

17. *Chinolyl-(4)-bis-(2-methyl-indolyl)-methan. HBr-Salz:* Aus 0.31 g (0.002 Mol) *Chinolin-aldehyd-(4)*, 0.52 g (0.004 Mol) *2-Methyl-indol* in je 2 ccm Äthanol und 1.5 ccm 40-proz. HBr. Man erwärmt die rote Lösung kurz auf dem Wasserbad und läßt abkühlen. Nach einiger Zeit tritt Kristallisation ein. Man saugt ab, wäscht mit Alkohol und trocknet i. Vak. über P₂O₅ und Paraffin bei etwa 60°. Aus Alkohol goldgelbe Prismen, die sich an der Luft allmählich leicht bräunen. Schmp. nach viermaligem Umkristallisieren unscharf bei 211° (unter Dunkelrotfärbung). Rohausb. 0.8 g (83 % d. Th.). Löslich in Alkohol, Aceton, Chloroform, Eisessig, schwer löslich in Wasser, Äther, Petroläther, Benzol.

$C_{28}H_{23}N_3 \cdot HBr$ (482.4) Ber. C 69.6 H 5.01 N 8.70 Br 16.55
Gef. C 69.01 H 5.08 N 8.65 Br 16.29

HANS MUSSO und HERMANN BEECKEN

Über Orceinfarbstoffe, IV¹⁾

CRAIG-VERTEILUNG UND VERTEILUNGSCROMATOGRAPHIE

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen
(Eingegangen am 11. Mai 1957)

Durch CRAIG-Verteilung wird die Einheitlichkeit aller Hauptkomponenten des Orceins gesichert. Ein Vergleich zwischen Verteilungchromatographie und CRAIG-Verteilung bei der Trennung dieser Farbstoffe zeigt, daß die Trennwirkung von 1 cm Cellulosepulversäule 200–600 theoretischen Verteilungsstufen entsprechen kann.

Vor kurzem konnte das Orcein durch Verteilungchromatographie an Cellulosepulver und Kieselgel in 12 definierte Farbstoffe getrennt werden; die 7 Hauptkomponenten ließen sich kristallisiert isolieren^{1,2)}. Sie besitzen alle keinen scharfen Schmelzpunkt, kristallisieren bereits einheitlich, wenn sie noch nachweisbare Anteile aus den Nachbarzonen enthalten und zersetzen sich während der Aufarbeitung zum großen Teil in Sekundärprodukte. Somit war weder ihre Einheitlichkeit gesichert noch nach der chromatographischen Trennung die Aussage möglich, ob alle Komponenten erkannt, und ob die Nebenkomponenten ursprünglich im Orcein vorhanden waren.

Aus diesen Gründen haben wir alle Hauptkomponenten des Orceins in der von N. GRUBHOFER³⁾ entwickelten und von F. A. v. METZSCH⁴⁾ automatisierten Apparatur einer CRAIG-Verteilung über 100 bis 300 Stufen in verschiedenen Lösungsmittelsystemen unterworfen und die gemessenen Verteilungskurven mit den berechneten

¹⁾ III. Mitteil.: H. MUSSO, H.-G. MATTHIES, H. BEECKEN und H. KRÄMER, Angew. Chem. **69**, 178 [1957].

²⁾ H. MUSSO, Chem. Ber. **89**, 1659 [1956]. ³⁾ Chemie-Ing.-Techn. **22**, 209 [1950].

⁴⁾ Chemie-Ing.-Techn. **25**, 66 [1953].

verglichen; denn die Basis- und Halbwertsbreite einer Verteilungskurve sind sehr empfindliche Kriterien für die Einheitlichkeit einer Verbindung.

CRAIG-VERTEILUNG DER ORCEINKOMPONENTEN

Zunächst haben wir beim α -Amino- und α -Oxy-orcein die Gültigkeit des NERNSTSCHEN Verteilungssatzes und des LAMBERT-BEERSCHEN Gesetzes kolorimetrisch bis zu einer Konzentration von 50 mg/l geprüft und gefunden, daß diese Voraussetzungen für eine einfach zu berechnende Verteilung streng erfüllt sind.

Aus den Verteilungskurven in Abbild. 1 und den Einzelheiten dieser Versuche, die in Tab. 1 zusammengefaßt sind, erkennt man: α -Amino-orcein (I) liefert im System Formamid (10)/Chloroform (10), Pyridin (2.6) eine theoretische Kurve. β - und γ -Amino-orcein (III und IV) sind ebenfalls einheitlich, doch zersetzen sie sich im alkalischen System n-Butanol/0.2 m Phosphatpuffer p_H 11.85 langsam, denn die Menge der Zersetzungsprodukte, die mit größerem Verteilungskoeffizienten aus den Maxima von III und IV herauswandern, nimmt bei der Verteilung von 100 auf 300 Stufen zu.

Die Oxy-orceine sind gegen Luftoxydation in Alkali noch bedeutend empfindlicher. Bei der Verteilung von α -Oxy-orcein (II) in n-Butanol/0.2 m Phosphatpuffer (p_H 12.80) erkennt man eine Beimengung X_{II}, die sich auch an Cellulosepulver im gleichen System abtrennen läßt, doch laufend aus II entsteht, denn die Extinktion sinkt zwischen den beiden Maxima nicht auf 0. X_{II} ist also keine neue Orceinkomponente, sondern ein Zersetzungspunkt von II. β - und γ -Oxy-orcein (V und VI) werden im Butanol-Puffersystem, das bei p_H 11.30 die günstigsten Verteilungskoeffizienten ergibt, beim Schütteln an der Luft so schnell in die Nebenkomponenten Va, Vb und VII bzw. VIa, VIb und VII verwandelt, daß nach einem neutralen System gesucht werden mußte. In Di-n-butyläther (5), n-Butanol (2)/Wasser (5), Aceton (4) erscheinen sie beide stabil und einheitlich. Der geringe Unterschied in den Verteilungskoeffizienten (Tab. 1) zeigt, daß im neutralen System die Selektivität zur Trennung dieser beiden Orceinkomponenten gering ist, die Nebenkomponenten aber mit 15 mal kleineren Koeffizienten in den ersten Elementen der Apparatur zurückbleiben. Ein Versuch mit rohem Orcein im neutralen System ergab daraufhin, daß die Nebenkomponenten Va bis VIb nur in Spuren von vornherein im Orcein enthalten sind. Die blauvioletten Komponenten B_{III} zersetzt sich in Alkali in einen rotvioletten Farbstoff X_{BIII} mit größerem Verteilungskoeffizienten. Im System Di-n-butyläther (5), n-Butanol (10)/Wasser (13), Eisessig (2) bleibt sie unverändert und liefert ebenfalls eine Verteilungskurve, die der berechneten entspricht.

VERGLEICH ZWISCHEN CRAIG-VERTEILUNG UND VERTEILUNGSCROMATOGRAPHIE

Bei diesen Versuchen benutzten wir z. T. die gleichen Systeme wie bei der präparativen Trennung des Orceins. So konnten wir die relativen Wanderungsgeschwindigkeiten (*R*-Werte) bei beiden Verfahren vergleichen (Tab. 2), wenn die Werte aus der CRAIG-Verteilung um das Volumenverhältnis auf den Säulen ($V = 1.6$) korrigiert wurden. Die Übereinstimmung zeigt, daß bei den Säulen eine *Adsorption* am Cellulosepulver, die eine deutliche Verringerung der *R*-Werte zur Folge hätte, vernachlässigt werden kann. Auch beim langsamen Durchlauf der mobilen Phase liegen die Unter-

schiede in der Fehlerbreite des Vergleichs. Die Erhöhung der Tropfgeschwindigkeit auf das Vierfache hat auf die Zonenbreite keinen Einfluß; die Einstellung des Verteilungsgleichgewichts ist also in beiden Fällen gleich gut.

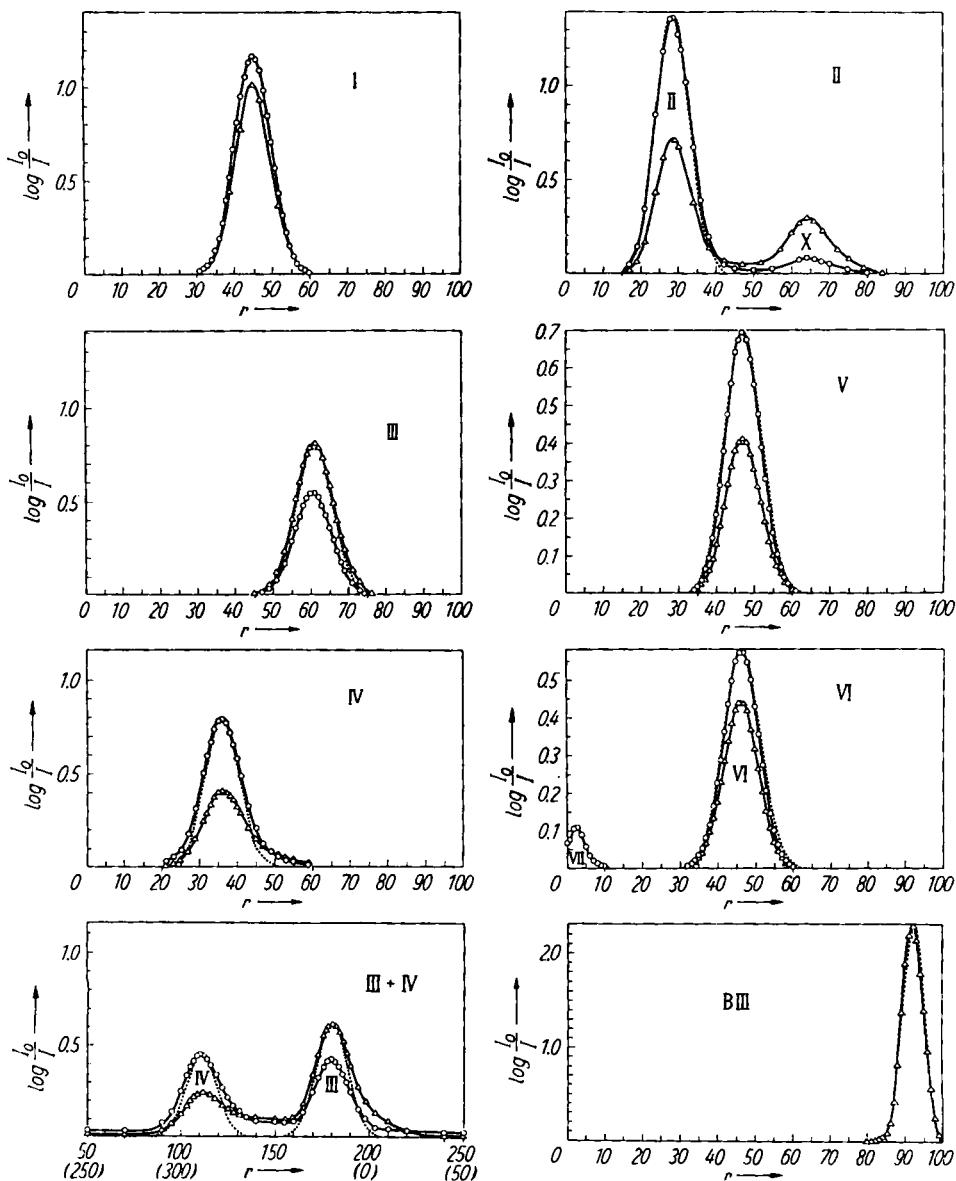


Abbildung 1. Verteilungskurven der Orceinkomponenten I–VI und BIII.
Extinktion in der Δ – Oberphase; \circ – Unterphase; berechnet.
Verteilungssysteme siehe Text und Tab. 1

Tab. 1. Einzelheiten der Verteilungsversuche

Orcin-Komponente	Verteilungssystem	Einwaage mg	Temp. °C	Stufenzahl n	Verteilungszahl G	r _{max} -Elementar. des Max.	$\lambda_{\text{max}} (\text{m}\mu)$ Unterphase	Stabilität im angegebenen System
I	Formamid (10)/Chloroform (10), Pyridin (2.6)	7.10	18.5—19	96	0.89	45	565	531
II	n-Butanol/0.2 m Phosphatpuffer pH 12.30	5.85	2f —21.5	100	(X _H 1.77) (64)	28.5 60—61	582—583 555—560	569—570 (575)
III	n-Butanol/0.2 m Phosphatpuffer pH 11.85	5.06	20 —21	100	1.51	—	570	nahzu stabil
IV	n-Butanol/0.2 m Phosphatpuffer pH 11.85	4.85	21.5—22	100	0.58	36.5	555—560	nahzu stabil
III + IV	n-Butanol/0.2 m Phosphatpuffer pH 11.85	7.55 III 7.00 IV	21 —22	300	III 1.50 IV 0.59	180 111	s. o.	s. o.
V	n-Butanol/0.2 m Phosphatpuffer pH 11.30	5.63	18.5—19	100	(V _A 0.76) (43)	56	586—588 (586—588)	582 (582)
V	Di-n-butyläther (5), n-Butanol (2)/Wasser (5), Aceton (4)	6.54	16.5—17.5	100	0.89	47	590—592 u. 477—480	586—587
Va	Di-n-butyläther (5), n-Butanol (2)/Wasser (5), Aceton (4)	10.93	16.5—17.5	100	0.06	5	488	586
VI	Di-n-butyläther (5), n-Butanol (2)/Wasser (5), Aceton (4)	6.67	17.5—18.5	100	0.87	46.5	wie V	stabil
B III	n-Butanol/0.2 m Phosphatpuffer pH 11.85	5.78	17.5—18.5	100	B III 1.08 (X _{B III} 1.69)	52 (63)	—	Bildung von X _{B III}
B III	Di-n-butyläther (5), n-Butanol(10)/Wasser(13), Eisessig (2)	2.53	17.5—18	100	10.9	92	597	—

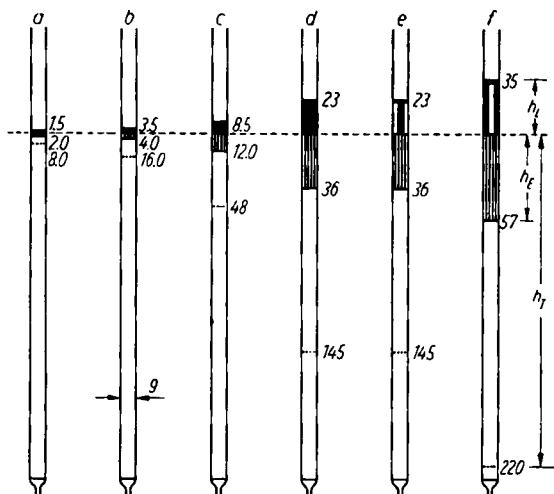
Jedes Verteilungselement enthält 25 ccm jeder Phase. Dauer der Verteilung über 100 Stufen ca. 10 Std. Die Extinktion wurde in jedem 2. oder 3. Element bei der angegebenen Wellenlänge im Beckman-Spektrophotometer gemessen.

Tab. 2. Vergleich der R -Werte von β - und γ -Amino-orcein
in n-Butanol/0.2 m Phosphatpuffer p_H 11.85; 18°

	R_{III}	R_{IV}	R_{IV}/R_{III}
CRAIG-Verteilung umgerechnet für $V=1.6$	0.71	0.48	0.68
Verteilungschromatographie an $4 \times 50\text{-cm}$ -Cellulosepulversäulen. $V=1.6$			
Tropfgeschwindigkeit: 15 Tropfen/Min.	0.64	0.43	0.67
57 Tropfen/Min.	0.69	0.47	0.68

Einen Anhaltspunkt über die Stufenzahl, die der Trennung auf der Cellulosepulversäule entspricht, erhielten wir auf folgendem Wege:

Aus den Verteilungskoeffizienten (Tab. 1) und dem Volumenverhältnis unserer Cellulosepulversäulen $V = 1.6$ errechnete man mit der von E. HECKER⁵⁾ abgeleiteten Trennfunktion, daß 168 Verteilungsschritte (entspr. 168 theoretischen Böden oder Trennstufen) erforderlich sind, um ein Gemisch aus gleichen Teilen β - und γ -Amino-orcein in n-Butanol/Phosphatpuffer p_H 11.85 zu 99.7% in die Komponenten zu zerlegen. Diese Stufenzahl muß sich in der Säulenlänge h_T befinden, die von der mobilen Phase durchlaufen werden muß, damit sich das Gemisch gerade deutlich in zwei Zonen trennt. Diese Säulenlänge h_T haben wir in Abhängigkeit von der Substanzmenge und vom aufgegebenen Lösungsmittelvolumen bestimmt und gefunden, daß, wie Abbild. 2 zeigt, die Höhe der Einlaufzone h_E und die benötigte Säulenlänge h_T



Abbild. 2. Cellulosepulversäulen zur Ermittlung der Trennstufenzahl pro cm Säulenlänge. Gemisch β - und γ -Amino-orcein 1:1; Cellulosepulver SCHLEICHER & SCHÜLL Nr. 123; Butanol/0.2 m Phosphatpuffer p_H 11.85; Temp. 21–22°. h_L = Höhe der Lösung vor dem Einlaufen; h_E = Höhe der Einlaufzone vor dem Aufgeben der reinen mobilen Phase; h_T = Front der mobilen Phase im Augenblick der vollendeten Trennung.
Zahlen in mm. Einzelheiten siehe Tab. 3

bei geringen Konzentrationen von der Substanzmenge unabhängig sind, aber mit der Höhe der Lösung h_L auf der Säule vor dem Einlaufen praktisch linear zunehmen

⁵⁾ Z. Naturforsch. 8b, 77 [1953].

($h_T = 4h_E = 6.25 h_L$). Um die Trennstufenzahl einer Verteilungssäule möglichst weitgehend auszunutzen, muß man ganz allgemein das Volumen der aufzugebenden Lösung möglichst klein halten. Gibt man 1.4 mm Lösung auf, so sind demnach in 8 mm Wanderungsweg der mobilen Phase mindestens 168 theoretische Verteilungsstufen anzunehmen; das entspricht 210 Stufen/cm Säulenlänge. Berücksichtigt man noch, daß $h_E = 1/4 h_T$ beträgt, also ein Viertel der 168 Stufen zu Anfang der Trennung bereits mit Substanz gefüllt ist, so würde man in der Verteilungsapparatur eine dreifache Stufenzahl zur Trennung benötigen, wodurch sich die Stufenzahl/cm Säulenhöhe auf rund 600 erhöht. In der Größenordnung stimmt diese Zahl mit 500 theoretischen Böden/cm, die A.J.P. MARTIN und R.L.M. SYNGE⁶⁾ für Kieselgel angeben, überein⁷⁾, doch sind die Zonen der Orceinfarbstoffe an Kieselgel viel verwaschener als an Cellulosepulver.

Bei der Trennung von α -Amino- und α -Oxy-orcein bei p_H 12.80 haben wir den gleichen Zusammenhang von h_E und h_T gefunden (Tab. 4) und auf die oben gezeigte Weise 100 bis 300 Trennstufen/cm erhalten. Bei der präparativen Trennung des Orceins²⁾ an 4×50 -cm-Säulen errechneten wir aus der Zonenbreite⁶⁾, daß die Trennwirkung etwa 20 bis 40 theoretischen Verteilungsstufen/cm entspricht. Hierbei wurden aber 15 bis 25 ccm gesättigte Lösung, also etwa 100 mal mehr Substanz aufgegeben.

Tab. 3. Säulentrennung von β - und γ -Amino-orcein

a	b	c	d	e	f	Säulenbez. (s. Abbild. 2)
0.05	0.15	0.45	1.35	1.35	2.0	ccm aufgegebener Lösung
1.2	1.2	1.2	1.2	0.4	0.8	mg/ccm Gesamtkonzentration (III + IV) in der Lösung.
1.5	3.5	8.5	23.0	23.0	35.0	mm h_L
2.0	4.0	12.0	36.0	36.0	57.0	mm h_E
8.0	16.0	48.0	145.0	145.0	220.0	mm h_T

Tab. 4. Säulentrennung von α -Amino- und α -Oxy-orcein

0.017	0.05	0.15	0.45	0.9	1.8	ccm aufgegebener Lösung ($c = 0.5 \text{ mg I} + 0.5 \text{ mg II}/\text{ccm}$)
0.5	1.5	4.5	13.5	27.0	53.0	mm h_E
3.5	7.0	19.0	45.0	90.0	185.0	mm h_T

Die Front der mobilen Phase wurde mit 4-Dimethylamino-4'-nitro-azobenzol markiert, das in der stationären Phase unlöslich ist, also auf der Säule mit der Lösungsmittelfront wandert.

Diese Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die kristallisierten Orcein-Komponenten sind nicht nur chromatographisch sondern auch nach der CRAIG-Verteilung einheitliche Verbindungen. Da die Trennungsverhältnisse in der Verteilungsapparatur und auf der Cellulosepulversäule übereinstimmen, ist mit Sicherheit kein wesentlicher Bestandteil des Orceins bei der präparativen Trennung übersehen worden.
2. Vergleicht man die CRAIG-Verteilung und Verteilungschromatographie in ihrer Trennleistung, so wird beim präparativen Arbeiten die Verteilungschromatographie meistens durch die viel größere Kapazität und den geringen Zeit- und Lösungsmittel-

⁶⁾ Biochem. J. 35, 1358 [1941].

⁷⁾ Vgl. hierzu F. TURBA, Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954, S. 24.

bedarf überlegen sein. Sie wird aber die Craig-Verteilung niemals ersetzen können, wenn es darauf ankommt, sich über den Reinigungseffekt klar zu werden und analytische Trennungen und Reinheitsprüfungen exakt und zuverlässig durchzuführen.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für die großzügige Unterstützung unserer Versuche.

HANS MUSSO und HANS-GEORG MATTHIES

Über Orceinfarbstoffe, VI)

IR- UND UV-SPEKTREN

HYDROXY- UND AMINO-SUBSTITUIERTER PHENOXAZONE

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 27. Mai 1957)

Es wird an mehreren Hydroxy- und Amino-phenoazonen und ihren Acetaten gezeigt, daß Phenozone im IR-Spektrum zwischen 6.0 und 6.5 μ drei charakteristische Schlüsselfrequenzen besitzen. Die Verschiebung der längstwelligen Bande im sichtbaren Spektrum dieser Verbindungen mit Säure und Alkali hängt von der Stellung der Hydroxy- und Aminogruppe am Phenozon-Grundgerüst ab. Sie ist für eine Substitution in 7-Stellung besonders charakteristisch und kann mit dem Auftreten mesomerer Ionenstrukturen in bestimmten p_{H} -Bereichen gedeutet werden. Das chromophore Grundgerüst von allen Orceinkomponenten wird spektroskopisch aufgeklärt.

Bei der Autoxydation von Orcin (3,5-Dihydroxy-toluol) in wäßrigem Ammoniak entsteht das Orcein, ein tiefvioletter Farbstoff, der sich verteilungschromatographisch in seine Komponenten zerlegen lässt²⁾. Die Einheitlichkeit der sieben Hauptkomponenten wurde durch CRAIG-Verteilung gesichert¹⁾. Diese Farbstoffe zeigen im IR-Spektrum alle zwischen 6.0 und 6.5 μ intensive Banden und geben mit Säure und Alkali sehr charakteristische Farbumschläge, nach denen sie sich in drei Gruppen ordnen lassen. Es war daher naheliegend, das Grundgerüst dieser Verbindungen auf spektroskopischem Wege zu ermitteln.

IR-SPEKTREN

Die oben erwähnten Banden in den IR-Spektren ließen C=O-, C=N- und C=C-Doppelbindungen in den Orceinfarbstoffen vermuten. Schon früher sind für das Orcein unter anderem auch Phenozone³⁾ und Chinon-anil⁴⁾-Strukturen (I und II) diskutiert aber nicht bewiesen worden.

1) IV. Mitteil.: H. MUSSO und H. BEECKEN, Chem. Ber. 90, 1808 [1957], vorstehend.

2) H. MUSSO, Chem. Ber. 89, 1659 [1956].

3) F. HENRICH und W. MEYER, Z. Farben- u. Textil-Chemie 1, 595, 599 [1902]; J. F. W. MC OMIE und I. M. WHITE, J. chem. Soc. [London] 1955, 2619.

4) F. HENRICH, S.-B. physik.-med. Soz. Erlangen 71, 199 [1939]; F. HENRICH und W. HEROLD, Ber. dtsch. chem. Ges. 61, 2343 [1928].