

126. Adsorptions- und Verteilungseffekte bei der Trennung von sulfogruppenhaltigen o/p-Hydroxyazofarbstoff-Isomeren

von O. A. Stamm und Hch. Zollinger.

Herrn Prof. Dr. T. Reichstein zum 60. Geburtstag gewidmet.

(20. IV. 57.)

1. Problemstellung.

Im Zusammenhang mit Arbeiten über das o/p-Verhältnis bei der Azokupplung von α -Naphtholderivaten¹⁾ war die saubere Trennung, Isolierung und quantitative Bestimmung der isomeren Reaktionsprodukte von verschieden substituierten Diazobenzolderivaten mit 1-Naphthol-3-sulfosäure eine Voraussetzung für uns interessierende mechanistische Probleme. Da die von Gattermann *et al.*²⁾ und Zollinger³⁾ angewandte Trennung der reduktiven Spaltprodukte nur grobe qualitative Schlüsse erlaubt, wurden einige neuere Trennmethoden, die im letzten Jahrzehnt vor allem in der Naturstoffchemie zu grosser Bedeutung gelangt sind, nämlich qualitative und quantitative Papierchromatographie, Craig-Verteilung und Papierelektrophorese angewandt. Da über diese Verfahren im Zusammenhang mit Problemen der technischen Farbenchemie bis jetzt nur wenig veröffentlicht wurde, schien es uns angezeigt, ihre Anwendbarkeit über den Rahmen der eigentlichen Bedürfnisse hinaus zu untersuchen. In Bezug auf die präparative Auswertung der Craig-Verteilung von Farbstoffgemischen ist unseres Wissens noch nie gearbeitet worden.

Da sich an einem Modellbeispiel, wie im dritten Abschnitt gezeigt wird, der Unterschied zwischen vorherrschender Verteilung und überwiegender Adsorption deutlich machen lässt, scheint uns diese Untersuchung nicht nur für die spezielle Farbenchemie, sondern allgemein für die organische Analytik von Interesse zu sein.

2. Zusammenhänge zwischen Konstitution, Lösungsmittel und Methodik bei der Papierchromatographie.

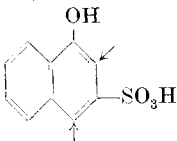
Wir erprobten systematisch eine grosse Zahl von Lösungsmittelgemischen mit den Reaktionsprodukten der Kupplung von 1-Naphthol-3-sulfosäure mit diazotiertem 4-Chloranilin, 4-Nitranilin, 2-Nitranilin, 3-Nitranilin und 2,4-Dinitranilin (vgl. Tab. 1).

¹⁾ Vgl. Dissertation O. A. Stamm, Universität Basel, 1957.

²⁾ L. Gattermann & H. Schulze, Ber. deutsch. chem. Ges. **30**, 50 (1897); L. Gattermann & H. Liebermann, Liebigs Ann. Chem. **393**, 198 (1912).

³⁾ Hch. Zollinger, Kinetik und Mechanismus der Kupplungsreaktion, Habilitationsschrift, Universität Basel, 1951.

Tabelle 1.
Untersuchte Farbstoffe.

Kupplungskomponente	Diazokomponente	Farbstoff-Nr.
	4-Chloranilin	I
	4-Nitranilin	II
	2-Nitranilin	III
	3-Nitranilin	IV
	2,4-Dinitranilin	V

(\rightarrow : Kupplungsstellen)

Die Lösungsmittel (LM), welche sich als am besten geeignet erwiesen, sind in Tab. 2 zusammengestellt. Die entsprechenden Rf-Werte, die nach der angewandten Technik⁴⁾ getrennt aufgeführt sind, finden sich in Tab. 3. Die Zuordnung zur ortho- bzw. para-Reihe kann mittels Tüpfelreaktion auf dem Papier erfolgen, da das p-Isomere infolge seines tiefen pK-Wertes⁵⁾ bereits mit Natriumhydrogencarbonatlösung einen Farbumschlag ergibt⁶⁾. Bei der von uns gewählten sodaalkalischen Kupplung bei 0—5° entsteht mit 4-Chlor-diazobenzol ausschliesslich o-Farbstoff, während alle andern Diazokomponenten ein Gemisch des o- und des p-Isomeren (VI bzw. VII) liefern.

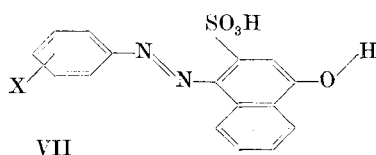
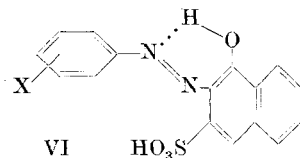


Tabelle 2.
Lösungsmittelzusammensetzung.

	LM Nr.
n-Butanol/Pyridin/H ₂ O 60:40:30	1
n-Butanol/Pyridin/H ₂ O 50:40:40	2
n-Butanol/ α -Picolin/H ₂ O 60:40:30	3
n-Butanol/Äthanol/H ₂ O 40:11:19	4
n-Butanol/tert. Butanol/H ₂ O 60:20:20	5
tert. Butanol/Äthanol/H ₂ O 40:50:10	6
tert. Butanol/Methanol/H ₂ O 40:50:10	7
Methyläthylketon/Pyridin/H ₂ O 70:15:15	8
Isopropanol/H ₂ O/konz. NH ₃ 80:18:2	9
Phenol/H ₂ O 80:20	10
H ₂ O/Phenol 94:6	11
aq. dest.	12
2-proz. NaCl-Lösung	13

⁴⁾ Vgl. experimentellen Teil.

⁵⁾ Über Aciditätskonstanten von o- und p-Hydroxyazoverbindungen werden wir später berichten.

⁶⁾ Vgl. Tab. 10, S. 1118.

Tabelle 3.

Rf-Werte (auf *Whatman*-Papier Nr. 1).

Farb- stoff Nr.	Rf		Δ Rf a)	LM	Methode ^{b)}	Laufzeit	Temp.
	ortho- Isomeres	para- Isomeres					
I	0,60	—	—	1	<i>Ruegg</i>	18 h 15'	21°
	0,67	—	—	1	<i>Giri</i>	4 h	23°
	0,69 ^{c)}	—	—	1	↓	12 h 40'	19°
	0,75 ^{c)}	—	—	1	↑	14 h 50'	19°
	0,66	—	—	2	<i>Ruegg</i>	18 h	19°
	0,50	—	—	3	<i>Ruegg</i>	18 h 30'	21°
	0,46	—	—	4	<i>Ruegg</i>	24 h	22°
	0,47	—	—	4	<i>Giri</i>	5 h	22°
	0,70	—	—	9	<i>Giri</i>	6 h 40'	21°
	0,78	—	—	10	<i>Ruegg</i>	22 h	18°
II	0,57	0,75	0,18	1	<i>Ruegg</i>	18 h 21'	21°
	0,60	0,82	0,22	1	<i>Giri</i>	3 h 25'	18°
	0,66 ^{c)}	0,87 ^{c)}	0,21	1	↓	9 h 10'	19°
	0,72 ^{c)}	0,89 ^{c)}	0,17	1	↑	14 h 15'	19°
	0,64	0,82	0,18	2	<i>Ruegg</i>	18 h	19°
	0,49	0,83	0,34	3	<i>Ruegg</i>	18 h 30'	21°
	0,62	0,88	0,26	8	<i>Giri</i>	1 h 55'	22°
	0,66	0,84	0,18	9	<i>Giri</i>	6 h 40'	21°
	0,78	0,67	0,11 ^{d)}	10	<i>Ruegg</i>	22 h	18°
III	0,59	0,68	0,09	1	<i>Ruegg</i>	24 h	19°
	0,63	0,76	0,13	1	<i>Giri</i>	1 h 50'	21°
	0,68 ^{c)}	0,79 ^{c)}	0,11	1	↓	12 h 40'	19°
	0,72 ^{c)}	0,83 ^{c)}	0,11	1	↑	14 h 50'	19°
	0,63	0,72	0,09	2	<i>Ruegg</i>	18 h	19°
	0,47	0,60	0,13	3	<i>Ruegg</i>	18 h 30'	21°
	0,64	0,58	0,06 ^{d)}	9	<i>Giri</i>	6 h 40'	21°
	0,88	0,73	0,15 ^{d)}	10	<i>Ruegg</i>	22 h	18°
	0,68	0,80	0,12	11	<i>Ruegg</i>	15 h 30'	21°
	0,46	0,70	0,24	12	<i>Ruegg</i>	4 h 30'	21°
	0,44	0,63	0,19	12	<i>Giri</i>	1 h 50'	21°
	0,32 ^{c)}	0,54 ^{c)}	0,22	12	↓	3 h 40'	19°
	0,41 ^{c)}	0,66 ^{c)}	0,25	12	↑	3 h 20'	19°
	0,50	0,69	0,19	12	Ring- chromat.	2 h	20°
	0,23	0,24	0,01	13	<i>Giri</i>	1 h 30'	21°

^{a)} Δ Rf = Trennfaktor (vgl. Text).
^{b)} ↑ = aufsteigend; ↓ = absteigend. *Giri*, *Ruegg*: vgl. S. 1118.
^{c)} Vgl. Tab. 4.
^{d)} Rf (ortho) > Rf (para):

Tabelle 3 (Fortsetzung).

Farbstoff Nr.	Rf		ΔRf a)	LM	Methode ^{b)}	Laufzeit	Temp.
	ortho- Isomeres	para- Isomeres					
IV	0,62	0,77	0,15	1	<i>Ruegg</i>	24 h	19°
	0,63	0,84	0,21	1	<i>Giri</i>	1 h 50'	21°
	0,64 ^{c)}	0,81 ^{c)}	0,17	1	↓	9 h 10'	19°
	0,70 ^{c)}	0,86 ^{c)}	0,16	1	↑	14 h 50'	19°
	0,69	0,84	0,15	2	<i>Ruegg</i>	18 h	19°
	0,50	0,81	0,31	3	<i>Ruegg</i>	18 h 30'	21°
	0,40	0,61	0,21	4	<i>Giri</i>	5 h	22°
	0,27	0,50	0,23	5	<i>Giri</i>	5 h	20°
	0,46	0,84	0,38	6	<i>Giri</i>	3 h 25'	22°
	0,68	0,89	0,21	8	<i>Giri</i>	1 h 55'	22°
V	0,62	0,72	0,10	1	<i>Ruegg</i>	24 h	19°
	0,67	0,79	0,12	1	<i>Giri</i>	1 h 50'	21°
	0,74 ^{c)}	0,82 ^{c)}	0,08	1	↓	13 h 45'	19°
	0,75 ^{c)}	0,83 ^{c)}	0,08	1	↑	14 h 50'	19°
	0,69	0,77	0,08	2	<i>Ruegg</i>	18 h	19°
	0,53	0,68	0,15	3	<i>Ruegg</i>	18 h 30'	21°
	0,20 ^{c)}	0,45 ^{c)}	0,25	7	↓	10 h 15'	19°
	0,18 ^{c)}	0,42 ^{c)}	0,24	7	↑	13 h 45'	19°
	0,61	0,43	0,18 ^{d)}	9	<i>Giri</i>	6 h 40'	21°
	0,40	0,63	0,23	12	<i>Ruegg</i>	4 h 30'	21°
	0,57	0,69	0,12	12	<i>Giri</i>	1 h 15'	21°
a) ΔRf = Trennfaktor (vgl. Text). b) ↑ = aufsteigend; ↓ = absteigend. <i>Giri</i> , <i>Ruegg</i> : vgl. S. 1118. c) Vgl. Tab. 4. d) $Rf(\text{ortho}) > Rf(\text{para})$:							

Sobald dem Lösungsmittel Basen (NH_3) beigemischt wurden (z. B. im LM 9; Tab. 2), traten drei Flecke auf, wobei die dritte, sehr schwache Bande offensichtlich dem Phenolat des p-Isomeren zuzuschreiben ist. Zusätze von Säuren wirkten sich weder auf Trennung noch auf Bandenschärfe günstig aus⁷⁾.

Zur Charakterisierung der Trennwirkung führen wir im folgenden den Begriff Trennfaktor (ΔRf) ein. Er ist wie folgt definiert:

$$\Delta Rf = Rf(\text{Substanz A}) - Rf(\text{Substanz B}).$$

Um negative Trennfaktoren zu vermeiden, soll für A die Substanz mit dem grösseren Rf-Wert gewählt werden: $Rf(\text{Substanz A}) \geq Rf(\text{Substanz B})$. Selbstverständlich erfolgt eine Trennung von zwei Verbindungen A und B nur, wenn $\Delta Rf \neq 0$.

⁷⁾ Vgl. dagegen den günstigen Einfluss von Säurezusätzen auf die Trennschärfe bei Säure-Base-Systemen. *E. Lederer & M. Lederer*, *Chromatography*, Amsterdam 1953, S. 77 f.

Wie aus den Messungen mit n-Butanol-Pyridin-Wasser-Gemischen (LM 1 und 2) ersichtlich ist, vergrößert die Erhöhung des Wasseranteils auf Kosten des Butanols (Übergang von Lösungsmittel 1 zu 2) die Rf-Werte, während die Trennfaktoren praktisch gleich bleiben⁸⁾, z. B. Farbstoff II in LM 1: Rf (ortho) 0,57, Rf (para) 0,75; in LM 2: Rf (ortho) 0,64, Rf (para) 0,82. Trennfaktor in LM 1: $\Delta Rf = 0,18$; in LM 2: $\Delta Rf = 0,18$.

Wurde im gleichen System LM 1 das Pyridin durch α -Picolin ersetzt (LM 3), so erhöhte sich dagegen der Trennfaktor meist stark: Farbstoff II, ΔRf in LM 3 = 0,34 gegenüber ΔRf in LM 1 = 0,18.

Dieser für die praktische Auswertung wesentliche Gewinn wurde jedoch dadurch grossenteils illusorisch gemacht, dass die Flecke der p-Isomeren ziemlich diffus waren. Das zeigt gleichzeitig, dass wir bei Stoffen, die nicht scharfe, engbegrenzte Banden geben, mit den auf den Bandenschwerpunkt bezogenen Rf-Werten nicht viel anfangen können, da sich aus ihnen offenbar nicht auf den Trenneffekt von zwei Substanzen schliessen lässt. Da bei Farbstoffen die Flecke häufig diffus sind, ist es viel zweckmässiger und aufschlussreicher, wenn man die Rf-Werte von Bandenfront und Bandenende angibt⁹⁾ (vgl. Tab. 4).

Tabelle 4.

Rf-Werte von Bandenfront, Bandenschwerpunkt und Bandenende
(auf Whatman-Papier Nr. 1).

Farbstoff Nr.	LM	Technik	Bandenfront		Bandenschwerpunkt		Bandenende	
			o	p	o	p	o	p
I	1	↓	0,74	—	0,69	—	0,62	—
	1	↑	0,82	—	0,75	—	0,70	—
II	1	↓	0,73	0,91	0,66	0,87	0,59	0,81
	1	↑	0,78	0,92	0,72	0,89	0,67	0,86
III	1	↓	0,72	0,85	0,68	0,79	0,65	0,76
	1	↑	0,75	0,88	0,72	0,83	0,67	0,79
IV	1	↓	0,69	0,86	0,64	0,81	0,60	0,76
	1	↑	0,76	0,90	0,70	0,86	0,66	0,81
V	1	↓	0,78	0,88	0,74	0,82	0,70	0,79
	1	↑	0,78	0,90	0,75	0,83	0,70	0,80
III	12	↓	0,35	0,56	0,32	0,54	0,22	0,42
	12	↑	0,44	0,70	0,41	0,66	0,30	0,57
V	7	↓	0,24	0,51	0,20	0,45	0,12	0,34
	7	↑	0,24	0,50	0,18	0,42	0,09	0,26

⁸⁾ Über analoge Ergebnisse bei Aminosäuren vgl. *H. R. Bentley & J. K. Whitehead*, Biochem. J. **46**, 341 (1950).

⁹⁾ *A. Lacourt, G. Sommereyns, E. De Geyndt, J. Baruh & J. Gillard*, Mikrochem. Microchim. Acta **34**, 215 (1949).

Daraus lässt sich leicht die Schärfe eines Fleckes erkennen. Als Mass für diese Schärfe schlagen wir den Zonenwert $\Delta R_z = R_f$ (Bandenfront) – R_f (Bandenende) vor.

3. Unterscheidung zwischen Verteilung und Adsorption.

Der oben definierte Zonenwert zeigt uns das Ausmass der Adsorption einer Substanz: Ein grosser ΔR_z -Wert entspricht diffusen Flecken mit langen Schwänzen, ein Zeichen für starke Adsorption. Daher kann trotz guter Trennung der Bandenschwerpunkte [R_f (Substanz A) \gg R_f (Substanz B)] bei grossem Zonenwert eine Überlappung der beiden Banden erfolgen.

Adsorptionseffekte sind bei der Papierchromatographie von Farbstoffen häufig besonders gross¹⁰). Dies ist nicht verwunderlich, da Farbstoffe die Cellulosefaser „färben“ können. Natürlich ist das Ausmass der Substantivität der verschiedenen Stoffe sehr unterschiedlich; ihre Affinität zur Faser wächst aber kontinuierlich und nicht sprungweise.

Wir werden nun am Beispiel des Farbstoffs III den Unterschied zwischen vorherrschender Verteilung und vorherrschender Adsorption aufzeigen.

Wenn wir destilliertes Wasser als Lösungsmittel verwenden, so haben wir eine reine Adsorptionschromatographie¹¹). Das geht z. B. deutlich aus den folgenden Befunden hervor:

1. Wir haben grosse R_f -Unterschiede zwischen absteigender und aufsteigender Technik (vgl. Tab. 5).

2. Wir haben grosse Zonenwerte, was in der Praxis Schwanzbildung und diffuse Flecken bedeutet (vgl. Tab. 6).

3. Die Papiersorte hat sowohl auf den R_f -Wert und damit auf den Trennfaktor ΔR_f , wie auch auf den Zonenwert, d. h. auf die Bandenschärfe, einen Einfluss. Die Verwendung von dickerem Papier (z. B. *Whatman* Nr. 3 MM) führt zu stärkerer Adsorption; dabei steigen die ΔR_f - und die ΔR_z -Werte (vgl. Tab. 7). Wir haben hier einen typischen Fall, bei dem einerseits die Trennung scheinbar besser wird (ΔR_f der Schwerpunkte wird grösser), dieser Effekt jedoch andererseits durch die gleichzeitige Vergrösserung der Zonenwerte weitgehend kompensiert wird.

4. Ein Zusatz von Salz zum Lösungsmittel erniedrigt die R_f -Werte stark (Aussalzeffekt) und setzt die Trennung enorm herab (ΔR_f sehr klein; vgl. Tab. 8). Vom Färben auf Cellulosefasern her ist bekannt, dass bei konstanter Temperatur das Gleichgewicht des Farbstoffs mit zunehmender Salzkonzentration sich stark zugunsten

¹⁰) H. Zahn, Textil-Praxis **6**, 127 (1951).

¹¹) Zur Verwendung von Wasser als Lösungsmittel bei der Papierchromatographie von Acidinfarbstoffen vgl. M. Lederer, Nature **165**, 529 (1950).

der Faser verschiebt; es gibt sogar Farbstoffe, die in reinem Zustand und ohne Salz im Färbebad überhaupt nicht auf Baumwolle ziehen, in Gegenwart kleiner Salzmenngen aber bereits befriedigende Färbungen ergeben¹²⁾.

Das Resultat, dass die beiden Isomeren des Farbstoffs III durch Cellulose adsorbiert werden, hat für die allgemeine Farbenchemie eine überraschende Konsequenz: Diese Chromatographieversuche zeigen, dass ein einfacher, saurer Benzolazo-naphtalinfarbstoff bereits substantiv (d. h. celluloseaffin) ist. Im Gegensatz zu der allgemeinen und auch in Lehrbüchern verankerten Meinung, dass für die Substantivität bestimmte Gruppierungen (z. B. mehrere Azogruppen, Benzin- und I-Säure-Derivate usw.) nötig seien, zeigt unser Beispiel, dass Monoazoverbindungen, die konstitutionell zu den sauren Wollfarbstoffen gehören, ebenfalls (wenn auch in geringem Masse) Celluloseaffinität aufweisen können.

Tabelle 5.

Abhängigkeit des Rf-Wertes von der Technik.

LM	Rf-Werte				Fbst. Nr.	Kupplungstyp
	<i>Ruegg</i>	<i>Giri</i>	↓	↑		
1	0,57	0,60	0,66	0,72	II	ortho
1	0,59	0,63	0,68	0,72	III	ortho
12	0,46	0,44	0,32	0,41	III	ortho
1	0,75	0,82	0,87	0,89	II	para
1	0,68	0,76	0,79	0,83	III	para
12	0,70	0,63	0,54	0,66	III	para

Im Gegensatz dazu finden wir bei der Verwendung von LM 1 (vgl. Tab. 2) genau die umgekehrten Effekte:

1. Wir haben geringe Rf-Unterschiede zwischen absteigender und aufsteigender Technik (vgl. Tab. 5).

2. Wir haben kleine Zonenwerte, was zu relativ scharfen, deutlichen Flecken führt (vgl. Tab. 6).

3. Die Papierdicke hat praktisch keinen Einfluss: die Trennfaktoren (ΔR_f) bleiben konstant und die Zonenwerte (ΔR_z) nehmen nicht zu (vgl. Tab. 7).

Diese Effekte zeigen, dass die Trennwirkung des Lösungsmittelgemisches 1 weitgehend durch einen Verteilungsvorgang bedingt ist.

Dieses Beispiel zeigt gleichzeitig die Nützlichkeit des Zonenwertbegriffs. Er ist neben dem Trennfaktor ΔR_f ein Kriterium für die Brauchbarkeit eines Lösungsmittelsystems für die saubere, quantitative Trennung von zwei Substanzen auf dem Papierchromatogramm.

¹²⁾ H. Wahl, Teintex **19**, 667 (1954).

Tabelle 6.Einfluss der Adsorption auf die Bandenschärfe beim Farbstoff III^{a)}.

Papier	Whatman Nr. 1				Whatman Nr. 3			
	absteigend		aufsteigend		absteigend		aufsteigend	
	ΔR_z		ΔR_z		ΔR_z		ΔR_z	
LM	o	p	o	p	o	p	o	p
1	0,07	0,09	0,08	0,09	0,07	0,08	0,07	0,09
12	0,13	0,14	0,14	0,13	0,18	0,15	0,17	0,14
^{a)} $\Delta R_z = R_f$ (Bandenfront) — R_f (Bandenende); je 10 γ Substanz als 0,1-proz. Lösung aufgetragen.								

Tabelle 7.Einfluss von Papiersorte und Lösungsmittel auf R_f -Werte, Trennfaktoren und Zonenwerte (Farbstoff III)^{a)}.

Lösungs- mittel	Whatman- Papier Nr.	R_f		ΔR_f	ΔR_z		vorherrschend
		o	p		o	p	
1	1	0,68	0,79	0,11	0,07	0,09	Verteilung
1	3 MM	0,68	0,78	0,10	0,07	0,09	Verteilung
12	1	0,32	0,54	0,22	0,13	0,14	Adsorption
12	3 MM	0,41	0,72	0,31	0,18	0,15	Adsorption
^{a)} Technik: absteigend. Entwicklungsdauer: Lösungsmittel 1: 13 h; Lösungsmittel 2: 4 h. Temperatur: 19°. Aufgetragen: je 10 γ Substanz.							

Tabelle 8.Einfluss von Salzzusatz zum Lösungsmittel auf den R_f -Wert von Farbstoff III in Wasser (Technik nach *Giri*).

Kupp- lungsprod. von III	LM	R_f -Wert	
		12	13
ortho		0,44	0,23
para		0,63	0,24

für 12: Laufzeit 1 h 50'; Temp. 21°. für 13: Laufzeit 1 h 30'; Temp. 21°.

Die Abhängigkeit des R_f -Wertes von der angewandten Methode zeigt deutlich die Tab. 5. Während wir bei der Verteilung (Lösungsmittel 1) immer eine gleichsinnige Zunahme der R_f -Werte von der Glasplattenmethode nach *Ruegg* über *Giri*-Rundfiltertechnik und absteigendes Chromatogramm zur aufsteigenden Methode finden, ist der Gang der R_f -Werte bei der Adsorption (Lösungsmittel 12) ein ganz willkürlicher. Es ist also wesentlich, bei Angaben des R_f -Wertes auch die angewandte Technik zu erwähnen.

Bei der Rundfiltertechnik, wo man das Lösungsmittel im Prinzip durch Variation der Dochtbreite beliebig rasch zufließen lassen kann, zeigt sich auch die Abhängigkeit der Rf-Werte von der Strömungsgeschwindigkeit. Bei recht genauer Konstanz der Trennfaktoren nehmen die Rf-Werte selbst mit grösserer Strömungsgeschwindigkeit zu, was aus Tab. 9 am Beispiel der Farbstoffe III, IV und V deutlich hervorgeht.

Tabelle 9.

Abhängigkeit der Rf-Werte von der Strömungsgeschwindigkeit^{a)}.

Entwicklungs- dauer	III			IV			V		
	o	p	ΔR_f	o	p	ΔR_f	o	p	ΔR_f
1 h 50'	0,63	0,76	0,13	0,63	0,84	0,21	0,67	0,79	0,12
3 h 50'	0,55	0,69	0,14	0,59	0,81	0,22	0,61	0,73	0,12
a) Papier: <i>Whatman</i> Nr. 1. Lösungsmittel 1. Technik: <i>Giri</i> . Laufstrecke: grösster Radius = 6 cm (in Faserrichtung); kleinster Radius = 5,5 cm (senkrecht zur Faserrichtung).									

Das Bestehen einer mathematischen Beziehung zwischen den Rf-Werten auf rechteckigen Papieren und denen auf Rundfiltern, wie sie von *Chakraborty & Burma*¹³⁾ angegeben wird, konnten wir nicht bestätigen.

Die Verwendung des Rf-Wertes als Charakteristikum einer Substanz (analog dem Smp., Sdp., Spektrum, der Kristallform, Drehung usw.) ist also, sobald Adsorptionseffekte eine Rolle spielen, von so vielen Faktoren abhängig, dass seine praktische Verwendbarkeit, speziell bei Farbstoffen, fraglich erscheint.

4. Quantitative papierchromatographische Bestimmung der o- und p-Isomeren.

Zur quantitativen Bestimmung der beiden isomeren Farbstoffe wurden die Flecke extrahiert und anschliessend kolorimetrisch die Farbstoffkonzentrationen bestimmt. Als Modellsubstanz wählten wir aus verschiedenen Gründen den Farbstoff III: er ist sicher reproduzierbar herzustellen (kleinere Gefahr der Zersetzung des Diazoniumsalzes und keine Bildung von Disazofarbstoff); er hat von allen isomeren Nitranilinfarbstoffen die beste Wasserlöslichkeit; die Isolierung der beiden reinen Isomeren, welche als Eichsubstanzen benötigt wurden, ist präparativ möglich; sie lassen sich rasch und sauber mit einem billigen Lösungsmittel (dest. Wasser) papierchromatographisch trennen.

Für die Eluierung der Farbflecke kommen organische Lösungsmittel nicht in Frage, da unsere sulfogruppenhaltigen Substanzen

¹³⁾ *H. C. Chakraborty & D. P. Burma*, J. Indian chem. Soc. **32**, 533 (1955).

darin sehr schwer löslich sind. Wir verwendeten dafür einen Acetatpuffer (Ionenstärke $I = 0,01$), um bei allen Versuchen die gleichen Bedingungen zu haben; denn, da kochend extrahiert werden musste, schlug das p-Isomere ($pK = 7,47^5$) mit gewöhnlichem dest. Wasser schon um.

Die Ablösung der Farbstoffe ging recht schwer, da sie ziemlich fest auf der Papierfaser hafteten; daher kam auch ein dickeres Papier als *Whatman* Nr. 1 (etwa *Whatman* Nr. 3 MM) nicht in Frage, trotzdem man damit bedeutend grössere Mengen aufs Mal chromatographieren könnte.

Da das *Lambert-Beer'sche* Gesetz innerhalb des uns interessierenden Konzentrationsbereiches nicht vollkommen gültig ist (vgl. Tab. 12, S. 1120), bestimmten wir die Konzentrationen nicht rechnerisch, sondern mittels Eichkurven, was auch sonst genauer und zeitsparender ist. Infolge der Affinität von Farbstoffen zur Cellulosefaser wäre es allerdings einfacher und rationeller, die Konzentrationen der Substanzen spektrophotometrisch direkt auf dem Papier zu bestimmen; die nötigen Hilfsmittel dafür standen uns aber nicht zur Verfügung. Immerhin erreichten wir mit unserer Methode einen ausserordentlich hohen Genauigkeitsgrad (relativer Fehler durch Verlust von Farbstoff auf dem Papier max. 1%). Diese Genauigkeit scheint – in Anbetracht der kleinen Substanzmengen pro Versuch ($5 \cdot 10^{-7}$ Mol, entsprechend 21,3 γ Substanz) und der in anderen Verbindungsklassen normalerweise grössern Streuungen – überraschend gut. Sie beruht darauf, dass bei Farbstoffen keine Entwicklungsreaktionen auf dem Papier oder im Eluat nötig sind und die Lösungen direkt kolorimetriert werden können.

5. *Craig*-Verteilung.

Da die quantitative Bestimmung des Isomerenverhältnisses auf kolorimetrischem Wege mittels einer Eichkurve erfolgte, brauchten wir die beiden Isomeren nicht nur getrennt, sondern vor allem in präparativen Mengen. Das war ja eine der Bedingungen, die mitverantwortlich waren für die Wahl des o-Nitranilinfarbstoffs III als Modellsubstanz.

Die grosse Schwierigkeit war nicht die Reindarstellung des o-Isomeren, da dieses bei der Kupplung in stark saurem Medium fast ausschliesslich entsteht und sich leicht durch Umkristallisation reinigen lässt. Dagegen war das p-Isomere auch bei stark alkalischen und pyridin-katalysierten Kupplungen nur im Gemisch mit o-Farbstoff zu erhalten, und zudem traten bei hohen pH-Werten unkontrollierbare Zersetzungsprodukte auf. Ferner lagen die Löslichkeitsverhältnisse für eine Abtrennung des p-Isomeren vom o-Isomeren ungünstig (der p-Farbstoff ist leichter löslich als der o-Farbstoff), so dass man mit gewöhnlicher Umkristallisation nicht zum Ziel kommt. Bei Farbstoff III gelang es uns immerhin, allerdings recht mühsam, durch fraktioniertes Lösen und Ausfällen, reines p-Isomeres zu erhalten.

Prinzipiell wäre natürlich die Übertragung der in analytischem Maßstab gelungenen papierchromatographischen Trennungen auf den präparativen Maßstab durchaus möglich¹⁴); doch standen uns die entsprechenden Hilfsmittel nicht zur Verfügung.

Auch beim Farbstoff II liess sich das o-Isomere durch stark saure Kupplung und anschliessende Umkristallisation leicht rein gewinnen. Bei der Isolierung des p-Isomeren scheiterte jedoch das Verfahren des fraktionierten Lösens und Fällens. Zudem zersetzte sich der Farbstoff bei diesen Fraktionierungsversuchen grossenteils zu einer in Wasser praktisch unlöslichen Substanz. Auch der Versuch, aus dem teilweise gereinigten Produkt durch *Soxhlet*-Extraktion die wasserlöslichen Bestandteile herauszuholen, führte zu weitgehender Zersetzung (Titer des extrahierten Farbstoffs = 36,9%!).

Daher versuchten wir, diesen Farbstoff durch multiplikative Verteilung in seine Isomeren zu zerlegen. Das Problem war insofern etwas einfacher, als wir uns nur für präparative Mengen des p-Isomeren interessierten. Wir wählten als Lösungsmittelsystem Methyl-isobutylketon als Oberphase und einen Citrat-Phosphat-Puffer nach *McIlwaine* vom pH 7,8 als Unterphase. Diese günstigsten Bedingungen wurden in Vorversuchen ermittelt. Höhere pH-Werte führten, ebenso wie tiefere, zu Emulsionsbildungen.

Sehr erschwerend wirkte sich die Tatsache aus, dass der Farbstoff in allen Lösungsmitteln ziemlich schwer löslich ist (noch am besten in Wasser). Das zwang uns dazu, schon für kleine Substanzmengen mit relativ grossen Lösungsmittelquantitäten zu arbeiten. Vorteilhafter wären hier wahrscheinlich schubweise multiplikative Verfahren mit mehrmaliger Substanzzufuhr (z. B. *o'Keeffe*-Verteilung, *Watanabe-Morikawa*-Verteilung) oder gleichförmige multiplikative Verteilung mit einmaliger (*Martin-Synge*-Verteilung) bzw. dauernder Substanzzufuhr (*Jantzen*- bzw. *van Dyk*-Verteilung¹⁵). Nach dem letztgenannten Prinzip ist sogar ein Arbeiten in halbtechnischem und technischem Maßstab möglich¹⁶). Die Ergebnisse der *Craig*-Verteilung lassen sich leicht auf die andern Verteilungsmethoden übertragen.

Eine quantitative Abtrennung des p-Isomeren gelang in einer zehnstufigen *Craig*-Verteilung in Scheidetrichtern mit anschliessender Nachfraktionierung nach der Methode der vollständigen Entnahme¹⁷). Da der pK-Wert des p-Farbstoffes 7,12 beträgt⁵), hatten wir den Vorteil, dass man sofort sah, ob p-Isomeres in der Unterphase war (Farbumschlag von rot nach violett; vgl. experimenteller Teil).

Die Verteilung der Substanzen auf die einzelnen Scheidetrichter wurde papierchromatographisch verfolgt. Dabei zeigte es sich, dass sich das p-Isomere quantitativ auf die Oberphase der Trichter 6–10 (also auf die ersten 5 Trichter der Reihe¹⁸)) verteilte, während in der

¹⁴) Vgl. z. B.: *E. von Arx & R. Neher*, *Helv.* **39**, 1664 (1956).

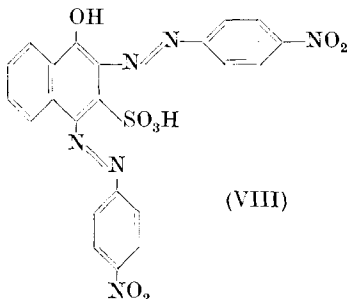
¹⁵) Zur Nomenklatur der verschiedenen Verfahren vgl.: *E. Hecker & K. Allemann*, *Angew. Chem.* **66**, 557 (1954); sowie *E. Hecker*, Verteilungsverfahren im Laboratorium, Weinheim, 1955.

¹⁶) *F. A. von Metzsch*, *Angew. Chem.* **68**, 323 (1956).

¹⁷) Vgl. *E. Hecker*, *loc. cit.*¹⁵⁾, S. 61 ff.

¹⁸) Zur konventionell festgelegten Numerierung der Verteilungselemente vgl. *E. Hecker*, *l. c.*¹⁵⁾, S. 47.

organischen Phase der Trichter 3, 4 und 5 eine weitere, im Papierchromatogramm rot färbende Substanz auftrat. Sie hatte genau den gleichen Rf-Wert wie das p-Isomere, zeigte aber mit Hydrogencarbonat- bzw. Soda-Lösung keinen Farbumschlag. Wahrscheinlich handelt es sich um den Disazofarbstoff VIII. Das o-Isomere ging in die wässrige, untere Phase.



(VIII)

Zwei Tatsachen scheinen uns an diesem Versuch beachtenswert. Einmal zeigt sich wieder, wie schon so oft, dass ein Substanzgemisch, das auf dem Papier in einer sehr grossen Zahl von Lösungsmittelgemischen (auch zweidimensional) immer einheitlich zwei Zonen gibt, in Wirklichkeit aus mehr als zwei Stoffen bestehen kann. Getrennte Zonen auf dem Papierchromatogramm sind daher nicht ein absolut zuverlässiges Kriterium für Auftrennung in einheitliche Substanzen. Die papierchromatographische Prüfung auf Einheitlichkeit einer Substanz wird, wie dieses Beispiel zeigt, durch eine zusätzliche Untersuchung mit Hilfe einer *Craig*-Verteilung wesentlich sicherer.

Zum zweiten zeigt uns unser Beispiel, dass eine Verteilung auf Löslichkeitsunterschieden beruht und dass nicht etwa Unterschiede in den pK-Werten usw. das Wesentliche sind; die pK-Werte können höchstens dafür dienen, ungünstige Löslichkeitsverhältnisse zu variieren, nicht aber dazu, um sie vorauszusagen. Wenn man vom Einfluss der Löslichkeitsunterschiede in der organischen Phase absieht, würde man erwarten, dass der o-Farbstoff (pK = 11,19)⁵⁾, der beim pH-Wert des Puffers (7,8) praktisch vollständig als Naphtol vorliegt, in die organische Phase ginge, und das p-Isomere (pK = 7,12), das zu einem grossen Teil als Naphtolat vorliegt, in die wässrige. Unsere Verteilung beweist, dass gerade das Umgekehrte der Fall ist. Offensichtlich sind nun aber eben die Löslichkeitsverhältnisse so, dass das p-Isomere als Naphtol unverhältnismässig viel leichter löslich ist in der gewählten organischen Phase als das o-Isomere.

Da zwei verschieden gefärbte Verbindungen getrennt werden, eignet sich diese *Craig*-Verteilung zur Demonstration der Trennung zweier Substanzen mit Hilfe eines multiplikativen Verfahrens¹⁹⁾.

¹⁹⁾ Vgl. die eingehende Vorschrift im experimentellen Teil.

6. Papierelektrophorese.

Durch die Wahl eines geeigneten Puffers lässt sich erreichen, dass eine Verbindung, die ein Zwitterion bilden kann, als solches vorliegt oder aber dass dieses in ein Kation oder in ein Anion übergeht. Analog lässt sich bei nicht zu starken Säuren und Basen deren Dissoziationsgrad, und so ihre Wanderungsgeschwindigkeit, durch Variation des pH der Lösung in der gewünschten Weise beeinflussen. Bei unsern o/p-Hydroxyazogemischen weisen die p-Isomeren durchwegs Aciditätskonstanten auf, die um 2–4 Zehnerpotenzen grösser sind als die der entsprechenden o-Farbstoffe⁵⁾. Eine elektrophoretische Trennung lag deshalb auf der Hand²⁰⁾.

Als Modellbeispiel wählten wir den Farbstoff IV (m-Nitrodiazobenzol → 1-Naphtol-3-sulfosäure). Wie erwartet, ergaben sich sowohl mit einem Puffer von pH 8, als auch, und zwar noch besser, bei pH 10, saubere quantitative Trennungen, wobei der p-Farbstoff rascher zur Anode wanderte. Während die Bande des o-Isomeren orange blieb, wanderte das p-Isomere als Naphtholat, was an der Rotfärbung der Bande erkenntlich war.

Die Versuche zeigen, dass sich die Papierelektrophorese sowohl zur quantitativen Bestimmung des Isomerenverhältnisses solcher o/p-Hydroxyazogemische (spektrophotometrisch auf dem Papier oder in Eluaten) als auch zur präparativen Gewinnung der Isomeren eignen würde.

Neben den in den vorstehenden Abschnitten besprochenen Trennmethode haben wir auch Versuche mit andern Methoden (Trennung an Ionenaustauschern und Aluminiumoxyd, Umkristallisation, fraktionierte Auflösung bzw. Ausfällung sowie Komplexbildung) durchgeführt¹⁾.

Experimenteller Teil.

1. Darstellung der Farbstoffe. 2-(p'-Chlorphenylazo)-1-naphtol-3-sulfosäure (Farbstoff I). 0.01 Mol p-Chloranilin wurde in 10 ml H₂O und 3 ml konz. HCl in üblicher Weise warm gelöst und im Eisbad diaziiert. Man liess die klarfiltrierte Lösung unter Rühren zu einer Lösung von 3.0 g 1-Naphtol-3-sulfosäure (korrigiertes Molgewicht $M' = 292$) und 5 g Soda in 80 ml H₂O bei 0–5° zutropfen. Nach ½ Std. wurde der rote Niederschlag abfiltriert, getrocknet und reduktometrisch analysiert. Erhalten 5.05 g. Für die Aufnahme des Absorptionsspektrums wurde die Substanz aus Wasser umkristallisiert.

2-(4)-(p', o' und m'-Nitrophenylazo)-1-naphtol-3-sulfosäure, 2-(4)-(2', 4'-Dinitrophenylazo)-1-naphtol-3-sulfosäure (Farbstoffe II, III, IV bzw. V). Die Diazotierung der 3 isomeren Mononitraniline und des 2,4-Dinitranilins erfolgten nach den Vorschriften von Fierz-David & Blangey²¹⁾ in Salzsäure bzw. 2-n. Nitrosylschwefelsäure (für 2,4-Dinitranilin). Die klarfiltrierten Diazolösungen wurden analog wie oben gekuppelt und aufgearbeitet. Erhaltene Mengen: p-Nitrofarbstoff (II) 5.03 g; o-Nitrofarbstoff (III) 4.5 g; m-Nitrofarbstoff (IV) 4.66 g; 2,4-Dinitrofarbstoff (V) 5.2 g.

²⁰⁾ Vgl. z. B. H. Hoyer, Kolloid-Z. **122**, 164 (1951).

²¹⁾ H. E. Fierz-David & L. Blangey, Grundlegende Operationen der Farbenchemie, 8. Aufl., Wien 1952, S. 242ff.

2. Qualitative papierchromatographische Trennung der Kupplungsprodukte. Es wurde durchwegs, sofern nichts anderes vermerkt ist, als Chromatographiepapier *Whatman* Nr. 1 verwendet; für Rf-Wert-bestimmungen wurde in einigen wenigen Fällen *Whatman* Nr. 3 MM gebraucht. Wir arbeiteten sowohl mit Rundfiltern²²⁾ als auch nach der absteigenden²³⁾ oder der aufsteigenden²⁴⁾ Methode. Um für eine bestimmte Substanz die geeignetste Lösungsmittelzusammensetzung zu finden, erwiesen sich Reihenversuche mittels der aufsteigenden Methode in Reagenzgläsern nach *Rockland & Dunn*²⁵⁾ als sehr zweckmässig. Auch die Rundfiltertechnik in der *Petri*-Schale nach *Giri & Rao*²⁶⁾ (im theoretischen Teil kurz mit „*Giri*“ bezeichnet) war für diesen Zweck sehr gut geeignet; kurze Laufzeiten, gute Trennwirkung und die Möglichkeit, bis zu sechs Substanzen gleichzeitig laufen zu lassen, machten sie zum idealen Mittel, um rasch über den Stand einer Operation qualitativ Aufschluss zu erhalten. Unsere Rundfilter hatten einen Durchmesser von 13 cm, die *Petri*-Schale einen solchen von 14 cm und das Lösungsmittelschälchen einen solchen von 3 cm. Die Substanzen wurden auf einem Kreis im Abstand von 1,5 cm vom Zentrum aus aufgetragen. Durch Variation der Dochtbreite kann die Laufgeschwindigkeit beliebig variiert werden. Als weiteres nach dem Rundfilterprinzip arbeitendes Verfahren verwendeten wir die von *R. Ruegg*²⁷⁾ ausgearbeitete Modifikation der Glasplattenmethode (im theoreet. Teil mit „*Ruegg*“ bezeichnet). In analoger Weise wie bei der eben beschriebenen Rundfiltermethode werden auf einem quadratischen Papier (25 × 25 cm) die Proben im Abstand von 2 cm vom Mittelpunkt aus aufgetragen. Das Papier wird zwischen zwei mit einem Bleirahmen beschwerte Glasplatten gebracht. Ihre Grösse entspricht der des Papiers. Die Zugabe des Lösungsmittels erfolgt genau über dem Papierzentrum durch eine mit einem Fliesspapierstopfen verschlossene Bohrung (~ 0,7 mm Durchmesser) in der obren Platte.

Die aufsteigende und die absteigende Technik wurde nach den üblichen Methoden durchgeführt; aufsteigend in Glaszylindern (28,5 × 40 cm), absteigend in Akkumulatorenkasten (20 × 30 × 50 cm) mit Glaseinsatz. Die Papiere wurden auf die gewünschte Grösse zugeschnitten (absteigend 23 × 47 cm; aufsteigend 36 × 46,5 cm) und die Substanzen in Form von 0,1-proz., meist heissen, wässrigen Lösungen mittels einer Mikropipette (Inhalt 0,1 ml) aufgetragen. Pro Fleck wurden jeweils 5–10 µl aufgetupft, was einer Substanzmenge von 5–10 γ entspricht. Nach Eintrocknen der Flecke wurde chromatographiert. Die chromatographierten Papiere wurden an der Luft getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt.

Die Zuordnung der Flecke zum o- bzw. p-Isomeren erfolgte durch Tüpfeln mit NaHCO₃-Lösung: Nur der p-Farbstoff zeigt dabei den in Tab. 10 vermerkten Umschlag.

Tabelle 10.

Farbumschlag mit NaHCO₃-Lösung auf dem Papier.

Farbstoff Nr.	I	II	III	IV	V
Umschlag	kein Umschlag (nur o-Kupplung)	rot → violett	orange → lila	orange → rot	gelb → blau

Die verwendeten organischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch alle durch Destillation (das Phenol nach Angaben von *Draper & Pollard*²⁸⁾ unter Zusatz von 0,1% Aluminiumspänen und 0,05% Natriumhydrogencarbonat) gereinigt.

²²⁾ *L. Rutter*, *Nature* **161**, 435 (1948); *Analyst* **75**, 37 (1950).

²³⁾ *R. Consden*, *A. H. Gordon & A. J. P. Martin*, *Biochem. J.* **38**, 224 (1944).

²⁴⁾ *R. J. Williams & H. Kirby*, *Science* **107**, 481 (1948).

²⁵⁾ *L. B. Rockland & M. S. Dunn*, *Science* **109**, 539 (1949).

²⁶⁾ *K. V. Giri & N. A. N. Rao*, *Nature* **169**, 923 (1952).

²⁷⁾ *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel.

²⁸⁾ *O. J. Draper & A. L. Pollard*, *Science* **109**, 448 (1949).

3. Quantitative Bestimmung des o/p-Verhältnisses. Zur quantitativen papierchromatographischen Auswertung der Kupplungsversuche von diazotiertem o-Nitranilin mit 1-Naphthol-3-sulfosäure (Farbstoff III) verwendeten wir die aufsteigende Methode auf *Whatman* Nr. 1 mit destilliertem Wasser als Lösungsmittel.

Auf die Papiere wurden im Abstand von 2,5 cm vom untern Rand auf vorbereitete Bleistiftmarkierungen (5 Banden, die in je 10 Punkte von 5 mm Abstand unterteilt waren) eine Lösung von $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Farbstoff in 100 ml dest. Wasser aufgetragen. Infolge der schlechten Wasserlöslichkeit der Farbstoffe musste meist die warme Lösung verwendet werden.

Auf jeden Punkt wurden 5 μ l aufgetupft, pro Bande also 50 μ l, pro Bogen 250 μ l, was $5 \cdot 10^{-7}$ Mol Farbstoff pro Bogen entspricht. Die einzelnen Flecke einer Bande verliefen auf dem Papier zu einer gemeinsamen Linie, so dass jede Bande als geschlossenes Ganzes wanderte. Nach beendeter Entwicklung (im Mittel 3 Std.) wurden die Papiere an der Luft getrocknet und, wenn nicht sofort weiterverarbeitet, im Dunkeln aufbewahrt. Die Flecke wurden ausgeschnitten, in kleine Schnitzel zerteilt und mit 5–6 Portionen (je 15–20 ml) eines Acetattuffers von der Ionenstärke $I = 0,01$ (6 g Eisessig und 13,61 g krist. Natriumacetat mit dest. Wasser auf 10 l stellen) ausgekocht. Die heissen Eluate wurden durch eine G-3-Glasfritte in einen 100 ml Messkolben, der in einem Filtriertopf stand, abgesaugt. Nach Erkalten des Filtrats wurde mit der gleichen Pufferlösung auf 100 ml aufgefüllt.

Um Fehlerquellen auszuschliessen, die einerseits zufolge ungenauer Titan-Titer (Mitbestimmung von Zersetzungsprodukten) und andererseits infolge Volumenveränderungen beim Tüpfeln (Auftragen warmer Lösungen) entstehen können, verwendeten wir für die kolorimetrische Konzentrationsbestimmung Eichlösungen für den o-Farbstoff und den p-Farbstoff. Dadurch waren wir zur Angabe des Isomerenverhältnisses von den absoluten Konzentrationen unabhängig, was äusserst wichtig war, wie ein Vergleich mit dem Differenzverfahren (Bestimmung der Konzentration nur des einen Isomeren und Ergänzung der Menge des andern auf die Totaleinwage) zeigte.

4. Eichlösungen. *Stammlösung*: $2 \cdot 10^{-3}$ -m. 10^{-3} Mol Farbstoff werden in dest. Wasser gelöst und damit auf 500 ml aufgefüllt.

a) Verdünnungsreihe für direkte Kolorimetrierung. 5 ml Stammlösung werden mit dem oben beschriebenen Acetattuffer ($I = 0,01$) auf 2000 ml gestellt (Lös. I). Die weiteren Verdünnungen erhält man, indem die in Tab. 11 angegebenen Mengen von Lösung I mit Acetattuffer auf 100 ml gestellt werden.

Tabelle 11.

Nr.	I	II	III	IV	V
ml Lös. I/100ml	unverdünnt	75	50	25	10
Farbstoffkonz.	$5,00 \cdot 10^{-6}$ -m.	$3,75 \cdot 10^{-6}$ -m.	$2,50 \cdot 10^{-6}$ -m.	$1,25 \cdot 10^{-6}$ -m.	$0,50 \cdot 10^{-6}$ -m.

b) Verdünnungsreihe für die Kolorimetrierung nach Eluierung aus dem Papierchromatogramm. Die erwähnte Stammlösung ($2 \cdot 10^{-3}$ -m.) dient als Lösung I dieser Verdünnungsreihe. Die Lösungen II–V werden analog wie oben durch Auffüllen von 75, 50, 25 bzw. 10 ml Lösung I auf 100 ml (hier jedoch nicht mit Acetattuffer, sondern mit dest. Wasser) hergestellt. Diese Verdünnungsreihe gibt, wenn 5 Banden, wobei man für jede Bande 10mal 5 μ l der obigen Lösungen auf tupft (vgl. Beschreibung oben), mit Acetattuffer eluiert und dann auf 100 ml gestellt werden, folgende Verdünnungsreihe mit den gleichen Endkonzentrationen wie vorher:

Eluat von Lösung I: $5,00 \cdot 10^{-6}$ -m.
 Eluat von Lösung II: $3,75 \cdot 10^{-6}$ -m.
 Eluat von Lösung III: $2,50 \cdot 10^{-6}$ -m.
 Eluat von Lösung IV: $1,25 \cdot 10^{-6}$ -m.
 Eluat von Lösung V: $0,50 \cdot 10^{-6}$ -m.

5. Kolorimetrische Bestimmung der Farbkonzentration. a) Eichkurven. Die Eichlösungen wurden in einem Lumetron-Kolorimeter, Modell 402-E, in Küvetten von 5 cm Schichtdicke gemessen. Als Filter verwendeten wir Interferenzfilter (Filtraflex Typ B²⁹) von 493 m μ für den o-Farbstoff ($\lambda_{\max} = 500$ m μ) und von 464 m μ für den p-Farbstoff ($\lambda_{\max} = 475$ m μ). Die gemessenen Transmissionswerte trägt man gegen die Farbstoffkonzentration graphisch auf.

Wie die Tab. 12 zeigt, gehorchen die Extinktionswerte der Eichlösungen dem Lambert-Beer'schen Gesetz nicht vollkommen.

Tabelle 12.

Konz. (10 ⁻⁶ . Mol/l) .	0,25	0,50	1,25	2,50	3,75	5,00
ortho % T	—	86,8	72,5	53,2	39,4	29,6
E	—	0,062	0,140	0,274	0,404	0,529
para % T	93,4	88,7	75,3	57,8	44,6	35,0
E	0,030	0,052	0,125	0,238	0,351	0,456
%T = Transmission (Durchlässigkeit) in %; E = Extinktion (opt. Dichte) = 2 - log %T.						

Die Eichungen wurden mehrmals wiederholt, und wir erhielten bei den einzelnen Konzentrationen Streuungen der Transmissionswerte, die sowohl bei der direkten Kolorimetrierung als auch bei der Kolorimetrierung nach Eluierung aus dem Papierchromatogramm max. $\pm 0,6$ Transmissions-Proz. betragen.

Ein Vergleich der Werte der direkten Konzentrationsbestimmung mit denen der Bestimmung nach der Chromatographie zeigt die relativ hohe Genauigkeit der Methode. Wenn man die Werte der direkten Bestimmung als richtig annimmt, so beträgt der relative Fehler, der durch den Verlust von Farbstoff bei der Chromatographie und Extraktion entsteht, maximal 1%. Dabei ist er im Konzentrationsbereich von 5,0 bis 2,5 $\cdot 10^{-6}$ -m. stets kleiner als 0,5%, bei Konzentrationen unter 2,5 $\cdot 10^{-3}$ -m. kleiner als 1%.

b) Lösungen der eluierten Reaktionsprodukte. Die, wie vorstehend beschrieben, erhaltenen Lösungen der o- bzw. p-Isomeren unserer Kupplungsversuche wurden genau analog wie die Eichlösungen kolorimetriert. Alle Ablesungen wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt und der Mittelwert berechnet. Der Ablesefehler betrug maximal $\pm 0,1$ Transmissions-Proz. Anhand der Eichkurven wurde aus den gemessenen Transmissionswerten die Konzentration ermittelt und daraus das prozentuale Isomerenverhältnis berechnet.

6. Craig-Verteilung von 2(4)-(p'-Nitrophenylazo)-1-naphthol-3-sulfosäure (Farbstoff II). (Grundprozess und anschliessende Nachfraktionierung nach der Methode der vollständigen Entnahme³⁰.) Die Vorversuche zur Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittelsystems wurden in kleinen Scheidetrichern durchgeführt. Als geeignet erwies sich das System Methylisobutylketon/Phosphat-Citrat-Puffer nach *McIlvaine*³¹).

Um den für die Verteilung günstigsten Pufferbereich zu ermitteln, variierten wir systematisch das pH der Unterphase zwischen 7 und 9 (pH 7,0, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0 und 9,0). Bis pH 8 verwendeten wir den *McIlvaine*-Puffer, für pH 9 den Borsäure-Puffer nach *Clark & Lubs*³²). Diese Verteilungen wurden mit 75 mg Farbstoff in 250 ml Scheidetrichterreihen mit je 25 ml Ober- und Unterphase durchgeführt. Für die Pufferlösungen verwendeten wir reinste Chemikalien (Merck) und destilliertes, CO₂-freies Wasser.

²⁹) Hersteller: *Gerätebau-Anstalt* Balzers, Lichtenstein.

³⁰) *E. Hecker*, l. c.¹⁵), S. 61 ff.

³¹) *T. C. McIlvaine*, *J. biol. Chemistry* **49**, 183 (1921).

³²) *W. M. Clark & H. A. Lubs*, *J. biol. Chemistry* **25**, 479 (1916).

Bei niedrigen pH-Werten (7,4 und tiefer) wurde ein vernünftiges Arbeiten (obwohl der Trenneffekt mit sinkendem pH grösser werden sollte, da das p-Isomere in die organische Phase geht) durch immer stärker werdende Emulsionen unmöglich; das Gleiche galt auch für höhere pH-Werte (pH 9). Als optimalen Kompromiss wählten wir für die Unterphase ein pH von 7,8. Wir geben im folgenden dafür eine genaue Vorschrift, da sich dieser Versuch wegen der verschiedenen Färbung der beiden Phasen sehr gut zur Demonstration einer *Craig*-Verteilung im Chemieunterricht eignet.

Puffer (untere Phase): a) 21,01 g Zitronensäure ($C_6H_8O_7$, H_2O) in 1 l dest. H_2O ;
b) 284 g wasserfreies sek. Natriumphosphat (Na_2HPO_4) in 10 l dest. H_2O .

9570 ml Lösung b) werden mit 430 ml Lösung a) gemischt.

Organisches Lösungsmittel (obere Phase): destilliertes Methyl-isobutyl-keton (Sdp. 114–116°).

Die wässrige Pufferlösung wird mit dem organischen Lösungsmittel über Nacht geschüttelt. Dann wartet man, bis die beiden Phasen sich getrennt haben und lässt die untere in ein separates Gefäss laufen. Damit sind die beiden Phasen miteinander ins Gleichgewicht gebracht und verwendungsfähig.

Verteilung. In elf 2-l-Scheidetrichern (numeriert von 10 bis 0) befinden sich je 750 ml mit Pufferlösung gesättigtes Methyl-isobutyl-keton (im folgenden kurz „Keton“ genannt).

In 750 ml mit organischer Phase gesättigter Pufferlösung (im folgenden kurz „Pufferlösung“ genannt) werden 3,75 g feinst verriebenen und gesiebten ungereinigten Farbstoffs unter gelindem Erwärmen gelöst (wobei nicht alles in Lösung geht). Dann lässt man auf Zimmertemperatur abkühlen und nutscht die tief violett gefärbte Lösung durch ein Hartfilter ab. Das Filtrat (das klar sein muss, sonst wird nochmals filtriert) wird nun in den Scheidetrichter 10 gegeben und in diesem zwei Min. geschüttelt.

Nach Trennung der Phasen wird die untere Schicht in den Scheidetrichter 9 gegeben und dieser analog geschüttelt. In den Scheidetrichter 10 werden 750 ml neue Pufferlösung gegeben und geschüttelt.

Die untere Phase von Trichter 9 wird in den Trichter 8 abgelassen und dieser geschüttelt. In den Trichter 9 wird die untere Phase aus Trichter 10 gegeben und geschüttelt. In den Trichter 10 gibt man 750 ml neue Pufferlösung zu uns schüttelt.

In gleicher Weise wird fortgefahren bis Trichter 10 bis 0 je mit Unter- und Oberphase gefüllt und geschüttelt sind. Nun ist der Grundprozess beendet, und es beginnt die Nachfraktionierung.

Aus Trichter 0 lässt man die Unterphase abfließen; sie wird (in unserem Fall) verworfen. In analoger Weise wie vorher werden die Unterphasen von Trichter 1 in Trichter 0, von 2 in 1 usw. bis von Trichter 10 in Trichter 9 verschoben. Dabei ist es wichtig, dass der letzte Rest Unterphase aus Trichter 10 in den Trichter 9 kommt. In Trichter 10 wird keine neue Unterphase mehr eingefüllt.

Nun lässt man wiederum aus Trichter 0 die Unterphase ab und verschiebt wie vorher die Unterphasen je um ein Gefäss bis zum Transport aus Trichter 9 in Trichter 8; aus Trichter 9 muss der letzte Rest Unterphase in Trichter 8 sein; es wird keine frische Pufferlösung mehr nachgefüllt.

In gleicher Weise wird fortgefahren, bis die letzte Unterphase von Trichter 1 in Trichter 0 verschoben, dieser geschüttelt und die Unterphase abgelassen worden ist.

Es befindet sich jetzt in allen 11 Scheidetrichern nur noch Oberphase („Keton“). Man lässt die Trichter über Nacht stehen und kann dann Unterphase, die sich noch abgetrennt hat, ablassen.

Nun prüft man die Oberphasen mittels Papierchromatogramm (Rundfilter; Lösungsmittel: n-Butanol/Pyridin/dest. H_2O 6:4:3) auf ihren Gehalt an p-Farbstoff.

Der Inhalt derjenigen Scheidetrichter, bei denen der Farbstoff rein und in merklicher Menge vorhanden ist (in unserem Fall die Trichter 10 bis 6), wird vereinigt, mit destilliertem Wasser ausgewaschen (um in der organischen Phase gelöste Fremdstoffe, z. B. Citrat und Phosphat aus der Pufferlösung, zu entfernen) und durch ein Hartfilter abgenutscht. Dann destilliert man das Lösungsmittel im Vakuum bis fast zur Trockne ab,

und lässt den Rest im Vakuumtrockenschrank verdunsten. Als Rückstand erhält man das reine p-Isomere des Farbstoffs II.

Da der p-Farbstoff sich in der organischen Phase mit roter (Naphtolform), in der basischen Pufferlösung aber mit violetter Farbe (Naphtolatform) löst, lässt sich seine Wanderung gut verfolgen. Mit zunehmender Zahl von Transportoperationen verschwindet die violette Farbe in der untern Phase. Die Unterphasen, welche aus dem Trichter 0 abgelassen werden, sind blass orange gefärbt.

Wir versuchten, diese Verteilung auch auf *Whatman*-Papier Nr. 1, das mit *McIlwaine*-Puffern (pH = 7,8, 7,0 bzw. 6,4) imprägniert war, unter Verwendung von mit entsprechenden Puffern gesättigtem Methyl-isobutyl-keton durchzuführen. Der Farbstoff wanderte jedoch unter diesen Bedingungen nicht.

7. Papierelektrophorese des Farbstoffs IV (Tab. 13). Die Versuche wurden auf *Whatman*-Filterpapier Nr. 1 in einer Elektrophoresekammer nach *Grassmann & Hannig*³³⁾, dem Elphor H der Firma *Bender & Hobein* (München, Zürich und Frankfurt) ausgeführt (Spannung 110 Volt). Die Auftragung der Substanzen auf das Papier erfolgte wie bei der qualitativen Papierchromatographie (vgl. oben), pro Fleck 10–20 γ . Wir arbeiteten mit zwei Puffersystemen bei pH 8 (Phosphatpuffer nach *Sørensen*³⁴⁾) bzw. pH 10 (Borsäurepuffer nach *Clark & Lubs*³²⁾).

Tabelle 13.

	pH	Versuchsdauer in Std.	Weg ^{a)} in cm	Farbe
o-Farbstoff	8	16	2,2	orange
	10	11	3,4	orange
p-Farbstoff	8	16	5,0	rot
	10	11	10,0	rot
a) Vom Farbstoff von der Auftragsstelle aus zurückgelegte Wanderungsstrecke.				

Wir danken den Herren Dr. E. Seebeck (*Sandoz A.G.*), Dr. R. Neher, Dr. C. Wittwer und E. von Arx (*CIBA Aktiengesellschaft*) für wertvolle Ratschläge. Die *CIBA Aktiengesellschaft* stellte uns in verdankenswerter Weise die apparativen Mittel zur Ausführung papierchromatographischer Trennungen am Institut für Farbenchemie der Universität Basel zur Verfügung.

SUMMARY.

1. The qualitative separation and quantitative estimation of the two isomeric azo compounds 2- and 4-arylaazo-1-naphthol-3-sulphonic acid by paper chromatography is described (aryl = 4'-chloro-, 2'-nitro-, 3'-nitro-, 4'-nitro- and 2',4'-dinitro-phenyl).

2. The R_f-values are discussed as a function of several parameters. As a result of this procedure, preferential adsorption and preferential partition can be distinguished. To characterize these effects, we introduce two new terms, namely Trennfaktor ΔR_f and Zonenwert ΔR_z .

³³⁾ W. Grassmann & K. Hannig, Z. physiol. Chem. **290**, 1 (1952); vgl. auch W. Grassmann, K. Hannig & M. Knedel, Dtsch. Med. Wschr. **76**, 333 (1951).

³⁴⁾ S. P. L. Sørensen, Biochem. Z. **21**, 131 (1909); **22**, 352 (1909).

3. A procedure for counter-current distribution followed by diamond separation of such isomeric pairs on a preparative scale is given.

4. The separability of these isomers by paper electrophoresis is demonstrated.

5. The fact that the isomeric 2- and 4-aryloxy-1-naphthol-3-sulphonic acids are adsorbed by paper demonstrates that simple monoazo dyes can be substantive for cellulose. This is in contrast to the general views on the phenomenon of dye substantivity.

Institut für Farbenchemie Universität Basel.

127. Etudes sur les matières végétales volatiles – CXLV¹⁾.

Sur l'iso- α -irone et sur les iso- α -iols et néo-iso- α -iols

par Yves-René Naves.

Dédié à Monsieur le Prof. T. Reichstein à l'occasion de son 60^e anniversaire.

(24 IV 57.)

J'ai décrit en 1955²⁾ l'irone α trans(2,6) cis (2₁,2₂) qui est, selon la nomenclature proposée³⁾, l'iso- α -irone vraie, la cétone décrite auparavant sous ce nom étant en réalité la néo-iso- α -irone (trans(2,6) trans (2₁,2₂)). L'iso- α -irone vraie est caractérisée, notamment, par sa phényl-4-semicarbazone F. 158,5–159,5° et sa dinitro-2,4-phénylhydrazone F. 151–152°.

L'iso- α -irone isolée par distillation fractionnée à partir de mélanges d'irones isomères a été ainsi décrite: $d_4^{20} = 0,9306$; $n_D^{20} = 1,4950$; $ERM_D = + 0,99$; ses spectres d'absorption présentant un maximum, dans l'alcool à 95%, à 235,5 m μ ($\epsilon = 9.550$) et dans l'isooctane à 229 m μ ($\epsilon = 9.830$).

Or, j'ai constaté que cette préparation a été, entre son obtention et les mesures, nettement altérée. Traitée par chromatographie et redistillée rapidement à l'abri de l'air, elle a montré les caractères que nous avons observés sur les préparations ultérieures.

Celles-ci ont été obtenues par distillation à partir de sous-produits de la fabrication industrielle d' α -irones, et sélectionnées d'après leur absorption infra-rouge entre 9 et 13 μ , d'après le renforcement des bandes de 1052 et de 800 cm⁻¹ et l'affaiblissement de celles de 1060, 984–998 et 793 cm⁻¹ appartenant aux α -irone et néo- α -irone,

¹⁾ CXLIV^e communication, Bull. Soc. chim. France, 1768 (1956).

²⁾ Y. R. Naves, Bull. Soc. chim. France, 253 (1955).

³⁾ Y. R. Naves, Helv. 32, 969 (1949).