 0° wurden 0,372 ml NaNO_2 -Lösung entsprechend 13,3 mg NaNO_2 zugetropft. Nach 5 Min. wurden 25 mg inaktives Anilin · HCl in 0,265 ml Lösung zugefügt und anschließend 1 g gepulvertes Natriumacetat · 3 H_2O . Nach 1stünd. magnetischem Rühren wurde der ausgefällte Farbstoff auf der Fritte des *Emich*-Bechers gesammelt und mit 3 ml Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde 4mal mit je 3 ml Petroläther ausgeschüttelt. Das im *Emich*-Becher befindliche Diazoaminobenzol wurde durch öftere Behandlung mit je 3 ml Petrol-

⁶ E. Broda und G. Rohringer, Z. Elektrochem. 58, 634 (1954).

äther aufgenommen, von der Fritte in ein Kölbchen gespült und mit den übrigen Petrolätherauszügen vereint im Vak. eingedampft.

2. 4-Aminoazobenzol.

Zum oben erhaltenen Diazoaminobenzol wurden 0,5 g. Anilin und 0,1 g. Anilin · HCl gegeben, $\frac{1}{2}$ Std. bei Raumtemp. und $\frac{3}{4}$ Stdn. bei 45° magnetisch gerührt und nach Zusatz von 3 ml 2 n HCl noch $\frac{1}{2}$ Std. weitergerührt. Das ausgefällte Aminoazobenzol · HCl wurde auf einer Sinternutsche G 2 gesammelt, 2mal mit je 1,5 ml 2 n HCl gewaschen und trocken gesaugt. Der Farbstoff wurde anschließend auf der Nutsche mit Alkohol gelöst, in einen 50-ml-Rundkolben filtriert und im Vak. zur Trockne gebracht. Ausbeute 92% d. Th.

3. Natriumsalz der 4-Aminoazobenzol-3,4'-disulfonsäure.

Das im Rundkolben befindliche Aminoazobenzol · HCl wurde mit 1 g 25%igem Oleum versetzt; nach Verschuß des Gefäßes mit Steigrohr und Chlorkalziumrohr wurde durch magnetisches Rühren bei Raumtemp. gelöst und ohne Rühren $5\frac{1}{2}$ Stdn. auf 40° erwärmt. Nach Stehen über Nacht wurde soviel Eis zugegeben, daß das Volumen ungefähr 20 ml betrug. Die trübe, dunkelrote Lösung wurde mit gesättigter Sodalösung bis zur Bildung einer klaren, gelben Lösung versetzt. Nun wurde am Wasserbad zur Trockne gedampft, der Rückstand feinst gepulvert und so vollständig als möglich in einen kleinen Glassintertiegel gebracht, der den Einsatz eines Soxhlet-Apparates bildete. Die Extraktion mit Alkohol wurde solange fortgesetzt, bis die Extrakte farblos abliefen. Hierbei ist aber der von Na_2SO_4 umhüllte Anteil des Echtgelb noch nicht in Lösung gegangen. Deshalb wurden die im Glassintertiegel verbliebenen Salze in Wasser gelöst, die gelbe Lösung im Vak. eingedampft und die Extraktion mit Alkohol nochmals wiederholt.

Die beiden Extrakte wurden vereinigt und im Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in 10 ml Wasser gelöst, auf eine Cellulosepulversäule von 15 cm Länge und 1,8 cm Durchmesser gebracht und mit Wasser eluiert. Während am Kopfe der Säule eine gelbe Zone des aminoazobenzol-monosulfonsauren Natriums zurückblieb, wurde das Echtgelb vollständig eluiert und im 100-ml-Meßkolben gesammelt.

1 ml dieser Lösung wurde zur kolorimetrischen Bestimmung auf 36 ml verdünnt. Diese Verdünnung erwies sich als zweckmäßig, weil dadurch eine ähnliche Farbstoffkonzentration erreicht wurde, wie sie auch bei der Aufstellung der Eichkurve mit dem Vergleichspräparat angewendet worden war. Die Messung wurde bei Schichtdicke 1 cm und Filter S 47 vorgenommen. Durch Umrechnung wurde festgestellt, daß in den erhaltenen 100 ml Gesamtlösung 54,0 mg Echtgelb enthalten waren, entsprechend 69,3% d. Th., bezogen auf das eingesetzte radioaktive Anilin · HCl.

In der auf 36 ml verdünnten Lösung wurde auch die Radioaktivität bestimmt. Sie betrug, auf die 100 ml Gesamtlösung berechnet, $1,09 \cdot 10^6$ Zerfälle/Min. Die Gesamtausbeute an Echtgelb hat demnach eine Aktivität von 0,49 Mikrocurie.

Wir danken der *Sonnleitner*-Stiftung der Österr. Akademie der Wissenschaften und dem *Damon-Runyon*-Fonds für Krebsforschung für großzügige finanzielle Unterstützung.