

## 238. Hans Musso: Die Trennung des Orceins in seine Komponenten (II. Mitteil. über Orceinfarbstoffe)<sup>1)</sup>

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]  
(Eingegangen am 3. April 1956)

Verteilungschromatographisch gelingt es, im Orcein 14 farbige Komponenten nachzuweisen, von denen 5 kristallisiert und 4 weitere chromatographisch rein dargestellt wurden. Ihre Isolierung, Eigenschaften und Absorptionsspektren werden beschrieben.

Behandelt man bestimmte hellgraue Flechten (*Roccella*-, *Lecanora*- und *Variolaria*-Arten) mit Harn oder wäßrigem Ammoniak und Luft, so entsteht nach einigen Tagen ein violetter Farbstoff, der seit dem Mittelalter (vielleicht schon seit dem Altertum) bis zum Ende des 19. Jahrhunderts als Orseille (Cudbear, Archil, Persio oder Purple française) neben Alizarin und Indigo zum Färben von Seide und Wolle Verwendung fand. Orcein, der gereinigte Alkoholextrakt der Orseille, ist im vorigen Jahrhundert wiederholt untersucht worden. Dieser Farbstoff zieht aus saurem, neutralem und schwach alkalischem Bade gleich gut auf die Faser, ist aber nicht echt, so daß heute damit nur gelegentlich Lebensmittel und in der Histologie elastische Fasern gefärbt werden.

H. Robiquet<sup>2)</sup> isolierte 1829 aus den Färberflechten Orcin (3,5-Dihydroxy-toluol), das in den Pflanzen als Orsellinsäure-depsid (Lecanorsäure, Erythrin) vorliegt. Er erhielt aus Orcin unter den gleichen Bedingungen wie aus den Flechten einen Farbstoff, den er von Orcin nicht unterscheiden konnte, und stellte fest, daß bei dieser Reaktion der Luftsauerstoff notwendig ist und Stickstoff aus dem Ammoniak in den Farbstoff eingebaut wird. Weitere Reinigungsversuche und Analysen von Liebig, J. Dumas<sup>3)</sup>, R. Kane<sup>4)</sup>, J. Stenhouse und C. Liebermann<sup>5)</sup> zeigten, daß Orcein nicht einheitlich ist. Die Versuche zur Konstitutionsermittlung der alten Farbstoffe führten bei Indigo und Krapp zum Ziel, beim Orcein dagegen nicht. Es ist historisch interessant, wie sich aus der Suche nach den Chromogenen die umfangreiche Chemie der Flechteninhaltsstoffe<sup>6)</sup> entwickelt hat, ohne daß die Struktur der Farbstoffe bekannt wurde, denen ursprünglich die Aufmerksamkeit galt. Wegen unzureichender Trennungsmethoden gelang es bisher nicht, aus dem Orcein eine mit Sicherheit einheitliche Verbindung zu isolieren. Die Summenformel  $C_{28}H_{24}O_7N_2$  von K. Zulkowski und K. Peters<sup>7)</sup> sowie alle späteren Versuche<sup>8)</sup> und Konstitutionsvorschläge von F. Henrich und J. Pavolini<sup>9)</sup> blieben deshalb unbefriedigend.

Mit den modernen Methoden (Papierchromatographie, Elektrophorese, Ionenaustausch und Verteilung) erscheint es möglich, dieses Farbstoffgemisch

<sup>1)</sup> I. Mitteil.: H. Musso, Naturwissenschaften **42**, 513 [1955].

<sup>2)</sup> Liebigs Ann. Chem. **15**, 289 [1835].

<sup>3)</sup> Liebigs Ann. Chem. **27**, 140 [1838]. <sup>4)</sup> Liebigs Ann. Chem. **89**, 25 [1841].

<sup>5)</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. **7**, 247 [1874]; **8**, 1649 [1875].

<sup>6)</sup> Y. Asahina u. S. Shibata, Chemistry of Lichen Substances, Tokyo [1954].

<sup>7)</sup> Mh. Chem. **11**, 227 [1890].

<sup>8)</sup> J. Herzig u. F. Wenzel, Mh. Chem. **24**, 881 [1903]; F. Henrich u. W. Meyer, Z. Farben- u. Textil-Chemie **1**, 595, 599 [1902]; F. Henrich u. W. Herold, Ber. dtsch. chem. Ges. **61**, 767, 2343 [1928]; F. Henrich, M. Dannehl, H. Haertlein u. W. Hoffmann, J. prakt. Chem. N. F. **140**, 1 [1934]; F. Henrich, S.-B. physik.-med. Soz. Erlangen **71**, 199 [1939]. <sup>9)</sup> Atti Congr. naz. Chim. pura appl. **4**, 557 [1933]; C. **1934** II, 256.

zu trennen. Bevor man mit der Konstitutionsermittlung beginnen kann, ist es notwendig, eine analytische Trennungsmethode auszuarbeiten, die es gestattet, Orcein auf seine Bestandteile und die einzelnen Komponenten auf Einheitlichkeit zu prüfen, und ausreichende Mengen der reinen Komponenten zu gewinnen, indem man entweder durch Variation der Reaktionsbedingungen bei der Darstellung des Orceins aus Orein versucht, vorwiegend nur eine Komponente zu erhalten, oder, wenn dieses nicht möglich ist, das Gemisch präparativ zu trennen. In der vorliegenden Arbeit werden die Versuche zur Lösung dieser Aufgaben und die präparative Darstellung der reinen Komponenten beschrieben.

### 1. Analytische Trennung des Orceins

Papierchromatographie. Bei der Prüfung zahlreicher Lösungsmittelsysteme wurde gefunden, daß man mit *n*-Butanol oder *sek.-*Butanol und wäßrigem 0.2 bis 0.5 m Phosphatpuffer vom  $p_{\text{H}}$  11.5 bis 12.5 im Ringchromatogramm 10 z. T. etwas verwaschene Zonen erkennen kann, wenn man das Papier (Schleicher & Schüll 2043 b) mit dem Puffer tränkt, an der Luft bei Raumtemperatur trocknet und wie üblich verfährt. Nach der auf- oder absteigenden Methode wurden nur ausgezogene Flecken erhalten, die stark überlappten. Überträgt man diese Systeme auf kleine Cellulosepulversäulen (siehe weiter unten), so stimmt aber die Reihenfolge der Zonen nicht mit der auf dem Papier überein. Das puffergesättigte Butanol verliert offenbar beim Ausbreiten über dem gepufferten Papier soviel Feuchtigkeit, daß keine echte Verteilung stattfinden kann, und ein Teil der Substanz, auch bei einheitlichen Verbindungen, mit dem trockenen Butanol der Lösungsmittelfront mitgenommen wird. Auf naß gepuffertem Papier ist die Trennung besser reproduzierbar, jedoch treten neue Zonen mit kleinen  $R_F$ -Werten auf. Prüft man die an der Säule einheitliche und gut kristallisierte Komponente V im Ringchromatogramm, so zeigt sie überraschenderweise drei Zonen (1, 2, 3) und wenig Substanz (4), die am Startpunkt hängen bleibt. Eluiert man die drei Zonen aus Ringchromatogrammen und trägt sie einzeln bei  $E_1$ ,  $E_2$  und  $E_3$  neben der reinen Komponente V auf, so erhält man ein Chromatogramm, wie es in Abbild. 1 zu sehen ist. Alle Substanzen erscheinen nicht einheitlich. Die eluierte Zone  $E_1$  zeigt 1, 2, 3 und 4 sowie wenig Substanz (0), die mit der Lösungsmittelfront läuft. Im Vergleich zur reinen Komponente V ist aber die Zone 1 schwächer und die Zone 4 wesentlich stärker vertreten. Die eluierte Zone  $E_2$  enthält 2, 3, 4 und 0, die eluierte Zone  $E_3$  entsprechend nur noch 3, 4 und 0. Die Zone 1 enthält demnach die reine Komponente V, die beim Eluieren und erneuten Chromatographieren laufend verändert wird, wobei die Zersetzungprodukte 2, 3 und 4 in der angegebenen Reihenfolge entstehen. An Cellulosepulver in der Säule erhält man mit den eluierten Zonen ( $E_1$ ,  $E_2$  und  $E_3$ ) ein dem Ringchromatogramm entsprechendes Bild (Abbildung 1), aber nur eine Zone, wenn man die reine Komponente V chromatographiert. Dieses zeigt, daß die Trennung an der Säule und auf dem Papier gleich gut verläuft, nur daß die reine Komponente V an der Säule unver-

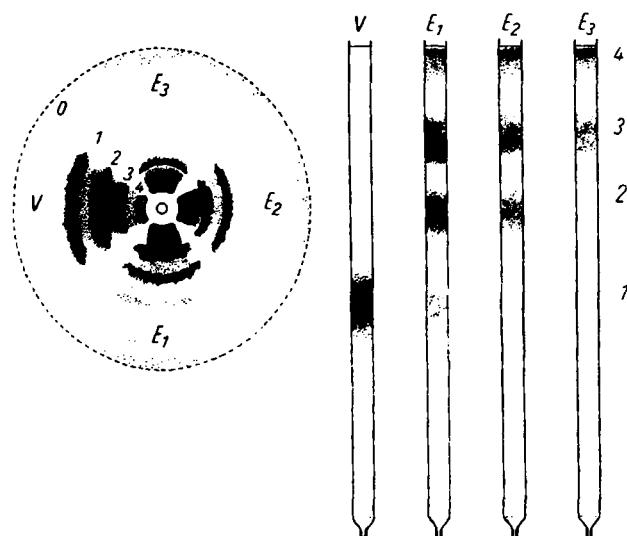


Abbildung 1. Ringchromatogramm und Säulentrennung der Zersetzungspprodukte von V, die während der Papierchromatographie auftreten; in Butanol-Phosphatpuffer  $p_H$  12.00

ändert wandert, während sie im Ringchromatogramm bereits am Anfang, auf der großen Oberfläche des Papiers ausgebreitet, wahrscheinlich durch den Luftsauerstoff, in die Sekundärprodukte 0, 2, 3 und 4 verwandelt wird. Es gelang bisher nicht, ein System zu finden, das auf dem Papier auch nur annähernd soviel Zonen erkennen ließ wie auf der Säule (siehe weiter unten) und bei dem keine Veränderung der Orceinfarbstoffe stattfand.

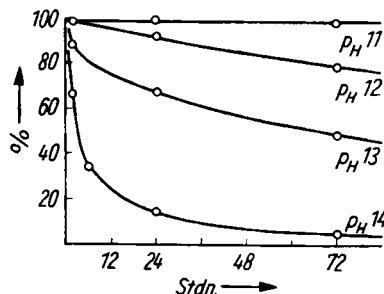
Adsorptionschromatographie und Ionenaustausch ergaben keine gute Trennung, da Orcein in den schwach polaren Lösungsmitteln, die für eine Chromatographie an den klassischen Adsorptionsmitteln geeignet sind, zu wenig löslich ist, und von den starken Adsorbenzien nicht vollständig eluiert werden konnte. An Aluminiumoxyd<sup>10)</sup> wurden aus Tetrahydrofuran, Butanol, Methanol und währ. Ammoniak 4 bis 5 sehr verwaschene, an Kieselgel 2 und an Gips 5 etwas schärfere Zonen beobachtet. Die basischen Ionenaustauscher Dowex 1 und 2, sowie Amberlite IR-4B waren ungeeignet. Unter den verschiedensten Bedingungen ließen sie 3 Zonen erkennen, und stets wurde ein Teil des Orceins irreversibel adsorbiert, was bei aromatischen Hydroxy-Verbindungen an Polystyrolharzen verständlich ist.

Die Papierelektrophorese des Orceins gelingt erst ab  $p_H$  12.00, wobei man 7 anodisch wandernde Komponenten erkennt. Doch traten hier bei der Prüfung chromatographisch einheitlicher Substanzen aus den gleichen Gründen wie im Papierchromatogramm mehrere Zonen auf, was selbst durch Hochspannungselektrophorese bei 50 V/cm in 15 Min. unter Toluol nach H. Michl<sup>11)</sup> nicht vollständig verhindert werden konnte. Man muß also bei der Trennung des Orceins die Ausbreitung der Substanz auf einer großen Papieroberfläche an der Luft vermeiden.

Verteilung zwischen zwei begrenzt mischbaren Phasen. Aus den Löslichkeiten des Orceins (siehe Versuchsteil) ließen sich zwei brauchbare Ver-

<sup>10)</sup> Hrn. Dr. H. Harms, Sero.-Bakt.-Abtlg. d. Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, danke ich für den Hinweis auf die Arbeit von R. L. Engle u. E. W. Dempsey, J. Histochim. and Cytochem. 2, 9 [1954], die Orcein an Aluminiumoxyd in 4 Fraktionen zerlegten. <sup>11)</sup> Mh. Chem. 82, 489 [1951].

teilungssysteme ableiten. In *n*-Butanol und wäßrigem Phosphatpuffer (System A) liegt der Verteilungskoeffizient bei  $p_{\text{H}}$  12.00 etwa um  $K = 1$  und kann mit steigendem  $p_{\text{H}}$ -Wert zugunsten der wäßrigen Phase und durch Verminde-  
rung des  $p_{\text{H}}$ -Wertes zugunsten der Butanolphase beliebig eingestellt werden.  
Im zweiten System (B): Chloroform-Formamid-Pyridin erreicht man das  
gleiche durch verschiedene Pyridinmengen oder durch Zusatz von Wasser.  
Besonders im ersten System, in dem papierchromatographisch die meisten  
Zonen auftreten, sind die Verteilungskoeffizienten in konzentrierteren Lösun-  
gen temperatur- und konzentrationsabhängig, so daß man keine ideale Ver-  
teilungskurve erwarten darf. Außerdem sind die Farbstoffe in alkalischer  
Lösung bei Luftzutritt nicht beständig (vergl. Abbild. 2). Deshalb wurde von  
einer Craig-Verteilung zunächst Abstand genommen und die Verteilung an  
festen Trägern in Chromatographiesäulen versucht. Hierbei ist es nämlich  
einfacher, den Luftsauerstoff auszuschließen.



Abbild. 2. Abnahme der Extinktion des Orcins beim Maximum 575 m $\mu$  in wäßrigem 0.5 m Phosphatpuffer bei  $p_{\text{H}}$  11 bis 13 und in 2n NaOH,  $p_{\text{H}}$  14; Konz. 20 mg/l

Im System A erwies sich Cellulosepulver als geeigneter Träger für die wäßrige Phase und im System B Kieselgel für die Formamidphase. Verteilt man 3 bis 5 mg Orcin an  $0.9 \times 25$ -cm-Säulen, so erkennt man im System A sechs Hauptzonen (I bis VI) und drei Nebenzonen (Va, VIa und VIb) mit rotvioletter bis violetter Farbe, die bei verschiedenem  $p_{\text{H}}$  unterschiedlich gut voneinander getrennt sind (Abbild. 3A). Bei  $p_{\text{H}}$  12.25 sind I, II und III deutlich auseinandergezogen, und die übrigen Fraktionen wandern als schmale Zonen nur langsam. Mit abnehmendem  $p_{\text{H}}$  rücken die oberen Zonen dichter, aber besser voneinander getrennt, an I und II heran. Am oberen Ende der Säule bleibt stets eine grau- bis braunviolette Zone (VII) hängen, die uncharakteristisch gefärbte Nebenprodukte enthält. Ferner beobachtet man drei blauen Zonen (B1, BII und BIII), von denen die ersten beiden wegen ihrer geringen Menge nur mit mehr Substanz an einer 50 cm langen Säule sichtbar werden. Die blauen Komponenten überlappen mit II, III und IV, so daß sie im System A nicht in einem Durchlauf rein abgetrennt werden konnten.

Beginnt man die Verteilung an Kieselgel mit dem Gemisch Chloroform-Formamid-Pyridin 10:10:2, so wandert mit der Lösungsmittelfront eine braunviolette Zone (0) durch, die an Cellulosepulver nicht von I und II ge-

trennt werden kann. Dann folgt eine rote Zone (I und II), während alle übrigen Komponenten noch am Kopf der Säule zurückgehalten werden (Abbildung 3B). Erhöht man den Pyridingehalt des Systems auf 10:10:3, so wird eine zweite rote Zone durchgewaschen (III bis VI), und die blauen Komponenten befinden sich gemeinsam im oberen Viertel der Säule. Bei weiterem Pyridinzusatz wandern auch sie langsam abwärts.

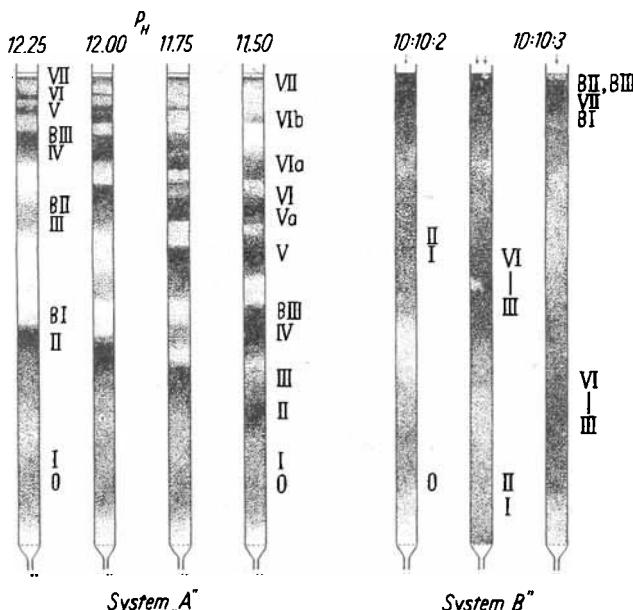


Abbildung 3. Verteilung des Orceins im System A an Cellulosepulver bei verschiedenem  $p_H$  nebeneinander; und im System B an Kieselgel mit verschiedenem Pyridingehalt auf der gleichen Säule nacheinander

Durch eine geeignete Kombination dieser Verteilungssysteme erkennt man im Orcein 14 Komponenten, die z. T. durch besonders leuchtende Farben auffallen und in Säure und Alkali charakteristische Farbumschläge zeigen (Tafel 1). Die Hauptkomponenten (I bis VII) erkennt man an einer Cellulosepulversäule bei  $p_H$  12.00, die Nebenkomponenten (Va, VIa, VIb) bei  $p_H$  11.75 und  $p_H$  11.50. An Kieselgel kann man die Zone 0 und die blauen Komponenten (BI, BII, BIII zusammen) nachweisen. BI, BII und BIII lassen sich aus der Kieselgelsäule eluieren und an Cellulosepulver bei  $p_H$  12.25 voneinander trennen. Damit war die Voraussetzung für die präparative Isolierung der einzelnen Komponenten gegeben.

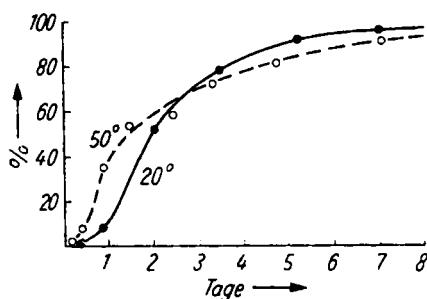
## 2. Analyse verschiedener Orcein- und Orseille-Präparate

Beim Vergleich verschiedener Proben an kleinen Cellulosepulversäulen zeigte sich, daß die meisten käuflichen Orcein-Präparate<sup>12)</sup> mit dem Orcein,

<sup>12)</sup> Der Drogenhandlung Gebr. Blembel, Hamburg, der Firma Dragoco, Holzminden, und der Firma Laroche & Juillard, Lyon, danke ich für das bereitwillige Überlassen von Orcein-, Orseille- und Flechtenproben.

das man aus Orcin in ammoniakalischer Lösung mit Luft erhält, im wesentlichen übereinstimmen. Ältere Präparate enthalten relativ viel Verunreinigungen, die am Kopf der Säule hängen bleiben (VII) und dem Chromatogramm einen verwaschenen bläulichen Untergrund verleihen. Verwendet man bei der Darstellung statt Luft Wasserstoffperoxyd<sup>7)</sup> als Oxydationsmittel, so erfolgt die Farbstoffbildung schneller, doch nimmt dabei die Menge der reinen Zonen ab und der blaue Untergrund zu. Orcin-Erakte aus Flechten enthalten dagegen keine blauen und nur sehr geringe Mengen der übrigen schnell wandernden Komponenten, dafür aber viel rotbraune Farbstoffe, die besser wasserlöslich sind und daher in dem hier genannten Lösungsmittelsystem am Kopf der Säule hängen bleiben.

Verfolgt man die Farbstoffbildung aus Orcin bei Raumtemperatur und 50° bei verschiedenen Verdünnungen quantitativ, so erkennt man am Anfang der Kurve eine kurze Induktionsperiode (Abbild. 4). Außerdem stellt man fest, daß die von Zulkowski und Peters<sup>7)</sup> gewählte Orcinkonzentration für die Ausbeute an den Hauptkomponenten die günstigste ist, und fast alle Komponenten gleichzeitig auftreten und gleichmäßig vermehrt werden. In größerer Verdünnung oder mit festem Orcin und feuchtem Ammoniakdampf entstehen vorwiegend schwerlösliche, uncharakteristisch braun gefärbte Stoffe. In der Oxydationslösung erkennt man unter dem Mikroskop bei der ersten Trübung nach ein bis zwei Tagen neben amorphen Krümeln gelegentlich braune Nadelchen und später dünne, biegsame, violette Nadeln, die meist nicht mehr zu finden sind, wenn die Lösung nach ein bis zwei Wochen ein schwarzvioletter Brei geworden ist. Durch Abfiltrieren und Auswaschen des Niederschlags erhält man jedoch keine reine Komponente, man erkennt lediglich, daß sich im Niederschlag I, II, IV, VI anreichern und die übrigen vorwiegend in Lösung bleiben. Läßt man die Ansätze länger als 4 Wochen stehen,



Abbild. 4. Zeitlicher Verlauf der Orcin-Synthese aus Orcin bei 20 und 50°.  
Ausbeute in Gewichtsproz. des angesetzten Orcins

so nehmen die Hauptkomponenten wie bei der Wasserstoffperoxyd-Oxydation langsam ab, und die Komponenten, die auf den Cellulosepulversäulen den verwaschenen blauen Untergrund bilden, laufend zu. Mit Hilfe der früher angewandten Fraktionierungs- und Fällungsmethoden gelingt es nicht, eine Komponente deutlich anzureichern.

### 3. Präparative Trennung des Orceins in die Komponenten

14 g nach Zulkowski und Peters<sup>7)</sup> aus Orcin hergestelltes und durch Chloroformextraktion von nicht umgesetztem Orcin gereinigtes Orcein wurden zunächst an  $40\ 4 \times 50\text{-cm}$ -Cellulosepulversäulen bei  $p_H$  11.75 in 10 Fraktionen (I bis VII, Va, VIa und VIb) zerlegt, indem die Säulen, sobald die Zone I das untere Ende erreicht hatte, herausgestoßen und zerschnitten wurden. Da die Substanzen nie länger als 8 bis 10 Stdn. mit dem alkalischen Puffer in Berührung kamen, traten nur geringe Verluste auf. Man konnte aber die Zersetzungprodukte an kleinen Säulen deutlich als schnell wandernde Zone 0 und bei Zone VII erkennen. Anschließend wurden I bis V jede für sich an insgesamt  $20\ 6 \times 50\text{-cm}$ -Säulen in System B von den schnell wandernden Zonen 0 und den blauen Komponenten getrennt und danach jede Hauptfraktion und die blauen Zonen nochmals bei  $p_H$  12.25 (I, II, BI bis BIII), bei  $p_H$  12.00 (II bis IV) und bei  $p_H$  11.50 (V) zusammen an  $24\ 4 \times 50\text{-cm}$ -Säulen von geringen Verunreinigungen durch die Nachbarzonen der ersten Trennung befreit. Die Einzelheiten und geringen Abweichungen von diesem Schema sind im Versuchsteil angegeben. Auf diese Weise wurden die Komponenten 0, I bis V und BI bis BIII chromatographisch rein dargestellt und Va, VI, VIa, VIb und VII weitgehend angereichert.

Die präparative Trennung des Orceins wird dadurch mühevoll, daß die geringe Kapazität der Lösungsmittelsysteme A und B eine große Zahl von Chromatographiesäulen erfordert, die sich besonders mit Cellulosepulver nicht mit beliebigem Querschnitt (höchstens 6 cm) gleichmäßig stopfen lassen. Außerdem treten während der Chromatographie und Aufarbeitung laufend Zersetzungprodukte auf (bis 50 %), die die Ausbeute an reinen Komponenten verringern und die Kristallisation erschweren.

Die kristallisierten Orcein-Komponenten sind im Vakuum monatelang haltbar und werden mit steigender Reinheit schwerer löslich. Geringe Verunreinigungen durch Zersetzungprodukte erhöhen die Löslichkeit erheblich. Beim langsamem Erwärmen färben sich alle Komponenten zwischen 280 und 300° dunkel und verändern ihre Form bis 350° nicht. Sie schmelzen unter Zersetzung nur, wenn man sie in einer Kapillare in den vorgeheizten Block wirft. Ferner kristallisieren sie z. T. aus Methanol mit Lösungsmittel aus, das bei 150° i. Hochvak. nur sehr schwer entweicht. Daher waren einige Analysen nicht gut reproduzierbar. In Tafel 1 sind die Farbumschläge und in Tafel 2 die Eigenschaften der 5 kristallisierten Komponenten zusammengestellt.

Die Komponente 0 ist im Orcein je nach Alter und Herstellung des Präparates zu etwa 0.5 bis 3% vorhanden und besteht aus z.T. harzigen, in Methanol leicht löslichen Zersetzungprodukten der anderen Komponenten, so daß ihre Menge während der Aufarbeitung laufend zunimmt. Die Komponenten BI und BII, die beide weniger als 1% des Orceins ausmachen, wurden als dunkelviolette Pulver mit bronzenem Kantharidenglanz erhalten. Die Komponente BIII stellt ein braunviolettes Pulver mit besonders auffallendem Bronzeglanz dar und ist im Orcein mit 10 bis 12 % vertreten ( $\lambda_{max}$  593 m $\mu$ ,  $\alpha = 164$ , in Methanol). Alle blauen Komponenten sind in Methanol mäßig löslich und enthalten nach längerem Aufbewahren in geringer Menge schwer lösliche Zersetzungprodukte.

Tafel 1. Farbumschläge der reinen Orcein-Komponenten\*)

	0	I	II	III	IV	V	VI	BII	BIII
Grundlösung in Methylarol 1 mg/50 ccm	schmutzig rotbraun- violett	karminrot	rotorange	karminrot	karminrot	rotorange	violett	violett	violett
mit Wasser 1:10 verd.	schmutzig rotbraun- violett	rot	rotviolett	karminrot (rotviolett)	karminrot (rotviolett)	rot	violett (blau)	violett	violett
mit 2n HCl 2:3 verd.	schmutzig rot	rot	rot (orange)	rot (karmin)	rot (karmin)	rot (orange)	violettrot	violett (rot)	violett (rot)
mit 2n NH <sub>3</sub> 2:3 verd.	schmutzig rotviolett	rotviolett (rot)	rotviolett (rot)	karminrot (violett)	karminrot (violett)	karmimrot (violett)	violett (blau)	violett	violett
nach 5 Tagen							etw. heller	gelb	gelb
mit 2n KOH 2:3 verd.	schmutzig rotviolett	rotviolett (violett)	rotviolett (violett)	rotviolett	rotviolett	violett- blau	rothraun (violett)	rothraun	rothraun
nach 5 Tagen	heller	schw. gelb	etw. heller	farblos	farblos		schw. gelb	schw. gelb	schw. gelb
feste Subst. i. konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	schmutzig violett	himmelblau	violettblau	blau	blau	blauviol. n. 1 Stde. ultramarin	hellbraun- violett	olivbraun	olivbraun

\*) Die eingeklammerten Farben geben die Nuancen der Grundfarbe an, z. B. violett (blau) = blaustrichig violett.

Tafel 2. Eigenschaften der kristallisierten Orcein-Komponenten

	I	II	III	IV	V
Kristallform aus Methanol.....	braunviole. Nadeln in grünem Glanz	derbe, rote Vierecke m. grünlichem Glanz	fache, dunkelrote Nadeln m. grünlichem Goldbraun. Glanz	dunkelrote Prismen m. grünlichem Glanz	hellrote Nadeln
Löslichkeit in Methanol	sehr gering	mäßig	sehr gering	sehr gering	gering
Schmp. (Zers.) .....	320°	290°	> 350°	290°	340°
Gehalt im Orcein (%)	10–12	10–12	5–6	12	10–15
$\lambda_{\max} \text{ m}\mu \text{ (}\alpha\text{) in Methanol} \dots \dots \dots$	566 (146)	472–476 (67) 577 (16) 513–514 (138)	540–560 (104) 525–527 (89) 553–556 (84)	540–555 (100) 525 (85) 552–556 (80)	486 (62) 586 (10) 521 (136)
$0.2 \text{ n HCl}$ in	514–517 (131)				
$0.2 \text{ n NH}_3$ in Methanol	569 (156)	578 (229) 576 (161)	559–563 (99) 563–566 (100)	558–562 (95) 561–564 (95)	586 (246) 587 (187)
$0.2 \text{ n KOH}$	578 (184)				
Reduzierbarkeit					
Zn–HCl .....	leicht	leicht	leicht	leicht	leicht
Na-Dictionit .....	leicht	leicht	leicht	leicht	leicht
TiCl <sub>3</sub> .....	nur i. Übersch.		nur i. Übersch.		
SnCl <sub>2</sub> .....	unvollständig	vollständig	unvollständig	unvollständig	vollständig
kleinste Bruttoformel..	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	C <sub>31</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> N	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> N	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> N	ähnlich wie II

Sie lassen sich mit Natriumdithionit und Zink leicht, mit Zinn(II)-chlorid schwer und reversibel entfärben und liegen somit in der Reduzierbarkeit zwischen I und II.

Die Komponenten Va (1%), VI (10 bis 12%), VIa (6 bis 8%), VIb (2%) und VII (je nach Herstellung und Alter 2 bis 10%) wurden bisher nur als Rohprodukte erhalten. Sie zeigen so ähnliche Farbumschläge wie V, daß man auf ein nahe verwandtes chromophores System schließen kann.

Bei der Autoxydation von Orcin in wäßrigem Ammoniak können somit insgesamt 14 gefärbte Komponenten isoliert werden, von denen zwei (0 und VII) uninteressante Zersetzungspprodukte enthalten. Die übrigen 12, zusammen über 90 % des Orceins, sind ausgeprägte Farbstoffe, von denen acht fast gleichzeitig in Mengen von 6 bis 15 % gebildet werden. Ich halte es für unwahrscheinlich, daß im Orcein noch weitere gefärbte Komponenten mit mehr als 1 % vorkommen.

Alle bisher chromatographisch rein dargestellten Verbindungen enthalten Stickstoff, und man kann sie auf Grund ihres O/N-Verhältnisses, der Spektren, der Farbumschläge, der Beständigkeit gegen Luftsauerstoff in alkalischer Lösung und ihrer Reduzierbarkeit in drei Gruppen einteilen: 1. Die Komponenten I, III und IV, deren Maximum im sichtbaren Spektralbereich durch Alkali nur wenig langwellig, durch Säure aber deutlich ins kurzwellige Gebiet verschoben wird, und die alle relativ viel Stickstoff enthalten. III und IV müssen auf Grund identischer Spektren gleiche Chromophore besitzen. 2. Die Komponenten II und V enthalten weniger Stickstoff und geben mit Säure eine deutliche und mit Alkali eine etwa doppelt so weite Verlagerung der Hauptabsorption nach längeren Wellen hin. 3. Drei blaue Komponenten, deren Farbe durch Säure und Ammoniak kaum beeinflußt wird, mit starker Lauge aber nach Rotbraun umschlägt.

Allen Komponenten gemeinsam sind zwei Maxima im UV-Spektrum, die im sauren Gebiet um  $230 \text{ m}\mu$  und  $268 \text{ m}\mu$  liegen und durch Alkali nach  $240 \text{ m}\mu$  bzw.  $290$  bis  $300 \text{ m}\mu$  verschoben werden. Bei den blauen Farbstoffen sind sie weniger ausgeprägt. Die IR-Spektren von III und IV sowie von BII und BIII sind praktisch gleich, die der übrigen Farbstoffe bis auf die Banden von  $6 \mu$  bis  $8 \mu$  einander sehr ähnlich. Bei  $3 \mu$  erkennt man assoziierte Hydroxy-Gruppen und an den kurzweligen Schultern der intensiven Banden um  $6.25 \mu$  (bei II deutliches Maximum bei  $6.06 \mu$ ) chinoide C=O- und C=N-Doppelbindungen.

Hrn. Professor Dr. H. Brockmann danke ich für die großzügige Förderung und das Interesse an dieser Arbeit. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für eine Sachbeihilfe und Hrn. Michael Zölfel für die experimentelle Mitarbeit.

#### Beschreibung der Versuche

**Orcein-Synthese.** Kleiner Ansatz: Eine Lösung von 2 g Orcin-hydrat in 8 ccm Wasser und 8 ccm konz. wäßrigem Ammoniak wurde in einem 50-cm-Erlenmeyerkölbchen (mit einem Uhrgläse bedeckt) bei  $20^\circ$  aufbewahrt und täglich umgerührt. Nach 24 Stdn. ist der Ansatz tief rotbraun und nach etwa 5 Tagen ein violetter Brei, der laufend dunkler und dicker wird. Nach 4 Wochen wurde i. Vak. über konz. Schwefelsäure eingedampft, getrocknet und 6 Stdn. mit Chloroform heiß extrahiert. Ausb. 1.7 g Orcein. Saugt man nach 2 Wochen den Brei ab, so erhält man 0.8 g Orcein, das wenig von den Komponenten III und V und kaum Verunreinigungen (0, VII, blauer Untergrund) enthält.

Großer Ansatz: 10 g Orcin-hydrat wurden entsprechend bei 50° 7 Tage unter gelegentlichem Umrühren an der Luft oxydiert und nach Abkühlen auf 0° abgesaugt. Der Niederschlag wurde mit 3 ccm konz. Ammoniak gewaschen und getrocknet. Ausb. 2 g Orcin, das viel I, II, IV und VI enthält. Die Mutterlauge wurde i. Vak. über konz. Schwefelsäure eingedampft, aus dem Rückstand i. Hochvak. bei 90° nicht umgesetztes Orcin absublimiert und der Sublimationsrückstand (1.5 g), der besonders viel III, V, VII und blaue Komponenten enthielt, zum ersten Niederschlag gegeben. In späteren Ansätzen wurde das Orcin nicht aus der Mutterlauge abgetrennt, sondern diese mit Ammoniak gesättigt und erneut oxydiert. Läßt man sie ohne Ammoniakzusatz stehen, so fällt kein Niederschlag mehr aus, und es entstehen so viel Zersetzungspprodukte, daß die Ansätze für die chromatographische Trennung unbrauchbar werden.

Orcein ist ein dunkel braunviolette Pulver mit folgenden Löslichkeiten: Wasser, spurenweise, rotviolett; 2n NH<sub>3</sub>, gut, violett; 2n NaOH, gut, violett; 2n HCl, wenig, hellrot; konz. HCl, mäßig, rot; konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, gut, violett; Methanol, Äthanol, Propanol, Butanole, Amylalkohole, gut bis mäßig, tiefrot; Phenol, gut, rot; Eisessig, gut, rot; Essigsäure-anhydrid, wenig, rot; Essigester, wenig, rot; Aceton, wenig, rot; Äther, spurenweise, gelb; Dioxan, wenig, gelbbraun; Tetrahydrofuran, mäßig, rot; Nitromethan, wenig, orange; Acetonitril, mäßig, tiefrot; Formamid, gut, tiefrot; Dimethylformamid, mäßig, tiefrot; Kohlenwasserstoffe, Chlorkohlenwasserstoffe, Anisol, Nitrobenzol, Phthalsäure-ester; nicht; Pyridin, gut, tiefrot; Morpholin, gut, violett; Piperidin, mäßig, violett; Triäthylamin, Tri-n-butylamin, nicht.

Zur Ermittlung der günstigsten Synthesebedingungen wurden: a) Portionen von 50 mg Orcin-hydrat mit mit konz. Ammoniak gesätt. Luft bei 20°; b) 1 g Orcin-hydrat in 4 ccm Wasser und 4 ccm konz. Ammoniak bei 20°; c) wie b) bei 50°; d) 1 g Orcin-hydrat in 40 ccm Wasser und 40 ccm konz. Ammoniak bei 20° unter Luftpuffert aufbewahrt. Nach 4, 10, 20, 32, 56 usw. Stdn. wurden Proben von 50 mg bzw. 0.2 ccm entnommen, über konz. Schwefelsäure i. Vak. getrocknet, i. Hochvak. bei 100° vom nicht umgesetzten Orcin befreit und aus der Gewichtsdifferenz die Kurven in Abbild. 4 aufgestellt. 5 mg jeder Probe analysierte man an kleinen Cellulosepulversäulen (0.9 × 25 cm) in Butanol-Phosphatpuffer, pH 12.00.

**Orseille-Synthese:** Eine Mischung von 5 g gepulverten Flechten (*Roccella*-Arten) und 10 ccm konz. Ammoniak wurde in flachen Schälchen bei Raumtemperatur an der Luft unter täglichem Umrühren aufbewahrt. Nach 3 Tagen wurde noch 1 ccm Ammoniak zugesetzt. Nach 2 Wochen wurde der violette Brei i. Vak. über konz. Schwefelsäure getrocknet, mit 2n HCl befeuchtet, getrocknet, gepulvert und im Heißextraktor mit Methanol ausgezogen, bis der ablaufende Extrakt farblos blieb. Die Extrakte wurden i. Vak. abgedampft, die Rückstände zwischen 100 ccm Butanol und 100 ccm 2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verteilt und die Butanolphasen bis zum Neutralpunkt mit Wasser gewaschen. Die Butanolösung hinterließ nach dem Abdampfen i. Vak. und Trocknen einen tief rotbraun gefärbten Lack, der chromatographisch analysiert wurde.

#### Präparative Trennung des Orceins

a) Erste Trennung an Cellulosepulver im System A bei pH 11.75<sup>13)</sup>: Ein 4×80-cm-Glasrohr, das unten konisch verengt mit einem Kapillarhahn und einem oben plattgestampften Wattepropfen und Puffer luftblasenfrei verschlossen ist, wird in einem langsamem Guß entlang der Wand mit einem dünnen Brei aus Cellulosepulver (Schleicher & Schüll Nr. 123) und butanolgesättigtem 0.2 m Kaliumphosphatpuffer, pH 11.75, gefüllt. Bei Öffnen des Hahnes und schwachem, gleichmäßigem Klopfen (Vakuumschlauch) setzt sich das Cellulosepulver langsam ab. Alle 5 bis 10 cm wird umgerührt und soviel Brei nachgefüllt, daß die Säule zum Schluss 56 cm lang ist. Gegen Ende wird unter 15 bis 20 Torr Überdruck gearbeitet. Dann wird die Säule mit einem Gummistampfer (4 cm Durchm.) langsam auf 50 cm zusammengeschoben, der überstehende Puffer abgelassen,

<sup>13)</sup> Sämtliche Pufferlösungen wurden mit einer alkalifesten Glaselektrode und dem „Radiometer Kopenhagen“ auf ± 0.03 pH-Einh. eingestellt.

puffergesättigtes Butanol aufgegeben und bis zum Durchbrechen der oberen Phase unter leichtem Überdruck nachgewaschen. Vor Aufgabe der Substanz muß die mobile Phase bis zum oberen Rand der Säule abgelassen und die Säule nochmals leicht angedrückt werden, damit die Substanzlösung nicht an der Glaswand schneller wandert als in der Säulenmitte, was häufig vorkommt, wenn die Säulen über Nacht gestanden haben.

1.4 bis 1.8 g Orcein werden jeweils mit 30 ccm, dann dreimal mit 20 ccm und zuletzt mit 10 ccm oberer Phase bei 50° gerührt und zwischendurch jedesmal zentrifugiert. Die vereinigten Lösungen werden gleichmäßig auf 4 Säulen verteilt, die geringen schwarzen Rückstände aus der Zentrifuge verworfen. Nur bei frühzeitig abgesaugten, an I besonders reichen Orcein-Präparaten betrug der Rückstand bis 0.4 g und wurde später direkt zu weitgehend reinem I verarbeitet. Die Säulen wurden unter Druck nachgewaschen, bis die Farbstoffe das untere Säulenende erreichten (7 bis 8 Stdn.), mit Druckluft herausgestoßen und in 10 Fraktionen zerschnitten. Die von allen Säulen vereinigten Fraktionen wurden mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührt, mit 2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert, und soviel Butanol zugesetzt, daß sich das Cellulosepulver am Boden des Gefäßes und die tief gefärbte Butanolphase oben gut absetzten. Darauf wurden die Butanolphasen abgetrennt, die wässrigen Phasen mit dem Pulver noch zwei- bis dreimal mit je 100 bis 200 ccm Butanol ausgerührt und die vereinigten Butanolauszüge jeder Fraktion mit Wasser gewaschen (7- bis 10mal), bis das Wasser neutral abließ. Bei den Fraktionen, die viel von den blauen Komponenten enthielten, traten dabei stabile Emulsionen auf. Die neutralen Butanollösungen hinterließen beim Abdampfen bei 12 Torr die Farbstoffe als Lacke, die in möglichst wenig Methanol bei 50° aufgenommen wurden. Nach Filtern und Abdampfen des Methanols i. Vak. und Trocknen der Rückstände i. Vak. über konz. Schwefelsäure bei 20° konnten aus insgesamt 14 g Orcein an 40 Säulen die in Tafel 3 zusammengestellten Mengen der einzelnen Fraktionen gewonnen werden. Die Fraktionen I, IV und V trockneten 14 Tage, bis sie gewichtskonstant und gut pulverisierbar anfielen. 5 mg jeder Fraktion wurden nun an kleinen Säulen in den Systemen A und B analysiert. Die enthaltenen Komponenten sind in der letzten Spalte in Tafel 3 angegeben.

Tafel 3. Ausbeute an Orcein-Fraktionen nach der 1. Trennung

Fraktion	g	Proz.*)	Zusammensetzung**)
I	1.09	7.8	(0), I, II
II	1.76	12.7	(0), I, II, (BI)
III	1.90	13.7	(0, II), III, (BII, IV)
IV	3.20	23.0	(0, III), IV, BIII
V	2.51	18.0	(0), V, (Va)
Va	0.08	0.6	(0), V, Va, VI, (VII)
VI	1.21	8.7	(0), VI, VIa, (VIb, VII)
VIa	1.22	8.8	(0, VI), VIa, VIb, (VII)
VIb	0.48	3.4	(0), VIa, VIb, (VII)
VII	0.86	6.2	(0), VII
Summe	14.31	103.0***)	

\*) bezogen auf eingesetztes Orcein.

\*\*) Hauptbestandteil fett gedruckt; () unter 5% geschätzt.

\*\*\*) Der Blindwert der Säule betrug 2 mg/10 ccm Eluat; wurde aber nicht abgezogen, da er beim Zerschneiden der Säule nicht genau berechnet werden konnte und durch das Auswaschen abnahm.

b) Trennung der rohen Fraktionen an Kieselgel im System B; Technisches Kieselgel (Firma Hermann, Köln; Em DIN 60/80 B) wurde durch Schlämmen mit dest. Wasser von feinen und groben Bestandteilen befreit und 24 Stdn. bei 110° getrocknet. Chloroform (getrocknet und frisch destilliert), Formamid (Merck) und Pyridin (Sdp. 114–116°) wurden im Vol.-Verhältnis 10:10:2 vermischt und wiederholt geschüttelt. In 6×80-cm-Glassäulen wurde ein Glaswollepfropfen mit der leichteren Phase (Formamid) luftblasenfrei eingeführt und mit einer 5 cm dicken Schicht grobem Kieselgel, das

mit der oberen Phase angerührt und bis zum Sieden des Chloroforms i. Vak. von Luftblasen befreit war, fest gestampft. Darauf wurde ein dünner Broi aus mittelfeinem Kieselgel in der oberen Phase, ebenfalls entgast, eingefüllt und bei abfließendem Lösungsmittel unter leichtem Klopfen absitzen gelassen, wobei soviel nachgefüllt wurde, daß die Säulenlänge 50 cm betrug. Man wusch nach, bis die mobile Phase (Chloroform) am unteren Säulenende austrat.

Die Fraktionen der ersten Trennung wurden durch wiederholtes Ausziehen mit kleinen Portionen Chloroformphase gelöst, die nacheinander auf die Säulen gegeben wurden. Die Zonen 0, I und II ließen sich mit dem angegebenen Gemisch eluieren, wobei Fraktionen von 20 ccm aufgefangen wurden. Da die Zonen an der Kieselgelsäule verwaschen sind, muß man etwa 0.2 ccm jeder Eluatfraktion mit frischer Formamidphase in einem kleinen Reagenzglas schütteln und kann nach dem Absitzen an der Änderung des Verteilungskoeffizienten das Durchbrechen einer neuen Zone leicht visuell erkennen. Geringe Zwischenfraktionen wurden verworfen. III, IV und V wurden mit der Chloroformphase eines Gemisches mit erhöhtem Pyridingehalt (erst 10:10:2.5, darauf 10:10:3) bis zur Mitte der Säule gewaschen und wie die blauen Komponenten durch Zerschneiden der Säule gewonnen.

Die Eluate befreite man bei 30 Torr vom Chloroform und bei 12 Torr und 50° weitgehend vom Pyridin und trennte das zurückbleibende Formamid und den darin gelösten Farbstoff durch Verteilen zwischen 2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Butanol in 3 bis 5 Scheidetrichtern über etwa 15 bis 20 Stufen, wobei der Farbstoff im Butanol zurückgehalten und das Formamid mit der fast farblosen wäßrigen Phase verworfen wurde. Die herausgeschnittenen Säulenstücke rührte man mit 2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und soviel Butanol durch, daß sich die organische Phase oben absetzte, dekantierte die obere Phase und verteilte sie mit der vom Kieselgel abgesaugten wäßrigen Phase, wie oben beschrieben, zwischen Butanol und 2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Aus den neutral gewaschenen Butanolösungen wurden die Farbstoffe wie bei den Cellulosesäulen isoliert und analysiert. Tafel 4 enthält die Ausbeuten und Zusammensetzungen der Fraktionen. Die Zersetzungprodukte 0 sind bereits auf 30% der gesamten Substanz angewachsen.

#### Reindarstellung der Komponenten durch nochmalige Chromatographie im System A

Komponente 0 ergab bei p<sub>H</sub> 12.25 jeweils eine unten graublaue, oben rotviolette bis rotbraune Zone, aus der keine definierten sondern nur klebrige und wenig charakteristische Lacke isoliert werden konnten.

Komponente I: 280 mg Fraktion I<sub>2</sub> wurden sechsmal nacheinander mit 20 ccm oberer Phase bei 50° ausgerührt. Es hinterblieb ein grünlichbrauner Rückstand (32 mg), der mit dem Rückstand von Fraktion II<sub>2</sub> (90 mg) zusammen, zweimal durch Heißextraktion mit siedendem Methanol aus der Hülse umkristallisiert, 93 mg violettblaue Nadeln mit dunkelgrünem Glanz ergab. Aus den vereinigten Rückständen der 1. Trennung (530 mg), die viel I, wenig II, IV und VI enthielten, wurden nach dreimaliger Heißextraktion und verlustreichem Umkristallisieren aus wassergesättigtem Butanol 160 mg graubraune schwertförmige Nadeln mit silbergrauem Oberflächenglanz isoliert, die aus Methanol in violettblauen Nadeln kristallisierten und neben 5% II nur I enthielten. Aus 7 Säulen der 3. Trennung von I<sub>2</sub> und II<sub>2</sub> bei p<sub>H</sub> 12.25 resultierten 230 mg amorphes I, die mit 0 verunreinigt waren. Zur Analyse wurden alle Präparate bei 150° 3 Std. i. Hochvak. getrocknet, ohne daß chromatographisch eine Änderung eintrat.

C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> (360.4)	Ber. C 69.99 H 4.48 O 17.76 N 7.77	3 C—CH <sub>3</sub> 12.5
C <sub>21</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> (362.4)	,, C 69.60 H 5.00 O 17.66 N 7.73	
C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> (364.4)	,, C 69.21 H 5.53 O 17.56 N 7.69	

Gef. C 69.28, 69.98, 69.06 H 5.45, 5.45, 5.09 O 17.59 N 7.54, 7.55 C—CH<sub>3</sub> 10.0

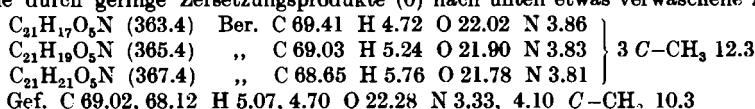
Komponente II: 1.08 g II<sub>2</sub> kochte man mit 100 ccm absol. Methanol aus, filtrierte von 90 mg Rückstand (Aufarbeitung siehe bei Komponente I) und tropfte zur siedenden Lösung 20 ccm heißes Wasser. Bei 0° wurden 743 mg braune Nadeln erhalten, die noch I enthielten. Aus der i. Vak. eingeengten Mutterlauge gewann man noch 123 mg gleicher Qualität. Eine Lösung von 523 mg davon in 140 ccm Butanolphase ergab an 4 Cel-

Tafel 4. Ausbeute an Orcein-Fraktionen nach der 2. Trennung

Eingesetzt g	Fraktions-Nr.	g	Proz.*)	Zusammensetzung	Eigenschaften
I 0.990 an 2 Säulen	I <sub>1</sub>	0.325	33	0	klebrig
	I <sub>2</sub>	0.280	28	I, (II)	z. T. krist.
	I <sub>3</sub>	0.051	5	I, II	amorph
	I <sub>4</sub>	0.055	6	BI	amorph
		0.711	72		
II 1.590 an 3 Säulen	II <sub>1</sub>	0.365	23	0	klebrig
	II <sub>2</sub>	1.081	68	I, II	z. T. krist.
	II <sub>3</sub>	0.084	5	BI, BII	amorph
		1.530	96		
III 1.583 an 3 Säulen	III <sub>1</sub>	0.206	13	0	klebrig
	III <sub>2</sub>	0.232	15	(0), II	z. T. krist.
	III <sub>2-3</sub>	0.285	18	II, III	amorph
	III <sub>3</sub>	0.366	23	III, (IV)	z. T. krist.
	III <sub>4</sub>	0.317	20	BII, BIII	amorph
		1.406	89		
IV 3.079 an 6 Säulen	IV <sub>1</sub>	1.000	33	0	klebrig
	IV <sub>2</sub>	0.622	20	IV, (III)	z. T. krist.
	IV <sub>3</sub>	0.601	19	BIII	amorph
		2.223	72		
V 2.480 an 4 Säulen	V <sub>1</sub>	0.786	32	0	klebrig
	V <sub>2</sub>	0.630	25	V	z. T. krist.
		1.416	57		
Va 0.073 an 1 Säule	Va <sub>1</sub>	0.030	41	0	klebrig
	Va <sub>2</sub>	0.023	32	V, Va, VI	amorph
	Va <sub>3</sub>	0.016	22	VI, VII	amorph
		0.069	95		
9.795		7.355	75	Gesamtsumme	

\*) bezogen auf die eingesetzte Menge jeder Fraktion.

lulosésäulen bei  $p_H$  12.25 336 mg, die, zweimal aus siedendem Methanol umkristallisiert, 227 mg Büschel aus orangebraunen, schmalen Plättchen lieferten. 340 mg wurden zusammen mit 226 mg Fraktion III<sub>2</sub> zweimal an je 2 Säulen bei  $p_H$  12.25 und 12.80 chromatographiert und ergaben 104 mg besonders reines, etwas heller rot gefärbtes II, das in derben, roten Viercken mit grünlichem Glanz kristallisierte. II ist so empfindlich, daß beim Einengen der Methanolösung bei 40 bis 50° dunkelrote Flocken ausfallen, die eine Kristallisation erschweren. Auch frisch bereitete Präparate zeigen an der Säule stets eine durch geringe Zersetzungprodukte (0) nach unten etwas verwaschene Zone.



Komponente III: 366 mg Fraktion  $\text{III}_3$  und die III enthaltende Fraktion von  $\text{IV}_2$  aus der dritten Trennung (94 mg siehe unten) wurden zusammen bei  $p_{\text{H}}$  12.00 an 2 Säulen zerlegt und ergaben 263 mg krist. III sowie 47 mg amorphes IV. Nach Umkristallisieren mit siedendem Methanol aus der Hülse erhielt man 209 mg dunkelrote, flache Nadeln mit grünlichbronzenem Glanz. Aus den vereinigten Mutterlaugen wurden 103 mg chromatographisch reines, nur z. T. krist. III isoliert.

$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}$ (243.3)	Ber. C 69.12 H 5.39 O 19.73 N 5.76	} 2 C-CH <sub>3</sub> 12.3
$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}$ (245.3)	„ C 68.55 H 6.16 O 19.57 N 5.71	
Gef. C 68.73, 69.78, 67.93	H 5.49, 5.90, 5.31 O 20.74 N 5.13, 5.55	C-CH <sub>3</sub> 10.5

Komponente IV: 622 mg Fraktion  $\text{IV}_2$  wurden fünfmal mit 20 ccm oberer Phase bei 50° angerührt, die Lösung vom Rückstand zentrifugiert und an 4 Säulen bei  $p_{\text{H}}$  12.00 getrennt. Es wurden 420 mg chromatographisch reines IV erhalten, doch scheiterten alle Kristallisationsversuche. Der Rückstand ergab nach zweimaliger Extraktion mit Methanol aus der Hülse 49 mg dunkelrote Prismen mit grünlichem Oberflächenglanz.

Gef. C 68.06, 68.90? H 5.84, 5.14 O 20.91 N 5.47, 5.38

Komponente V: 630 mg Fraktion  $\text{V}_2$  wurden gepulvert, mit 10 ccm absol. Methanol aufgekocht und in der Kälte von der dunkelroten Lösung filtriert. Den hellroten Rückstand (485 mg) kristallisierte man zweimal aus der Hülse mit Methanol um. Ausb. 255 mg hellrote flache Nadeln. Aus den Mutterlaugen wurden noch 50 mg gut kristallisiert und chromatographisch rein erhalten.

Gef. C 68.44, 68.12 H 5.18, 5.05 O 22.87 N 3.14, 3.07 C-CH<sub>3</sub> 10.2

Komponenten BI und BII: 52 mg  $\text{I}_4$  und 81 mg  $\text{II}_3$  lieferten an 2 Cellulosesäulen bei  $p_{\text{H}}$  12.25 92 mg BI und 30.7 mg BII. BI enthielt wieder Zersetzungspprodukte (0) und wurde nochmals über eine 6×25-cm-Kieselgelsäule im System B gereinigt: 20 mg amorphes schwarzviolettes Pulver. BII ist etwas heller und besitzt bronzenen Kantharidenglanz.

BI:	Gef. C 65.07 H 6.31 O 21.88 N 6.28	} C-CH <sub>3</sub> 9.0
BII:	Gef. C 68.05 H 6.55 O 19.64 N 5.88	
BIII:	Gef. C 64.01 H 5.88 O 22.43 N 7.43	

Komponente BIII: 307 mg  $\text{III}_4$  gaben an 2 Säulen bei  $p_{\text{H}}$  12.25 neben viel graublauen Verunreinigungen und etwas BIII 117 mg BIII. 150 mg  $\text{IV}_3$  gaben an einer Säule 125 mg chromatographisch reines BIII, das beim langsamem Einengen der Methanollösung als braunviolette Pulver mit leuchtendem Bronzeglanz anfiel und beim Einwerfen in den auf 290° heißen Block unter Zersetzung schmolz. Alle blauen Komponenten lösen sich nach dem Trocknen nur unvollständig in Methanol. Die geringen schwarzblauen Rückstände sind in 2n NaOH rotbraun löslich und werden durch Säure als blauschwarze Flocken gefällt. Da aus diesen Komponenten das Methanol auch nach 6 Stdn. i. Hochvak. bei 150° nicht vollständig entfernt wurde (IR-Spektrum bei 3.4  $\mu$ ), zeigen die Analysen lediglich, daß sie relativ viel Stickstoff enthalten.

Die chromatographischen Trennungen wurden bei 16 bis 20° ausgeführt. Langsame und gleichmäßige Temperaturschwankungen von 1 bis 2° störten nicht, ungleichmäßige und plötzliche dagegen sehr.