

K.-A. Kovar und U. Bitter

## Farbreaktionen von Arzneistoffen mit substituierter Anilinteilstruktur 1. Mitt.: Die Anfärbung nach Vitali-Morin\*)

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen  
(Eingegangen am 9. Oktober 1973).

Der Anfärbemechanismus von Arzneistoffen mit substituierter Anilinteilstruktur nach Salpetersäure-Behandlung mit Aceton und KOH (VITALI-MORIN-Methode) wird an Hand von Dimethyl- und Monomethylanilin untersucht. Beide setzen sich zu den Polynitroverbindungen 1 (N-Methyl-N,2,4,6-tetranitroanilin) und 2 (N,N'-Dimethyl-N,N', 3,3', 5,5'-hexanitrobenzidin) um, welche die farbigen MEISENHEIMER-Salze 3 – 6 ausbilden.

### Colour Reaction of Drugs Possessing Substituted Aniline Structure

#### Part 1: Coloration by Vitali-Morin\*)

The colouring mechanism of drugs possessing substituted aniline structure with acetone and potassium hydroxide after treatment with fuming nitric acid (VITALI-MORIN method) was investigated on the examples dimethyl and monomethyl aniline. The coloured compounds were determined as the MEISENHEIMER type salts 3–6 produced from N-methyl-N,2,4,6-tetranitroaniline (1) and from N,N'-dimethyl-N,N', 3,3', 5,5'-hexanitrobenzidine (2).

Verschiedene Arzneistoffe mit substituierter Anilinteilstruktur wie Bamipin oder Tetracain (Tab. 1) bilden beim Behandeln mit rauchender Salpetersäure Nitroprodukte, die in Aceton gelöst und mit KOH versetzt intensive Rotfärbungen ergeben<sup>1)2)</sup>.

Für die Untersuchung des Anfärbemechanismus wurden als Modellsubstanzen Dimethyl- und Monomethylanilin ausgesucht, denn beide Verbindungen lassen sich unter denselben Bedingungen gleichfalls intensiv rot anfärben. Der Rückstand der Substanzen nach Salpetersäurebehandlung ist braun. Die dc Untersuchung (Abb. 1) ergab außer einer Verunreinigung am Start zwei neue Flecke mit den Rf-Werten 0,55 (gelb) und 0,06 (gelblich).

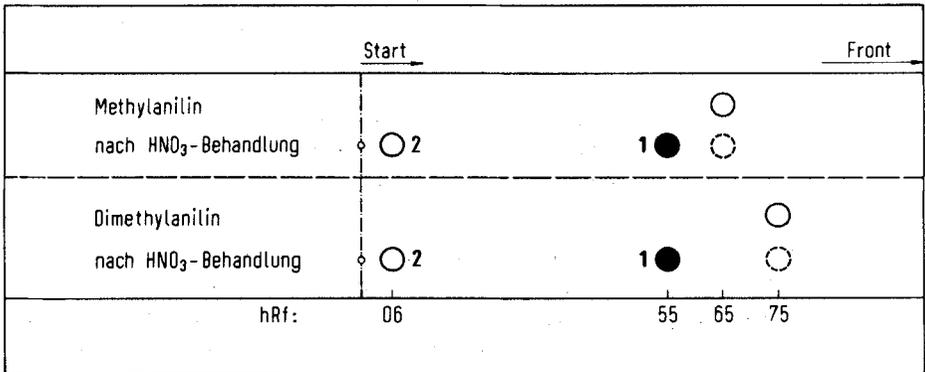
\* Teilauszug aus 2) und aus der Dissertation U. Bitter, Tübingen 1973, vorgetragen auf der Vortragsveranstaltung der DPhG in Marburg 1972.

1 H. Auterhoff und K.-A. Kovar, Identifizierung von Arzneistoffen. Wissenschaftl. Verlagsges. 2. Aufl., Stuttgart, 1973.

2 K.-A. Kovar, Habilitationsschrift Tübingen 1972.

**Tabelle 1:** Die Anfärbung von Arzneistoffen mit substituierter Anilinteilstruktur

Substanz	Farbe des Rückstandes mit rauch. HNO <sub>3</sub>	Farbe mit 1 ml 0,1 n äthanol. KOH ohne Aceton	Farbe mit Aceton
Acetanilid	rotbraun	braun	rotbraun
Antazolin	hellbraun	rotbraun	rotbraun
Bamipin	gelbbraun	orange	blutrot
Folsäure	gelb	schwach rot	rotvioletter Nd.
Imipramin	braun	violett	rotviolett
Lidocain	gelb	gelborange	grün
Mefenamensäure	gelb	gelb	blutrot
Niclosamid		rotbraun	weinrot
Physostigmin	rotbraun	braun	rotorange
Strychnin	gelb	rotviolett dann braun	rotviolett
Tetracain	gelb	orange	rotviolett



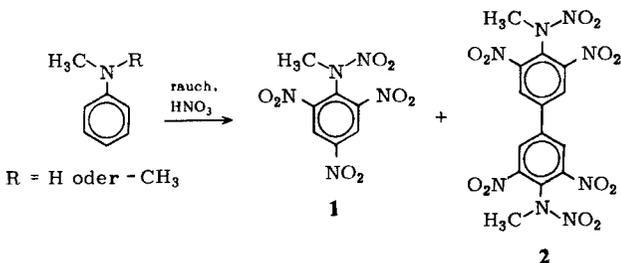
Ph 371.1

**Abb. 1:** DC-Untersuchung der Umsetzungsprodukte aus Dimethylanilin und Monomethylanilin mit rauch. HNO<sub>3</sub>, auf Kieselgel F 254 Merck-Fertigplatten. Fließmittel: Benzol, Laufstrecke: 15 cm, Vario-KS-Kammer, rel. Feuchte: 81 % bei 25°.

Dimethyl- und Monomethylanilin werden offensichtlich zu gleichen oder ähnlichen Produkten umgesetzt. Nach der Literatur kann man neben einfach bis mehrfach ni-

trierten Anilinderivaten<sup>3)4)5)6)</sup> auch mehrfach nitrierte Benzidinverbindungen<sup>7)8)9)</sup> erwarten. Aus dem Rückstand eines präparativen Ansatzes mit rauchender Salpetersäure wurde als alkohollösliche, gelbe Substanz N-Methyl-N,2,4,6-tetranitroanilin (**1**), als Sprengstoff unter dem Namen Tetryl<sup>10)</sup> bekannt, und als alkoholunlösliche, hellgelbe Verbindung N,N'-Dimethyl-N,N', 3,3', 5,5'-hexanitrobenzidin (**2**) isoliert.

Formelschema 1



Tetranitroanilin **1** wandert im DC nach Rf 0,55 und das Hexanitrobenzidin **2** nach Rf 0,06. **1** gibt in Aceton auf Zusatz von KOH eine rote, **2** eine violette Färbung. Letztere wechselt nach weiterer KOH-Zugabe zu Grün. Da für die Entstehung der Farben Aceton oder ein anderer Elektronendonator wie Dimethylsulfoxid oder Dimethylformamid in Verbindung mit Laugen Voraussetzung ist, muß die Ausbildung von MEISENHEIMER-Salzen<sup>2)11)</sup> angenommen werden. Diese sind sowohl durch das Elektronenspektrum als auch durch NMR-Messung ausreichend charakterisiert<sup>2)</sup>.

Bei der stöchiometrischen Umsetzung von Tetranitroanilin (**1**) und äthanol. KOH im Verhältnis 1 : 1 in acetoniger Lösung erhält man das typische Elektronenspektrum eines Trinitrocyclohexadienat-Komplexes<sup>12)2)</sup> mit den beiden Maxima 454 und 546 nm, die sich in ihren Intensitäten wie 2 : 1 ( $\epsilon_1 : \epsilon_2 = 23000 : 11500$ ) verhalten.

3 A. Weber, Ber. dtsh. chem. Ges. 10, 761 (1877).

4 K. Mertens, Ber. dtsh. chem. Ges. 10, 995 (1877).

5 P. van Romburgh, Recueil Trav. chim. Pays-Bas (Amsterdam) 2, 109 (1883); 6, 253 (1887).

6 K. J. P. Orton, Ber. dtsh. chem. Ges. 40, 374 (1907).

7 K. Mertens, Ber. dtsh. chem. Ges. 19, 2126 (1886).

8 P. van Romburgh, Recueil Trav. chim. Pays-Bas (Amsterdam) 5, 244 (1886); 41, 41 (1922).

9 H. H. Hodgson und G. Turner, J. chem. Soc. (London) 1942, 584.

10 W. L. Tanner, Chem. metall. Eng. 29, 404 (1923) ref. in C. 1924, 2046.

11 J. Meisenheimer, Liebigs Ann. Chem. 323, 205 (1902).

12 C. F. Bernasconi, J. Amer. chem. Soc. 90, 4982 (1968).

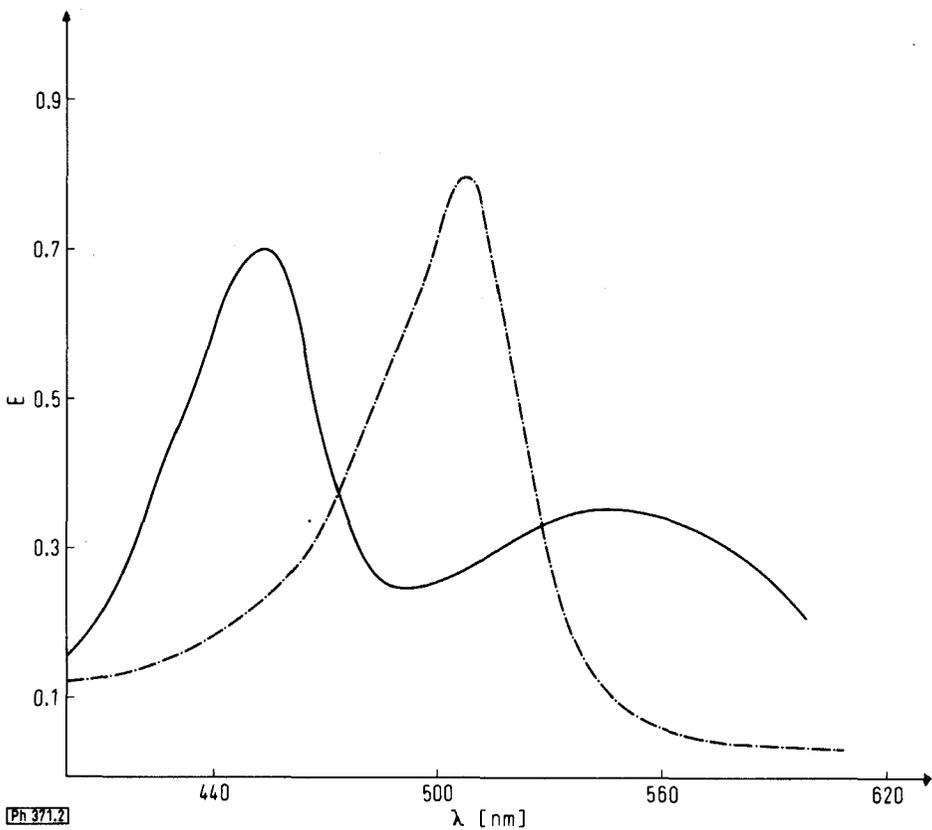


Abb. 2: Elektronenspektren von Tetranitroanilin (1) in Aceton nach Zusatz von 1 Mol (—) und 2 Mol (-.-.-) äthanol. KOH  $c = 0,3 \cdot 10^{-4}$  Mol/l.

Beim Ansatz mit der doppelten Menge KOH bildet sich innerhalb von 30 Min. ein neues Maximum bei 507 nm unter Verlust der ursprünglichen Maxima aus. Dieses Verhalten weist auf die Bildung eines Propenid-Komplexes<sup>13)2)</sup> hin.

Während der Umsetzung von Hexanitrobenzidin (2) mit KOH vollzieht sich der Wechsel von Violett nach Grün (2 Mol KOH) schleppend. Im Elektronenspektrum (Abb. 3) verschieben sich die anfänglichen Maxima um 475 und um 570 nm (1 Mol 1 + 0,5 Mol KOH) nach 418 und 622 nm (Molverhältnis 1 : 2). Auch dieses Elektronenspektrum mit einem Extinktionsverhältnis von 1,6 : 1 ( $\epsilon_1 : \epsilon_2 = 32200 : 20200$ ) ist

13 M. J. Strauss, Chem. Reviews 70, 667 (1970).

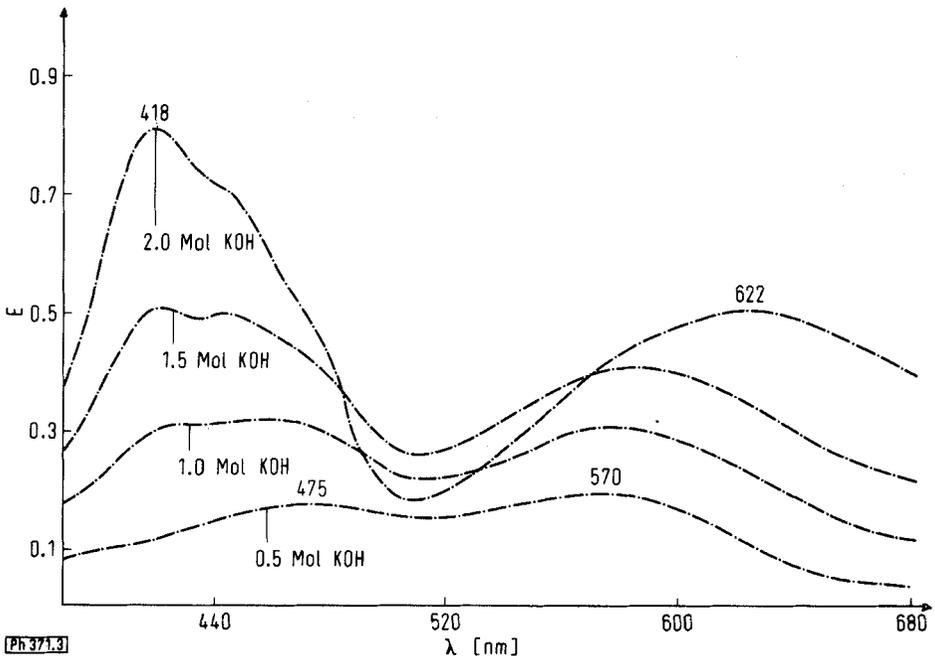


Abb. 3: Elektronenspektren von Hexanitrobenzidin (2) in Aceton nach Zugabe von 0,5–2 Mol äthanol. KOH,  $c = 0,25 \cdot 10^{-4}$  Mol/l

als Cyclohexadienat-Kurve anzusehen, wobei offensichtlich 2 Acetonylcarbanionen addiert werden. Erst nach vierfachem Laugenüberschuß tritt eine Änderung durch Farbzersetzung ein.

Eine Propenid-Kurve kann im Gegensatz zum Tetranitroanilin (1) nicht registriert werden.

Die Aussagen der Elektronenspektren werden durch NMR-Messungen bestätigt und präzisiert (Tab. 2). Da Direktmessungen mit 40proz. NaOD in  $D_2O$  und Aceton- $d_6$  keinen Erfolg brachten, wurde nach Foster und Mitarb.<sup>14)</sup> Triäthylamin als Base zugesetzt. Aus 0,5 mMol Tetranitroanilin (1) und 0,5 mMol Triäthylamin erhält man in einer Lösung von Aceton- $d_6$  nach 2 Std. ein NMR-Spektrum, welches die Trinitrocyclohexadienat-Struktur 3 beweist. Neben den Signalen eines aromatischen Protons bei  $\delta = 8,53$  und  $8,48$  (1 H, 2 Dubletts wegen der unsymmetrischen N-Funktion<sup>13)</sup> mit  $J_{a,b} = 1,5$  Hz) erscheint bei  $\delta = 5,32$  ppm programmgemäß<sup>2)13)14)</sup>  $H_b$  als Dublett mit einer Metakopplung von 1,5 Hz aber ohne weitere Aufspaltung

14 D. Vitali, Orsi 1880 Nr. 8 ref. in Arch. Pharmaz. 218, 307 (1881); Z. analyt. Chem. 20, 563 (1881); C 1881, 710.

aufgrund der deuterierten Acetylgruppe. Auch die im Elektronenspektrum vermutete Propenid-Struktur **4** wird durch das NMR-Spektrum nachgewiesen. **1** wurde in Aceton- $d_6$  diesmal mit Diäthylamin im molaren Verhältnis von 1 : 2 versetzt, nach 2 Std. mit Äther ausgefällt und der Niederschlag in Aceton- $d_6$  gemessen. Erwartungsgemäß fehlen die Signale von aromatischen Protonen.  $H_b$  wird nach  $\delta = 4,70$  und  $4,60$  ppm verschoben. Als Ursache der unsymmetrischen N-Funktion erhält man auch hier zwei Signale, die gleichfalls wegen der deuterierten Acetylgruppe nicht weiter aufgespalten werden.

## Formelschema 2

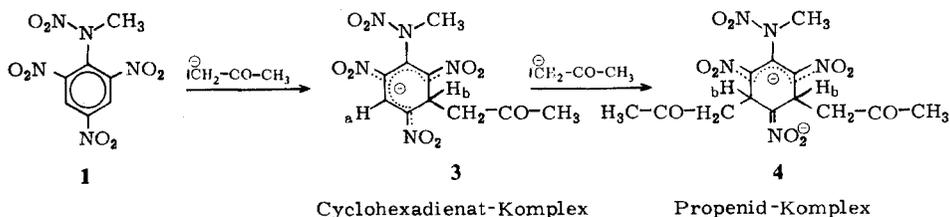


Tabelle 2: Chemische Verschiebung  $\delta$  (in ppm) von  $H_a$  und  $H_b$  in den 60 MHz-NMR-Spektren der MEISENHEIMER-Verbindungen **3**, **4** und **6**.

TMS  $\delta = 0,00$  ppm.

	$H_a$	$H_b$	J (Hz)	Lösungsmittel	
<b>3</b>	8,53 D	8,48 D	5,32 D <sup>+</sup>	1,5	Aceton- $d_6$
<b>4</b>	—	4,70 S <sup>+</sup>	4,60 S <sup>+</sup>	—	Aceton- $d_6$
<b>6</b>	7,53 S	5,07 M			Dimethylsulfoxid- $d_6$

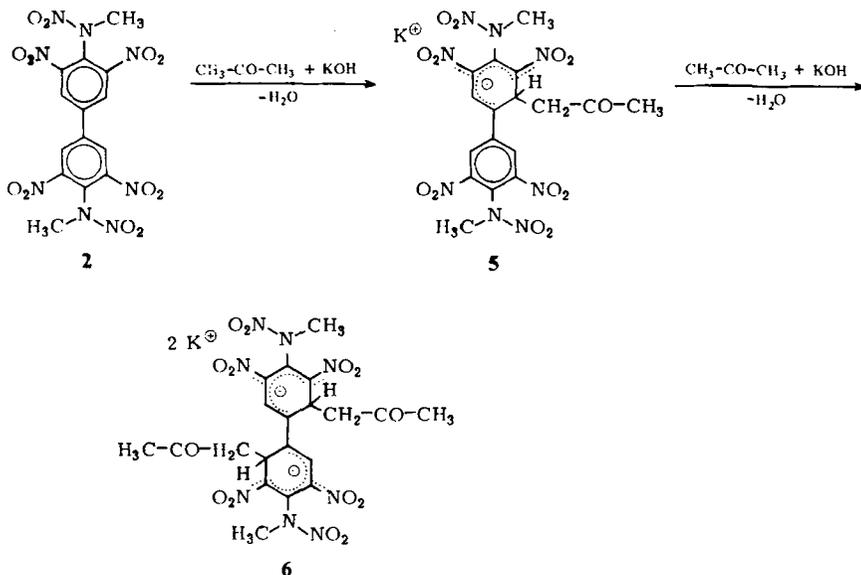
D = Dublett, M = Multipllett, S = Singulett

+) keine weitere Aufspaltung wegen deuterierter Acetylgruppe

Für Hexanitrobenzidin (**2**) wurde im Elektronenspektrum über eine violette Zwischenstufe eine Cyclohexadienat-Kurve in Aceton bei doppeltem Basenüberschuß registriert (Abb. 2), die durch das Kernresonanzspektrum erhärtet wird. Am günstigsten erwies sich die Messung des mit Äther aus acetoniger Lösung von **2** nach Zugabe von 2 Mol äthanol. KOH ausgefallten, grünschwarzen Niederschlages. Man erkennt ein breites aromatisches Signal bei  $\delta = 7,53$  ppm und ein schlecht aufgelöstes Multipllett (theoretisch 2 Tripletts wegen der benachbarten Acetylgruppe und wegen der unsymmetrischen N-Funktion) im Intensitätsverhältnis 1 : 1. Dies stimmt mit

dem angenommenen MEISENHEIMER–Cyclohexadienat-Addukt **6** überein, das über die violette Zwischenstufe **5** aus Hexanitrobenzidin (**2**), Aceton und Basen gebildet wird.

Formelschema 3



Das allgemeine Prinzip der Anfärbung von Arzneistoffen mit substituierter Anilinteilstruktur dürfte folglich auf der Ausbildung von MEISENHEIMER–Addukten durch Addition von einem oder zwei Acetonylcarbanionen an die mit rauchender Salpetersäure entstandenen Polynitroaromaten beruhen.

### Beschreibung der Versuche

Elektronenspektren: Beckman Spektralphotometer DB GT. IR-Spektren: Beckman Spektrophotometer IR 8 :  $\tilde{\nu}$  /cm (KBr). NMR-Spektren: Varian A 60. Chemische Verschiebung  $\delta$  (in ppm) in Bezug auf internes Tetramethylsilan.

Allgemeine Farbreaktion nach der Vitali-Morin-Methode<sup>14)15)</sup>

Wenige Milligramm der zu untersuchenden Substanz werden in einer Porzellanschale mit 0,5 ml rauchender  $\text{HNO}_3$  versetzt und auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Den Rückstand löst man nach dem Erkalten in 5 ml Aceton und tropft 1 ml 0,1 n äthanol. KOH hinzu.

*Präparative Umsetzung von Dimethyl- bzw. Monomethylanilin mit rauch. HNO<sub>3</sub>*

1,0 g Dimethyl- bzw. Monomethylanilin werden vorsichtig in kleinen Anteilen in 5 ml rauch. HNO<sub>3</sub> eingetragen und auf dem Wasserbad noch zweimal mit je 5 ml rauch. HNO<sub>3</sub> und dreimal mit je 5 ml H<sub>2</sub>O zur Trockne eingedampft.

*Isolierung von N-Methyl-N,2,4,6-tetranitroanilin (1)*

Der erkaltete Rückstand o. a. Umsetzung wird dreimal mit je 20 ml Äthanol digeriert und nach Abziehen des Äthanolis i. Vak. die hellgelbe Masse mehrmals aus H<sub>2</sub>O umkristallisiert. Ausbeute: 1,22 g (= 52 % d. Th.), gelbe Plättchen vom Schmp. 128°. IR: 1545, 1340 (-NO<sub>2</sub>), 1560, 1280 (Nitramin). NMR: 9,39 (2 arom. H), 3,76 (3H, -N(NO<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>) identisch mit Tetryl nach Tanner<sup>10</sup>.

*Isolierung von N,N'-Dimethyl-N,N',3,3',5,5'-hexanitrobenzidin (2)*

Der erkaltete Rückstand des o. a. Reaktionsansatzes wird nach dem mehrmaligen Ausziehen mit Äthanol aus 50 ml Nitrobenzol umkristallisiert. Man erhält 0,55 g (= 27 % d. Th.) hellgelbe Plättchen, die mit 30ml heißem Äthanol und mit Äther ausgewaschen werden. Schmp. 240°. IR: 1540, 1340 (-NO<sub>2</sub>), 1560, 1290, 1270 (Nitramin). NMR: 9,12 (4 arom. H), 3,61 Singulett (6 H, 2 x -N(NO<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>). Identisch mit N,N'-Dimethyl-N,N',3,3',5,5'-hexanitrobenzidin aus N,N'-Tetramethylbenzidin mit rauch. HNO<sub>3</sub> nach o. a. Umsetzung gewonnen.

*Cyclohexadienat-Komplex 3 aus 1*

Zur Messung des Elektronenspektrums werden 144 mg (0,5 mMol) 1 in 20 ml Aceton gelöst, mit 5 ml 0,1 n äthanol. KOH (= 0,5 mMol) versetzt und 30 Min. stehen gelassen. 1 ml dieser Lösung wird mit Aceton zu 100,00 ml aufgefüllt und davon 60,00 ml entnommen und nochmals mit Aceton auf 100,00 ml verdünnt,  $c = 0,3 \cdot 10^{-4}$  Mol/l. Zur Messung des NMR-Spektrums werden 144 mg (0,5 mMol) 1 in 1,5 ml Aceton-d<sub>6</sub> gelöst und mit 50 mg Triäthylamin gemischt. Nach 2 Std. wird durch eine Glasfritte G4 filtriert und gemessen.

*Propenid-Komplex 4 aus 1*

Elektronenspektren wie oben mit 10 ml 0,1 n äthanol. KOH (= 1 mMol). Zur Messung des NMR-Spektrums werden 144 mg (0,5 mMol) 1 in 5 ml Aceton-d<sub>6</sub> gelöst und mit 73 mg (= 1 mMol) Diäthylamin versetzt. Nach 2 Std. wird mit Äther eine rote Verbindung ausgefällt, die nach dem Abfiltrieren in Aceton-d<sub>6</sub> gemessen wird,  $\lambda_{\max}$ : 507 nm ( $\epsilon = 26500$ ).

*Cyclohexadienat-Komplex 6 aus 2*

120 mg (0,25 mMol) 2 werden in 10 ml Aceton gelöst und mit 1 ml 0,5 n äthanol. KOH (0,5 mMol) versetzt. Nach 2 Std. fällt man aus der Lösung mit Äther einen grünen, voluminösen Niederschlag, den man nach dem Filtrieren mehrmals mit Äther auswäscht und zu NMR-Messung bringt.