

Perhydrierung von natürlichem Kryptoxanthin. 20 mg natürliches Kryptoxanthin werden in einer Lösung von 20 cm³ Essigester und 20 cm³ Eisessig unter Verwendung von Platinoyd 24 Std. bei Raumtemperatur hydriert. Das in üblicher Weise gewonnene Rohprodukt ist ein farbloses Öl; $[\alpha]_D^{21} = -16,1^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 0,96$ in Chloroform).

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. H. Waldmann) ausgeführt. Die IR.-Spektren hat Dr. L. Chopard-dit-Jean in unserer physikochemischen Abteilung (Leitung Dr. M. Kofler) aufgenommen.

SUMMARY.

Cryptoxanthin has been synthesized from acetoxy- β -C₁₉-aldehyde and β -C₂₁-acetylenic carbinol following the scheme C₁₉ + C₂₁ = C₄₀. The C₁₉-aldehyde was obtained from keto-iso-C₁₄-aldehyde *via* the acetoxy- β -C₁₄- and -C₁₆-aldehydes. The optically inactive synthetic cryptoxanthin has the same melting point as the natural product, and the absorption spectra of the solutions are identical. Starting with the acetoxy- β -C₁₉-aldehyde, an improved synthesis of zeaxanthin was developed, following the scheme C₁₉ + C₂ + C₁₉.

Chemische Forschungsabteilung
der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel.

56. La (p-azophényl-phényl)-4-semicarbazide et son emploi en chimie analytique

par M. Winter, E. Demole et E. Sundt.

(25 I 57)

Pour nos recherches sur les aldéhydes et les cétones présents dans les fruits, nous devons disposer d'un réactif sensible, conduisant à des dérivés cristallisés aisément purifiables par chromatographie – laquelle est plus aisée avec des dérivés colorés – et susceptibles de régénérer facilement par hydrolyse l'aldéhyde ou la cétone fixés. Les dérivés de la dinitro-2,4-phénylhydrazine bien connue ne satisfont pas à la dernière condition, leur hydrolyse exigeant des conditions spéciales¹). D'autre part, certaines dinitro-2,4-phénylhydrazones forment des isomères²), ce qui peut compliquer les séparations chromatographiques. En outre, la préparation des dérivés en milieu aqueux exige un pH fortement acide, très gênant dans notre cas.

Parmi les réactifs du groupe carbonyle remplissant les conditions ci-dessus, notre choix s'est porté sur la (p-azophényl-phényl)-4-semi-

¹) J. Demaecker & R. H. Martin, *Nature* **173**, 266 (1954); C. Djerassi, *J. Amer. chem. Soc.* **71**, 1003 (1949); R. Robinson, *Nature* **173**, 541 (1954).

²) L. I. Braddock et collab., *Analyt. Chemistry* **25**, 301 (1953); B. E. Gordon et collab., *ibid.* **23**, 1754 (1951).

carbazide (désignée par la suite par AZPS). Une publication de *M. U. Tsao & E. Van Dyke*³⁾ sur une séparation de trioses au moyen de leurs dérivés AZPS nous incite à publier nos propres expériences.

L'AZPS est facile à préparer d'après *F. Bohlmann*⁴⁾ ou d'après *M. U. Tsao & E. van Dyke*³⁾. Ses solutions (aqueuses, acides ou organiques) s'altèrent lentement en donnant naissance à des substances non identifiées, aisément séparables par chromatographie (subst. X). En dissolvant le réactif au moment de l'emploi, on élimine cet inconvénient, qui apparaît d'ailleurs aussi avec d'autres semicarbazides substituées en 4, par exemple l'o,p-dinitrophényl-4-semicarbazide.

Les dérivés AZPS se forment avec de bons rendements par les méthodes classiques. Avec les aldéhydes et cétones inférieurs, la réaction est presque instantanée, et les rendements sont excellents. Certaines cétones, comme l'acétophénone, réagissent moins facilement. Un cas extrême, la jasmone, ne nous a donné aucune réaction. Nous avons élaboré une technique spéciale pour déceler et précipiter de faibles quantités de corps cétoniques ou aldéhydiques en solution aqueuse, en opérant dans un milieu modérément acide (pH 2–2,3) (voir partie expérimentale). Dans le cas de solutions trop diluées pour qu'il y ait précipitation, nous isolons les traces de dérivés AZPS formés, par extraction au chloroforme ou à l'éther. La séparation entre réactif et dérivé se fait au moyen de l'un des deux procédés décrits plus loin, et les identifications ultérieures sont effectuées par chromatographie sur papier. Cette technique nous permet par exemple d'isoler et d'identifier l'aldéhyde hexylique à une concentration de 1 mg par litre.

Propriétés des dérivés AZPS.

Ces dérivés (voir tableau), obtenus purs après cristallisation dans les dissolvants usuels (alcool, benzène ou hexane) sont fortement colorés (du jaune au rouge) et stables. Au-dessus de 200°, ils se transforment plus ou moins vite en produits peu fusibles; de ce fait, il est impossible d'indiquer un point de fusion net pour les dérivés fondant au-dessus de cette température, la fusion étant accompagnée d'une décomposition. Nous avons pu néanmoins reproduire les F. de façon satisfaisante, en prenant soin de ne mettre la substance dans le bloc qu'au moment où il a atteint une température inférieure de 20° au point de fusion, et en chauffant rapidement. Sur le banc *Kofler*, on observe des F. (avec décomposition) plus élevés, mais qui nous paraissent plus difficiles à reproduire. Les températures de fusion des mélanges de dérivés sont généralement inférieures à celles des constituants purs.

³⁾ J. Amer. chem. Soc. **77**, 6693 (1955).

⁴⁾ Chem. Ber. **84**, 490 (1951).

L'existence de formes isomériques, signalée pour les dinitro-2,4-phénylhydrazones²⁾, n'a pas été observée jusqu'à présent avec les dérivés AZPS.

A température modérée, l'action des acides forts, minéraux ou organiques, provoque aisément la scission des dérivés AZPS avec régénération quantitative de la substance carbonylée.

Absorption des dérivés AZPS dans l'UV. et l'IR.

F. Bohlmann⁴⁾ a partiellement étudié et illustré l'absorption dans l'UV. de quelques dérivés. Ces spectres offrent un intérêt analytique évident, en permettant de distinguer facilement certains types de (p-azophényl-phényl)-4-semicarbazones. En particulier les corps dont le groupe carbonyle est conjugué avec une double liaison ou un cycle aromatique donnent des dérivés dont l'absorption UV. diffère notablement de celle de l'ensemble de la série aliphatique saturée (voir fig. 1).

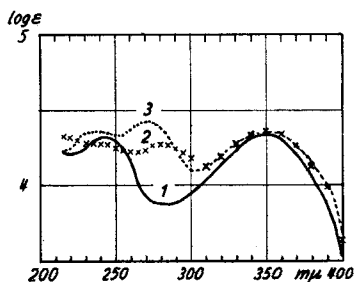


Fig. 1.

Absorption dans l'UV. de (p-azophényl-phényl)-4-semicarbazones dans l'alcool méthylique; cuves de 10 mm (spectrographe *Beckman*, modèle DU).

courbe 1: dérivé du n-hexanal ($0,370 \cdot 10^{-4}$ m.)

courbe 2: dérivé de l'acétophénone ($0,307 \cdot 10^{-4}$ m.)

courbe 3: dérivé de l'hexène-2-al ($0,208 \cdot 10^{-4}$ m.)

Maxima: courbe 1: env. 245 mμ; log ε = 4,32; 350 mμ; log ε = 4,33.

Maxima: courbe 2: env. 280 mμ; log ε = 4,28; 350 mμ; log ε = 4,37.

Maxima: courbe 3: env. 270 mμ; log ε = 4,42; 350 mμ; log ε = 4,36.

Dans l'IR. les caractéristiques spectrales de chaque dérivé sont quelquefois peu marquantes, mais elles sont toujours suffisamment nettes malgré tout pour assurer leur identification par comparaison directe avec un échantillon connu.

Résolution et identification des mélanges de (p-azophényl-phényl)-4-semicarbazones.

Pour nos problèmes de recherches, nous avons impérieusement besoin de procédés précis permettant de fractionner des mélanges complexes de dérivés, tout en requérant peu de substance. Notre technique analytique est la suivante :

A. *Par un test préliminaire* avec H_3PO_4 50 %, effectué sur quelques parcelles de substance, nous contrôlons avec soin la présence possible d'un excès de réactif libre, qui se manifeste par l'apparition immédiate d'une coloration rouge-orangé. Une coloration plus pâle, et n'apparaissant qu'après environ 10 secondes indiquera la présence de dérivés AZPS d'aldéhydes et de cétones de petit poids moléculaire (aldéhyde acétique, acétone), les dérivés de corps carbonylés de p. m. élevé ne donnant une coloration qu'à chaud. Les dérivés bruts, obtenus par précipitation en milieu aqueux, peuvent facilement contenir des traces de réactif libre, parfois accompagnées par un produit d'altération non identifié (subst. X). La présence de réactif libre s'avère particulièrement gênante lors de la séparation ultérieure des mélanges. On peut l'éliminer par deux procédés: a) Dissoudre 10 mg de mélange dans 0,5 à 1 ml d'acide formique à 98 % et ajouter 3 à 5 volumes d'eau. Les semicarbazones précipitent et seule l'AZPS reste en solution. b) Chromatographier sur oxyde d'aluminium (voir partie expérimentale).

B. *Chromatographie d'adsorption sur colonne*: L'oxyde d'aluminium sépare très bien le réactif de ses dérivés; par contre ceux-ci sont fractionnés avec plus de précision sur des colonnes d'acide silicique (*Mallinckrodt*). Pour préparer de grandes colonnes avec ce dernier support, une nouvelle technique de remplissage à l'aide d'un Vibromixer a été utilisée avec succès (voir partie expérimentale). Sur l'acide silicique les dérivés AZPS aliphatiques saturés sont retenus dans l'ordre de leur poids moléculaire, les dérivés à p. m. les plus élevés étant adsorbés le moins énergiquement. Les dérivés aliphatiques des aldéhydes ou cétones insaturés en $\alpha-\beta$ sont retenus plus fortement, de même que les dérivés aromatiques. Après un développement «standard», la mesure du déplacement des bandes colorées permet de caractériser directement de nombreux dérivés. Ces chromatogrammes «standard» sont hautement reproductibles et peuvent être obtenus avec 0,25 à 0,5 mg de substance par constituant.

Nous avons constaté récemment que la chromatographie sur acide silicique n'est pas uniformément applicable. Il semble qu'au-delà d'une certaine activité-limite du support, les dérivés AZPS adsorbés se transforment lentement. Ces altérations augmentent proportionnellement à la durée de contact avec le support. Ainsi, sur un support très actif⁵⁾ (acide silicique *Mallinckrodt* tamisé, 140–270 mesh), on note un début de transformation du dérivé AZPS de l'hexanal, qui est parfaitement stable sur un support SiO_2 , 100 mesh. L'acétone-AZPS et le réactif AZPS lui-même s'altèrent déjà sur le support 100 mesh. La séparation d'un mélange de dérivés AZPS des aldéhydes acétique, hexanoïque, hexénoïque, benzoïque et de l'acétone, décrite

⁵⁾ E. W. Malmberg, *Analyt. Chemistry* **27**, 840 (1955).

dans la partie expérimentale, illustre bien ces faits. Dans ce chromatogramme, la totalité de l'acétone-AZPS (11% du mélange) «disparaît», tandis que des fractions «lourdes» de 1,7% (aldéhyde benzoïque et hexanal) ont pu être identifiées. Par chromatographie de partage sur papier, nous avons pu démontrer que l'AZPS subit une dégradation en p-amino-azobenzène, corps qui est également un des produits de transformation du dérivé acétone-AZPS. Ceci nous fait supposer que la première étape de l'altération des dérivés instables est une scission en AZPS et substance carbonylée originale. Nous avons en effet observé l'apparition d'odeurs aldéhydiques et cétoniques⁶⁾ lors de la purification chromatographique de certains dérivés AZPS.

C. *Chromatographie de partage sur papier.* Le système décrit dans la partie expérimentale nous a donné d'excellents résultats avec les dérivés aliphatiques. Quant aux dérivés aromatiques, leurs Rf sont

Chromatogrammes de dérivés AZPS.

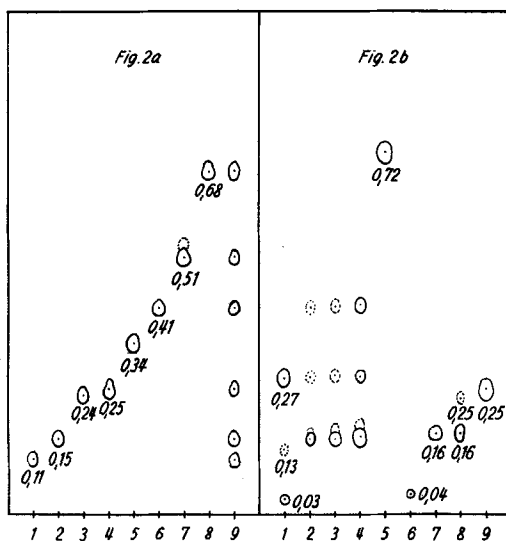


Fig. 2a.

- 1 formaldéhyde, 5 γ
- 2 acétaldéhyde, 5 γ
- 3 propanal, 5 γ
- 4 acétone, 5 γ
- 5 butanal, 5 γ
- 6 hexène-2-al, 5 γ
- 7 hexanal 5 γ
- 8 nonanal, 5 γ
- 9 mélange de 1, 2, 4, 6, 7 et 8

Fig. 2b.

- 1 réactif AZPS
- 2 mélange: acétaldéhyde 85%
acétone 5%
hexène-2-al 10% } 5 γ
- 3 même mélange, 10 γ
- 4 même mélange, 20 γ
- 5 méthylhexylcétone
- 6 aldéhyde salicylique
- 7 benzaldéhyde
- 8 aldéhyde cinnamique
- 9 p-amino-azobenzène

⁶⁾ M. Winter, travaux non publiés.

peu différenciés; ces résultats sont pourtant sensiblement meilleurs que ceux obtenus avec les dinitro-2,4-phénylhydrazones aromatiques⁷⁾. Le système proposé par *M. U. Tsao & E. van Dyke*³⁾ pour leurs dérivés AZPS de trioses n'était pas applicable à notre cas.

Dans la figure 2, nous reproduisons quelques chromatogrammes caractéristiques; les Rf peuvent différer légèrement d'un chromatogramme à l'autre; ils sont influencés surtout par le degré d'humidité. L'AZPS seule donne en général deux taches; parfois, pour des causes inconnues, on en observe jusqu'à cinq. Certains dérivés aromatiques forment aussi deux taches. La sensibilité de la méthode est très bonne; ainsi une fraction de 0,25 γ d'acétone-AZPS dans 5 γ d'un mélange de trois composés est encore nettement décelée (voir fig. 2b).

Nous pensons qu'à l'heure actuelle les (p-azophénylphényl)-4-semicarbazones peuvent, dans certains cas, compléter de façon très utile la gamme des réactifs pour les substances carbonylées. Dans le but d'obtenir des réactions plus énergiques et d'améliorer la stabilité des dérivés, on pourrait envisager la synthèse de (p-azophényl-phényl)-4-semicarbazides substituées sur un des noyaux aromatiques.

Partie expérimentale.

(Partiellement avec la collaboration technique de *P. Enggist*). — Les F. déterminés dans le bloc ne sont pas corrigés. Tous les dissolvants utilisés ont été purifiés spécialement.

1. (*p*-Azophényl-phényl)-4-semicarbazide (AZPS). La préparation selon *M. U. Tsao & E. van Dyke*³⁾ donne un meilleur rendement (environ 70%) et un produit plus pur que celle d'après *Bohlmann*⁴⁾: aiguilles orangées (alcool) ou paillettes orangées, brillantes (diméthylformamide-hexane). Sur le banc de *Kofler*, l'AZPS a un double point de fusion: 210°, suivi d'une solidification immédiate et d'une nouvelle fusion-décomposition à 280°. Dans le bloc *Maquenne* préchauffé à 215°, on observe une décomposition-fusion à 225° environ, et le chauffage ultérieur amène une lente carbonisation. Mis dans un bloc chauffé à 180°, l'AZPS subit un noircissement progressif avec décomposition à partir de 270°.

$C_{13}H_{13}ON_5$ (255) Calculé C 61,16 H 5,13% Trouvé C 61,09 H 5,33%

2. Exemples de préparation des (*p*-azophényl-phényl)-4-semicarbazones (les analyses et les rendements sont indiqués dans le tableau).

a) *En solution organique*: Dissoudre 260 mg (1,02 mmole) de réactif dans 30 ml d'alcool bouillant, contenant 1% d'acide acétique, puis ajouter 100 mg (1,0 mmole) de n-hexanal en solution dans quelques ml d'alcool. Lors du refroidissement, le dérivé cristallise avec un rendement de 92%; il est pur après une recristallisation dans l'alcool.

b) *En solution aqueuse diluée*: Dissoudre 127 mg (0,5 mmole) de réactif dans 7,5 ml d'acide formique 98% pur, compléter à 10 ml par addition d'eau. Verser cette solution dans 1000 ml d'eau contenant 46 mg (0,4 mmole) de n-heptanal pur, en agitant doucement. Le pH de la solution atteint 2,3. Le dérivé précipite presque immédiatement, et toute odeur aldéhydique disparaît en dix min. environ. On isole par filtration 142 mg de n-heptanal-AZPS (100% de la théorie), obtenue parfaitement pure après une recristallisation dans l'alcool.

0,5 mmole de réactif constitue la quantité maximum soluble dans les conditions indiquées. En présence de concentrations supérieures à 0,0005-m. de substance carbonylée, la solution de réactif est ajoutée par portions successives.

⁷⁾ *E. Sundt*, travaux non publiés.

Dérivés AZPS.

Aldéhyde ou cétone de départ	Dérivé AZPS, formule	Dissolvant pour la préparat.	F. °C (bloc)	Rdt %	C % calc./trouvé		H % calc./trouvé	
Formaldéhyde . . .	C ₁₄ H ₁₃ ON ₅	—	215 décomp.	—	—		—	
Acétaldéhyde . . .	C ₁₅ H ₁₅ ON ₅	aq. ^{a)}	212—216 décomp.	100	64,04	63,86	5,37	5,48
n-Propanal . . .	C ₁₆ H ₁₇ ON ₅	aq.	180—182	—	65,06	65,28	5,80	5,64
n-Butanal . . .	C ₁₇ H ₁₉ ON ₅	alc. ^{b)}	168—171	74	66,00	66,12	6,19	6,32
iso-Butanal . . .	C ₁₇ H ₁₉ ON ₅	—	184,5/185,5	—	—		—	
iso-Valéral . . .	C ₁₈ H ₂₁ ON ₅	—	174—175	—	—		—	
n-Hexanal . . .	C ₁₉ H ₂₃ ON ₅	alc.	182—185	100	67,63	67,53	6,87	6,92
n-Heptanal . . .	C ₂₀ H ₂₅ ON ₅	aq.	177,5—179	101	68,35	68,60	7,17	7,37
n-Octanal . . .	C ₂₁ H ₂₇ ON ₅	alc.	179—181	90	69,01	69,11	7,45	7,25
n-Nonanal . . .	C ₂₂ H ₂₉ ON ₅	alc.	134,5—136	75	69,63	69,48	7,70	7,73
Crotanal . . .	C ₁₇ H ₁₇ ON ₅	—	211—212	—	—		—	
Hexène-2-al . . .	C ₁₉ H ₂₁ ON ₅	alc.	181—183	70	68,04	67,90	6,31	6,42
Benzaldéhyde . . .	C ₂₀ H ₁₇ ON ₅	alc.	206—208	89	69,95	69,77	4,99	4,98
Aldéhyde cinnamique. . .	C ₂₂ H ₁₉ ON ₅	alc.	225—226,5	76	71,52	71,41	5,18	5,26
Aldéhyde salicylique . . .	C ₂₀ H ₁₇ O ₂ N ₅	alc.	229—234	91	66,84	67,05	4,77	4,97
Aldéhyde anisique . . .	C ₂₁ H ₁₉ O ₂ N ₅	alc.	217—219	78	67,54	67,49	5,13	5,49
Furfural	C ₁₈ H ₁₅ O ₂ N ₅	—	192—195,5	—	—		—	
Acétone	C ₁₆ H ₁₇ ON ₅	alc.	211—213	94	65,05	64,80	5,80	6,00
Butanone	C ₁₇ H ₁₉ ON ₅	—	174—176	—	66,00	66,07	6,19	6,15
Méthyl-hexyl-cétone	C ₂₁ H ₂₇ ON ₅	alc.	137—148 ^{d)}	—	69,01	69,23	7,45	7,28
Diacétyl (2 carbonyles)	C ₃₀ H ₂₈ O ₂ N ₁₀	aq.	décomp. 220	100	64,27	63,57	5,03	5,01
α-Ionone	C ₂₆ H ₃₁ ON ₅	acét. ^{c)}	229—231	92	72,69	72,51	7,27	7,18
Acétophénone	C ₂₁ H ₁₉ ON ₅	aq.	214—216	81	70,57	69,71	5,36	5,50

^{a)} Acide formique dilué.

^{c)} Acide acétique dilué.

^{b)} Alcool - acide acétique.

^{d)} F. 138° mr banc *Kofler*.

Pour chaque aldéhyde ou cétone il existe une concentration critique au-dessous de laquelle il n'y a plus de précipitation dans cette solution d'acide formique dilué; par exemple:

aldéhyde acétique: env. 5 mg/litre (0,1-mmole);

acétone: env. 29 mg/litre (0,5-mmole);

hexanal: env. 5 mg/litre (0,05-mmole).

c) En solution aqueuse très diluée (ne précipitant plus): Préparer comme ci-dessus une solution formique de 100 mg de réactif (0,4 mmole), puis la verser dans 1000 ml d'eau spécialement purifiée (eau pour catalyses, redistillée sur KMnO₄) contenant 5 mg d'hexanal (0,05 mmole) et 11,6 mg d'acétone (0,2 mmole). Après 60 heures à 5°, un léger précipité se forme, composé de produits d'altération du réactif (surtout subst. X). Une quadruple extraction au chloroforme (4 × 50 ml, purifié par traitement avec de la dinitro-2,4-phényl-

hydrazine) livre un extrait neutre de 63,4 mg (cristaux orangés), auquel on applique le traitement à l'acide formique pour éloigner l'AZPS libre. On obtient deux précipités successifs: *précipité A*, par adjonction de 1 volume d'eau: 14,5 mg; *précipité B*, par adjonction de 5 volumes d'eau: 24 mg. Par chromatographie sur papier, on vérifie que le précipité A est bien le dérivé de l'hexanal, accompagné de traces du dérivé de l'acétone (rendement 88% de la théorie, calculé sur l'hexanal). Le précipité B représente le dérivé de l'acétone, accompagné de traces du dérivé de l'acétaldéhyde (provenant de l'eau ou du chloroforme utilisés⁸⁾) et du réactif libre.

On a traité de façon analogue une solution aqueuse contenant 1 mg d'hexanal par litre. Déjà dans l'extrait chloroformique brut on a pu déceler par chromatographie sur papier le dérivé de l'hexanal, qui a été purifié ensuite par chromatographie sur acide silicique.

3. *Hydrolyse des dérivés AZPS*. 30 mg d'acétone-AZPS, placés dans un petit ballon contenant 15 ml d'eau et 2 g d'acide oxalique, sont soumis à un entraînement à la vapeur. On recueille un premier distillat de 15 ml, qui fournit avec la dinitro-2,4-phénylhydrazine 22 mg du dérivé de l'acétone (rdt 89%).

Dans le cas de dérivés AZPS moins solubles, on effectue l'hydrolyse en présence d'acide lactique à 50% qui sert à la fois de dissolvant et de catalyseur. L'entraînement de la substance carbonylée peut se faire à la vapeur d'eau (sous pression ordinaire ou réduite) ou uniquement par un courant de gaz inerte (azote). Traitée selon ce dernier mode opératoire, l'hexène-2-al-AZPS est hydrolysable quantitativement (l'hexène-2-al libéré est recueilli directement, sous forme de sa dinitro-2,4-phénylhydrazine; l'opération s'effectue à 80—90°).

4. *Chromatographie sur colonne, exemples*: a) *Sur l'oxyde d'aluminium*. Une solution des dérivés AZPS des aldéhydes suivants: de l'aldéhyde acétique, 3,5 mg; de l'aldéhyde propionique, 7 mg; de l'hexanal, 3 mg; et de 5 mg d'AZPS libre, dans 40 ml benzène, est versée sur une colonne d'oxyde d'aluminium (1 g, *Woelm*, neutre, activité II/III). Par élution on obtient les fractions suivantes: I, 50 ml benzène, 4,6 mg; II, 30 ml benzène + 2⁰/₀₀ C₂H₅OH, 8,5 mg; III, 30 ml benzène + 5⁰/₀₀ C₂H₅OH, 0,2 mg; IV, 30 ml benzène + 1% C₂H₅OH, 4 mg. La colonne est devenue pratiquement incolore. Identification des substances éluées: I: mélange des dérivés de l'hexanal et du propanal; II: mélange des dérivés du propanal et de l'acétaldéhyde; rendement I + II: 13,1 mg = 97% en dérivés AZPS; III + IV: réactif AZPS.

Dans ces chromatographies, l'élution doit se faire promptement. En effet, après 24 h, l'AZPS libre s'altère déjà, en formant une bande jaune facilement éluable par des dissolvants non polaires. La chromatographie sur papier de cette zone donne la tache caractéristique du p-amino-azobenzène.

b) *Sur l'acide silicique*. Nous avons utilisé l'acide silicique *Mallinckrodt*, 100 mesh; on a fait varier le pourcentage total d'eau de 12 à 20%; avec 16% d'eau on obtient une bonne activité moyenne. Le remplissage des colonnes est une opération délicate. Pour obtenir des zones colorées horizontales et nettes, l'adsorbant doit être parfaitement homogène et ne contenir aucune bulle d'air.

Mode de remplissage des petites colonnes (colonne «standard»): Préparer une suspension homogène de 6 g d'adsorbant (acide silicique *Mallinckrodt* 100 mesh, 12% H₂O) dans 15 ml de solvant (usuellement un mélange benzène-acétate d'éthyle 1:1), la verser rapidement dans un tube à chromatographie de 12 × 200 mm dont on tapote vivement l'extérieur. Un brassage mécanique du contenu de la colonne (opération ordinairement superflue) élimine les bulles d'air rétives. En appliquant une légère surpression au sommet de la colonne, on chasse l'excès de solvant et provoque le tassement graduel de l'adsorbant dont la hauteur se stabilise finalement entre 90 et 100 mm.

⁸⁾ La préparation d'eau et de dissolvants organiques totalement exempts de dérivés carbonyliques fait encore l'objet de recherches dans nos laboratoires.

Ces colonnes nous ont été utiles pour faire des analyses préliminaires rapides sur des mélanges de dérivés (procédé de chromatographie sans élution). Exemple: une solution des dérivés de l'acétaldéhyde et de l'hexanal (0,5 mg de chaque dans 0,5 ml de benzène-acétate d'éthyle 1:1) est introduite avec précaution sur la colonne. Le développement du chromatogramme, effectué avec le même solvant sous légère surpression, arrive à terme après écoulement total de 6 ml d'effluent au bas de la colonne. On constate l'existence de deux bandes colorées sur l'adsorbant: celle du dérivé acétaldéhydique (à 33 mm du haut, largeur 9 mm) et celle du dérivé de l'hexanal (à 62 mm du haut, largeur 11 mm).

La résolution de certains mélanges, par la même voie, offre plus de difficultés. Par exemple:

1. On ne peut séparer l'un de l'autre les dérivés de l'acétaldéhyde et de l'acétone qu'à la condition d'effectuer la chromatographie sur 0,25 mg de mélange seulement (les bandes colorées restent cependant bien visibles).

2. La séparation (partielle) des dérivés de l'hexanal et de l'hexène-2-al n'est possible que par emploi d'un acide silicique 140—270 mesh, en présence d'éluants de faible polarité (benzène, isoocétane).

La subst. X (impureté formée par altération des solutions aqueuses d'AZPS) est retenue de façon caractéristique (bande de 3 mm de largeur à 3 mm du haut de la colonne), ce qui permet son élimination intégrale.

La préparation de colonnes plus grandes (avec 50—2000 g d'acide silicique) requiert l'introduction progressive de la suspension adsorbante (continuellement brassée) sur la pièce vibrante d'un agitateur électro-magnétique (Vibro Mixer[®]), placée dans le tube à chromatographie, et avec laquelle on suit la montée de la suspension.

Dans le cas des chromatogrammes par élution, une même colonne d'acide silicique peut être employée pour plusieurs séparations. Comme dissolvant pour l'élution nous avons utilisé l'hexane, le benzène, l'acétate d'éthyle, le chloroforme, l'alcool ou leurs mélanges. Le passage d'un dissolvant à un autre doit être très graduel, sinon les colonnes se fissurent. Une fois l'élution terminée on redonne au support son activité initiale en le rinçant très progressivement avec des solvants moins polaires.

Exemple d'une séparation de dérivés AZPS par chromatographie d'élution: Introduire sur une colonne de 50 g d'acide silicique (Mallinckrodt, 100 mesh, 20% H₂O) 25 mg d'un mélange de semicarbazones dissous dans 8,5 ml benzène (dérivés AZPS de l'aldéhyde benzoïque: 0,4 mg; du hexanal: 0,4 mg; de l'acétone: 2,8 mg; de l'aldéhyde acétique: 8,5 mg; de l'hexanal: 12,9 mg). Développer le chromatogramme avec du benzène; on obtient 4 zones colorées qui sont éluées avec un mélange benzène-acétate d'éthyle, 95:5. Plusieurs interruptions ont porté à 8 jours la durée totale de la chromatographie. Résultat:

<i>Éluats</i>	<i>ml solvants</i>	<i>mg subst.</i>	<i>Identification</i>
1	100	1,6	hexanal + très peu de p-amino-azobenzène
2	170	1,6	hexanal + hexénal
3	100	8	hexénal pur
4	530	4,8	hexénal + aldéhyde benzoïque
5	100	8,8	acétaldéhyde

Les éluats 2—4 contiennent également des traces de p-amino-azobenzène, et les éluats 4 et 5, des traces d'impuretés non identifiées. Les substances éluées sont identifiées par chromatographie sur papier. Même avec des chromatogrammes de 2 mg (chromatographie préparative sur une ligne de 13 cm), nous n'avons décelé aucune trace du dérivé de l'acétone, qui s'est donc décomposé quantitativement. Dans des chromatogrammes analogues, mais obtenus avec un mélange à teneur en acétone-AZPS plus élevée (20%), la décomposition n'a été que partielle et une importante proportion en a été retrouvée dans les éluats.

[®] A. G. für Chemie-Apparatebau, Zürich.

5. *Chromatographie de partage sur papier*. Pour des quantités de substance allant jusqu'à 10 γ , nous utilisons le papier *Whatman* N° 7, et pour des quantités supérieures (jusqu'à 50 γ), le *Whatman* plus épais N° 3. Phase stationnaire: diméthylformamide (DMF, *Merck*); phase mobile: mélange cyclohexane-cyclohexène, 5:3, saturé de DMF; développement descendant à 25°. L'imprégnation des papiers se fait avec un mélange de DMF-acétone, 1:1; ensuite les papiers sont brièvement séchés à l'air. Appliquer la substance en solution chloroformique pour les dérivés habituels, ou en solution dans le DMF pour les dérivés peu solubles ($c = 1$ mg/ml). Il est primordial que ces solutions soient fraîches. Le conditionnement soigneux des papiers est également de première importance pour la réussite des chromatographies. La cuvette (38 \times 30 \times 54 cm (hauteur)) a ses deux parois latérales (30 \times 54 cm) recouvertes de papiers-filtres plongeant dans des cristallisoirs remplis de phase mobile. Une des grandes parois (38 \times 54 cm) est recouverte de façon identique par un papier-filtre plongeant dans un cristallisoir contenant du DMF saturé de phase mobile. Au fond de la cuvette se trouvent deux autres cristallisoirs contenant également du DMF, saturé de phase mobile. Les papiers préparés sont conditionnés dans cette atmosphère à 25° pendant les 12 h précédant la chromatographie. Sur papier *Whatman* N° 7, la migration de la phase mobile est de 40 cm au bout de 4-5 h. Les taches obtenues sont directement visibles jusqu'à 0,5 γ , grâce à la couleur intense des dérivés AZPS.

En lumière UV. et sur un fond de papier traité à la fluorescéine, les dérivés AZPS forment des taches foncées, et deviennent visibles même en traces infimes. Le traitement suivant permet de nuancer ou de renforcer jusqu'à un certain point la coloration des taches: pulvériser très légèrement sur les papiers une solution aqueuse de KMnO_4 à 0,1%, laisser sécher à l'air, pulvériser ensuite légèrement une solution de H_2SO_4 à 10% et sécher à nouveau. On obtient des taches orangées, roses ou rouges, alors que le p-aminoazobenzène donne une tache rouge-violet caractéristique.

Pour les dérivés AZPS qui migrent difficilement sur le papier, nous avons mis au point le développement des chromatogrammes par égouttement prolongé de la phase mobile, celle-ci étant dans ce cas de la décaline.

SUMMARY.

The preparation of 4-(p-phenylazophenyl)-semicarbazones in organic solutions and in highly diluted aqueous solutions has been described, as well as the separation and the identification of mixtures of these derivatives by chromatographic methods. Aldehydes and ketones form in good yield highly coloured 4-(p-phenylazophenyl)-semicarbazones. These can be useful in analytical investigations. Some ketones do not react easily and their 4-(p-phenylazophenyl)-semicarbazones are unstable under the mentioned chromatographic conditions. Jasnone gives no reaction at all.

Genève, Laboratoire de Recherches
(direction *M. Stoll*) de la Maison *Firmenich & Cie*.
