

Über Äther des Resazurins

Von

E. Ružička und J. Juřina

Aus dem Institut für organische, analytische und physikalische Chemie der
Palacký-Universität Olmütz (Olomouc, ČSSR)

(Eingegangen am 8. November 1965)

Die seit langem bekannten und in der Literatur als chemische Individuen betrachteten Äther des Resazurins haben sich als Gemische von Resazurin- und Resorufinäthern erwiesen. Mittels Chromatographie an Kieselgel oder Aluminiumoxid konnten die Äther des Resazurins in reinsten Form erhalten werden.

Ethers of resazurin described in the literature were found to be mixtures of resazurin ethers and resorufin ethers. Pure resazurin ethers could be isolated by means of chromatography on silica gel or aluminium oxide.

Kürzlich hat der eine von uns¹ gezeigt, daß Resazurinäther als Redox-Indikatoren angewendet werden können. Da wir bei der Reindarstellung dieser Farbstoffe zu einigen von den Literaturangaben abweichenden Resultaten gekommen sind, fühlen wir uns veranlaßt, über unsere Versuchsergebnisse kurz zu berichten.

Während dem Resazurin eine große Anzahl von Arbeiten gewidmet ist, werden seine Äther seit langem in der Literatur nicht erwähnt. *Nietzki* und Mitarb.² stellten durch Umsetzung des Silbersalzes des Resazurins mit Äthyljodid in Äthanol den Resazurinäthyläther dar; später zeigten *Meyer* und *Elbers*³, daß die Einwirkung von salpetrigsäurehaltiger Salpetersäure auf Resorcinmonomethyläther in Eisessig zum Resazurinmethyläther führt.

Obwohl wir die Versuchsbedingungen der genannten Autoren streng eingehalten haben, gelang es uns nicht, chromatographisch einheitliche Stoffe zu erhalten. Da stets Gemische von Resazurinäthern mit verhältnismäßig

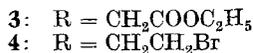
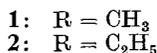
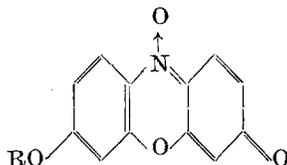
¹ *E. Ružička*, Coll. Czech. Chem. Commun. **29**, 2244 (1964).

² *R. Nietzki*, *A. Dietze* und *H. Mäckler*, Ber. dtsh. chem. Ges. **22**, 3020 (1889).

³ *K. H. Meyer* und *W. E. Elbers*, Ber. dtsh. chem. Ges. **54**, 337 (1921).

großem Gehalt an Resorufinäther erhalten wurden, sind wir zur Überzeugung gelangt, daß sowohl *Nietzki* als auch *Meyer* und *Elbers* unreine Produkte in Händen gehabt haben.

Wir versuchten Resazurin- und Resorufinäther durch Chromatographie an Kieselgel oder Aluminiumoxid voneinander zu trennen und nachstehende Resazurinäther 1—4 rein darzustellen.



Für die Alkylierung wurde zweckmäßig nicht vom reinen Resazurin, sondern von seinem Gemisch mit Resorufin ausgegangen, denn das infolge der leichten Zersetzung von Resazurinäthern entstandene Gemisch der beiden Äther mußte anschließend sowieso getrennt werden, gleichgültig, ob das Silber- oder Natriumsalz des Resazurins und Resorufins angewendet wurden, oder aber, ob mit einem Überschuß von Alkalicarbonat in wäßrig-alkohol. Lösung gearbeitet wurde. Es ist bemerkenswert, daß die Alkylierung in absol. Äthanol ziemlich langsam vor sich geht und zudem in geringer Menge eine neue, von Resazurin- und Resorufinäthern unterschiedliche, gelborange gefärbte Verbindung auftritt, die nicht näher untersucht wurde; erst nach Zugabe von Wasser oder bei Umsetzung in gewöhnlichem Äthanol findet die Alkylierung mit präparativ verwendbarer, wenn auch niedriger Ausbeute statt. Alle Versuche sie zu verbessern, blieben ohne Erfolg; Temperaturerhöhung und längere Reaktionsdauer hatte nur vermehrte Umsetzung von Resazurin- zu Resorufinäther zur Folge.

Resazurinmethyläther wurde ferner aus Resorcinmonomethyläther nach³ dargestellt. Auch hier gelang es nicht, reinen Resazurinmethyläther zu erhalten; das Gemisch der Äther mußte chromatographisch getrennt werden. Wurden Resorcinmonoäthyläther bzw. Resorcinmonoglykolsäure (3-Hydroxy-phenoxyessigsäure) dieser Reaktion unterzogen, lag im ersten Fall die Resazurinäthyläther-Ausbeute unter einem Prozent, und im zweiten trat nur sehr schwache Rotfärbung ein. Die Reaktion scheint demnach für die Darstellung anderer Stoffe dieser Reihe ohne präparative Bedeutung zu sein.

³ *H. Musso*, Chem. Ber. **92**, 2862 (1959).

Auch durch Einwirkung von ätherischer Diazomethanlösung läßt sich Resazurinmethyläther gut gewinnen, doch muß dabei großer Überschuß an Diazomethan vermieden werden, da sonst einerseits die Zersetzung von Resazurinmethyläther zum Resorufinmethyläther, andererseits die Bildung einer neuen, nicht näher untersuchten Verbindung, deren R_F -Wert zwischen den R_F -Werten der beiden Methyläther liegt, in Erscheinung treten. Die analoge Umsetzung von Resazurin mit Diazomessigester verläuft mit so geringer Geschwindigkeit, daß sie keine präparative Bedeutung besitzt.

Resazurinäther sind sowohl im festen Zustand, als auch in alkoholischen Lösungen gegen Wärme sehr empfindlich. Deswegen empfiehlt es sich nicht, sie aus Äthanol umzulösen oder lange bei höherer Temperatur zu trocknen. Deshalb gelang es auch nicht, den hochempfindlichen Resazurin- β -bromäthyläther zu isolieren. In unpolaren Lösungsmitteln sind diese Stoffe relativ beständig.

IR-Bestrahlung in alkohol. Lösung wandelt Resazurinäther im Laufe weniger Min. glatt und quantitativ in Resorufinäther um; dies tritt — in bedeutend kleinerem Umfang — auch am Tageslicht ein.

Schließlich wurde noch das nach *Nietzki* und Mitarb.² hergestellte Gemisch von Resazurin- und Resorufinacetat chromatographisch getrennt und Resazurinacetat isoliert.

Experimenteller Teil

Alle Schmelzpunkte wurden nach *Kofler* bestimmt und sind korrigiert. Die Absorptionsmaxima beziehen sich auf Feinsprit als Lösungsmittel und die Messungen erfolgten in einem Beckman-DU-Gerät. Der erste R_F -Wert der dünnschichtchromatographischen Angaben (DC) bezieht sich auf Kieselgel und Benzol—Aceton (3:1), der zweite auf Al_2O_3 und $CHCl_3$. Bei der Säulen- und Dünnschichtchromatographie wurde Silikagel CH(Lachema) und Aluminiumoxid Reanal (Akt. Stufe II, neutral) verwendet.

Resazurinmethyläther (1)

a) 50 mg des nach *Weselsky*⁵ hergestellten Gemisches von Resazurin und Resorufin wurden in 300 cm³ Äthanol unter gelindem Erwärmen gelöst; nach Abkühlung auf Zimmertemp. wurde mit einer aus 0,5 g Nitrosomethylharnstoff dargestellten äther. CH_2N_2 -Lösung portionsweise versetzt. Nach Aufhören der N_2 -Entwicklung (was nach einigen Min. der Fall war) konnten nur Spuren von Ausgangsstoffen chromatographisch festgestellt werden. Darauf destillierte man unter vermindertem Druck zuerst überschüss. CH_2N_2 und dann, bei höchstens 40° Badtemp., den Alkohol bis zur Trockne ab. Der rotbraune Rückstand wurde in Benzol—Aceton (3:1) gelöst und an Kieselgel, wie unter (b) beschrieben, chromatographiert.

b) Nach dem Verfahren von *Meyer* und *Elbers* (l. c.) wurde die Umsetzung mit 5 g Resorcinmonomethyläther durchgeführt. Dabei wurden 0,75 g braun-

⁵ *P. Weselski*, Ann. Chem. **162**, 273 (1872).

rotes, fein kristallinisches Pulver vom Schmp. 248—251° gewonnen, was mit den Literaturangaben³ in gutem Einklang steht. Dünnschichtchromatographisch war das Produkt jedoch nicht einheitlich und wurde deshalb der Säulenchromatographie an Kieselgel in Benzol—Aceton (3:1) unterworfen. Dabei erhielt man zwei Zonen: eine rascher wandernde gelborange Zone (Resorufinmethyläther) und eine tiefrote Zone, die dem Resazurinmethyläther entspricht. Um bei der Trennung befriedigende Ergebnisse zu erzielen, war es erforderlich, einen ziemlich großen Überschuß an Kieselgel zu verwenden. So konnten z. B. 20—30 mg des nach a) oder b) hergestellten Gemisches an 250—300 g Kieselgel verläßlich aufgetrennt werden. Statt Kieselgel kann auch Al₂O₃ (CHCl₃ als Lösungsmittel) verwendet werden. Die vereinigten roten Eluate mehrerer Ansätze wurden bei 40° Badtemp. im Vak. zur Trockne verdampft. Der Rückstand ergab nach Umkristallisieren aus Benzol—Petroläther rotbraune, verfilzte Nadeln. Zur Analyse wurde durch mehrtägiges Stehen im Vak. über P₂O₅ getrocknet; Schmp. 275—278° (u. Zers.) (Lit.³ 252°).

C₁₃H₉O₄N. Ber. C 64,20, H 3,73, N 5,76.

Gef. C 64,32, H 3,73, N 5,52.

Maxima: 204, 226, 494, 525, 560 (Schulter) m μ ;

ϵ = 31500, 36500, 15200, 16100, 9500.

DC: 0,44; 0,20.

Der Abdampfrückstand aus den gelborange Eluaten lieferte nach dem Umlösen aus Äthanol Resorufinmethyläther als feine orange Nadelchen, die, bei 110° getrocknet, den Schmp. von 253—254° besaßen.

C₁₃H₉O₃N. Ber. N 6,17. Gef. N 5,94.

Maxima: 225, 252, 280 (Schulter), 400 (Schulter), 465 m μ ;

ϵ = 24400, 14200, 6000, 10000, 22300.

DC: 0,62; 0,29.

Resazurinäthyläther (2)

2 g des Gemisches von Resazurin und Resorufin wurden in einer durch Auflösen von 0,3 g Na in 100 cm³ Äthanol bereiteten NaOC₂H₅-Lösung 15 Min. unter Rühren am Rückfluß gekocht. Danach wurde 2 Stdn. mit 2 cm³ C₂H₅J auf 60° erwärmt, das Reaktionsgemisch im Vak. zur Trockne eingedampft (Badtemp. < 50°) und der Rückstand mit Benzol (insgesamt etwa 300 cm³) portionsweise ausgezogen. Benzol wurde unter vermindertem Druck abgedampft, der Farbstoff in Benzol—Aceton (3:1) aufgenommen und wie oben der Chromatographie unterzogen. Die Eluate lieferten 110 mg dunkelrote, verfilzte Nadeln, die, aus Benzol—Petroläther umgelöst und über P₂O₅ im Vak. getrocknet, bei 258—259° (u. Zers.) schmolzen (Lit.² 215°).

C₁₄H₁₁O₄N. Ber. C 65,37, H 4,31, N 5,45.

Gef. C 64,80, H 4,25, N 5,53.

Maxima: 204, 226, 494, 525, 560 (Schulter) m μ ;

ϵ = 28400, 35700, 15900, 17000, 10100.

DC: 0,45, 0,11

Außerdem wurden 80 mg orangefarbene, kleine Nadeln von Resorufinäthyläther erhalten. Die aus Äthanol umkristallisierte und bei 110° getrocknete Substanz zeigte den Schmp. von 235—236°; Lit.² 225°.

$C_{14}H_{11}O_3N$. Ber. N 5,81. Gef. 5,57.

Maxima: 225, 252, 280 (Schulter), 400 (Schulter), 465 $m\mu$;

$\epsilon = 25\,500, 14\,000, 5\,800, 10\,200, 23\,500$.

DC: 0,64; 0,29.

Resazurincarbäthoxymethyläther (3)

Ähnlich wie für **2** angegeben, wurden 2 g des Gemisches von Resazurin und Resorufin mit 2,5 g Bromessigsäureäthylester umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt dabei 160 mg tiefrote, filzige Nadelchen; die aus Benzol—Petroläther umgelöste und mehrere Tage über P_2O_5 im Vak. getrocknete Substanz schmolz bei 193—196° (u. Zers.); sie ist bisher nicht beschrieben worden.

$C_{16}H_{13}O_6N$. Ber. C 60,95, H 4,16, N 4,44.

Gef. C 60,97, H 4,22, N 4,54.

Maxima: 202, 232, 493, 525, 560 (Schulter) $m\mu$;

$\epsilon = 19\,600, 28\,000, 14\,500, 14\,800, 8\,500$.

DC: 0,47; 0,13.

Der dem Stoff **3** analoge Resorufincarbäthoxymethyläther wurde nach Umlösen aus Äthanol und Trocknen bei 110° als orangefarbene Nadelchen (150 mg) vom Schmp. 171—173° erhalten; auch dieser Stoff ist bisher nicht beschrieben worden.

$C_{16}H_{13}O_5N$. Ber. C 64,20, H 4,38, N 4,68.

Gef. C 64,30, H 4,05, N 4,54.

Maxima: 223, 252, 279 (Schulter), 394 (Schulter) 463 $m\mu$;

$\epsilon = 23\,000, 13\,500, 4\,400, 10\,200, 20\,400$.

DC: 0,65; 0,24.

Resorufin- β -bromäthyläther: 0,5 g des Gemisches von Resazurin—Resorufin mit 2 cm^3 Äthylbromid wurden in üblicher Weise umgesetzt und aufgearbeitet. **4** konnte seiner Labilität wegen nicht gefaßt werden, es wurden nur 65 mg Resorufin- β -bromäthyläther (orangefarbene Nadeln, aus Äthanol) gewonnen. Beim Erhitzen vertiefte das Produkt allmählich seine Farbe und schmolz anschließend bei 223—226° (u. teilw. Zers.).

$C_{14}H_{10}O_3NBr$. Ber. C 52,53, H 3,15, N 4,38.

Gef. C 52,43, H 3,33, N 4,30.

Resazurinacetat: Das aus dem Gemisch von Resazurin und Resorufin nach Nietzki² hergestellte Produkt lieferte nach Chromatographie an einer Kieselsäule das gegen Wärme äußerst empfindliche Resazurinacetat vom Schmp.

219—222° (u. Zers.; Lit. 222°). Zur Analyse wurde es über P_2O_5 im Vak. getrocknet.

$C_{14}H_9O_5N$. Ber. C 62,00, H 3,35, N 5,16.
Gef. C 61,98, H 3,44, N 4,83.

Maxima: 204, 234, 488, 512, 560 (Schulter) $m\mu$;

$\epsilon = 21300, 27900, 11600, 10800, 5800$.

DC: 0,60; an Al_2O_3 tritt Verseifung ein.

Das entsprechende *Resorufinacetat*, Schmp. 225,5—227°, ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden (z. B. *Musso*⁴; Schmp. 223—226°).

DC: 0,73; an Al_2O_3 verseifte es sich.