

### Anfärbung von N-freien Estern durch Dragendorffs Reagens

Colouring of N-free Esters by Dragendorffs Reagent

W. RÖRMERMANN, A. RÖMER und H. BUDZIKIEWICZ

Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln

(Z. Naturforsch. 26 b, 1372 [1971]; eingegangen am 23. September 1971)

Das Reagens nach DRAGENDORFF<sup>1</sup> hat nach anfänglich widersprüchlichen Ergebnissen, die wohl auf Fehler bei der Herstellung zurückzuführen waren<sup>2</sup>, zum Nachweis von N-haltigen Verbindungen, besonders Alkaloiden große Beliebtheit erlangt. Bei der DC-Überprüfung (Kieselgelplatten SIF der Firma Riedel-de Haën AG) von Alkaloidgemischen mußten wir feststellen, daß sich auch Phthalsäureester (Diäthyl-, Dioctylphthalat) rot anfärben lassen. Daraufhin durchge-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. BUDZIKIEWICZ, Institut für Organ. Chemie der Universität Köln, Lehrstuhl II, D-5000 Köln, Zulpicher Str. 47.

<sup>1</sup> Die Herstellung des Sprühreagens für die Plattenchromatographie erfolgte nach H. JATZKEWITZ, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 292, 94 [1953].

<sup>2</sup> G. CAPPELLI, Ann. chim. applic. 14, 261 [1924].

<sup>3</sup> Herr Prof. Dr. W. WIEGREBE, Pharmazeutisches Institut der Universität Bern, teilte in einem Schreiben vom 19. 7. 1971 mit, daß auch 2-Hydroxymethyl-3,4-dimethoxyphenyllessigsäurelacton eine positive Dragendorff-Reaktion gibt.

führte Versuche mit einer Reihe von aliphatischen und aromatischen Methyl- und Äthylestern ergaben kein einheitliches Bild (z. B. ließ sich Benzoessäuremethyl-ester ebenso wie die erwähnten Phthalsäureester stark und dauerhaft anfärben, während der Fleck von Zimtsäureäthylester nach etwa 5 Min. verblaßte und Phenylpropionsäureäthyl- und Salicylsäuremethylester keine Reaktion zeigten<sup>3</sup>).

Wichtig erscheint dabei auf folgendes hinzuweisen: Da Screening-Programme auf Alkaloide gewöhnlich zum Nachweis DRAGENDORFFS Reagens verwenden<sup>4</sup>, andererseits aber Phthalester, die u. a. als Weichmacher Verwendung finden, sehr leicht aus Plastikflaschen, -schläuchen usw. durch Lösungsmittel eingeschleppt werden können<sup>5</sup>, sollte zur Vermeidung von Irrtümern auf die Abwesenheit dieser Ester peinlich geachtet werden, was z. B. auf massenspektroskopischem Wege durch das charakteristische Ion bei  $m/e$  149 sehr leicht möglich ist<sup>6</sup>.

<sup>4</sup> Zum Beispiel: O. AURICK, G. OSSKE, K. PUFAHL, A. ROMEIKE, H. RÖMSCH, K. SCHREIBER u. G. SEMBDNER, Die Kulturpflanze, 13, 623 [1965].

<sup>5</sup> G. v. UNRUH, G. REMBERG u. G. SPITELLER, Chem. Ber. 104, 2071 [1971].

<sup>6</sup> J. SEIBEL, Massenspektrometrie, Akad. Verlagsges., Frankfurt 1970, S. 158.

### Magnetic Nonequivalence in Chlorosulphinyl Compounds

M. MIKOŁAJCZYK<sup>1</sup> and J. DRABOWICZ

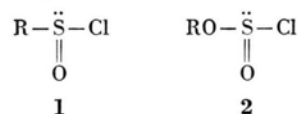
Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Łódź 40, Żwirki 36, Poland

(Z. Naturforsch. 26 b, 1372—1374 [1971]; received August 16, 1971)

Methylene and isopropyl methyl protons adjacent to an asymmetric centre are diastereotopic and may be magnetically nonequivalent<sup>2</sup>. Chemical shift differences of the diastereotopic protons have been observed in the nmr spectra of the organic sulphur compounds such as sulphoxides, sulphonium salts, sulphinates, sulphinamides and sulphites<sup>2, 3</sup>.

The approximately tetrahedral sulphur atom of the chlorosulphinyl group,  $-S(O)Cl$ , can also induce magnetic nonequivalence of geminal nuclei. SEEL et al.<sup>4</sup> have recently demonstrated that the methylene protons

of a simple alkylchlorosulphites exhibit the magnetic nonequivalence.



We wish now to present the first examples of alkylsulphinyl chlorides (**1**) as well as a new chlorosulphites (**2**) containing diastereotopic protons for which the chemical shift differences are observed. Some representative examples and nmr data are summarized in the Table 1.

We have not been able to detect the magnetic nonequivalence of the methylene protons in ethylsulphinyl chloride (**1a**). As expected, methyl signals of the isopropylsulphinyl chloride (**1b**) consist of a doublet by coupling to the methine proton which is doubled again due to magnetic nonequivalence. Isobutyl group

<sup>1</sup> Requests for reprints should be sent to Doz. Dr. M. MIKOŁAJCZYK, Polish Academy of Sciences, Institute of Organic Chemistry, Department of Heteroorganic Compounds, Żwirki 36, Łódź 40, Poland.

<sup>2</sup> K. MISLOW and M. RABAN, Topics Stereochem. 1, 1 [1967].

<sup>3</sup> R. E. LACK and L. TARASOFF, JR., J. chem. Soc. [London] 1967, 1095, and references cited therein.

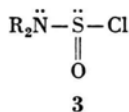
<sup>4</sup> F. SEEL, J. BOUDIER, and W. GOMBLER, Chem. Ber. 102, 443 [1969].

No	Compounds	Solvent	Chemical shift		Multi- plicity <sup>a</sup>	Coupling constants [Hz]	
			H <sub>A</sub>	H <sub>B</sub>			
1b	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{S(O)Cl} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	d	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	1.015	1.04	d	7.20 <sup>b</sup>
1c	$\begin{array}{c} \text{X AB} \\ (\text{CH}_3)_2\text{CHCHH}-\text{S(O)Cl} \end{array}$	d	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	2.88	3.02	m	13.50 <sup>c</sup>
1d	$\begin{array}{c} \text{AB} \\ \text{Cl}_3\text{C}-\text{CHH}-\text{S(O)Cl} \end{array}$	e	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	4.15	4.25	d	14.40
2a	$\begin{array}{c} \text{AB} \\ (\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{CHH}-\text{O}-\text{S(O)Cl} \end{array}$	f	CCl <sub>4</sub>	3.93	4.23	d	10.20
2b	$\begin{array}{c} \text{AB} \\ \text{Cl}_3\text{C}-\text{CHH}-\text{O}-\text{S(O)Cl} \end{array}$	f	CCl <sub>4</sub>	4.25	4.55	d	10.50

Table 1. Chemical shifts and coupling constants of diastereotopic protons in some alkylsulphonyl chlorides and alkylchlorosulphites. <sup>a</sup> d - doublet, m - part AB of ABX multiplet, <sup>b</sup> coupling constant between methyl and methine protons, <sup>c</sup> J<sub>AX</sub> = J<sub>BX</sub> = 7.50 Hz, <sup>d</sup> prepared according to the method of DOUGLAS and NORTON<sup>9</sup>, <sup>e</sup> prepared according to the method of SOBO-ROVSKII et al.<sup>10</sup>, <sup>f</sup> prepared from the corresponding alcohols and thionyl chloride<sup>11</sup>.

in the chloride **1c** contains not only diastereotopic methylene but also methyl protons. In the nmr spectra the methylene protons appear as a typical ABX-octet. However, in contrast to diisobutyl sulphoxide<sup>5</sup> and methyl isobutyl sulphoxide<sup>6</sup> in which isopropyl methyl groups were found to be nonequivalent, chemically shifted methyl signals were not observed for the chloride **1c**.

Since the asymmetry effect in a molecule can be transmitted across a nitrogen atom<sup>7</sup> the nmr spectra of dialkylaminosulphonyl chlorides **3** were examined.



The nmr spectrum of diethylaminosulphonyl chloride (**3b**) in CCl<sub>4</sub> solution at room temperature consists of the normal methylene quartet and methyl triplet. However, at -70° in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solution two methyl triplets and two partly overlapped methylene quartets were observed (see Fig. 1). Similarly, the low temperature nmr spectra of dimethylaminosulphonyl chloride (**3a**) and diisopropyl-aminosulphonyl chloride (**3c**) showed two methyl and two isopropyl signals, respectively. It is interesting to note that even at low temperatures the magnetic nonequivalence of the geminal protons in the chlorides (**3b**) and (**3c**) due to the asymmetry of the chlorosulphonyl group was not observed.

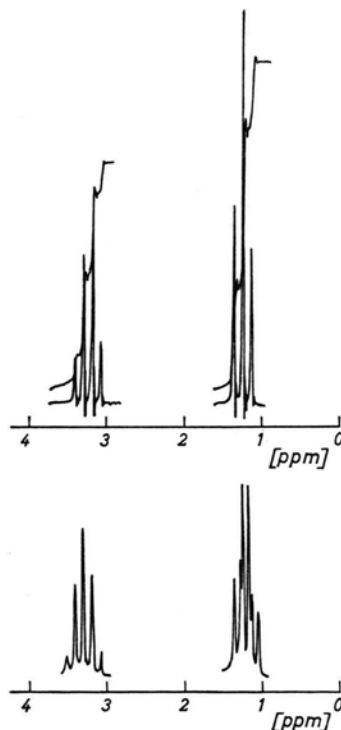


Fig. 1. Nmr spectra of Et<sub>2</sub>N-SOCl (**3b**) at 60 MHz. a) At room temperature in CCl<sub>4</sub> solution, b) at -70° in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solution.

<sup>5</sup> E. T. STROM, B. S. SNOWDEN, JR., and P. A. TOLDAN, Chem. Comm. **1969**, 50.

<sup>6</sup> M. MIKOŁAJCZYK and J. DRABOWICZ, unpublished data.

<sup>7</sup> M. VAN GORKOM and G. E. HALL, Quart. Rev. (Chem. Soc., London) **22**, 14 [1968].

<sup>8</sup> G. BINSCH, Topics Stereochem. **3**, 97 [1968].

<sup>9</sup> J. B. DOUGLAS and R. V. NORTON, J. org. Chemistry **33**, 2104 [1968].

<sup>10</sup> B. M. GLADSHTEIN, I. P. KULYULIN, and L. Z. SOBO-ROVSKII, Pat. U.S.S.R. **159**, 835 (Jan. 14, 1964); C. A. **60**, 11899 [1964].

<sup>11</sup> W. VOSS and E. BLANKA, Liebigs Ann. Chem. **485**, 258 [1931].

These results can be best interpreted in terms of a slow rotation around the N—S bond on the nmr time-scale.

The free energy of activation for rotation around the N—S bond in the chlorides (3 a) and (3 c) was determined by the dynamic nmr method<sup>8</sup>. The data are given in the Table 2.

Com- pound	$\Delta\nu$ [Hz]	$T_c$ [°]	$K_c$ [sec <sup>-1</sup> ]	$G^\ddagger$ [kcal · mol <sup>-1</sup> ]
3a	3.9	- 39	8.1	12.5 ± 0.4
3c	3.6	- 17	8.8	13.0 ± 0.4

Table 2. Free energy barriers for conformational interchange in dialkylaminosulphinyl chlorides (the spectra were recorded with a Joel spectrometer at 60 MHz in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solution with the aid of a variable temperature accessory).

<sup>12</sup> G. ZINNER and W. KÖLLING, *Naturwissenschaften* **46**, 354 [1959].

The nature of the restricted rotation in dialkylaminosulphinyl chlorides (3) is under investigation.

Dimethylaminosulphinyl chloride (3 a) was prepared from O-ethyl *N,N*-dimethylamidodisulphite and thionyl chloride<sup>12</sup>; b.p. 30°/0.2 mmHg,  $n_D^{20}$  1.4960 (l.c.<sup>13</sup> 43–45°/0.3 mmHg). The chlorides (3 b) and (3 c) were synthesized directly from the corresponding amines and thionyl chloride<sup>13</sup>; 3 b: b.p. 62°/0.6 mmHg,  $n_D^{20}$  1.5165; 3 c: b.p. 75–76°/0.4 mmHg, semisolid compound at room temperature.

*Note added in proof:* After this paper was submitted for publication, the magnetic nonequivalence of the methyl groups in isopropylsulphinyl chloride was reported by G. CANALINI, G. MACCAGNANI and F. TADDEI, *Tetrahedron Letters* [London] **1971**, 3035.

<sup>13</sup> G. WEISS and G. SCHULZE, *Pat.Ger.*, 1, 150, 994 (July 4, 1963); *C. A.* **60**, 2956 [1964].

### Reinigung einer „Pseudo“-Cholinesterase aus der Hämolymphe von *Helix pomatia*

Purification of a Pseudo-Cholinesterase from the Haemolymph of *Helix pomatia*

R. VOIGTMANN und G. UHLENBRUCK

Medizinische Universitätsklinik Köln-Lindenthal  
(Direktor: Prof. Dr. R. GROSS)

(*Z. Naturforsch.* **26 b**, 1374–1375 [1971]; eingeg. am 24. September 1971)

Das Vorkommen „echter“ Acetylcholinesterasen und auch sogenannter „Pseudo“-Cholinesterasen in Schnecken und Avertebraten ist schon länger bekannt<sup>1–3</sup>. Da diese Enzyme in verschiedenen Organen dieser Tiere nachgewiesen worden sind<sup>1,3,4</sup>, erscheinen vergleichende Studien dieser Varianten besonders reizvoll<sup>5</sup>. Voraussetzung für eine solche Untersuchung ist die Reindarstellung dieser Enzyme. Nachdem wir kürzlich im Eiweißdrüsensekret von *Helix pomatia*<sup>4</sup> eine Pseudocholinesterase nachweisen und teilweise gereinigt anreichern konnten, beschreibt die vorliegende Arbeit die Reindarstellung eines solchen Enzyms aus der Hämolymphe dieser Schnecken.

Hierzu wurde die Hämolymphe durch Punktion der großen Gefäße gewonnen. Eine erste Reinigung des Enzyms erfolgte mittels Anionenaustausch-Chromatographie und Gel-Filtration. Mittels Disk-Elektrophorese wurden die verschiedenen Fraktionen überprüft. Die Enzymaktivität bestimmten wir abgesehen von kleine-

ren Modifikationen nach der von ELLMAN<sup>6</sup> angegebenen Methode, wobei Acetylthiocholinjodid und Butyrylthiocholinjodid als Substrate eingesetzt wurden. Als Maß für die Enzymmenge bei den einzelnen Chromatographieschritten diente der Substratumsatz in  $\mu$ Mol pro Min. durch 0,1 ml Enzym-Lösung bei konstantem Reaktionsvolumen. Für nähere Einzelheiten über die Enzymbestimmung, Chromatographie und Disk-Elektrophorese verweisen wir auf die vorhergehende Arbeit<sup>4</sup>.

Nach ausgiebiger Dialyse der Hämolymphe gegen 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,9 über 48 Std. bei 4 °C erfolgte der erste Reinigungsschritt über eine DEAE-Cellulose-Säule (60 cm × 1,5 cm; Serva, Heidelberg). 6 ml Hämolymphe wurden durch einen linear ansteigenden NaCl-Gradienten in 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,9 bei einer Flußrate von 18 ml/Stde. und einem Fraktionsvolumen von 2 ml eluiert. Das Chromatogramm ist in Abb. 1 oben dargestellt; hierbei wurde das Enzym schon bei relativ geringer Ionenstärke von der DEAE-Cellulose desorbiert.

Der Befund, daß sich in den Fraktionen 55–80 eine große Enzymmenge befindet, aber keine Absorption bei 280 nm festzustellen ist, war bemerkenswert. Dies könnte auf ein Glykoprotein mit großem Kohlenhydratanteil oder aber auf ein Protein mit sehr geringen Mengen an aromatischen Aminosäuren hindeuten. In der Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese bei einer Acrylamidkonzentration von 7,0% und einem pH von 9,5 stellen sich die eingeeengten Fraktionen 55–80 in

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. G. UHLENBRUCK, Med. Universitätsklinik Köln, Abt. f. Immunbiologie, D-5000 Köln 41, Kerpener Str. 15.

<sup>1</sup> G. A. KERKUT and G. A. COTTRELL, *Comp. Biochem. Physiol.* **8**, 53 [1963].

<sup>2</sup> P. C. EMSON and G. A. KERKUT, *Comp. Biochem. Physiol.* **39 B**, 879 [1971].

<sup>3</sup> K. B. AUGUSTINSSON, *Biochem. J.* **40**, 343 [1946].

<sup>4</sup> R. VOIGTMANN u. G. UHLENBRUCK, *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.*, in press.

<sup>5</sup> K. B. AUGUSTINSSON, *Bull. Wld. Hlth. Org.* **44**, 81 [1971].

<sup>6</sup> G. L. ELLMAN, D. COURTNEY, V. ANDRES, and F. M. FEATHERSTONE, *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 [1961].

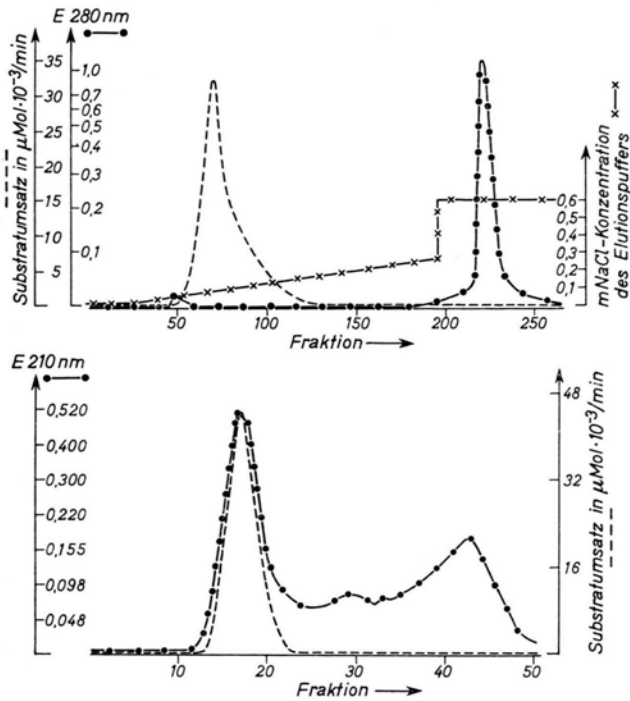


Abb. 1. Oben: Chromatogramm von 6 ml Hämolymphe über DEAE-Cellulose ( $60 \text{ cm} \times 1,5 \text{ cm}$ ), Elution mit linear ansteigendem NaCl-Gradienten in  $0,02 \text{ M}$  Phosphatpuffer pH 7,9  $\times$ — $\times$ , Extinktion des Eluates bei 280 nm  $\bullet$ — $\bullet$ , Enzymmenge in  $0,1 \text{ ml}$  Enzym-Lösung gemessen als Substratumsatz pro Minute — — —, Flußrate  $18 \text{ ml/Stunde}$ . Unten: Gel-Filtration der eingeeengten Fraktionen 55–80 nach Anionenaustauschchromatographie ( $3 \text{ ml}$ ) über Sephadex G 200 ( $60 \text{ cm} \times 1,5 \text{ cm}$ ), Elution mit  $0,02 \text{ M}$  Phosphatpuffer pH 7,9, Extinktion des Eluates bei 210 nm  $\bullet$ — $\bullet$ , Enzymmenge in  $0,1 \text{ ml}$  Enzym-Lösung gemessen als Substratumsatz pro Min. — — —, Flußrate  $16 \text{ ml/Stde.}$ , Fraktionsvolumen  $2 \text{ ml}$ .

drei Banden dar; zwei weit zur Anode gewanderte und eine nahe an der Kathode gelegene. Dieser Befund

rechtfertigte einen weiteren Reinigungsversuch durch Gel-Filtration über Sephadex G 200 (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Abb. 1, unten, zeigt das Chromatogramm der konzentrierten Fraktionen 55–80 über Sephadex G 200 ( $60 \text{ cm} \times 1,5 \text{ cm}$ ) bei einer Flußrate von  $16 \text{ ml/Stunde}$ . Zur Identifizierung der Proteine wurde die Extinktion des Eluates bei  $210 \text{ nm}$  gemessen. Ähnlich wie in der Disk-Elektrophorese lassen sich auch hier deutlich drei große Fraktionen unterscheiden, wobei die Enzymaktivität streng auf die erste beschränkt bleibt, was für die gelungene Reinigung des Enzyms spricht. Untermauert wurde diese Vermutung durch eine einzige einheitliche Bande in der Disk-Elektrophorese nach Anfärben mit Amidoschwarz, die nahe der Kathode lag. Die beiden zur Anode gewanderten Banden waren verschwunden.

Das Enzym zeigte den gleichen Substratumsatz pro Minute gegenüber Acetylthiocholinjodid wie gegenüber Butyrylthiocholinjodid, wonach es eindeutig in die Gruppe der Pseudocholinesterasen einzuordnen ist. Wie alle Cholinesterasen wurde es durch Prostigmin® gehemmt, so daß ein unspezifischer Esteraseeffekt auf die angebotenen Substrate ausgeschlossen werden konnte. Die fehlende Absorption der Enzym-Lösung bei  $280 \text{ nm}$  sowie die fehlende Retention des Enzyms im Sephadex-Gel, was auf ein Molekulargewicht von über  $200\,000$  schließen läßt — der letztere Befund wird auch durch die Lokalisation der Enzymbande in der Disk-Elektrophorese gestützt —, stellen weitere Charakteristika des gereinigten Enzyms dar. Weiteren Untersuchungen muß es vorbehalten bleiben, die Enzymkinetik der Varianten aus den verschiedenen Organen untereinander zu vergleichen, die pH-Abhängigkeit, den Einfluß von Ionen auf die Aktivität, die Substratspezifität zu prüfen und eine chemische Analyse der gereinigten Enzyme durchzuführen.

Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht. Wir danken Frau E. JÖRGES und Frau H. MEYER für ihre geschickte Mitarbeit.