

(Lit.¹⁵): Schmp. 265°) erhalten, welche die in der Literatur beschriebenen Löslichkeits-eigenschaften in Säuren, Alkalien und organischen Lösungsmitteln zeigen.

$C_8H_6ON_2$ (146.1) Ber. C 65.75 H 4.11 Gef. C 66.06 H 4.25

2-Diäthoxymethyl-benzimidazol (IV): Der Niederschlag B ergab, zweimal aus Petroläther-Alkohol umkristallisiert, 2,4 g 2-Diäthoxymethyl-benzimidazol vom Schmp. 171–172°. Nach Hydrolyse wurde mit Phenylhydrazin Benzimidazol-aldehyd-(2)-phenylhydrazon, Schmp. 148–149° (Hydrochlorid, Schmp. 278°), nachgewiesen.

Chinoxalin: Der Niederschlag C (5.5 g), Schmp. 28–29° (Lit.¹⁷): Schmp. 27°), wurde durch nachstehende Umsetzungen als Chinoxalin charakterisiert.

1. Chinoxalin-sulfat: Ein Teil der Verbindung wurde in absol. Alkohol gelöst und unter Umschütteln mit konz. Schwefelsäure versetzt. Das ausgefallene Sulfat wurde mit Alkohol-Äther gewaschen und im Vak.-Exsiccator getrocknet; Schmp. 184° (Lit.¹⁷): Schmp. 186–187°. Der Misch-Schmelzpunkt mit authent. Chinoxalin-sulfat war ohne Depression.

2. Chinoxalin-oxalat wurde durch Fällung mit wäßr. Oxalsäure erhalten; Schmp. 182° (Lit.¹⁷: 169°). Der Misch-Schmelzpunkt mit dem aus reinem Chinoxalin erhaltenen Oxalat war ohne Depression.

3. Fällung mit Tetrachlorjodsäure: Durch Versetzen von 0.5 g der Verbindung, gelöst in 2 ccm konz. Salzsäure, mit 20 ccm Tetrachlorjodsäure wurden gelbe Kristalle erhalten, die aus Essigsäure und wenig Tetrachlorjodsäure umkristallisiert wurden; Schmp. 131° (Lit.¹⁸): Schmp. 125–130°).

102. El Sayed Amin und Erich Hecker: Trennung der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester von Alkoholen durch Verteilung und Chromatographie

[Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie und dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität, Tübingen]

(Eingegangen am 12. November 1955)

Die farbigen und gut kristallisierenden 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester von Alkoholen lassen sich durch Craig-Verteilung und durch Verteilungschromatographie auf Kieselgur-Säulen trennen. Als Lösungsmittelsysteme eignen sich Kohlenwasserstoffe mit Nitromethan und Dimethylformamid in verschiedenen Mengenverhältnissen. Zur Trennung der Ester niedriger Alkohole bis *n*-Octanol wird der Kohlenwasserstoff als mobile Phase verwendet, während bei der Trennung der Ester höherer Alkohole der Kohlenwasserstoff als stationäre Phase dient. Der Trenneffekt in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Lösungsmittelsystems und des zu trennenden Gemisches wurde untersucht.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen¹⁾ über den Sexuallockstoff des Seidenspinners (*Bombyx mori* L.) gilt unser Interesse der Trennung und Isolierung der Komponenten von Alkoholgemischen. Wir haben vor kurzem die

¹⁷⁾ O. Hinsberg, Ber. dtsch. chem. Ges. 17, 320 [1884].

¹⁸⁾ F. D. Chattaway u. W. G. Humphrey, J. chem. Soc. [London] 1929, 649.

¹⁾ A. Butenandt, Naturwiss. Rdsch. 8, 457 [1955].

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester von Alkoholen beschrieben²⁾, deren intensive Eigenfarbe die Trennung von Gemischen durch Verteilung und Chromatographie erleichtert, während ihr hoher Schmelzpunkt für die Reinigung der getrennten Ester von Vorteil ist.

Die Trennung von farbigen Derivaten der homologen Alkohole und von Terpenalkoholen durch Adsorptionschromatographie ist schon mehrfach versucht worden (z. B. l. c.³⁻⁸⁾). Meist ließen sich, sowohl an Aluminiumoxyd als auch an Silicagel, nur die Derivate der niederen Alkohole trennen. Für die Derivate der höheren Alkohole erwies sich der Trenneffekt als nicht ausreichend. Auch uns ist es nicht gelungen, die 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester von höheren Alkoholen durch Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxyd, Silicagel, Talkum, Gips und wasserfreiem Kupfersulfat befriedigend zu trennen. Saubere Trennungen konnten jedoch durch Craig-Verteilung und durch Verteilungschromatographie erzielt werden. Durch Verteilungschromatographie sind kürzlich⁹⁾ auch die niedrig schmelzenden 4-Dialkylamino-3,5-dinitro-benzoesäure-ester von Alkoholen getrennt worden.

Verteilungsverhalten der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester

Die Verteilungsisothermen der Ester in den verwendeten Lösungsmittelsystemen sind innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode¹⁰⁾ bis zu verhältnismäßig hohen Konzentrationen linear. In Tafel 1 sind die Verteilungskoeffizienten K und die Trennfaktoren β einiger Ester für verschiedene Systeme wiedergegeben: Die größten Trennfaktoren werden im System a erhalten, dessen Kapazität jedoch gering ist. Mehr Substanz wird gelöst, wenn man System a Dimethylformamid (System b), Xylol (System c) oder Chloroform (System d) zusetzt. Wie auf Grund der früher¹¹⁾ aufgezeigten Regeln zu erwarten war, wird der Trennfaktor β durch diese Zusätze erniedrigt.

Die Trennfaktoren zweier Ester, deren Alkoholreste sich um 2 bzw. 4 C-Atome unterscheiden, sind verhältnismäßig klein (Tafel 1). Es lassen sich daher durch Craig-Verteilung mit wenigen Verteilungsschritten ($n \leq 30$) nur die Ester der niederen Alkohole trennen, wie man auf Grund der Trennfunktion des Verfahrens leicht abschätzen kann¹⁰⁾. Als Beispiel ist in Abbild. 1 die partielle Trennung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-äthyl- und -*n*-hexyl-esters durch Craig-Verteilung in System c wiedergegeben.

²⁾ E. Hecker, Chem. Ber. 88, 1666 [1955].

³⁾ M. R. Crow u. M. D. Sutherland, Univ. Queensland Papers, Dept. Chem. 1, No. 31, 6pp. [1948]; C. A. 44, 3945a [1950].

⁴⁾ J. B. Davenport u. M. D. Sutherland, Univ. Queensland Papers, Dept. Chem. 1, No. 39, 8pp. [1950]; C. A. 45, 2910e [1951].

⁵⁾ S. Masuyama, J. chem. Soc. Japan, pure Chem. Sect. [Nippon Kagaku Zassi] 70, 232 [1949]; C. A. 45, 5606d [1951].

⁶⁾ K. A. Jensen, F. Limborg u. W. M. Solstad, Acta chem. scand. 4, 392 [1950].

⁷⁾ P. A. S. Smith, D. R. Baer u. S. N. Ege, J. Amer. chem. Soc. 76, 4566 [1954].

⁸⁾ E. O. Woolfolk, F.-E. Beach u. S. P. McPherson, J. org. Chemistry 20, 391 [1955].

⁹⁾ H. van Duin, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 78, 68 [1954].

¹⁰⁾ E. Hecker, Verteilungsverfahren im Laboratorium, Verlag Chemie, Weinheim 1955.

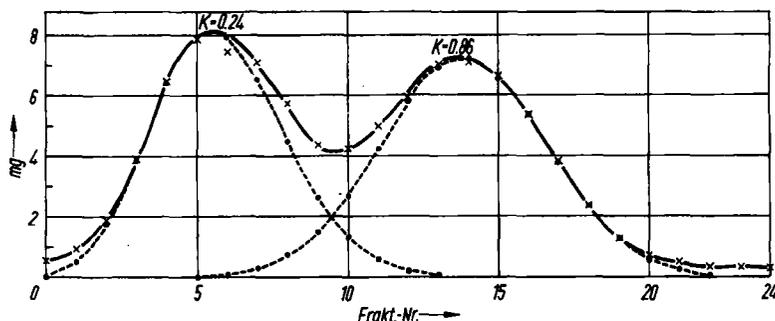
¹¹⁾ E. Hecker, Chimia [Zürich] 8, 229 [1954].

Tafel 1. Verteilungskoeffizienten K einiger 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester bei $22 \pm 2^\circ$ Die Trennfaktoren β gelten für untereinander stehende Ester ($\beta \geq 1$)

Lösungsmittelsysteme	a Cyclohexan/ Nitromethan		b Cyclohexan(10)/ Nitromethan(5) Dimethylform- amid(5)		c Cyclohexan(8) Xylol(2)/ Nitromethan(10)		d Cyclohexan(10)/ Chloroform(2) Nitromethan(8)	
	K	β	K	β	K	β	K	β
Äthanol	0.14	1.92	—	—	0.26	1.85	0.25	—
<i>n</i> -Butanol	0.25	4.36	0.20	2.15	0.48	3.12	—	—
<i>n</i> -Octanol	1.09	4.31	0.43	2.51	1.50	3.15	1.13	—
<i>n</i> -Dodecanol	4.70	—	1.08	—	4.72	—	3.51	3.11
Myristyl- alkohol	—	2.74	—	1.44	—	1.77	—	1.71
Cetylalkohol	12.86	—	1.55	1.52	8.33	1.65	6.00	1.64
Cholesterin	—	—	2.36	1.25	13.72	—	9.85	—
Cholesterin	29	—	2.95	—	—	—	—	—
Kapazität*) in mg	6.4		9.8		12.9		19.4	

*) bezogen auf Cetylster bei einem Volumenverhältnis von $V = 5/5$.

Die erforderliche hohe Zahl von Verteilungsschritten läßt sich mit einer vielstufigen Verteilungsbatterie oder – mit Mikromengen – durch Verteilungs-chromatographie erzielen.

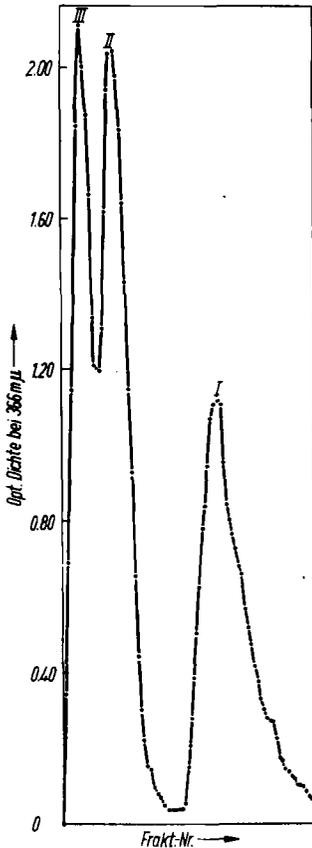


Abbild. 1. Trennung von je 50 mg 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-äthyl- ($K = 0.24$) und -*n*-hexylester ($K = 0.86$) in System c (Tafel 1). Volumenverhältnis $V = 3/3$, Methode der einphasigen Entnahme mit $n = 30$ Verteilungsschritten. Temperatur: 21° . (x-x-x) experimentelle Kurve, (o-o-o) nach l. c.¹⁰) berechnete Kurve

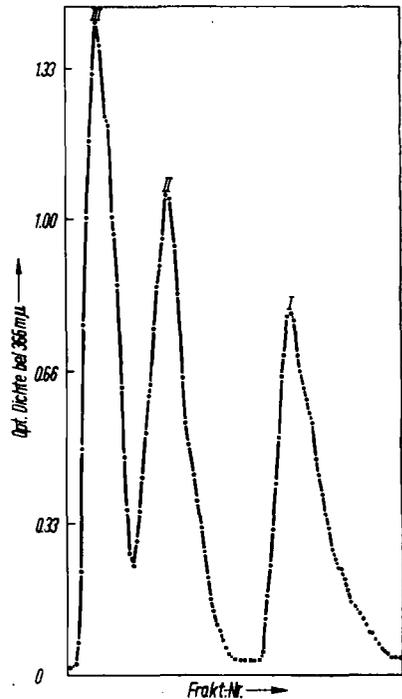
Verteilungschromatographische Trennung der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester

Als Trägermaterial wurde für die stationäre Phase bei allen Versuchen Kieselgur verwendet, die niedrigmolekulare Substanzen praktisch nicht adsorbiert. In einer ersten Versuchsreihe konnte deshalb von dem in Tafel 1 wiederergegebenen System a ausgegangen werden, dessen Trennwirkung mittels eines

Testgemisches aus Butyl-, Octyl- und Dodecylester untersucht wurde (Abbild. 2). Dasselbe Gemisch wurde unter vergleichbaren äußeren Bedingungen auch in den Systemen 2, 3 und 4 (Tafel 2) chromatographiert, wobei Cyclohexan stets als



Abbild. 2. Chromatographische Trennung eines Gemisches aus je 1 mg 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-*n*-butyl-(I), -*n*-octyl-(II) und -*n*-dodecylester (III) in System 1 (Tafel 2) auf einer Säule aus 20 g Kieselgur



Abbild. 3. Chromatographische Trennung eines Gemisches aus je 1 mg 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-*n*-butyl-(I), -*n*-octyl-(II) und -*n*-dodecylester (III) in System 4 (Tafel 2) auf einer Säule aus 20 g Kieselgur

mobile Phase diene. Der Trenneffekt nimmt mit steigendem Gehalt der stationären Phase an Dimethylformamid zu, jedoch konnten Octyl- und Dodecylester auch in System 4 nicht vollständig getrennt werden (Abbild. 3).

Für weitere Untersuchungen wurde die Zusammensetzung der mobilen Phase variiert und die stationäre Phase von System 4 beibehalten (Tafel 2, System 5 bis 10). Als Testgemisch für diese Systeme diene eine Mischung von Dodecyl- und Cholesterinester. Es zeigte sich, daß der Trenneffekt mit steigendem Molekulargewicht der mobilen Phase bis einschließlich Nonan (Sy-

Tafel 2. Lösungsmittelsysteme zur Verteilungschromatographie

System Nr.	Zusammensetzung*)
1	Cyclohexan(150)/Nitromethan(30)
2	Cyclohexan(150)/Nitromethan(32), Dimethylformamid(8)
3	Cyclohexan(150)/Nitromethan(20), Dimethylformamid(20)
4	Cyclohexan(150)/Nitromethan(10), Dimethylformamid(30)
5	Heptan(150)/Nitromethan(10), Dimethylformamid(30)
6	Octan(150)/Nitromethan(10), Dimethylformamid(30)
7	Nonan(150)/Nitromethan(10), Dimethylformamid(30)
8	Decan(150)/Nitromethan(10), Dimethylformamid(30)
9	Nonan(75), Paraffinöl(75)/Nitromethan(10), Dimethylformamid(30)
10	Paraffinöl(150)/Nitromethan(10), Dimethylformamid(30)
11	Paraffinöl(20)/Dimethylformamid(120), Nitromethan(40)
12	Nonan(30)/Nitromethan(120)

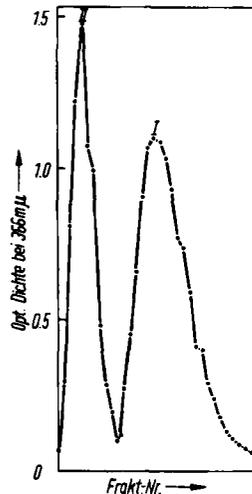
*) Die Zahlenangaben bedeuten „Volumina reiner Lösungsmittel“.

stem 7) zunimmt. Eine weitere Erhöhung des Molekulargewichts der mobilen Phase lieferte keine Steigerung des Trenneffektes mehr. Als Beispiel für diese Versuchsreihe ist in Abbild. 4 die Trennung des Testgemisches in System 7 wiedergegeben.

Bei den bisher beschriebenen Versuchen wurde stets die leichtere Phase des Lösungsmittelsystems als mobile Phase verwendet. Der Trenneffekt bei den Estern höherer Alkohole konnte weiter gesteigert werden, wenn die leichtere Phase durch Anwendung von hydrophobierter Kieselgur stationär gemacht wurde. In System 11 (Tafel 2) ließ sich das Testgemisch aus Dodecyl- und Cholesterinester durch Chromatographie mit umgekehrten Phasen quantitativ trennen.

Zur Gewinnung hydrophoben Trägermaterials wurde Kieselgur nacheinander mit Dämpfen von Dichlor-dimethylsilan und mit Wasser behandelt¹²⁾.

Wenn auf die Isolierung reiner Ester Wert gelegt wird, ist der Gehalt des Systems 11 an Paraffinöl von Nachteil. In weiteren Versuchen konnte schließlich das System 12 ermittelt werden, das nur aus flüchtigen Komponenten besteht und eine noch bessere Trennung des Testgemisches als System 11 liefert (Abbild. 5 s. S. 700).



Abbild. 4. Chromatographische Trennung eines Gemisches aus je 0.6 mg 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-*n*-dodecyl- (I) und -cholesterinester (II) in System 7 (Tafel 2) auf einer Säule aus 10 g Kieselgur

¹²⁾ G. A. Howard u. A. J. P. Martin, *Biochem. J.* **46**, 532 [1950].

Die gesammelten Erfahrungen ermöglichten erstmalig die Isolierung eines weitgehend einheitlichen, kristallisierten 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Sexuallockstoffes des Seidenspinners¹⁾.

Hrn. Prof. Butenandt danken wir herzlich für die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Zur Craig-Verteilung wird die bereit früher¹⁰⁾ beschriebene Verteilungsbatterie herangezogen. Die Verteilungskoeffizienten (Tafel 1) sind gravimetrisch bestimmt¹⁰⁾. Zur Messung der Kapazität eines Lösungsmittelsystems werden 30 mg des Cetylestere mit je 5 cm der Ober- und Unterphase 15 Min. geschüttelt und – nach Sedimentieren ungelösten Esters – aliquote Teile der beiden Phasen in einem gewogenen Kölbchen eingedampft¹⁰⁾. Aus dem Trockengewicht wird der Substanzgehalt des Lösungsmittelsystems für ein Volumenverhältnis von $V = \frac{5}{5}$ berechnet.

Die Säule für die Verteilungschromatographie bereiten wir in einer ca. 40 cm langen Glasröhre mit 2 bzw. 3 cm lichter Weite, die unten mit Glasfritte (G 1) und Hahn und oben mit einem Schliff versehen ist, der ein kugelförmiges Vorratsgefäß (Fassungsvermögen 250 bzw. 500 ccm) aufzustecken erlaubt. Die Säule mit 2 cm Durchmesser wird im folgenden als „kleine“, die mit 3 cm Durchmesser als „große“ Säule bezeichnet. Zum Stopfen der Kieselgur dient eine perforierte Platte aus V 2A-Stahl (Bohrungen 1 mm), die an einem Stahlstab hartverlötet ist und deren Durchmesser nicht wesentlich kleiner als der Durchmesser der jeweiligen Säule sein soll.

Trägermaterial und Lösungsmittel

Zur einfachen Verteilungschromatographie wird Kieselgur (Merck, DAB 6) gesiebt (Maschenweite 0.1 mm) und, wie unten beschrieben, mit stationärer Phase beladen.

Zur Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen wird silikonierte Kieselgur hergestellt. 250 g gesiebte Kieselgur werden bei 110° getrocknet und in einem Exsiccator 3 Tage über 40 ccm Dichlor-dimethylsilan bei 30° unter häufigem Durchmischen aufbewahrt. Danach wird mit 3 Portionen dest. Wasser behandelt und die auf der Wasseroberfläche schwimmende Substanz gesammelt, mit Methanol bis zur neutralen Reaktion gewaschen und bei 110° getrocknet.

Alle Lösungsmittel werden durch Destillation gereinigt.

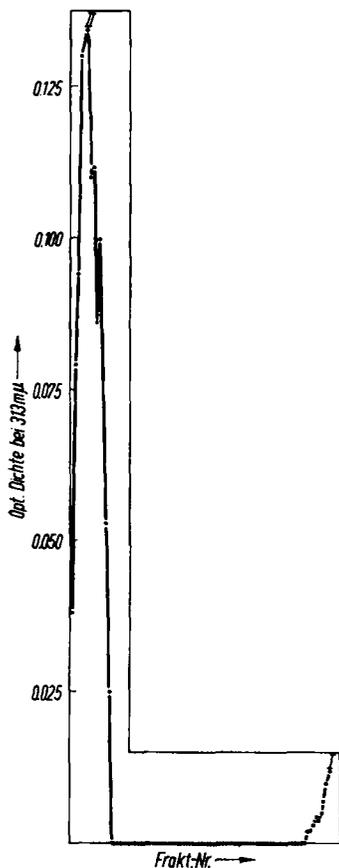


Abbildung 5. Chromatographische Trennung eines Gemisches aus je 0.4 mg 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-*n*-dodecylester (II) und -cholesterinester (I) in System 12 (Tafel 2) auf einer Säule aus 8 g silikonierter Kieselgur. Verteilungskurve I wurde nicht vollständig gemessen

Herstellung der Kieselgur-Säulen

Die begrenzt mischbaren Lösungsmittel werden durch kräftiges Schütteln bei Zimmertemperatur gegeneinander abgesättigt. Nach längerem Stehenlassen trennt man die beiden Phasen. Meist kommen 150 ccm der mobilen und 40 ccm der stationären Phase zur Anwendung.

Zur Füllung der kleinen Säule werden 10–20 g Kieselgur bzw. 8–10 g silikonierete Kieselgur mit dem gleichen Gewicht stationärer Phase gut vermischt und im verschlossenen Kolben 24 Stdn. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Für die große Säule wird die doppelte Menge Kieselgur bzw. silikonierete Kieselgur wie beschrieben präpariert. Das mit stationärer Phase gesättigte Trägermaterial wird in der mobilen Phase suspendiert, die Suspension in die Säule gegossen und dort durch rasches Auf- und Abbewegen des Stopfers homogenisiert. Dabei ist darauf zu achten, daß keine Luftblasen in die Suspension eingeschleppt werden. Nach dem Ablassen der mobilen Phase wird das Trägermaterial mit dem Stopfer in nicht zu kleinen Portionen festgepreßt. Wenn noch eine Flüssigkeitsschicht von ca. 1 mm über der Säule steht, ist sie betriebsfertig.

Ausführung einer chromatographischen Trennung

Das Estergemisch (0.5 bis 3 mg) wird, in 1–2 ccm der mobilen Phase gelöst, auf die Säule gebracht. Die Lösung soll weder übersättigt sein noch ungelöste Substanz enthalten. Man läßt einsickern, gibt noch 3 mal je 1 ccm der mobilen Phase nach und kann dann die gesamte mobile Phase auf die Säule geben. Da die Ester intensiv farbig sind, kann man die Auftrennung des Gemisches beobachten und auch *R*-Werte messen, wenn man eine Bezugssubstanz mitlaufen läßt. Die mobile Phase wird mit Hilfe eines Fraktionssammlers in 1-ccm-Fractionen aufgefangen und ihre optische Dichte – gegebenenfalls nach Verdünnung – im Elektrophotometer Eppendorf bestimmt.

Die eingesetzten Substanzmengen werden praktisch quantitativ von der Säule eluiert. Die beschriebenen Verteilungssäulen sind stabil und können jeweils für drei Trennungen benutzt werden. Das Retentionsvolumen für dieselbe Substanz wird bei jeder Wiederholung einer Trennung auf derselben Säule etwas kleiner.

103. Gábor Fodor und László Ötvös: Die Raumstruktur der Amino-desoxyzucker, II. Mitteil.: Die Konstellation des D-Glucosamins*]

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Szeged, Ungarn]

(Eingegangen am 29. Oktober 1955)

β -Äthyl-3.4.6-triacetyl-D-glucosaminid zeigte in verschiedenen (auch hydroxylfreien) Lösungsmitteln eine bedeutende Linksverschiebung der $[\alpha]_D$ -Werte. Auf Grund der Isolierung von β -Äthyl-N-acetyl-4.6-diacetyl-glucosaminid aus diesem Gemisch wurde der Vorgang als eine $O^3 \rightarrow N$ -Acylwanderung erkannt.

Die Lage der freigesetzten OH-Gruppe wurde gleichfalls experimentell bewiesen. Daraus folgt, daß C^3 -OAc und C^2 -NH₂, obwohl sie *trans*-ständig zueinander, – dennoch beide äquatorial gebunden sind, woraus zugleich auf die C1-Konstellation („conformation“) des ganzen Pyranosid-Ringes von Glucosaminiden geschlossen werden kann.

In früheren Arbeiten wurde die Stereospezifität der Acylwanderungen $N \rightarrow O$ erkannt und zum Konfigurationsbeweis von zahlreichen epimeren 1.2-

*) I. (vorläufige) Mitteil.: Acta chim. Acad. Sci. hung. 5, 205 [1954].