

Institut für Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover
(Direktor: Prof. Dr. H. v. MAYERSBACH)

Untersuchungen zur Synthese und zur Reinheitsbestimmung von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (DIS, DANSYLchlorid)

VON KLAS MILDENSTEIN

Mit 10 Abbildungen
(Eingegangen am 4. Dezember 1970)

Zusammenfassung

1. Ausarbeitung eines Darstellungsganges für ein weitgehend reines 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (DIS, DANSYLchlorid):
 - a) Reinigung der im Handel erhältlichen, rohen und stark gefärbten 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure (Laurentsche Säure),
 - b) Modifikation der Methylierung von 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure zu 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure,
 - c) Verbesserung der Darstellung des Säurechlorids von 1-Dimethyl-amino-naphthalin-5-sulfonsäure mit Thionylchlorid und Dimethylformamid als Katalysator.
2. Dünnschichtchromatographische Untersuchung zur:
 - a) Reinheitsbestimmung von 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure, 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure und 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (nach Hydrolyse) unter Einschluß kommerzieller Produkte,
 - b) Ermittlung der Effektivität verschiedener Methylierungsmethoden,
 - c) Identifizierung von Verunreinigungen.
3. Bestimmung des Einflusses des Reinheitsgrades von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure und 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (nach Hydrolyse) auf die Absorptionsspektren im UV-Licht.

Summary

1. Elaboration of a preparation mode for a widely pure 1-dimethylamino-naphthalene-5-sulphonic acid chloride (DIS, DANSYLchloride):
 - a) Purification of the crude and strongly stained commercial 1-amino-naphthalene-5-sulphonic acid (Laurent's acid),
 - b) Modification of the methylating process from 1-amino-naphthalene-5-sulphonic acid to 1-dimethylamino-naphthalene-5-sulphonic acid,
 - c) Improvement of the preparation of the acid chloride of 1-dimethyl-amino-naphthalene-5-sulphonic acid by means of thionyl chloride and dimethylformamide as catalysts.
2. Thin layer chromatographical investigations for the purpose of:
 - a) Purity determination of 1-amino-naphthalene-5-sulphonic acid, 1-dimethylamino-naphthalene-5-sulphonic acid and 1-dimethylamino-naphthalene-5-sulphonic acid chloride (after hydrolysis) inclusive of commercial products,

- b) Effectiveness determination of various methylating methods,
 c) Identification of contaminations.
 3. Determination of the influence of the purity grade of 1-dimethyl-amino-naphthalene-5-sulphonic acid and 1-dimethylamino-naphthalene-5-sulphonic acid chloride (after hydrolysis) on the UV absorption spectra.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	29
I. Einleitung	30
II. Methoden	32
A. Darstellungsgang für ein weitgehend reines 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (DIS, DANSYLchlorid)	32
1. Reinigung der 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure	32
2. Methylierung von 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure	32
3. Chlorierung von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure	33
Destillation von Thionylchlorid	33
Destillation von Dimethylformamid	33
4. Umkristallisation von DIS	34
B. Dünnschichtchromatographie	34
C. Messung der Absorptionsspektren von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure und 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (nach Hydrolyse)	35
III. Ergebnisse und Diskussion	35
A. Darstellung von weitgehend reinem 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (DIS, DANSYLchlorid)	35
1. Reinigung der 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure	35
2. Methylierung der 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure	36
3. Chlorierung der 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure	38
4. Umkristallisation von DIS	39
5. Charakterisierung von DIS	39
B. Dünnschichtchromatographische Reinheitsbestimmungen	40
1. 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure	41
2. 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure	41
3. 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (DIS, DANSYLchlorid)	43
C. Messung der Absorptionsspektren von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure und 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (nach Hydrolyse)	45
Literatur	48

I. Einleitung

An Proteine kopplungsfähige Fluoreszenzfarbstoffe haben für die verschiedensten Gebiete der Grundlagenforschung große Bedeutung gewonnen. Besonders häufig verwendet wird das 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (DIS, DANSYLchlorid).

WEBER (34) stellte das DIS erstmals im Jahre 1952 dar und koppelte Proteine zur Untersuchung ihrer Fluoreszenzpolarisation. Die Polarisationsmessung der Fluoreszenz erlaubt Rückschlüsse auf den Aufbau der markierten Proteine und ist heute zu einer wichtigen Methode der Proteinstrukturforschung geworden (17).

HARTLEY und MASSI
 Zentrum des Enzyms zu
 Methodologie in der Enzy

DIS kann zur Bestim
 benutzt werden (16) und
 von Aminosäuren und A

MAYERSBACH und P
 verschiedene Proteine mit D
 Proteinen verfolgen. In ah

DIS-markierter Tumor-ur
 Die Vorstufe von DI
 Fluoreszenzstandard für d

CLAYTON (6) erwähnt
 zur Lokalisation von Antig
 (25) die Eignung des Farb

fache Alternative dem sch
 über. Seit der Darstellung
 DIS nur noch selten in d

ehende Untersuchungen üb
 zen vorgenommen wurden
 Einige, wenn nicht all

sondere Reinheit des kopp
 In der Immunhistolog
 die Reinheit der Markierung

I. Bei der Kopplungsr
 menge eingesetzt werden.
 Kopplungsraten des Farbs

Raten) zu erhalten.
 Ist der Anteil von ko
 Umständen zu große Farbs

line „übermarkiert“ wird¹

1) In der Immunhistolog
 kierte γ -Globuline:
 Mittlere Farbstoff-Protein

spezifische Färbung durch mar
 Hohe F/P-Rate, dadurch s
 der Globuline im Gewebe, spezi

„Untermarkierte“ γ -Glob
 Niedrige F/P-Rate, keine
 spezifische Fluoreszenz infolge o

HARTLEY und MASSEY (19) koppelten Chymotrypsin mit DIS, um das aktive Zentrum des Enzyms zu identifizieren. Sie legten damit den Grund zu einer neuen Methodologie in der Enzymforschung (23).

DIS kann zur Bestimmung der Aminoendgruppen von Proteinen und Peptiden benutzt werden (16) und dient als sehr empfindliches Reagens zur Sichtbarmachung von Aminosäuren und Aminen auf Dünnschichtchromatographien (32, 33).

MAYERSBACH und PEARSE (27) sowie v. MAYERSBACH (26) markierten verschiedene Proteine mit DIS und konnten Verteilung und Schicksal von injizierten Proteinen verfolgen. In ähnlicher Weise untersuchten ERNST et al. (9) die Ablagerung DIS-markierter Tumor- und Leber-Desoxyribonucleinsäure.

Die Vorstufe von DIS die 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure wird als Fluoreszenzstandard für die Fluorometrie empfohlen (3).

CLAYTON (6) erwähnte DIS erstmalig als Markierungssubstanz von Antikörpern zur Lokalisation von Antigenen im Gewebe. Eingehend untersuchte v. MAYERSBACH (25) die Eignung des Farbstoffes für die Immunfluoreszenz und stellte ihn als einfache Alternative dem schwierig darstellbaren Fluoresceinisocyanat (FIC) (7) gegenüber. Seit der Darstellung des Fluoresceinisothiocyanats durch RIGGS et al. (30) wird DIS nur noch selten in der Immunhistologie verwendet, ohne daß jedoch vergleichende Untersuchungen über die Leistungsfähigkeit der beiden Markierungssubstanzen vorgenommen wurden (13).

Einige, wenn nicht alle der aufgeführten Anwendungsgebiete erfordern eine besondere Reinheit des kopplungsfähigen Farbstoffes.

In der Immunhistologie (Immunfluoreszenz, Markierte Antikörpertechnik) ist die Reinheit der Markierungssubstanz aus folgenden Gründen notwendig:

1. Bei der Kopplungsreaktion mit dem γ -Globulin muß eine definierte Farbstoffmenge eingesetzt werden, um unter sonst gleichen Bedingungen reproduzierbare Kopplungsraten des Farbstoffes mit dem Globulin (Farbstoff-Proteinraten = F/P-Raten) zu erhalten.

Ist der Anteil von kopplungsfähigem Farbstoff nicht bekannt, werden unter Umständen zu große Farbstoffmengen zugefügt, so daß ein großer Anteil der Globuline „übermarkiert“ wird¹⁾. Übermarkierte Antikörper verursachen unspezifische

1) In der Immunhistologie haben sich folgende Begriffe eingebürgert: „Optimal“ markierte γ -Globuline:

Mittlere Farbstoff-Proteinrate (F/P-Rate), dadurch gute spezifische Fluoreszenz, keine unspezifische Färbung durch markierte Proteine. „Übermarkierte“ γ -Globuline:

Hohe F/P-Rate, dadurch starke unspezifische Färbung infolge elektrostatischer Adsorption der Globuline im Gewebe, spezifische Färbung dadurch häufig überdeckt.

„Untermarkierte“ γ -Globuline:

Niedrige F/P-Rate, keine unspezifische Färbung, aber auch keine oder nur sehr schwache spezifische Fluoreszenz infolge der geringen Farbstoffmenge am Immunglobulin.

Färbung und müssen entfernt werden, wodurch es zu einem Verlust an Antikörpern kommt.

Werden andererseits zu geringe Farbstoffmengen zugeführt, überwiegen die „untermarkierten“ Globuline, die eine zu geringe Fluoreszenzstärke der Antigen-Antikörperagglomerate bewirken und deshalb ebenfalls zu entfernen sind.

2. Zur Verhinderung unspezifischer Färbungen durch Farbstoffverunreinigungen (5).

3. Zur quantitativen Beurteilungsmöglichkeit immunhistologischer Reaktionen.

4. Zum objektiven Vergleich der Kopplungskinetik und der Fluoreszenzausbeute verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe.

Verschiedene Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß das im Handel erhältliche Fluoresceinisothiocyanat weitgehend uneinheitlich ist (5, 8, 10, 24, 28, 29). Im Gegensatz zum FITC fehlen für das DIS Synthesevorschriften zur Reindarstellung und befriedigende Methoden zur Reinheitsbestimmung, wengleich schon früher Uneinheitlichkeit von DIS-Produkten beschrieben wurde (24).

II. Methoden

A. Darstellungsgang für ein weitgehend reines 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (DIS, DANSYLchlorid)

1. Reinigung der 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure (Laurentsche Säure)

20 g Laurentsche Säure (Fa. Th. Schuchardt) in 1 l Wasser suspendieren und 15 min zum Sieden erhitzen. Nach und nach NaOH in Substanz hinzufügen (ca. 3 g), bis die Laurentsche Säure vollständig gelöst ist. Einrühren von etwa 10 g Aktivkohle, auf dem Bunsenbrenner weitere 15 min kochen und durch einen Büchnertrichter mit Rundfilter 602 eh (Schleicher & Schüll) heiß filtrieren.

Zu dem noch warmen Filtrat konz. Salzsäure unter Rühren zusetzen, bis $pH = 1$ erreicht ist (Indikatorpapier).

Der rosa gefärbte Niederschlag der freien Säure wird auf dem Büchnertrichter abgesaugt und mit Wasser auf dem Filter gewaschen.

Die freie Säure in Portionen bis zur Vollsättigung in siedendes Wasser einbringen (ca. 3 bis 4 g pro 1 l Wasser), mit 6 g Aktivkohle pro Liter versetzen, 15 min kochen und durch einen Büchnertrichter mit Rundfilter 602 eh (Schleicher & Schüll) heiß filtrieren. Die völlig klare Lösung wird zur Kristallisation über Nacht zur Seite gestellt. Die entstandenen farblosen Kristallnadeln werden auf einem Büchnertrichter abgesaugt und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.

2. Methylierung von 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure

In einen Zweihalskolben (500 ml) mit Thermometer und Blasenähler werden 22,3 g (0,1 Mol) 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure und 29,4 g (0,35 Mol) Natriumhydrogencarbonat in 100 ml Wasser gegeben.

Nach $\frac{1}{2}$ stündigem Rühren auf dem Magnetrührer wird die Temperatur im Eisbad auf 5 bis 6 °C herabgesetzt.

Dann wird das gesamte Dimethylsulfat (23 ml = 0,25 Mol) hinzugefügt und die Reaktion bei dieser Temperatur bis zur Beendigung des Blasenstromes belassen (ca. 5 Std.).

Häufig tritt zu Beginn der Reaktion Schaumbildung auf, die durch Zufügen einer geringen Menge Wasser aufgelöst werden kann.

Nach Abklingen der Reaktion wird das überschüssige Dimethylsulfat durch 30 min langes Erwärmen des Kolbeninhaltes auf 60 bis 70 °C zersetzt.

Zur Abscheidung der 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure wird der Reaktionslösung konz. HCl bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 1 zugesetzt. Der Niederschlag wird auf dem Büchnertrichter abgesaugt, mit 0,1 N HCl gewaschen und mehrere Male (bis zu 10mal) aus 0,1 N HCl umkristallisiert.

3. Chlorierung von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure

In einem 100 ml Rundkolben wird 1 g 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure in 5 ml destilliertem Dimethylformamid suspendiert und 20 ml destilliertes Thionylchlorid hinzugefügt.

Die Reaktion geht fast momentan bei Zimmertemperatur unter Freisetzung von Wärme vor sich.

Das überschüssige Dimethylformamid und das Thionylchlorid werden am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 30 bis 40 °C entfernt. Es bleiben gelbe Kristallnadeln zurück.

Zur Zersetzung von restlichem Thionylchlorid und Dimethylformamid bzw. des Hydrochlorids des 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid wird mit 1 M Na₂CO₃-Lösung alkalisch gemacht und DIS durch Ausschütteln mit Diäthyläther im Scheidetrichter extrahiert.

Die ätherische Lösung von DIS wird mit wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet.

Nach Entfernen des Äthers am Rotationsverdampfer bilden sich orangefarbene Kristalldrusen von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (DIS, DANSYLchlorid).

Destillation von Thionylchlorid

Das Thionylchlorid ist als gelbgefärbte Flüssigkeit im Handel (Merck, Riedel de Haën).

Zunächst werden 250 ml Thionylchlorid über eine Vigreux-Kolonne mit Liebig-Kühler fraktioniert destilliert. Die erste Fraktion ergibt etwa 40 ml stark gefärbtes Destillat. Daran schließt sich die schwach gelb gefärbte Hauptfraktion mit 150 ml an. Im Kolben bleibt eine dunkelrotbraune Flüssigkeit zurück, auf deren Destillation verzichtet wird.

Die 150 ml der Hauptfraktion werden auf 60 g zerkleinertes Bienenwachs (Merck) gegossen und gelinde unter Rückfluß zum Sieden erhitzt (15 min).

Anschließend erneute Destillation über die Vigreux-Kolonne mit Liebig-Kühler. Thionylchlorid destilliert als wasserklare Flüssigkeit über.

Destillation von Dimethylformamid

Dimethylformamid enthält als Verunreinigung Amine, Ammoniak, Formaldehyd und Wasser.

Zu 175 ml Dimethylformamid (Merck) werden 23 ml Benzol und 8 ml Wasser hinzugefügt. Dieses Gemisch wird über eine Vigreux-Kolonne mit Liebig-Kühler fraktioniert destilliert.

Zunächst gehen bei Atmosphärendruck Benzol, Wasser, Amine und Ammoniak über. Es werden etwa 20 ml mit Benzolgeruch aufgefangen. Dann wird im Vakuum destilliert. Es gehen etwa 100 ml farbloses und geruchloses Dimethylformamid über. Im Kolben bleibt eine gelb gefärbte Flüssigkeit zurück.

4. Umkristallisation von DIS (4)

100 mg DIS werden in 5 ml eines warmen Isooctan-Acetongemisches (4,2 ml Isooctan + 0,8 ml Aceton) gelöst und die Lösung filtriert. Hierauf wird das Volumen des Filtrates durch einen Stickstoffstrom bis zur beginnenden Trübung der Lösung vermindert, die Lösung nochmals erwärmt und im Eisbad abgekühlt.

Es entstehen große orangefarbene Kristalle, die mit Isooctan gewaschen und im Vakuum getrocknet werden.

B. Dünnschichtchromatographie

Es werden Selecta-Fertigplatten beschichtet mit Cellulosepulver Nr. 144, Avicel (Schleicher & Schüll) benutzt.

Als Laufmittelsystem dient folgendes Vierkomponentengemisch:

n-Butanol	10 Teile
n-Propanol	5 Teile
Wasser	4 Teile
konz. NH_3	1 Teil.

Das Chromatogramm wird in einer Rechteckkammer der Fa. Desaga entwickelt. Um gute Kammersättigung zu erreichen, wird die Schliffverbindung zwischen Gefäß und Deckel gefettet, die Kammer U-förmig mit Filterpapier ausgekleidet, das Papier mit Laufmittel getränkt und die Flüssigkeit vor dem Einbringen der Platten umgeschüttelt. Die Substanzen werden mit einer Mikropipette aufgetragen. Um den Startpunkt möglichst klein zu halten, wird mehrmals nacheinander aufgetragen und jeweils mit einem Fön getrocknet.

1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure, 1-Amino-naphthalin-8-sulfonsäure, 1-Amino-naphthalin-3,8-disulfonsäure und 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure werden mit Wasser unter Zusatz von wenig NH_3 (25%) gelöst.

1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid wird sowohl in Wasser als auch in 0,1 N NaHCO_3 bei 60 bis 79 °C (Wasserbad) für etwa 24 Std. hydrolysiert.

Nach der Hydrolyse ergibt sich für die 0,1 N NaHCO_3 -Lösung ein pH-Wert von 8,4, für die wäßrige Lösung pH = 3,8. Durch Zufügen von 0,1 N NaHCO_3 wird auch die wäßrige Lösung auf einen pH-Wert von 8,4 gebracht.

Umsetzung von DIS mit 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure

In einem Reagenzglas werden 30 mg (0,13 mMol) 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure in 3 ml 0,5 M Na_2CO_3 gelöst. Dann Zutropfen von 38 mg (0,14 mMol) DIS in acetonischer Lösung (3,8 ml der 10 mg/ml enthaltenden Lösung) unter Rühren auf dem Magnetrührer.

Reaktionsdauer 7 Stunden bei Zimmertemperatur. Anschließend Hydrolyse bei 60 bis 70 °C im Wasserbad.

Die Auswertung der Dünnschichtplatten erfolgt im UV-Licht einer Quecksilberlampe. Zur Dokumentation werden die Platten im UV-Licht photographiert: Film Kodak Ektachrome High-speed, Blende 4,5 bei einer Belichtungszeit = 1 min mit Gelbfilter. Herstellung von Schwarz-Weiß-Abzügen.

C. Messung der Absorptionsspektren von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure und 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (nach Hydrolyse)

Die Absorptionsspektren werden durch kontinuierliche Registrierung auf dem Leitz- Unicam-Spektralphotometer 800 vermessem.

$\frac{1}{8}$ mMol = 31,41 mg 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure (Molekulargewicht = 251,28) werden in einem Liter H_2O bzw. in einem Liter 0,1 N $NaHCO_3$ gelöst. Die wäßrige Lösung weist einen pH-Wert von 4,5 auf, die Lösung in 0,1 N $NaHCO_3$ pH = 8,4.

$\frac{1}{8}$ mMol = 33,72 mg 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (Molekulargewicht = 269,75) werden zunächst in 5 ml H_2O bzw. 0,1 N $NaHCO_3$ im Wasserbad bei 60 bis 70 °C hydrolysiert (Dauer etwa 24 Std.) und dann jeweils auf einen Liter H_2O bzw. einen Liter 0,1 N $NaHCO_3$ aufgefüllt (pH-Werte der Lösungen 3,8 bzw. 8,4).

III. Ergebnisse und Diskussion

A. Darstellung von weitgehend reinem 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (DIS, DANSYLchlorid) (Abb. 1)

1. Reinigung der 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure (Laurentsche Säure)

Die als Ausgangsprodukt verwendete 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure (Th. Schuchardt, München) ist ein unreines, in festem Zustand grauviolett gefärbtes Produkt. Da das Natriumsalz der 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure wesentlich besser wasserlöslich ist als die freie Säure, werden zunächst konzentrierte Lösungen des Natriumsalzes hergestellt. In diese dunkelrotbraune Lösung wird Aktivkohle eingerührt, einige Zeit gekocht und heiß filtriert. Die Wiederholung dieses Reinigungsschrittes ist zwecklos, da sich die Laurentsche Säure im alkalischen Milieu und unter Luftzutritt immer wieder rasch unter Braunfärbung zersetzt. Die freie Säure ist dagegen wesentlich beständiger. Deshalb wird aus der leicht braun gefärbten Lösung des vorgereinigten Na-Salzes die freie Säure durch HCl-Zusatz unmittelbar ausge-

Synthesegang

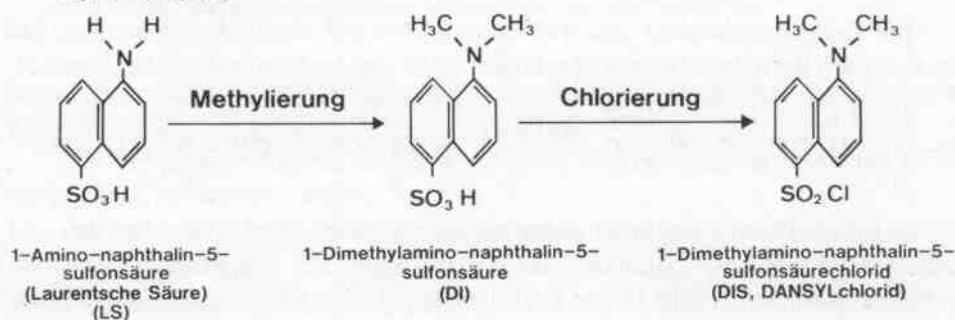


Abb. 1.

fällt und abgesaugt. Dann werden heißgesättigte wäßrige Lösungen der freien Säure hergestellt, mit Aktivkohle gekocht und heiß filtriert. Mit dem langsamen Abkühlen der Lösung kristallisiert die 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure in farblosen Nadeln oder Prismen.

Die Säure und ihre Salze zeigen im UV-Licht eine gelbgrüne Fluoreszenz.

2. Methylierung der 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure (Laurentsche Säure)

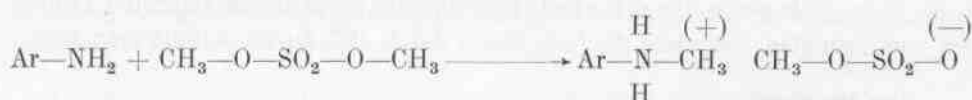
In der Literatur werden für die Methylierung der 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure unterschiedliche Methoden angegeben:

Nach FUSSGÄNGER (11) wird die Laurentsche Säure mit NaOH, Methanol und Jodmethyl vermischt, in Bombenrohre gefüllt und im Bombenofen erhitzt. Die Ausbeute beträgt etwa 80%.

Zur Vereinfachung des Arbeitsganges methyliert v. MAYERSBACH (25) die Laurentsche Säure nach Lösen in KOH unter Erwärmen und Schütteln mit Dimethylsulfat. Ausbeute: 60 bis 70%.

LAURENCE (23) löst die 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure in wäßriger Natronlauge, erhitzt am Rückfluß zum Sieden und fügt dann tropfenweise Dimethylsulfat hinzu. Ausbeute: 80%.

Alle diese Methoden sind nicht voll befriedigend. Entweder ist ein großer apparativer Aufwand erforderlich wie bei der Methode nach FUSSGÄNGER, oder die Methylierung bleibt unvollständig wie bei der Umsetzung in stark alkalischem Milieu (siehe Chromatogramm Abb. 2). Eine einfache und zuverlässige Methode zur Methylierung aromatischer Amine mit Dimethylsulfat wird von HÜNIG (20) angegeben: Der Mechanismus der Methylierung mit Dimethylsulfat besteht darin, daß das freie Elektronenpaar des Amins die Methylgruppe übernimmt:



Die Reaktionsmischung muß auf einem solchen pH-Wert gehalten werden, daß aus dem nach der obigen Gleichung gebildeten Salz das Amin hydrolytisch regeneriert.



Auf diese Weise entsteht zunächst aus dem primären Amin das sekundäre und entsprechend aus dem sekundären das tertiäre Amin. Um den pH-Wert nicht absinken zu lassen, wird NaHCO₃ zur Reaktionslösung hinzugefügt, das die entstehende H₂SO₄ unter Kohlensäureentwicklung neutralisiert. Das frei werdende CO₂ wird über

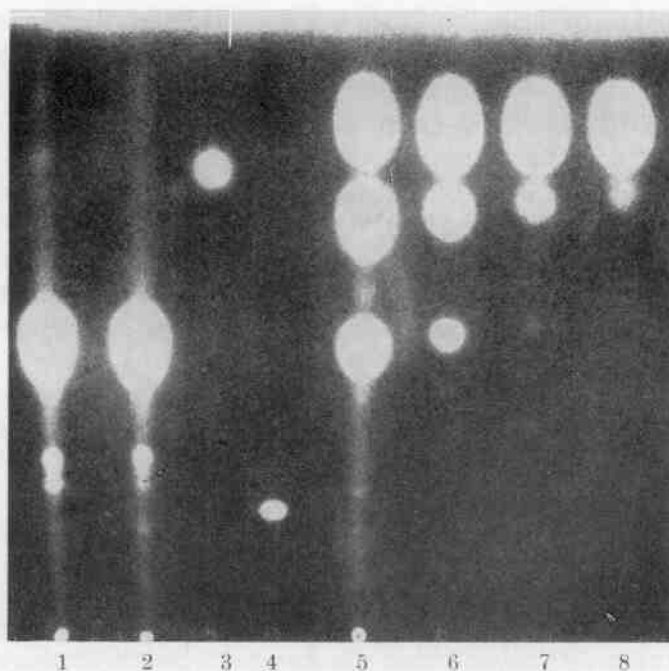


Abb. 2. Cellulosedünnschichtplatte, Laufmittel: n-Butanol 10 Teile
 n-Propanol 5 Teile
 (Photographie im UV-Licht) Wasser 4 Teile
 konz. NH_3 1 Teil

- 1 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure, ungereinigt, $5 \mu\text{g}$
- 2 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure, gereinigt, $5 \mu\text{g}$
- 3 1-Amino-naphthalin-8-sulfonsäure, $\frac{1}{8} \mu\text{g}$
- 4 1-Amino-naphthalin-3,8-disulfonsäure, $\frac{1}{8} \mu\text{g}$
- 5 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure, kommerzielles Produkt, $5 \mu\text{g}$
- 6 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure, synthetisiert nach v. MAYERSBACH, $5 \mu\text{g}$
- 7 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure, synthetisiert nach FUSSGÄNGER, $5 \mu\text{g}$
- 8 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure, eigenes Produkt, $5 \mu\text{g}$

einen Blasenähler zur Reaktionskontrolle und Bestimmung des Reaktionsendpunktes verwendet.

Die Temperatur wird bei etwa 5°C gehalten, wodurch die Verseifung des Dimethylsulfates verlangsamt wird.

Als optimales Verhältnis der Reaktionspartner wird von HÜNIG (20) angegeben:

Aromatisches Amin	1 Mol
Dimethylsulfat	2,5 Mol
Natriumhydrogencarbonat	3,5 Mol

Diese Reaktionsverhältnisse haben wir auch zur Methylierung der 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure mit Erfolg verwenden können. Auf diese Weise läßt sich die 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure einfach, gut kontrollierbar und nahezu vollständig in die 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure überführen. Vergleichbare Reaktionsbedingungen werden von GLEBOVA (12) mitgeteilt.

Anschließend wird die 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure durch Umkristallisation aus 0,1 N HCl gereinigt. 0,1 N HCl erweist sich wirksamer als Wasser, da die Verunreinigungen — 1-Amino-naphthalin-5-sulfonsäure und 1-Monomethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure (siehe Teil Dünnschichtchromatographie) — offenbar in 0,1 N HCl gegenüber 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure größere Löslichkeitsunterschiede aufweisen.

1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure kristallisiert in farblosen, glänzenden, vierseitigen Blättchen mit 1 Mol Kristallwasser. Sie ist in Wasser schwer, in organischen Lösungsmitteln praktisch unlöslich.

Die Substanz zersetzt sich oberhalb 270 °C, ohne zu schmelzen.

Die Säure und ihre Salze zeigen in wäßriger Lösung im UV-Licht grüne Fluoreszenz.

3. Chlorierung der 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure

Nach WEBER (34) haben bisher alle Autoren 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure durch Verreiben mit Phosphorpentachlorid (PCl_5) chloriert. LAURENCE (23) verreibt 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure und PCl_5 in einem dickwandigen Reagenzglas mit einem Glasstab zu einer graugelben Paste. Zur Zersetzung des überschüssigen PCl_5 bzw. des Hydrochlorids von DIS wird dann mit eiskalter 1 M Na_2HPO_4 -Lösung alkalisch gemacht und DIS mit Äther extrahiert. Nach Entfernen der letzten Ätherreste bilden sich orangefarbene Kristalle.

Die Umsetzung mit PCl_5 ist ein unbefriedigendes Verfahren, das sehr wechselnde Ausbeuten liefert (20 bis 60% der Theorie).

Durch Umsetzung von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure mit Thionylchlorid und Dimethylformamid konnten wir die Darstellung des Säurechlorids wesentlich verbessern.

Thionylchlorid allein eignet sich nicht zur Chlorierung von Sulfonsäuren. Erst BOSSHARD, MORY, SCHMIDT und ZOLLINGER (2) fanden im Dimethylformamid einen geeigneten Katalysator, der die Darstellung von Sulfochloriden mit SOCl_2 ermöglicht.

Der Reaktionsablauf entspricht folgendem Formelbild:



Dimethylformamid bildet mit Thionylchlorid ein Zwischenprodukt, das mit der Sulfonsäure reagiert. Dimethylformamid wird als echter Katalysator wieder frei.

Die Sulfonsäuren werden mit dieser Methode nahezu quantitativ zu den Sulfonsäurechloriden umgesetzt (21).

Wir erprobten verschiedene Versuchsanordnungen zur Chlorierung von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure:

Verwendung von Thionylchlorid als Lösungsmittel und Zusatz von kleinen Mengen Dimethylformamid (etwa 1/10 Äquivalente, bezogen auf die umzusetzende Säuregruppe), dann erhitzen unter Rückfluß. Es scheint jedoch unter diesen Bedingungen zu Zersetzungen des Sulfochlorids zu kommen.

In Dimethylformamid als Lösungsmittel unter Zugabe von wenig mehr als der theoretisch erforderlichen Menge Thionylchlorid läßt sich nur ein kleiner Teil der 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure chlorieren.

Als erfolgreich und einfach erweisen sich folgende Reaktionsbedingungen:

Suspendieren von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure (z. B. 1 g) in einer ausreichenden Menge Dimethylformamid (z. B. 5 ml) und Zufügen eines großen Überschusses von Thionylchlorid (z. B. 20 ml). Unter stärkerer Wärmetönung erfolgt fast momentan die Umsetzung in das Sulfochlorid.

Anschließend wird überschüssiges Dimethylformamid und Thionylchlorid am Rotationsverdampfer entfernt. Es bleiben gelbe Kristallnadeln des Hydrochlorids von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid zurück. Zur Zersetzung von restlichem Dimethylformamid und Thionylchlorid bzw. des Hydrochlorids von DIS wird mit Na_2CO_3 -Lösung alkalisch gemacht und DIS durch Ausschütteln mit Diäthyläther extrahiert. Die ätherische Lösung von DIS wird getrocknet und der Äther am Rotationsverdampfer entfernt. Es bleiben orangefarbene Kristalldrüsen von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid zurück.

Es war notwendig Thionylchlorid und Dimethylformamid durch Destillation zu reinigen, da es sonst durch Verunreinigungen zu störenden Nebenprodukten kommt.

4. Umkristallisation von DIS

WEBER (34) nimmt 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid in Aceton auf und verdünnt mit Wasser. Dabei entstehen kleine gelbe Kristalle, die sich nur schwer absaugen lassen.

LAURENCE (23) löst DIS in siedendem Äther und kühlt auf -10°C . Die Kristallisation kommt unter diesen Bedingungen nur schwer in Gang.

Besonders bewährt hat sich uns die von CHEN (4) angegebene Kristallisationsmethode. DIS wird dabei in einem warmen Isooctan-Acetongemisch gelöst und die Lösung im Eisbad abgekühlt. Es entstehen große orangefarbene Kristalle.

5. Charakterisierung von DIS

1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid (DIS, DANSYLchlorid) bildet orangefarbene oder gelbe Kristalle.

Es ist unlöslich in Wasser, zeigt jedoch gute Löslichkeit in Aceton, Äthanol, Benzol, Dioxan.

