



JUSTUS LIEBIGS
ANNALEN
DER CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON
HEINRICH WIELAND
ADOLF WINDAUS · RICHARD KUHN

BAND 563 · HEFT 3

VERLAG CHEMIE · GMBH · WEINHEIM/BERGSTR.

Liebigs Annalen der Chemie · Weinheim / Bergstr. 1949 · Band 563 · Heft 3 · Seiten 177 — 244

Inhalt

Hans Herloff Inhoffen, Georg Stoeck und Enno Lübeck, Totalsynthese des 1',6-Dimethyl-1,2-benzanthracens und des 1',5,6-Trimethyl-1,2-benzanthracens (mit 1 Figur im Text)	177
Heinz Gehlen, Über N β -Cyan-säurehydrazide und ihre Umwandlung in 1,2,4-Triazolone-3	185
Dietrich Jerchel und Hans Fischer, Diphenyl-substituierte Formazane und Tetrazoliumsalze (mit 1 Figur im Text)	200
Dietrich Jerchel und Hans Fischer, Über Diformazane und Ditetrazoliumsalze (mit 1 Figur im Text)	208
Feodor Lynen und Helmut Holzer, Über den aeroben Phosphatbedarf der Hefe. II. Die Umsetzung von Butylalkohol und Butyraldehyd (mit 9 Figuren im Text)	213
Hermann Engelhard, Heinz Schilfarth und Heinz-Günther Kaul, Die Oberflächenspannung aliphatischer Oxysäureester (mit 3 Figuren im Text)	239

Für die Herren Mitarbeiter zur Beachtung

Eine wissenschaftliche Zeitschrift kann bei gleichen Herstellungskosten ihren Lesern um so mehr bringen, je knapper die einzelnen Beiträge in der Abfassung gehalten sind. Kürze der Darstellung ist dem Verständnis förderlicher als ungenügende Weitschweifigkeit. Auf lange historische Einleitungen, wiederholte Beschreibung schon geschilderter Operationen, auf die liebevolle Charakterisierung an sich nebensächlicher Substanzen aus parallelen Reihen sollte verzichtet werden. Hier ist gedrängte Zusammenfassung im Lapidarstil am Platze.

Die Redaktion behält sich vor, Manuskripte, die den angedeuteten Grundsätzen entgegenlaufen, dem Autor zur Kürzung zurückzusenden.

Abhandlungen, deren Inhalt, wenn auch nur teilweise, schon an anderer Stelle veröffentlicht worden ist oder veröffentlicht werden soll, werden nicht aufgenommen.

Es wird besonders gebeten, die Korrekturen rasch zu erledigen. Nur dann ist das schnelle Erscheinen der Abhandlungen gewährleistet. Verzögerte Korrekturen führen zur Zurückstellung des betr. Beitrages.

Zusammengesetzte Namen sollen der Übersichtlichkeit wegen schon im Manuskript unter Anwendung von Trennungsstrichen wiedergegeben werden, z. B. Methyl-naphthyl-keton, nicht „Methylnaphthylketon“.

Formeln, die wiederkehren, werden zweckmäßig mit römischen Ziffern numeriert, die einen einfachen Hinweis gestatten.

Bei der Wiedergabe der Analysen ist im allgemeinen von der Ausführung der Belegzahlen Abstand zu nehmen.

Zitate von Zeitschriften werden nach dem jetzt allgemein eingeführten Brauch abgekürzt.

Die Redaktion

Liebigs Annalen erscheinen in Bänden zu je drei Heften. Die Redaktion besorgt Prof. Heinrich Wieland, (13b) Starnberg, Obb., Schießstättstraße 12.

50 Sonderabzüge werden den Verfassern kostenlos geliefert.

Abonnementspreis je Band 15,— DM zuzügl. Versandkosten.

Copyright 1949 by Verlag Chemie, GmbH. (Geschäftsführer: Eduard Kreuzhage), Weinheim/Bergstr.—Printed in Germany.—Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung, vorbehalten.

Ausgegeben am 15. Juni 1949.

JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE

563. Band

Totalsynthese des 1',6-Dimethyl-1,2-benzanthracens und des 1',5,6-Trimethyl-1,2-benzanthracens

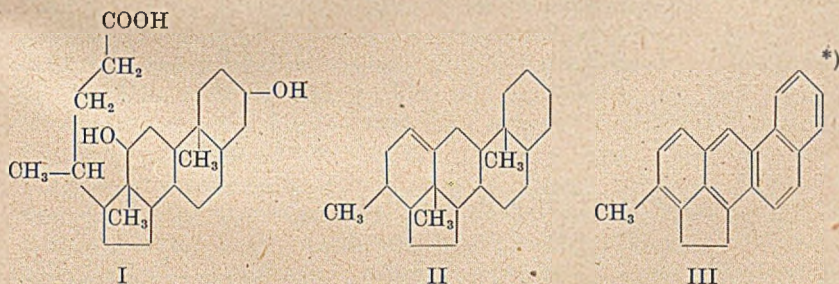
Von *Hans Herloff Inhoffen, Georg Stoeck und Enno Lübcke.*

(Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Hochschule Braunschweig)

(Mit 1 Figur im Text)

(Eingegangen am 31. Januar 1949)

Die Überführung der Desoxycholsäure (I) über das Dehydronorcholen (II) in das hochcancerogene Methylcholanthren (III)¹⁾ hat den Gedanken nahegelegt, daß unter Umständen auch im menschlichen und tierischen Organismus krebserregende Stoffe (z. B. III) aus Sterinen und Gallensäuren entstehen könnten. Nachdem es gelungen ist, auch Cholsäure und besonders Cholesterin in Methylcholanthren überzuführen²⁾, ist anzunehmen, daß aus allen Steroiden mit einer entsprechenden aliphatischen Seitenkette am C-Atom 17 Methylcholanthren unter bestimmten energischen Dehydrierungsbedingungen erhalten werden kann. Hinsichtlich



der Vermutung eines ähnlichen Dehydrierungsverlaufes in der menschlichen und tierischen Zelle müßte man annehmen, daß der Organismus

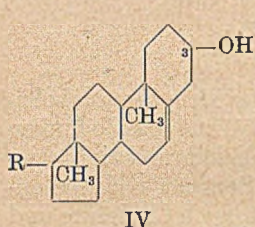
¹⁾ H. Wieland und E. Dane, H. 219, 243 (1933).

²⁾ Zusammenfassung: J. W. Cook, *Chemistry and Cancer*, London (1943).

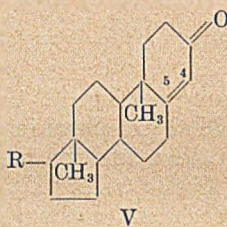
*) Abweichend von der üblichen Schreibweise für Steroide wurde die obige verwendet, um die konstitutionelle Beziehung der fünfkernigen Verbindungen zum Benzanthracen augenfällig zu machen.

unter bestimmten Bedingungen imstande ist, Dehydrierungen durchzuführen. Dem entgegen stehen die extremen Reaktionsbedingungen, die zur Bildung des Methylcholanthrens *in vitro* notwendig sind, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit der Verlauf *in vivo* ein anderer sein müßte.

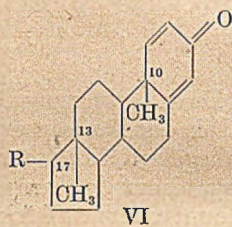
Einer der Gründe für die große Stabilität des hydroaromatischen Steroidskelettes und damit für die extremen Bedingungen einer Aromatisierung sind ohne Zweifel die beiden angulären Methylgruppen an den C-Atomen 10 und 13. Nachdem nun bei dem im Ring A zweifach ungesättigten Sterinketon (VI) der Ring A durch *Methylwanderung* unter wesentlich milderen Bedingungen aromatisiert werden konnte (VII³), wäre zu diskutieren, ob nicht die Einleitung für eine totale Dehydrierung des Steroidskelettes *in vivo* durch eine solche Aromatisierung des Ringes A, nämlich unter Methylwanderung, gegeben sein könnte. Ein möglicher Weg wäre dann der folgende:



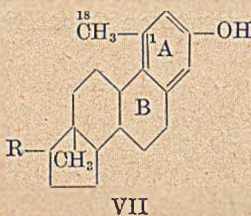
Cholesterin



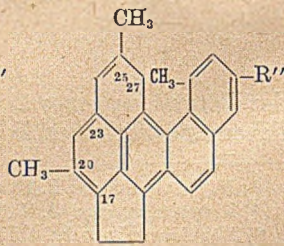
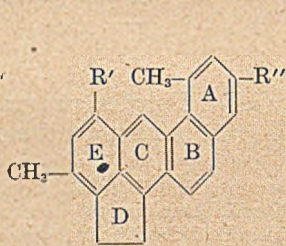
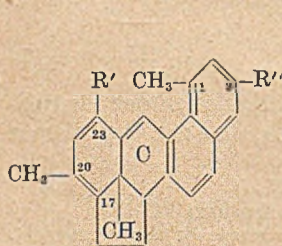
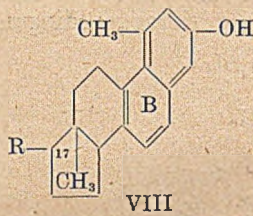
Cholestenon

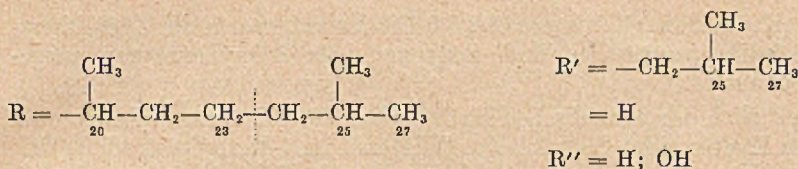


Cholestadienon



Sterinphenol





Aus dem Sterin IV mit der Seitenkette R könnte über das Keton V durch partielle Dehydrierung das 3-Keto-dien VI und hieraus unter Wanderung der C₁₀-Methylgruppe an das C-Atom 1 das bereits bekannte Sterinphenol³⁾ mit aromatischem Ring A entstehen, VII. Während die Annahme einer Umwandlung des einfach ungesättigten Ketons V in das zweifach ungesättigte Keton VI nicht zellunmöglich erscheint, liegen hinsichtlich einer Aromatisierung durch Methylgruppen-Wanderung VI → VII noch keine diesbezüglichen Erfahrungen vor. Nach dieser „einleitenden Aromatisierung“ stünde einer völligen Dehydrierung des Ringes B nichts mehr im Wege, VII → VIII. Ein anschließender Ringschluß und weitere Dehydrierung ergäbe dann einen Stoff IX, für dessen restlose Aromatisierung zum Dimethylcholanthren X noch die Eliminierung der angulären Methylgruppe an C₁₃ notwendig wäre. Die Fragen, ob ein Körper mit der Konstitution IX schon selbst krebserregende Eigenschaften besitzt und ob er unter bestimmten physiologischen Bedingungen in der Zelle in das Dimethylcholanthren umgewandelt werden kann, harren noch der Beantwortung. Ein nochmaliger Ringschluß vermittelt der restlichen C₄-Seitenkette R', wie ihn W. Bergmann diskutiert hat⁴⁾, würde zu einem theoretisch möglichen Endprodukt der Sterin-dehydrierung, zum Trimethylsteranthren (XI) führen.

In dem obigen Reaktionsschema muß die Umwandlung IV → V als physiologisch möglich angesehen werden, nachdem Cholestenon als Produkt des Cholesterin-Stoffwechsels gefaßt werden konnte⁵⁾. Desgleichen ist die Dehydrierung VII → VIII als zellmöglich anzusprechen im Hinblick auf den Befund, daß vom Pferd neben Oestron auch Equilin und Equilenin ausgeschieden werden⁶⁾.

In dem vorstehenden hypothetischen Reaktionsschema IV → X sind die beiden Grundgedanken die „einleitende Aromatisierung“ des Ringes A unter Methylwanderung und die schon mehrfach diskutierte vollständige Dehydrierung nebst Ringschluß. Ob die Eliminierung der phenolischen OH-Gruppe an 3 zellmöglich ist, scheint fraglich, nachdem Boyland und Shoppee⁷⁾ gefunden haben, daß an Ratten

³⁾ Zusammenfassung: H. H. Inhoffen, *Ang. Chem.* **53**, 473 (1940), **59**, 207 (1947).

⁴⁾ W. Bergmann, *Z. Krebsforsch.* **48**, 546 (1939).

⁵⁾ R. Schoenheimer und D. Rittenberg, *Science*, New York (N. S.) **82**, 156 (1935).

⁶⁾ A. Girard, G. Sandulesco, A. Fridenson und J. J. Rutgers, *C. R.* **195**, 981 (1932).

⁷⁾ *Chem. Soc.* 801 (1947).

und Kaninchen gefüttertes 1,2,5,6-Dibenz-anthracen als 4',8'-Dioxy-1,2,5,6-dibenz-anthracen und Benzpyren als 8-Oxybenzpyren ausgetrennt wird.

Bezüglich der phenolischen Hydroxylgruppe sei daran erinnert, daß dieses Hydroxyl im Sterinphenol (VII) und im 1-Methyl-östradiol (VII, R = OH) in eigenartiger und bislang unerklärlicher Weise von der m-ständigen Methylgruppe beeinflusst wird: beide Phenole sind alkalilöslich und wurden daher als Kryptophenole angesprochen. Darüber hinaus hat das Östradiol-molekül durch den Eintritt des Methyls in m-Stellung zur Hydroxylgruppe seine östrogene Wirksamkeit völlig eingebüßt. Es erhebt sich somit die weitere Frage, ob etwa ein spezieller Einfluß gerade dieser Methylgruppe dahingehend möglich ist, daß neben einem Kohlenwasserstoff X auch das entsprechende Phenol (R'' = OH) cancerogene Eigenschaften aufweist.

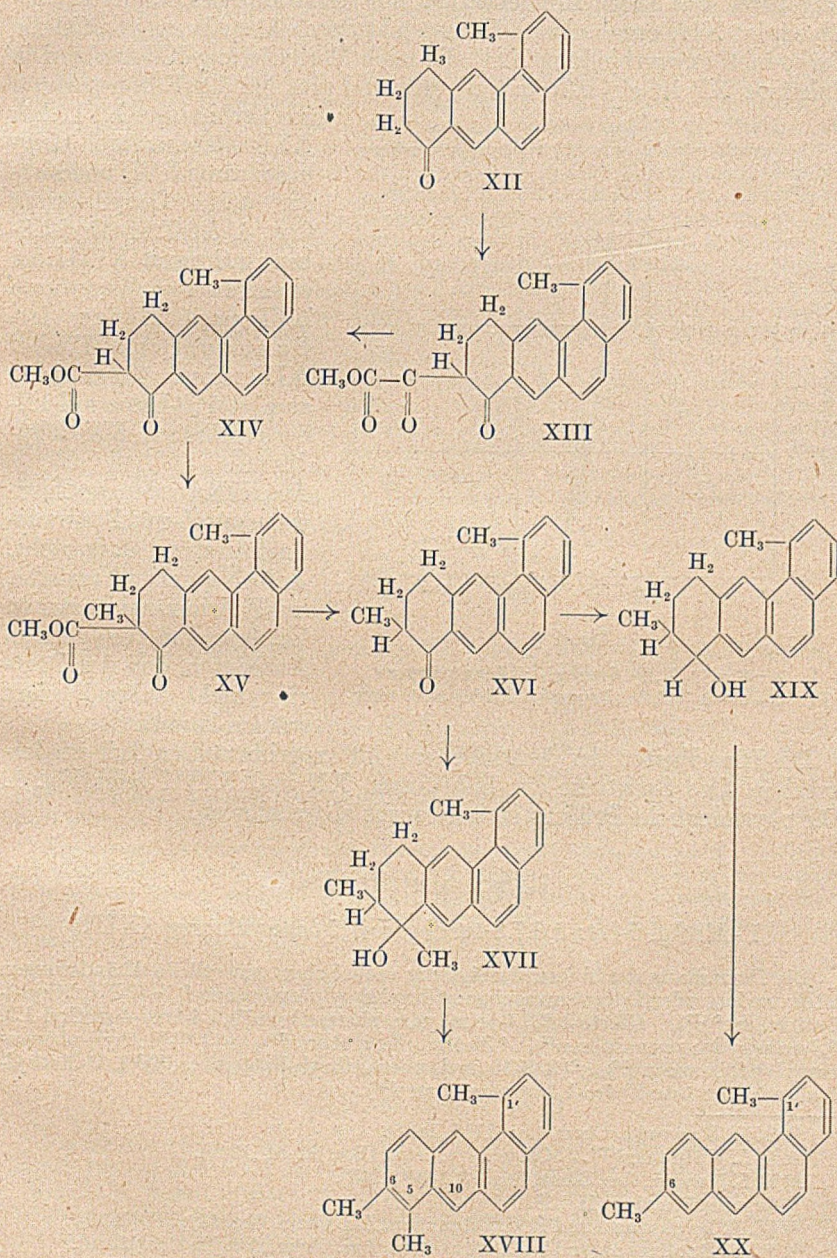
Wir haben für die diskutierten Reaktionen das Cholesterin herangezogen, da es im Organismus erheblich weiter verbreitet ist als die Gallensäuren. Während aus Gallensäuren nach obigem Schema ein Dimethyl-cholanthren (X, R' = H) entstehen sollte, müßte man beim Cholesterin, infolge seiner längeren Seitenkette, am C-Atom 23 des Cholanthrenmoleküls einen Isobutylrest erwarten. Nur ganz energische bzw. besondere Reaktionsbedingungen können eine Abspaltung dieser C₄H₉-Gruppe verständlich erscheinen lassen. Somit ergibt sich hier eine letzte Frage, ob die Grundgerüste IX und X auch dann noch cancerogen sind, wenn sie außer durch die beiden Methylgruppen an 1 und 20 auch noch durch Hydroxyl an 3 und Isobutyl an 23 substituiert sind.

Wir haben nun versucht, das Dimethylcholanthren X aus Gallensäuren darzustellen sowie auch synthetisch aufzubauen; beide Versuche haben noch nicht zum Ziel geführt: Die Synthese konnte nicht restlos zum Abschluß gebracht werden, da die Anfügung des Fünfringes an die Verbindung XIX bisher nur mit sehr schlechten Ausbeuten verläuft.

Auf dem Wege zum obigen Dimethylcholanthren konnten jedoch gleichzeitig das 1',6-Dimethyl-1,2-benzanthracen (XX) und das 1',5,6-Trimethyl-1,2-benzanthracen (XVIII) dargestellt werden. Sie interessieren als bisher unbekannt substituierte Benzanthracene, deren cancerogene Wirkung spezifisch von den Substituenten abhängt. Das Trimethyl-benzanthracen kommt gleichzeitig dem gesuchten Dimethylcholanthren nahe, nachdem Fieser und Newman gefunden haben, daß nicht der geschlossene Fünfring für die krebserregende Wirksamkeit notwendig ist, sondern nur eine Substitution an den C-Atomen 5 und 10⁸).

⁸) Amer. chem. Soc. 38, 2376 (1936).

Die Synthese wurde wie folgt durchgeführt:



Vom Naphthalin ausgehend wurde über 7 Zwischenstufen das Keton XII aufgebaut, das nach Kondensation mit Oxalsäure-dimethylester das Glyoxalat XIII ergab. Aus XIII entsteht durch Abspaltung von CO die Carbo-methoxyverbindung XIV, die nach Methylierung XV ergibt. Die Substanz XV ist ein β -Ketonsäureester und gibt bei der Ketonspaltung

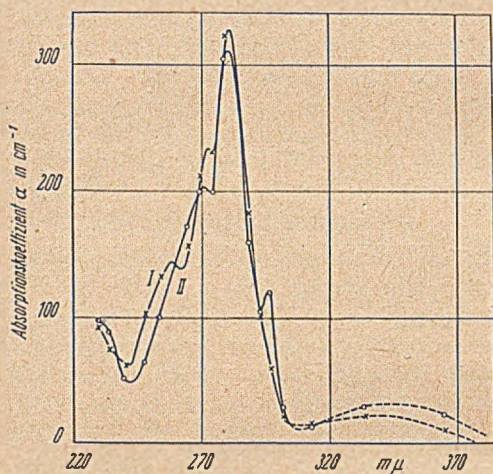


Fig. 1

- I $\times - \times - \times$ 1',6-Dimethyl-1,2-benzanthracen
 II $\circ - \circ - \circ$ 1',5,6-Trimethyl-1,2-benzanthracen

Die Einzelheiten der Synthese sind im experimentellen Teil wiedergegeben. Das Spektrum der Substanzen XX und XVIII zeigt Fig. 1. Die physiologische Prüfung ist noch nicht abgeschlossen.

Experimenteller Teil

1'-Methyl-5-keto-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-benzanthracen (XII)

Die Darstellung der obigen Verbindung verlief ohne wesentliche Abänderungen nach den folgenden Literaturangaben: β -Naphthoylpropionsäure⁹, γ -(2-Naphthyl)-buttersäure^{10,11}, 4-Keto-1,2,3,4-tetrahydro-phenanthren¹², 4-Oxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-phenanthren¹³, 4-Methyl-phenanthren¹³, β -(3-(5-Methyl)-phenanthroyl)-propionsäure¹⁴, γ -(3-(5-Methyl)-phenanthryl)-buttersäure^{10,11}, 1'-Methyl-5-keto-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-benzanthracen¹⁴.

⁹ R. D. Haworth, Chem. Soc. 1125 (1932).

¹⁰ A. L. Wilds und W. J. Close, Am. Chem. Soc. 68, 84 (1946).

¹¹ E. L. Martin, Am. Chem. Soc. 58, 1438 (1936).

¹² Organic Reactions II, 138.

¹³ W. E. Bachmann und R. C. Edgerton, Am. Chem. Soc. 62, 2220 (1940).

¹⁴ W. E. Bachmann und R. C. Edgerton, Am. Chem. Soc. 62, 2552 (1940).

Kondensation mit Oxalester (XIII)

400 mg von den Krusten befreites Natrium wurden in 40 cem abs. Methanol unter abs. Feuchtigkeitsausschluß in Lösung gebracht und dann das überschüssige Methanol i. V. auf dem Wasserbad restlos entfernt. Nach dem Abkühlen wurden 2,2 g sorgfältig getrockneten Oxalsäure-dimethylesters hinzugefügt. Der Reaktionskolben wurde dann mit Gaseinleitungsrohr, Tropftrichter und Rückflußkühler mit Calciumchloridrohr versehen, evakuiert und mit gut getrocknetem Stickstoff gefüllt. Die gesamte Reaktion wurde unter Stickstoff ausgeführt. Im Reaktionskolben wurde Natriummethylat und Oxalester unter schwachem Erwärmen in Lösung gebracht, wobei Verfärbung nach gelb-orange eintrat. Nach dem Abkühlen wurden 2 g der Substanz XII in 25 cem abs. Benzol gelöst zutropft. Es trat momentan die Abscheidung des Natriumsalzes des Glyoxalats ein. Die Lösung wurde 10 Minuten geschüttelt und blieb dann noch 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wurde durch Zutropfen von Wasser unter Eiskühlung zersetzt, in 300 cem Benzol aufgenommen und mit 160 cem 2proz. Natronlauge ausgeschüttelt. Aus der Benzollösung wurden 25 mg des Ausgangsmaterials zurückgewonnen, die durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt identifiziert wurden.

Die schwach trübe Lösung des Natriumsalzes des Glyoxalats wurde filtriert, mit überschüssiger verd. Salzsäure das Glyoxalat in Freiheit gesetzt und in Benzol-Äther aufgenommen. Nach dem Trocknen der neutral gewaschenen Benzol-Ätherlösung und Eindunsten hinterblieb ein dunkelgefärbtes Öl. Es wurde kurz mit Aktivkohle in Aceton gekocht, mit Methanol versetzt und konzentriert. Es wurden 2,2 g, d. s. 81% d. Th. vom Smp. 134—135° erhalten. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Methanol war der Smp. 135,5—136,5°.

$C_{22}H_{18}O_4$ Ber. C 76,30 H 5,22
Gef. „ 76,45 „ 5,17

1'-Methyl-5-keto-6-carbomethoxy-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-benzanthracen
(XIV)

2 g der Verbindung XIII wurden mit der mehrfachen Menge Glaspulver (geseibt, Maschenweite 0,15 mm²) im Mörser gut zermahlen und in einem kleinen Kolben mit Steigrohr unter Stickstoff erhitzt. Die bräunliche Schmelze zeigte ab 160° unter Aufschäumen eine lebhaft CO-Entwicklung. Die Gasentwicklung war nach wenigen Minuten abgeklungen. Insgesamt wurde 18 Minuten auf 185° erhitzt.

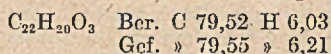
Nach dem Abkühlen wurde mit Aceton extrahiert und die dunkelbraune Lösung mit Aktivkohle aufgeköcht. Auf Zusatz von Methanol fiel die sehr schwer lösliche Substanz in feinen, schwach gefärbten, sternchenförmigen Kristallen vom Smp. 138—139° aus. Die Ausbeute betrug 1,60 g, d. s. 88% d. Th. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Aceton-Methanol war der Smp. 148,5°.

$C_{21}H_{18}O_3$ Ber. C 79,26 H 5,66
Gef. » 79,12 » 5,84

1'-Methyl-5-keto-6-methyl-6-carbomethoxy-5,6,7,8-tetrahydro-
1,2-benzanthracen (XV)

500 mg Natrium wurden in 12 cem abs. Methanol gelöst und zu der abgekühlten klaren Lösung eine durch Erwärmen bereitete Lösung von 1 g Substanz XIV in 5,5 cem abs. Benzol in einem Schuß zugesetzt. Es ist nötig, nur eine kleine Menge Benzol zu nehmen, da sonst die Reaktionszeit um ein Vielfaches verlängert wird. Bei den obigen Konzentrationen fällt sofort die Natriumverbindung als feinkristal-

liner, hellgelber Niederschlag aus. In den Kolben werden dann 3 cem Methyljodid eingebracht und an einem gut wirkenden Rückflußkühler so erhitzt, daß das Methyljodid wohl siedet, sich aber nicht zum größten Teil im Kühler befindet. Unter diesen Bedingungen ist die Reaktion in 10—20 Minuten beendet. Die hellbraune Lösung wurde dann noch 30 Minuten auf dem Wasserbad gekocht, abgekühlt, mit wenigen Tropfen Eisessig neutralisiert und etwas konzentriert. Es wurde dann in Benzol-Wasser aufgenommen und die wäßrige Lösung noch zweimal ausgeäthert. Die vereinigten organischen Lösungen wurden zweimal mit 2proz. Natronlauge und zweimal mit Wasser gewaschen und dann getrocknet. Nach dem Eindunsten hinterblieben 0,972 g hellgrüner Nadeln vom Smp. 154—155°, d. s. 93% d. Th. Nach dem Umkristallisieren aus Aceton-Methanol war der Smp. 157—158°.

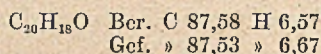


1'-Methyl-5-keto-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-benzanthracen (XVI)

Die Spaltung der Substanz XV zu XVI wurde sauer und alkalisch durchgeführt.

200 mg Substanz XV wurden mit 3 cem 45proz. Kalilauge und 10 cem Methanol 2 Stunden auf dem Wasserbad am Rückflußkühler gekocht. Dann wurde abgekühlt und mit Wasser verdünnt. Der schlecht filtrierbare, rötliche Niederschlag betrug 120 mg, d. s. 67% d. Th. Der Smp. war 146°, nach dem Umkristallisieren aus Methanol lag er bei 148°.

Zur sauren Spaltung wurden 1 g der Substanz XV mit 7,5 cem Eisessig und 2 cem conc. Salzsäure 4 Stunden am Rückflußkühler im Ölbad gekocht. Nach dem Abkühlen kristallisierte aus der violetten Lösung die Substanz XVI in langen Spießen mit einer Ausbeute von 98% d. Th. Mit wenig Aktivkohle in Aceton gekocht und mit Methanol versetzt wurden 0,796 g, d. s. 96% d. Th., vom Smp. 148—148,5° erhalten.

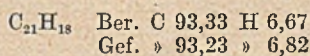


1'-Methyl-5-oxy-5,6-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-benzanthracen (XVII)

Aus 100 mg Magnesiumspänen und 0,24 cem Methyljodid wurde in 3 cem Äther eine Grignardlösung bereitet und bei 0° eine Auflösung von 100 mg der Substanz XVI in 3 cem Benzol langsam eingetropft. Die Lösung blieb 1 Stunde bei 0° und 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Die Zersetzung erfolgte mit fast gesättigter Ammoniumchloridlösung bei 0°. Die Äther-Benzollösung wurde mit wenig Wasser, sehr verdünnter Ammoniaklösung und wieder Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen und Abdestillieren hinterblieben 102 mg eines hellgelben Öles, d. s. 95% d. Th.

1',5,6-Trimethyl-1,2-benzanthracen (XVIII)

102 mg der Substanz XVII wurden mit 50 mg Palladiumkohle fein gemischt und 30 Minuten unter Stickstoff auf 310—320° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde mit viel Benzol extrahiert, mit wenig Aktivkohle entfärbt und das Benzol abgedunstet, wobei die Substanz sofort auskristallisierte. Die Ausbeute betrug 65 mg, d. s. 74% d. Th. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Methanol wurden fast farblose Nadeln vom Smp. 137—137,5° erhalten.



1'-Methyl-5-oxy-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-benzanthracen (XIX)

1 g der Substanz XVI wurde mit 32 cem einer 1-molaren Lösung von Aluminiumisopropylat in Isopropanol versetzt. Unter Benutzung eines Spezialkühlers wurden in 1,5 Stunden 22 cem Destillat erhalten. Der Aceton-Nachweis mit Dinitrophenylhydrazin war nach den ersten 8—9 cem bereits negativ. Auch wenn 15 Minuten unter Rückfluß gekocht wurde, zeigten die ersten destillierten Tropfen kein Aceton. Die Reaktionslösung wurde in 250 cem auf 0° gekühltes Wasser und 10 cem conc. Schwefelsäure eingegossen und ausgeäthert. Die Ätherlösung wurde mit Wasser, verd. Ammoniak und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurde der Äther verjagt und der Rückstand in Aceton aufgenommen und mit Petroläther versetzt. Nach Stehen im Eisschrank fielen sehr feine, grünstichige Nadeln vom Smp. 121 bis 122° (Sintern ab 107°). Die Auswaage betrug 0,920 g, entsprechend 92% d.Th. Durch Umkristallisieren konnte der Schmelzpunkt nicht geändert werden.

1',6-Dimethyl-1,2-benzanthracen (XX)

400 mg Substanz XIX wurden mit 200 mg Palladiumkohle fein gemischt und unter Stickstoff am Steigrohr 30 Minuten auf 310—320° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit viel Benzol extrahiert und mit wenig Aktivkohle entfärbt. Nach dem Eindunsten hinterblieb ein farbloses Öl, das nach Aufnehmen in Aceton und Versetzen mit Methanol 0,268 g feine farblose Nadeln ergab, d. s. 72% d. Th. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Methanol war der Smp. 114—114,5°.

$C_{20}H_{16}$ Ber. C 93,75 H 6,25
Gef. » 93,75 » 6,34

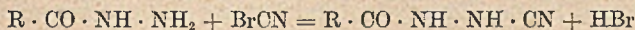
Über N^β-Cyan-säurehydrazide und ihre Umwandlung in 1,2,4-Triazolone-3

Von *Heinz Gehlen*

(Aus dem Institut für organische Chemie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität,
Frankfurt/Main)

(Eingegangen am 5. Februar 1949)

Die bisher nicht beschriebenen, am endständigen Stickstoffatom cyanierten Säurehydrazide der allgemeinen Formel $R \cdot CO \cdot NH \cdot NH \cdot CN$ lassen sich in glatter Reaktion durch Einwirkung von Bromcyan auf Säurehydrazide in wäßriger Lösung gemäß der Gleichung



gewinnen, wobei der freiwerdende Bromwasserstoff durch Hydrogencarbonat gebunden werden kann.

Die N^{β} -Cyan-säurehydrazide sind farblose, gut kristallisierende Verbindungen, die sehr leicht sublimieren und unterhalb ihres Schmelzpunktes beständig sind, aber wenige Grade darüber sich langsam zersetzen. Obwohl ihre wäßrige Lösung neutral reagiert, handelt es sich bei den N^{β} -Cyan-säurehydraziden um Verbindungen von deutlich alkalischem Charakter, denn sie bilden mit Mineralsäuren ausgezeichnet kristallisierende Additionsverbindungen, die in saurer Lösung sehr beständig sind, durch reines Wasser aber fast momentan unter Abspaltung der Säure und Rückbildung des Cyan-hydrazids zersetzt werden.

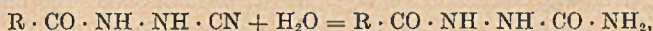
Die Cyan-hydrazide zeigen aber auch saure Eigenschaften, indem sie mit ammoniakalischer Silbernitrat-lösung Silber-salze bilden, in denen ein H-Atom durch Silber ersetzt ist. In neutraler oder schwach salpetersaurer Lösung werden durch Silbernitrat Additionsverbindungen gefällt, in denen auf 1 Mol des Cyan-hydrazids 1 Mol Silbernitrat kommt. Dementsprechend nehmen die zweifach cyanierten Hydrazide der Dicarbonsäuren 2 Mol Silbernitrat pro Mol Dicyan-dihydrazid auf. Jedoch ist hier das eine Mol Silbernitrat wesentlich schwächer gebunden als das andere. Denn beim Umkristallisieren der Di-Silbernitratverbindungen aus siedendem Wasser wird 1 Mol Silbernitrat abgespalten. Mit ammoniakalischer Kupfersulfatlösung entstehen blaugrüne Kupfersalze. Bei der Darstellung der Silber- und Kupfersalze gelang es stets, nur ein Wasserstoffatom der beiden NH-Gruppen durch das Metall zu ersetzen, und es ist sehr wahrscheinlich, in Analogie zu dem Salzbildungsvermögen des Cyan-amids, daß es das Wasserstoff-atom der Cyan-amid-gruppe $NH \cdot CN$ ist, das durch das Metall substituiert wird. Nun gelingt es aber auch, die Cyan-hydrazide zu acetylieren und zu benzoylieren, wobei stets nur ein Acyl-rest pro Mol Cyanhydrazid eingeführt werden kann. Dabei ist sehr bemerkenswert, daß die Acylverbindungen ebenfalls mit ammoniakalischer Silbernitratlösung farblose, amorphe Fällungen geben, die pro Mol Acyl-cyan-hydrazid ein Atom Silber enthalten, so daß man den Eindruck gewinnt, daß bei der Acylierung ein anderes Wasserstoff-atom in Reaktion tritt als bei der Salzbildung der nicht acylierten Cyan-hydrazide. Man wird demnach wohl annehmen können, daß die Acylierung an der Carbonamid-gruppe angreift und demnach den Acylverbindungen die allgemeine Formel $R \cdot CO \cdot N \cdot NH \cdot CN$ zukommt.



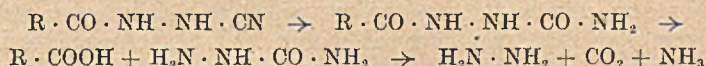
Auch die Acyl-cyan-säurehydrazide bilden mit Mineralsäuren gut kristallisierte Säureadditionsverbindungen. Dabei ist auffällig, daß bei ihrem Zerfall in Cyan-hydrazid und Säure durch Einwirkung von Wasser im Falle der Acetylverbindung gleichzeitig die Acylgruppe abgespalten wird, während bei der Benzoylverbindung eine analoge Verseifung nicht eintritt.

Von dem chemischen Verhalten der Cyanhydrazide werden in der vorliegenden Arbeit insbesondere die saure und alkalische Hydrolyse unter-

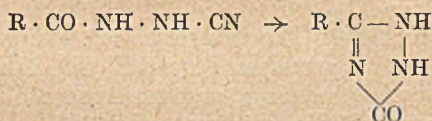
sucht. Die Erwartung, daß beim Erhitzen mit Säuren in erster Reaktionsphase isolierbare Carbonamide entstehen gemäß der Gleichung



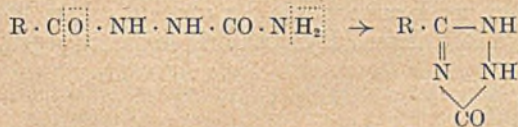
wie das bei den Nitrilen bzw. dem Cyanamid so leicht geschieht, hat sich nicht erfüllt. Zunächst erweisen sich die Cyanhydrazide dem Angriff von Säuren gegenüber verhältnismäßig stabil. Selbst nach mehrstündigem Erhitzen mit conc. Schwefelsäure auf 120° lassen sich in dem Reaktionsgemisch noch merkliche Mengen des unveränderten Cyan-hydrazids nachweisen, während andererseits bei dem angegriffenen Anteil die Hydrolyse gleich weiter bis zur vollständigen Aufspaltung in Carbonsäure, Hydrazin, Kohlensäure und Ammoniak geht. Die saure Hydrolyse der N-Cyan-säurehydrazide, die wohl über die acylierten Semicarbazine verläuft, läßt sich wie folgt formulieren:



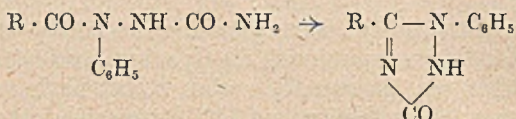
Auch die alkalische Hydrolyse der Cyanhydrazide nimmt zum Teil den oben angegebenen Verlauf, jedoch tritt hierbei in mehr oder minder großem Umfange, je nach der Natur des Restes R, eine ganz andere Reaktion in den Vordergrund, die zu einem am Kohlenstoffatom 5 substituierten 1,2,4-Triazolone-3 führt und im Endeffekt auf eine Cyclisierung des Cyanhydrazids hinausläuft nach:



Kocht man z. B. das N-Cyan-phenyl-propionsäure-hydrazid $\frac{1}{2}$ Stunde mit 10proz. Kalilauge, so geht mehr als 50% der Verbindung in 5- β -Phenyl-äthyl-1,2,4-triazolone-3 über, zu etwa 50% verläuft die Reaktion beim N-Cyan-phenyl-essigsäurehydrazid, während beim N-Cyan-benzhydrazid nur ein geringer Teil in das 5-Phenyl-1,2,4-triazolone-3 übergeht. Wohl ohne Zweifel wird man annehmen dürfen, daß bei dieser Reaktion das durch Wasseranlagerung an das Cyanhydrazid gebildete acylierte Semicarbazid als Zwischenprodukt auftritt, dann aber sofort unter Wasserabspaltung in das entsprechende 1,2,4-Triazolone umgewandelt wird.



Diese Annahme wird durch die Tatsache erhärtet, daß nach O. Widmann¹⁾ acylierte Phenyl-semicarbazide beim Erwärmen mit verdünnten Laugen in am Stickstoff phenylierte 1,2,4-Triazolone übergehen:



Um den Reaktionsverlauf bei der Umwandlung der Cyanhydrazide in Triazolone, insbesondere aber das Auftreten der Semicarbazide als Zwischenprodukte zu beweisen, wäre es also notwendig zu zeigen, daß die Acylsemicarbazide beim Erhitzen mit Laugen eine intramolekulare Kondensation unter Ringschluß zum Triazolone erleiden. In der Tat haben O. Widmann und A. Cleve²⁾ schon vor längerer Zeit beobachtet, daß das Formylsemicarbazid beim Kochen mit starker Ameisensäure in das 1,2,4-Triazol-3 übergeht. Doch gelang es ihnen nicht, diese Reaktion auf andere Acyl-semicarbazide zu übertragen. Sie sägen über ihre vergeblichen Versuche, Acetyl-, Isobutyryl- und Benzoyl-semicarbazid durch Erhitzen mit Laugen in die entsprechenden Triazolone (Oxytriazole) überzuführen:

„Alle Versuche, aus diesen Verbindungen Oxytriazole zu gewinnen, sind aber an ihrer großen Verseifbarkeit gescheitert. Die Acetylverbindung wird schon beim Kochen mit Wasser, alle Acidylverbindungen beim Kochen mit Säuren oder Alkali verseift.“

Im Gegensatz zu diesem Ergebnis habe ich nun gefunden, daß die Acyl-semicarbazide der allgemeinen Formel $\text{R} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$, in der R einen Alkylrest bedeutet, in guter Ausbeute beim Kochen mit verdünnter Kalilauge in die entsprechenden 1,2,4-Triazolone-3 übergehen. Auch diejenigen Semicarbazide, bei denen R ein Arylrest ist, liefern bei der genannten Behandlung Triazolone, jedoch ist hier die Ausbeute sehr schlecht. Beim Phenylacetyl-semicarbazid beträgt z. B. die Ausbeute 50%, beim Isobutyryl-semicarbazid 48%, beim Benzoyl-semicarbazid dagegen nur 9% d. Th. Die Ausbeutezahlen sind hier also ganz ähnliche wie bei der Behandlung der Cyanhydrazide mit siedender Kalilauge, ein Grund mehr für die Richtigkeit des oben angegebenen Reaktionsschemas.

Die untersuchten Semicarbazide wurden nicht, wie das Widmann und Cleve (l.c.) angeben, aus dem Säureanhydrid und dem freien Semicarbazid gewonnen, sondern es wurde der viel einfachere Weg über das Säurehydrazid gewählt, dessen Hydrochlorid erwartungsgemäß in wäß-

¹⁾ Ber. 29, 1946 (1896).

²⁾ Ber. 31, 378 (1898).

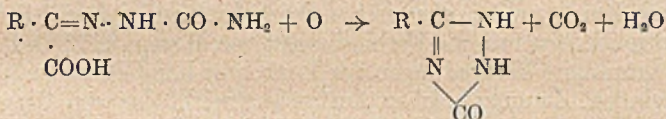
riger Lösung mit Kaliumcyanat in glatter Reaktion und ausgezeichneter Ausbeute das entsprechende Semicarbazid liefert:



Dieses Verfahren der Darstellung von am Kohlenstoffatom 5 substituierten 1,2,4-Triazolonen-3 bedeutet gegenüber der bequemsten bisher beschriebenen Bildung dieser Verbindungen von G. Young und E. Witham³⁾ durch Oxydation der in vielen Fällen nur sehr schwer zugänglichen Aldehyd-semicarbazone mit Eisenchlorid im Rohr eine wesentliche Vereinfachung.

Die oben geschilderten Resultate sind nun geeignet, auf frühere Veröffentlichungen anderer Autoren über an C_5 substituierte 1,2,4-Triazolone-3 ein neues Licht zu werfen und einige irrtümliche Schlußfolgerungen dieser Autoren richtigzustellen.

Schon vor längerer Zeit hat J. Bougault⁴⁾ bei der Oxydation der Semicarbozone von α -Ketosäuren mit Jod in soda-alkalischer Lösung gut kristallisierte Produkte erhalten, deren Konstitution zunächst ungewiß blieb, die aber in einer späteren Arbeit von J. Bougault und L. Popovici⁵⁾ als in 5 substituierte 1,2,4-Triazolone-3 angesprochen wurden gemäß folgender Gleichung



ohne daß allerdings diese Autoren einen Beweis für diese Annahme erbracht haben. Bougault ging z. B. bei seinen Versuchen von den Semicarbazonen der Phenyl-glyoxylsäure, der Phenyl-brenztraubensäure und der Benzyl-brenztraubensäure aus, die nach Bougault und Popovici bei dem genannten Oxydationsverfahren also das 5-Phenyl-, 5-Benzyl- und 5- β -Phenäthyl-1,2,4-Triazolone-3 liefern sollten. Bei der näheren Untersuchung der durch Oxydation der α -Ketosäure-semicarbazone entstehenden Verbindungen hätte nun schon Bougault festgestellt, daß bei der Hydrolyse mit wäßrigem Alkali eine Carbonsäure entsteht, aus dem durch Oxydation des Semicarbazons der Phenyl-brenztraubensäure er-

³⁾ Chem. Soc. 77, 228 (1900); Proc. chem. Soc. 16, 5 (1900). Nach neueren Versuchen von M. Girard (Ann. Chim. [11] 16, 326 [1941]) kommt das von Young und Witham angegebene Verfahren für die Darstellung der Triazolone wegen der sehr schlechten Ausbeuten nicht in Frage. Bei der Umsetzung tritt fast völlige Verharzung ein und auch bei größeren Ansätzen werden mitunter nur Bruchteile eines Gramms erhalten. Ich habe diese Angaben von Girard nachgeprüft und bestätigen können.

⁴⁾ Bl. (4) 21, 183 (1917); 25, 385 (1919); C. r. 163, 237 (1916).

⁵⁾ C. r. 189, 188 (1929).

Ebenso entsprechen sich das Oxydationsprodukt aus dem Semicarbazon der Phenyl-brenztraubensäure (Smp. 156°) und das Cyan-hydrazid aus dem Phenyl-essigsäure-hydrazid (Smp. $158,5^{\circ}$). Und das Oxydationsprodukt aus dem Semicarbazon der Benzyl-brenztraubensäure (Smp. 192°) entspricht dem Cyan-hydrazid aus dem Hydrozimtsäure-hydrazid (Smp. $191,0^{\circ}$).

Nachdem so die Übereinstimmung der Eigenschaften der Bougault'schen Verbindungen mit denjenigen der entsprechenden N^{β} -Cyan-säurehydrazide festgestellt war, habe ich nach der Vorschrift von Bougault das Semicarbazon der Phenyl-brenztraubensäure oxydiert. Das so erhaltene Produkt ergab mit dem aus Phenyl-acet-hydrazid und Bromcyan erhaltenem N^{β} -Cyan-phenyl-acethydrazid gemischt keine Schmelzpunktsdepression, wodurch die Identität der beiden Verbindungen bewiesen ist. Und in derselben Weise ergab sich die Identität des bei der Oxydation des Semicarbazons der Phenyl-glyoxylsäure mit Jod nach Bougault erhaltenen Produktes mit dem N^{β} -Cyan-benzhydrazid. Somit hat sich die von Bougault und Popovici (l.c.) aufgestellte Vermutung, daß es sich bei den Bougault'schen Verbindungen um 1,2,4-Triazolone handele, als irrig erwiesen und damit ist auch alles das hinfällig, was Girard über die Tautomerisierung der Bougault'schen Verbindungen zu 3-Oxy-1,2,4-Triazolen ausgesagt hat. Es handelt sich dabei nicht um eine Tautomerisierung, sondern um einen Übergang eines N^{β} -Cyan-säurehydrazids über das entsprechende Acyl-semicarbazid in ein in 5 substituiertes 1,2,4-Triazol-3.

Experimenteller Teil

N^{β} -Cyan-säurehydrazide

N^{β} -Cyan-acethydrazid

Zu einer Lösung von 7 g Acethydrazid und 10 g Kaliumhydrogencarbonat in wenig Wasser wird eine Lösung von 10 g Bromcyan in 150 ccm Wasser hinzugefügt. Es beginnt sofort eine mäßige Kohlendioxydentwicklung; nach mehrstündigem Stehen, wenn der Geruch nach Bromcyan ganz oder nahezu ganz verschwunden ist, wird die Lösung i. V. bei etwa 45° zur Trockene eingedampft und der orangefarbene Rückstand mit 50 ccm siedendem absol. Äthanol extrahiert. Die filtrierte orangefarbene Lösung wird nach dem Behandeln mit Kohle auf ein kleines Volumen eingedampft. Beim Abkühlen scheiden sich reichliche Mengen gut ausgebildeter, großer Nadeln ab, die nach dem Absaugen und Waschen mit Äther bei 90° getrocknet werden. Ausbeute 6 g (64% d. Th.). Zur Reinigung wird das etwas gelblich gefärbte Rohprodukt aus 50 ccm Aceton umkristallisiert: schneeweiße, kurze Prismen vom Smp. $186,5^{\circ}$).

⁷⁾ Alle Schmelzpunkte wurden mit der Mikroapparatur nach Kofler bestimmt.

Schon gegen 100° beginnt Sublimation in langen Nadeln. Leicht löslich in kaltem Wasser und Äthanol. In kaltem Aceton wenig, in heißem reichlicher löslich. Schwer löslich in Äther und siedendem Benzol.

Durch seine große Löslichkeit in Wasser und durch die tiefe Sublimationstemperatur unterscheidet sich das Cyan-acetylhydrazid von den anderen in dieser Arbeit beschriebenen Cyan-hydraziden.

$C_3H_5ON_3$ (99,15) Ber. C 36,36 H 5,08 N 42,41
Gef. » 36,72 » 5,33 » 42,31

Silbernitrat-Additionsverbindung. Zu einer Lösung von 1 g Cyan-acetylhydrazid in 20 ccm Wasser fügt man eine Lösung von 2 g Silbernitrat in 20 ccm Wasser. Der sofort ausfallende krystalline Niederschlag (Nadeln) wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und mit Äthanol und Äther getrocknet. Ausbeute 2,2 g (81,5% d. Th.). Nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser schmilzt die Verbindung scharf bei 198,0° (Zers.). In kaltem Wasser wenig, in heißem sehr leicht löslich. Unlöslich in verdünnter, leicht löslich in konzentrierter Salpetersäure. Unlöslich in Äthanol und Äther.

$C_3H_5ON_3 \cdot AgNO_3$ (268,98) Ber. Ag 40,11 Gef. Ag 39,53

Silbersalz. Zu einer mit etwas Ammoniak versetzten Lösung von 1 g Cyan-acetylhydrazid in 100 ccm Wasser wird eine ammoniakalische Lösung von 2 g Silbernitrat in 10 ccm Wasser hinzugefügt, der sofort ausfallende farblose Niederschlag mit Wasser ausgewaschen, zuerst auf Ton und dann in der Trockenpistole bei 56° getrocknet. Ausbeute: 1,4 g (etwa 63% d. Th.). Da die Verbindung in Ammoniak löslich ist, kann die Ausbeute durch Vertreiben des Ammoniaks auf dem Wasserbad vor dem Filtrieren verbessert werden. Smp. 188—189° (Zers.).

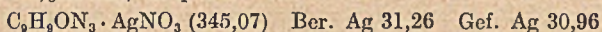
$C_3H_5ON_3Ag$ (205,97) Ber. Ag 52,38 Gef. Ag 52,53

N^β-Cyan-phenyl-acetylhydrazid

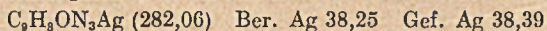
Zu einer in einem Zweiliter-Becherglas befindlichen Lösung von 13,8 g Phenyl-acetylhydrazid und 9,7 g $KHCO_3$ in 200 ccm Wasser fügt man eine Lösung von 9,7 g Bromcyan in 225 ccm Wasser. Unter anfangs nur geringer Kohlendioxidentwicklung beginnt nach etwa einer Minute die Abscheidung des Cyan-hydrazids, das sich in einem Schaum an der Oberfläche der Reaktionslösung sammelt. Nach mehrstündigem Stehen wird abgesaugt und mit Wasser bis zum Verschwinden der Bromidreaktion gewaschen. Zur weiteren Reinigung wird in verdünnter Salzsäure gelöst, von geringen Mengen einer nicht gelösten Verunreinigung abgesaugt, die Lösung mit verdünnter Lauge bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt, der entstandene Niederschlag mit Wasser bis zum Verschwinden der Chloridreaktion ausgewaschen und aus 600 ccm siedendem Wasser umkristallisiert. Trocknen im Exsikkator. Ausbeute 12 g (74,5% d. Th.). Die umkristallisierte Verbindung besteht teils aus großen, langen Tafeln, teils aus Rhomben und Dreiecken. Smp. 158,5°, schwach absinkend; sublimiert wenig oberhalb 100° in flachen, an den Enden charakteristisch eingekerbten Nadeln. Wiederholt wurde auch an reinen Präparaten ein Schmelzpunkt von 160,5° beobachtet, so daß anscheinend Dimorphismus vorliegt. Merklich löslich in kaltem, sehr viel leichter in heißem Wasser. Leicht löslich in kaltem Äthanol und Aceton. Etwas löslich in siedendem Äther. Mäßig löslich in kaltem, leichter in heißem Essigester. Schwerlöslich in kaltem, etwas leichter in heißem Benzol, aus dem die Verbindung in langen, äußerst feinen und stark verzigten Nadeln wieder herauskommt. Schwer löslich in Ligroin.

$C_9H_9ON_3$ (175,19) Ber. C 61,70 H 5,18 N 23,99
Gef. » 61,56 » 5,23 » 23,89

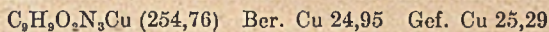
Silbernitrat-Additionsverbindung. 0,2 g Cyan-phenyl-acethydrazid werden in 10 ccm verd. Salpetersäure gelöst und mit einer Lösung von 0,4 g Silbernitrat in 10 ccm Wasser versetzt. Der sofort ausfallende krystalline Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und mit Äthanol und Äther getrocknet. Ausbeute 0,33 g (etwa 84% d. Th.). Smp. 177—178°.



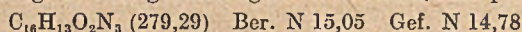
Silbersalz. Eine Lösung von 0,5 g Cyan-phenyl-acethydrazid in 100 ccm Wasser wird in der Siedehitze mit einer ammoniakalischen Lösung von 1 g Silbernitrat in wenig Wasser versetzt. Der sofort ausfallende farblose, amorphe Niederschlag wird nach dem Waschen mit heißem Wasser erst an der Luft und dann bei 110° getrocknet. Löslich in starker Salpetersäure und starkem Ammoniak.



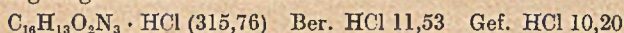
Basisches Kupfersalz. 200 ccm einer 0,25proz. wäßrigen Lösung des Cyan-phenyl-acethydrazids werden mit 2 ccm 12proz. Ammoniak und unter starkem Schütteln allmählich mit einer ammoniakalischen Kupfersulfatlösung versetzt (1 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in 25 ccm 2,5proz. Ammoniak). Der hierbei entstehende grünlich-blaue Niederschlag wird zweimal mit schwach ammoniakalischem, dann viermal mit reinem Wasser gewaschen, erst auf Ton und dann im Vakuum-Exsikkator über KOH getrocknet. Resedagrünes Pulver, das sich schon in siedendem Wasser unter Braunfärbung zersetzt.



Benzoylverbindung. Ein Gemisch von 0,6 g Cyan-phenyl-acethydrazid, 10 ccm Pyridin und 0,8 ccm Benzoylchlorid wird nach 10std. Stehen bei Raumtemperatur in 150 ccm Wasser gegossen. Die hierbei ausfallenden farblosen Nadeln wiegen nach dem Auswaschen mit Wasser und Trocknen bei 110° 0,95 g. Das Produkt wird in wenig Chloroform gelöst, von geringen Mengen einer Verunreinigung abfiltriert und die Lösung zur Trockene eingedampft. Ausbeute 0,8 g (etwa 84% d.Th.). Smp. nach dem Umkristallisieren aus Benzol 152,5°. Mäßig löslich in kaltem, sehr leicht in heißem Benzol oder Äthanol. Leicht löslich in kaltem Aceton oder Chloroform. Unlöslich in siedendem Ligroin. Wenig löslich in kaltem, etwas mehr in siedendem Äther. Etwas löslich in siedendem Wasser. Ammoniakalische Silbernitratlösung erzeugt in wäßriger Lösung einen farblosen, amorphen Niederschlag.



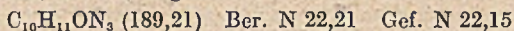
Hydrochlorid der Benzoylverbindung. 0,3 g der fein gepulverten Benzoylverbindung werden mit 10 ccm 33proz. Salzsäure verrieben. Nach 1std. Stehen wird abgesaugt und auf Ton über Nacht an der Luft getrocknet. Durch Wasser wird unter Abspaltung von Chlorwasserstoff die Benzoylverbindung sehr langsam regeneriert, da das Hydrochlorid — im Gegensatz zu den Säureverbindungen der nicht acylierten Cyan-hydrazide — ungewöhnlich stark hydrophob ist. Die Zersetzung zur titrimetrischen Bestimmung des Säuregehaltes muß daher mit heißem Wasser erfolgen. Bei der mikroskopischen Schmelzpunktbestimmung findet man den Schmelzpunkt des Benzoyl-cyan-phenyl-acethydrazids. Das Hydrochlorid spaltet schon oberhalb 50° Chlorwasserstoff ab. Auch findet sich bei der Analyse der lufttrockenen Substanz ein geringes Defizit an Chlorwasserstoff.



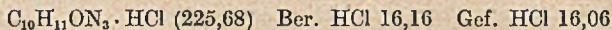
N^{β} -Cyan-hydrozimtsäure-hydrazid

Eine Lösung von 7,53 g Hydrozimtsäurehydrazid und 4,9 g $KHCO_3$ in 150 ccm Wasser wird mit einer Lösung von 4,9 g Bromcyan in 50 ccm Wasser versetzt. Die Abscheidung des Cyan-hydrazids in unregelmäßig begrenzten Tafeln beginnt sofort

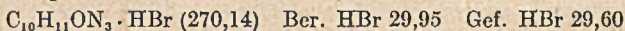
unter Bildung eines schneeweißen Schaumes. Aus 180 ccm Äthanol umkristallisiert. Smp. 191,5°. Löslich in viel siedendem Wasser oder Äthanol. Aus Wasser krystallisiert bildet es große, meistens angebrochene Rhomben, mitunter Sechsecke.



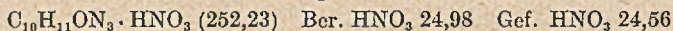
Hydrochlorid. 1 g Cyan-hydrozimtsäure-hydrazid wird in etwa 10 ccm mäßig conc. Salzsäure heiß gelöst. Beim Abkühlen krystallisieren sehr reichliche Mengen sechseckiger, vielfach unregelmäßig begrenzter Tafeln aus, die scharf abgesaugt und im Vakuum-Exsikkator über KOH getrocknet werden. Unzersetzt löslich in abs. Äthanol. Wasser spaltet momentan Salzsäure ab unter Rückbildung des Cyan-hydrazids.



Hydrobromid. Krystallisiert beim Abkühlen einer heißen Lösung von 1 g des Cyan-hydrazids in 10 ccm 22proz. Bromwasserstoffsäure in farblosen, langgestreckten Tafeln. Smp. 171—175°.

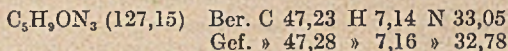


Nitrat. Krystallisiert aus einer heißen Lösung von 1,5 g Cyan-hydrozimtsäure-hydrazid in 13 ccm verdünnter Salpetersäure beim Abkühlen in sehr langen, teils spitzen, teils gerade abgeschnittenen Nadeln. In kalter, verd. Salpetersäure schwer, in der heißen Säure sehr leicht löslich. Spielend löslich in abs. Äthanol.

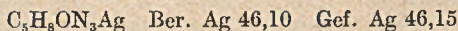


N^β-Cyan-isobutyryl-hydrazid

Zu einer Lösung von 9,7 g Isobutyryl-hydrazid in 75 ccm Wasser wird eine konzentrierte wäßrige Lösung von 10 g KHCO₃ und dann unter Umschütteln eine Lösung von 10 g Brom-cyan in 150 ccm Wasser hinzugefügt. Unter mäßig starker CO₂-Entwicklung beginnt nach etwa 15 Minuten die Abscheidung des farblosen Hydrazids in rasch zunehmender Menge. Die abgeschiedenen prismatischen Krystalle werden abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen, aus wenig Wasser umkristallisiert und an der Luft getrocknet. Ausbeute 3,0 g. Aus den Waschlagen lassen sich noch 1,4 g eines reinen Produktes gewinnen, Ausbeute an reinem farblosen Produkt insgesamt 8 g (66,3% d. Th.). Smp. 180,0°; Gleichgewicht sehr genau einstellbar, Wachsen und Schmelzen der Krystalle beim Ein- und Ausschalten des Heiztisches momentan; Sublimation in Nadeln schon ab 100°. Mäßig löslich in kaltem, sehr viel leichter in heißem Wasser. Löslich in kaltem, sehr leicht löslich in heißem Äthanol. Löslich in kaltem Aceton. Schwer löslich in siedendem Äther und Benzol.



Silbersalz. Aus der siedenden, schwach ammoniakalischen wäßrigen Lösung des Cyan-hydrazids mit überschüssiger ammoniakalischer Silbernitratlösung als farbloser amorpher Niederschlag gefällt. Löslich in verdünnten Mineralsäuren und starkem Amoniak.



Benzylverbindung. Zu einer Lösung von 0,25 g Natrium in 15 ccm abs. Äthanol werden 1,2 g des Cyan-hydrazids und 1,25 ccm Benzylchlorid gegeben. Die Lösung wird am Rückflußkühler 10 Minuten zum Sieden erhitzt und mit dem abgeschiedenen Natriumchlorid in 150 ccm Wasser gegossen. Das ausgeschiedene Öl wird mit Äther extrahiert, der nach dem Trocknen mit Natriumsulfat verdampft wird. Die ausgeschiedenen Krystalle werden von geringen Mengen eines Öls befreit. Ausbeute

0,5 g. Die Verbindung schmilzt nach dem Umkrystallisieren aus reichlich Wasser (kurze Prismen) oder wenig Benzol (Nadeln) bei 108° ; Gleichgewicht gut einstellbar und etwas absinkend; sublimiert nicht. Schwer löslich in kaltem, leichter in heißem Wasser. Leicht löslich in kaltem Äthanol, Äther, Chloroform und Aceton. Wenig löslich in kaltem, leichter in heißem Benzol.

$C_{12}H_{15}ON_3$ (217,27) Ber. N 19,34 Gef. N 19,30

Silbernitrat-Additionsverbindung. Zu einer Lösung von 0,5 g Cyan-isobutyryl-hydrazid in wenig 2n-Salpetersäure wird eine konzentrierte, wäßrige Lösung von Silbernitrat hinzugefügt. Der fast sofort ausfallende, krystalline Niederschlag (stark verästelte, zweigartige Gebilde) wird filtriert, mit Äthanol gewaschen, aus sehr wenig Wasser umkrystallisiert und mit Äthanol und Äther getrocknet. Ausbeute 1,0 g (86,5% d. Th.). Smp. $170-174^\circ$ (Zers.).

$C_8H_9ON_3 \cdot AgNO_3$ (297,04) Ber. Ag 36,32 Gef. Ag 35,81

N^β -Cyan-benzhydrazid

In einem Becherglas von 1 l Inhalt wird zu einer Lösung von 13 g Benzhydrazid und 10 g $KHCO_3$ in 200 ccm Wasser eine Lösung von 10 g Bromcyan in 150 ccm Wasser hinzugefügt. Der sich sofort unter CO_2 -Entwicklung bildende und bald in ein sehr gut filtrierbares, sandiges Pulver übergehende grauweiße Niederschlag wird nach einigen Stunden, nach dem Verschwinden des Geruches nach Bromcyan, abgesaugt, mit Wasser gewaschen und bei 110° getrocknet. Ausbeute 12,5 g (etwa 81% d. Th.). Nach dem Umkrystallisieren aus 300 ccm siedendem Äthanol erhält man 10 g eines farblosen, nadelförmig krystallisierenden Produktes. Schwer löslich in kaltem, etwas mehr in siedendem Wasser. Wenig löslich in kaltem, leichter in heißem Äthanol. Löslich in kaltem, äußerst leicht in heißem Pyridin. Nicht merklich löslich in siedendem Benzol. Smp. 238° (Zers.); sublimiert ab 140° anfangs in kurzen, dünnen, später in langen, breiten Nadeln.

$C_8H_7ON_3$ (161,16) Ber. C 59,61 H 4,38 N 26,08
Gef. » 59,68 » 4,54 » 25,62

Sulfat. Krystallisiert beim Abkühlen einer Lösung des Cyan-benzhydrazids in heißer, verd. Schwefelsäure in langen, flachen Nadeln, die nach dem Absaugen und Waschen mit Äther an der Luft getrocknet werden. Wasser spaltet sofort Schwefelsäure ab. Smp. 180° (Zers.).

$(C_8H_7ON_3)_2 \cdot H_2SO_4$ (420,40) Ber. H_2SO_4 23,33 Gef. H_2SO_4 22,65

Nitrat. Krystallisiert beim Abkühlen einer Lösung von 0,5 g Cyan-benzhydrazid in 15 ccm heißer 32proz. Salpetersäure tafelförmig aus. Leicht löslich in Äthanol, in dem auch in der Siedehitze keine Zersetzung eintritt. Smp. 160° (Zers.)

$C_8H_7ON_3 \cdot HNO_3$ (224,18) Ber. HNO_3 28,11 Gef. HNO_3 27,96

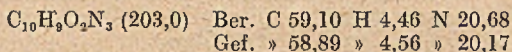
Silbersalz. Eine schwach ammoniakalische Lösung von 0,5 g Cyan-benzhydrazid in 500 ccm heißem Wasser wird mit einer ammoniakalischen Lösung von Silbernitrat in wenig Wasser versetzt.

$C_8H_9ON_3Ag$ (268,03) Ber. Ag 40,25 Gef. Ag 40,15

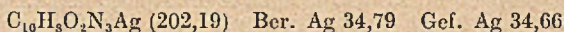
Basisches Kupfersalz. Zu einer heißen, ammoniakalischen Lösung von 0,8 g Cyan-benzhydrazid in 250 ccm Wasser wird eine ammoniakalische Lösung von 2 g Kupfersulfat-5-hydrat hinzugefügt. Grau-grüner Niederschlag, der sich beim kurzen Kochen mit Wasser im Gegensatz zu den Kupfersalzen der anderen untersuchten Cyan-hydrazide nicht zersetzt.

$C_8H_7O_2N_3Cu$ (240,73) Ber. Cu 26,47 Gef. Cu 26,75

Acetylverbindung. 2 g Cyan-benzhydrazid werden mit 10 cem Acetanhydrid 15 Minuten am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Die nach dem Abkühlen ausgeschiedenen Krystalle werden abgesaugt, mit Äther gewaschen und an der Luft getrocknet. Ausbeute 0,9 g. Nach dem Umkrystallisieren aus etwa 20 cem Äthanol (lange Nadeln) erhält man 0,62 g reine Substanz. Smp. 221°. In viel siedendem Wasser löslich. Mäßig löslich in kaltem, sehr reichlich in heißem Äthanol. Die wäßrige Lösung gibt mit ammoniakalischer Silbernitratlösung einen farblosen, amorphen, mit ammoniakalischer Kupfersulfatlösung einen himmelblauen Niederschlag. Bei längerem Stehen mit starker Bromwasserstoffsäure, fast augenblicklich beim Erhitzen, bildet sich unter Abspaltung des Acetylrestes das Hydrobromid des Cyan-benzhydrazids.

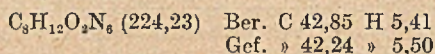


Das Silbersalz fällt aus einer schwach ammoniakalischen Lösung von 0,3 g der Acetylverbindung in 400 cem siedend heißem Wasser nach Zusatz einer ammoniakalischen Lösung von 0,5 g Silbernitrat als farbloser, flockiger Niederschlag aus, der sich rasch zusammenballt.

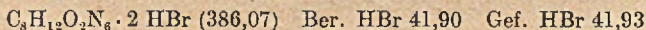


N^β,N'^β-Dicyan-adipinsäure-dihydrazid

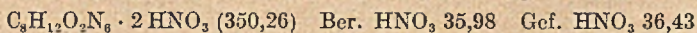
Zu einer Lösung von 10 g KHCO₃ und 25,2 g Adipinsäure-dihydrazid in 350 cem Wasser, die sich in einem Becherglas von 2 l Inhalt befindet, gibt man eine Lösung von 30 g Bromcyan in 450 cem Wasser. Unter lebhafter CO₂-Entwicklung beginnt fast sofort die Abscheidung des Cyanhydrazids in kleinen, körnigen Krystallen. Nach dem Stehen über Nacht wird filtriert, mit Wasser gewaschen und bei 105° getrocknet. Ausbeute 28,5 g (88% d. Th.). Schwer löslich in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln. Leicht löslich in Mineralsäuren. Aus der sauren Lösung durch Alkali in sehr kleinen Nadeln wieder fällbar. Läßt sich aus sehr viel Wasser (0,5 g auf 500 cem Wasser) umkrystallisieren, wobei auch bei langsamer Abkühlung nur kleine körnige Krystalle entstehen.



Hydrobromid. Krystallisiert aus der heißen Lösung von 1 g Cyan-adipinsäure-hydrazid in 25 cem 44proz. HBr beim raschen Abkühlen. Wird durch Wasser unter Rückbildung der Komponenten momentan zersetzt. Nicht merklich löslich in Äthanol.



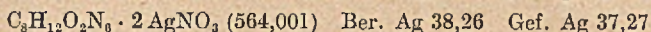
Nitrat. Krystallisiert beim Abkühlen einer heißen Lösung von 1 g Cyan-adipinsäure-hydrazid in 20 cem 33proz. Salpetersäure in sechsseitigen Tafeln. Beim Erhitzen färben sich die Krystalle ab etwa 135° braun und zersetzen sich unter Gasentwicklung bei 160°.



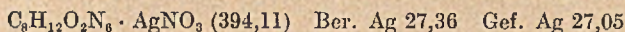
Silbernitrat-Additionsverbindungen

a) 1,0 g Cyan-adipinsäure-hydrazid wird in 50 cem 2n-Salpetersäure in der Kälte gelöst, die Lösung mit 50 cem Wasser verdünnt und mit einer Lösung von 2 g Silbernitrat in 25 cem Wasser gefällt. Der anfangs amorph ausfallende farblose Nieder-

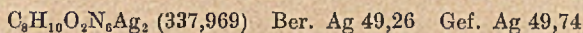
schlag wird beim Umschütteln rasch krystallin und setzt sich als schweres sandiges, körniges Pulver rasch ab. Ausbeute 2,1 g (etwa 83% d. Th.). Smp. scharf bei 217°.



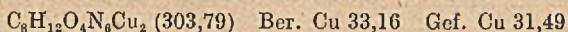
b) Die nach a) gewonnene Additionsverbindung mit 2 Mol Silbernitrat wird aus 200 ccm siedendem Wasser umkrystallisiert. Die beim Abkühlen entstehenden, heubündelartig zusammengewachsenen Nadeln werden nach dem Auswaschen mit Wasser, Äthanol und Äther in der Trockenpistole getrocknet. Smp. bei 213—217°.



Silbersalz. Zu einer heißen, schwach ammoniakalischen Lösung von 0,5 g Cyanadipinsäure-hydrazid in 500 ccm siedendem Wasser wird eine ammoniakalische Lösung von Silbernitrat im Überschuß zugesetzt.

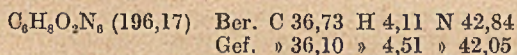


Basisches Kupfersalz. Darstellung wie oben mehrfach beschrieben; dunkelgrünes Pulver.

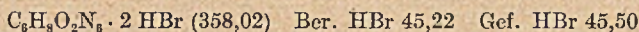


$N^{\beta}N^{\beta}$ -Dicyan-bernsteinsäure-dihydrazid

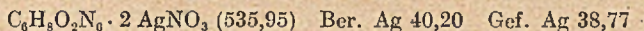
Fällt als mikrokrystallines, körniges Pulver beim Versetzen einer Lösung von 13,8 g Bernsteinsäure-dihydrazid und 20 g $KHCO_3$ in 175 ccm Wasser mit einer Lösung von 20 g Bromcyan in 200 ccm Wasser aus. Ausbeute 7 g (etwa 37% d. Th.). Löslich in Mineralsäuren. Schwer löslich in Wasser und den üblichen organischen Lösungsmitteln.



Hydrobromid. Krystallisiert in Tafeln (Spindeln und Sechsecke) beim Abkühlen einer Lösung von 1 g Dihydrazid in 10 ccm heißer 40proz. HBr. Smp. 241 bis 245° (Zers.).



Silbernitrat-Additionsverbindung. Auf die mehrfach beschriebene Weise dargestellt. Mikrokrystalliner, körniger Niederschlag.



1,2,4-Triazolone-3

Die Darstellung der Triazolone durch Erhitzen der Cyan-hydrazide mit Kalilauge wurde stets so durchgeführt, daß etwa 1 g des Cyan-hydrazids mit 25 ccm 10proz. Kalilauge 1 Stunde am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt wurde. Die Lösung wurde dann abgekühlt, von einer geringen Trübung abfiltriert und mit verd. Salzsäure schwach angesäuert, wobei die Triazolone gewöhnlich sofort, mitunter nach einigem Stehen, gut krystallisiert ausfallen und aus Wasser oder Äthanol umkrystallisiert werden können.

In allen Fällen wurde beim Erhitzen der Cyan-hydrazide mit Kalilauge Ammoniakentwicklung beobachtet. Hierdurch und durch den teilweisen Verlauf einer alkalischen Hydrolyse der Cyan-hydrazide analog ihrer Aufspaltung durch Säuren finden die zum Teil mäßigen Ausbeuten an Triazolonen ihre Erklärung.

In ganz analoger Weise werden die *Acylsemicarbazide*, deren Gewinnung aus den Acylhydraziden und Kaliumcyanat schon erwähnt wurde, in die Triazolone übergeführt.

Die angegebene Konzentration der Lauge und die Reaktionszeit haben sich bei Serienversuchen mit Variation der Laugenkonzentration und der Erhitzungsdauer am Beispiel des Phenyl-acetyl-semicarbazids als ausreichend erwiesen. Längere Kochzeiten und auch wesentlich konzentriertere Laugen verbessern die Ausbeute an Triazolen nicht, drücken sie aber auch nicht herab.

5-Methyl-1,2,4-triazolon-3

Aus Cyan-acethydrizid. Die alkalische Lösung, die nach dem Verkochen des Cyan-hydrizids mit Kalilauge erhalten wird, gibt beim Ansäuern, auch nach dem Stehen über Nacht, keinen Niederschlag und wird nach dem Neutralisieren gegen Lackmus auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft, der etwas gelbliche Rückstand mit siedendem Äthanol extrahiert, die alkoholische Lösung zur Trockene gebracht und der Rückstand durch Sublimation gereinigt. Ausbeute etwa 20% d. Th. Smp. 245,0°. Bildet schon etwa ab 140° nadelförmige Sublimate; gegen 200° sehr rasche Umwandlung der großen Nadeln in kleine körnige Krystalle, aus denen beim weiteren Erhitzen wieder lange Nadeln herauswachsen. Das Produkt ist also anscheinend dimorph. Sehr leicht löslich in kaltem Wasser, merklich löslich in kaltem, mäßig gut in heißem Äthanol, der sich zum Umkrystallisieren eignet und aus dem die Substanz in unregelmäßig begrenzten Tafeln herauskommt. Wenig löslich in kaltem, leichter in heißem Aceton. Nicht merklich löslich in kaltem Benzol.

$C_3H_5ON_3$ (99,09) Ber. C 36,36 H 5,08 N 42,41
Gef. » 36,05 » 5,39 » 41,78

Aus Acetyl-semicarbazid. Eine Lösung von 5 g Acethydrizid in 25 ccm Wasser wird unter Kühlung mit 6,38 ccm 33,16proz. Salzsäure versetzt und eine Lösung von 5,5 g Kaliumcyanat in 10 ccm Wasser hinzugefügt. Nach etwa 10 Minuten wird eine Lösung von 4 g KOH in 10 ccm Wasser zugesetzt und das Ganze 1 Stunde am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wird die Lösung filtriert, mit 20proz. Salzsäure gegen Lackmus neutralisiert und auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit siedendem abs. Äthanol extrahiert und die alkoholische Lösung zur Trockene eingedampft. Ausbeute 2,2 g (44% d. Th.). Das Rohprodukt wird durch Sublimation oberhalb 140° gereinigt und liefert ein Krystallisat, das völlig mit dem aus dem Cyan-acethydrizid erhaltenen Produkt übereinstimmt.

5-Benzyl-1,2,4-triazolon-3

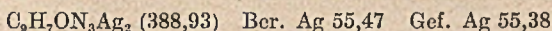
Aus Cyan-phenyl-essigsäurehydrizid. Unregelmäßig begrenzte Tafeln, gelegentlich Dreiecke. Smp. 223,5°, Sublimationsbeginn gegen 160° unter Bildung von langgestreckten Rechtecken mit unregelmäßig begrenzter kurzer Kante; beim Gleichgewicht in der Schmelze häufig Ausbildung von Rhomben. Leicht löslich in siedendem Äthanol, weniger in kaltem. Leicht löslich in Ammoniak und Alkalilaugen und aus diesen Lösungen durch Säuren wieder fällbar.

$C_9H_9ON_3$ (175,19) Ber. N 23,99 Gef. N 24,12

Aus Phenyl-acetyl-semicarbazid. Zu einer Lösung von 15,0 g Phenyl-essigsäurehydrizid in 50 ccm Wasser fügt man unter Kühlung 1 Mol etwa 20proz. Salzsäure und dann eine Lösung von 8,2 g Kaliumcyanat in 25 ccm Wasser. Der sofort ausfallende krystalline Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und aus sehr wenig Wasser, in dem das Semicarbazid in der Hitze sehr

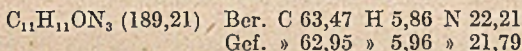
leicht löslich ist, umkrystallisiert. Große, rechteckige Tafeln. Ausbeute 11,7 g (86% d. Th.). Smp. 173° (Zers.). Beim Verkothen mit Kalilauge erhält man ein Produkt, das in allen Eigenschaften mit der aus dem Cyanhydrazid erhaltenen Substanz identisch ist. Ausbeute etwa 50 % d. Th.

Silbersalz. Fällt beim Zusammengießen einer heißen ammoniakalischen Lösung von 0,9 g Benzyltriazolon in 50 ccm Wasser und einer heißen ammoniakalischen Lösung von 3,5 g Silbernitrat in 20 ccm Wasser als farbloser Niederschlag aus.



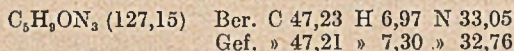
5-β-Phenyläthyl-1,2,4-triazolon-3

Aus Cyan-hydrozimsäure-hydrazid. Wegen seines sehr ausgeprägten hydrophoben Verhaltens wird dieses Cyan-hydrazid durch 10proz. Kalilauge nicht genügend benetzt, doch gelingt es mit stärkerer Kalilauge leicht, das Cyanhydrazid in Lösung und zur Cyclisierung zu bringen. 2 g des Cyan-hydrazids werden mit einer Lösung von 8 g KOH in 32 ccm Wasser $\frac{1}{2}$ Stunde am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Die Lösung wird dann wie im allgemeinen Teil geschildert weiter behandelt. Das erhaltene Reaktionsprodukt wird aus wenig Wasser umkrystallisiert. Ausbeute 1 g. Tafeln. Wenig löslich in kaltem, reichlicher in heißem Wasser. Smp. 205°, sublimiert ab 150° in sehr kleinen Tafelchen, die nur sehr langsam wachsen und selten rechteckige Formen zeigen; ab 190° auch grobe Nadeln und Bildung großer, rundlich begrenzter Tafeln. Im Schmelztropfen wachsen beim Abkühlen große Tafeln mit rundlichen Kanten aus, deren Lichtbrechung nur wenig von der der Schmelze abweicht. Mitunter wurden an denselben Präparaten auch die Schmelzpunkte 206° und 210° gefunden, so daß Polymorphie vorzuliegen scheint.

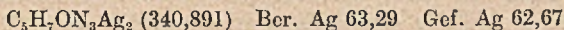


5-Isopropyl-1,2,4-triazolon-3

Aus Isobutyryl-semicarbazid. Das Semicarbazid wurde nicht isoliert, sondern nach der Darstellung alsbald in Lösung (10proz. KOH) verköcht. Aus 5,5 g wurden 3,17 g Triazolone (48% d. Th.) erhalten. Smp. 235,0°, sublimiert ab 140° in feinen Nadeln.

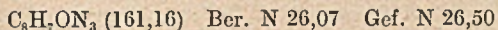


Silbersalz. Fällt als weißer, flockiger Niederschlag aus beim Versetzen einer Lösung von 0,5 g des Triazolons in 40 ccm heißem Wasser mit einer conc. ammoniakalischen Lösung von 1,5 g Silbernitrat in 10 ccm Wasser. In Salpetersäure und Ammoniak leicht löslich. Sehr schwer löslich in Wasser. In der Kälte fällt das Silbersalz gallertartig aus.



5-Phenyl-1,2,4-triazolon-3

Aus Cyan-benzhydrazid. Darstellung wie auf S. 197 beschrieben; Erhitzungsdauer $1\frac{1}{2}$ Stunden. Ausbeute etwa 15% d. Th. Schwer löslich in den gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln. Mäßig löslich in siedendem Benzol. Smp. 321°.



Silbersalz. Fällt als farbloser Niederschlag aus beim Eingießen einer siedend heißen Lösung von 0,16 g des Triazolons in 50 ccm verd. Ammoniak in eine heiße ammoniakalische Lösung von 0,7 g Silbernitrat in 10 ccm Wasser. Es wird bis zum

Verschwinden des überschüssigen Ammoniaks gekocht, der Niederschlag abfiltriert, mit heißem Wasser gewaschen und bei 110° getrocknet.

$C_8H_5ON_3Ag_2$ (374,90) Ber. Ag 57,53 Gef. Ag 57,07

Hexamethylen-glykol-bis-[β,β' -1,2,4-triazolon-(3)-yl-(5)-äthyläther]

Aus dem entsprechenden Semicarbazid ohne dessen Isolierung. Das Triazolin ist ein mikrokristallines, farbloses Pulver. Darstellung des Semicarbazids aus Hexamethylenglykol und Acryl-nitril, Verseifung des Kondensationsproduktes zum Äthylester und Umwandlung des Esters über das Hydrazid mit Kaliumcyanat in das Semicarbazid. Ausbeute etwa 40% d. Th. Nach dem Umkrystallisieren aus wenig Wasser schmilzt das Produkt bei 210—213°.

$C_{14}H_{24}O_4N_6$ (340,38) Ber. C 49,40 H 7,11 N 24,69
Gef. » 49,31 » 7,19 » 23,98

Das Silbersalz wurde wie üblich gewonnen; farbloser, amorpher Niederschlag.

$C_{14}H_{20}O_4N_6Ag_4$ (565,93) Ber. Ag 56,20 Gef. Ag 54,88.

Diphenyl-substituierte Formazane und Tetrazoliumsalze

Von *Dietrich Jerchel* und *Hans Fischer*

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für medizinische Forschung Heidelberg,
Institut für Chemie)

Mit 1 Figur im Text

(Eingegangen am 9. März 1949)

Das erstmalig von H. v. Pechmann und P. Runge¹⁾ dargestellte Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) erhielt durch seine Verwendungsmöglichkeit als Indikatorsubstanz für Reduktionsvorgänge bei den verschiedensten biologischen Objekten im Pflanzen-²⁾ und Tierreich³⁾ Bedeutung. Man versuchte, die Darstellungsvorschriften für das Triphenylformazan und für dessen Dehydrierung (Alkylnitrit¹⁾- und Bleitetraacetatverfahren⁴⁾ zu verbessern⁵⁾. Besondere Untersuchungen betref-

¹⁾ Ber. 27, 2920 (1894).

²⁾ D. Jerchel, *Fiat Review of Biochemistry* 39, 64; G. Lakon, *Ber. dtsh. bot. Ges.*, 60, 299, 434 (1942); H. J. Cottrell, *Nature* 159, 748 (1947); F. Flemion, *H. Pool Contrib. Boyce Thomson Inst.* 15, 243 (1948).

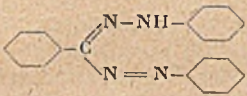
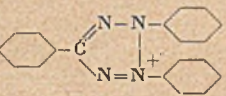
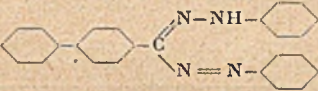
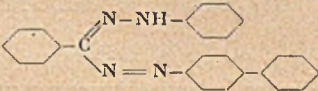
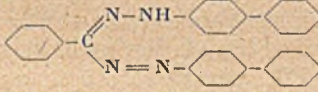
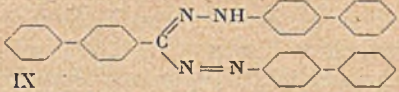
³⁾ M. A. Mattson, C. O. Jensen, R. A. Dutcher, *Science* 106, 294 (1947); F. H. Straus, N. D. Cheronis, E. Straus, *Science* 108, 113 (1948); W. Antopol, S. Glaubach, L. Goldman, *Public Health Reports* 63, 1231 (1948).

⁴⁾ R. Kuhn, D. Jerchel, *Ber.* 74, 941 (1941).

⁵⁾ M. A. Mattson, C. O. Jensen, R. A. Dutcher, *Am. Chem. Soc.* 70, 1284 (1948).

fen die Bestimmung des Reduktionspotentials⁶⁾, die Produkte der Licht- einwirkung auf TTC⁷⁾, die Veränderungen der Formazane im Licht⁸⁾, das analoge Verhalten von Triazoliumsalzen⁹⁾, die reduzierenden Fer- mentsysteme¹⁰⁾ u. a. Es ergab sich der Wunsch, weitere Tetrazolium- salze herzustellen, ihre Eigenschaften kennenzulernen und sie in Bezug auf ihre Brauchbarkeit als Indikatorensubstanzen zu prüfen. In der Tab. 1 sind die dargestellten Verbindungen (I bis X) zusammengefaßt.

Tab. 1. Formazane und Tetrazoliumsalze

<p>I</p>  <p>N,N',C-Triphenyl-formazan Smp. 172–174°</p>	<p>II</p>  <p>Cl⁻</p> <p>2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Smp. 256–258°</p>
<p>III</p>  <p>C-p-Diphenyl-N,N'-diphenyl-formazan Smp. 194–195°</p>	<p>V</p>  <p>C-Phenyl-N-p-diphenyl-N'-phenyl- formazan Smp. 167–168°</p>
<p>IV: Entsprechendes Tetrazoliumchlorid Smp. 220–222°</p>	<p>VI: Entsprechendes Tetrazoliumchlorid Smp. 242–243°</p>
<p>VII</p>  <p>C-Phenyl-N,N'-bis-p-diphenyl-formazan Smp. 172–173°</p>	<p>IX</p>  <p>N,N',C-Tris-p-diphenyl-formazan Smp. 214–216°</p>
<p>VIII: Entsprechendes Tetrazoliumchlorid Smp. 271–273°</p>	<p>X: Entsprechendes Tetrazoliumchlorid Smp. 220–221°</p>

Bequem und schnell läßt sich heute sehr reines Triphenylformazan (I) aus käuflichem TTC¹¹⁾ durch Reduktion z. B. mit Ascorbinsäure prä-

⁶⁾ D. Jerchel, W. Möhle Ber. 77, 591 (1944).

⁷⁾ J. Hausser, D. Jerchel, R. Kuhn, Ber. 82 (1949) im Druck.

⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ R. Kuhn, Kolloquium des Kaiser-Wilhelm-Institutes Heidelberg, 22. 11. 1948.

¹¹⁾ „Tetrazol“ der Farbwerke Bayer, Leverkusen.

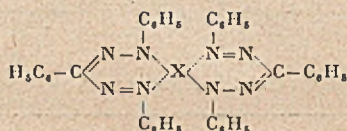
parativ gewinnen. Durch Umsetzung mit alkoholischer Kupfer-, Kobalt-, Nickelacetatlösung lassen sich in fast schwarz erscheinenden Kristallen außerordentlich schwer lösliche Komplexverbindungen darstellen.

Tab. 2. Triphenylformazan-Komplexverbindungen

$C_{35}H_{30}N_8Cu$ Schmp. 233—234°

$C_{35}H_{30}N_8Co$ Schmp. 147—150°

$C_{35}H_{30}N_8Ni$ Schmp. 292—294°



X = Cu, Co, Ni

Das nach der Dehydrierung mit Amylnitrit oder Bleitetraacetat anfallende Triphenyltetrazoliumchlorid (II) enthält meistens noch wechselnde Mengen eines Chloridchlorhydrates, das der wäßrigen Lösung saure Reaktion verleiht. Um reinstes TTC zu erhalten, kristallisiert man das Rohprodukt mehrmals aus Alkohol/Äther, besser noch aus Pyridin und anschließend aus Alkohol/Äther. Durch Schwerlöslichkeit und scharfe Schmelzpunkte zeichnen sich das Rhodanid, das Pikrat sowie die Quecksilberchloriddoppelverbindung des TTC (Tab. 3) aus.

Tab. 3. Schwerlösliche Triphenyltetrazoliumsalze.

Rhodanid	$C_{20}H_{15}N_3S$	Schmp. 134—136°
Pikrat	$C_{25}H_{17}N_7O_4$	Schmp. 186—188°
HgCl ₂ -Verbindung	$C_{19}H_{15}N_4Cl_3Hg$	Schmp. 235—237°

H.-J. Bielig¹²⁾ hat festgestellt, daß bei der Schardinger-Reaktion der Milch sich TTC an Stelle von Methyleneblau verwenden läßt.

In Angleichung an die Modellversuche zur Schardinger-Reaktion wie sie G. Bredig und F. Sommer¹³⁾ unter Verwendung von „anorganischem Ferment“ (Pt, Jr) mit Methyleneblau als Farbindikator beschrieben haben, wurden Versuche mit TTC angestellt. Fügt man zu einer wäßrigen, mit wenig NaOH und etwas 25proz. Formalin versetzten TTC-Lösung einen Tropfen kolloidale Palladiumlösung, dann tritt sofort Rotfärbung und Formazanabscheidung ein. Dies ist ein Versuch, der sich besonders zur Demonstration eignet, einfacher als derjenige mit Methyleneblau im luftleeren Thunbergrohrchen. An die Stelle des Formaldehyds kann u. a. auch Acetaldehyd oder Glukose treten.

Im folgenden wird die Synthese von p-Diphenyl-tetrazoliumsalzen beschrieben. Aus ihnen entstehen durch Reduktion — dies ist für ihre Verwendung als Indikatorensubstanzen von Interesse — außerordentlich tief gefärbte und schwer lösliche Formazane. Im Hinblick auf bio-

¹²⁾ Unveröffentlicht.

¹³⁾ Zschr. phys. Chem. 70, 34 (1910).

logische Anwendungen wurden Versuche über die Toxizität der beschriebenen Tetrazoliumsalze angestellt.

Die Diphenylformazane III, V, VII, IX wurden unter Verwendung von Pyridin/Methanol als Lösungsmittel bei der Kupplungsreaktion dargestellt. Der als Ausgangsmaterial für die Formazane III und IX benötigte p-Diphenylaldehyd wurde nach L. Gattermann¹⁴⁾ aus Diphenyl mit Aluminiumchlorid und Kupferchlorür gewonnen. Für die Formazane V, VII und IX benötigte man 4-Aminodiphenyl. Dieses wurde aus 4-Nitrodiphenyl durch Reduktion mit Wasserstoff und Raney-Nickel in guter Ausbeute erhalten. Das zur Darstellung von IX benötigte p-Hydrazinodiphenyl wurde aus dem Diazoniumsalz des 4-Aminodiphenyls durch Reduktion mit Natriumsulfit in Form seines Chlorhydrates dargestellt.

Die Diphenylformazane zeichnen sich durch sehr tiefe rote Farben aus. Von den isomeren Monodiphenylformazanen absorbiert V (Diphenyl an N) langwelliger als III (Diphenyl an C). Die Anhäufung von Diphenylresten bewirkt weitere Farbvertiefung (Farbe der Kristalle Tab. 4; Farbe der Lösung Fig. 1).

Tab. 4

III	tiefrote Kristalle
V	tiefrote Kristalle
VII	violettrote Kristalle
IX	metallglänzende, tiefdunkelrote Kristalle

Die Absorptionskurve (in Benzol) des Tri-diphenylformazans (IX) zeigt im Sichtbaren ein Maximum bei 540 m μ , das um 40 m μ langwelliger ist als dasjenige von Triphenylformazan (I, 500 m μ).

Die Dehydrierung der Formazane zu den entsprechenden Tetrazoliumsalzen (II, IV, VI, VIII, X) wurde mit Amylnitrit durchgeführt. Durch scharfe Schmelzpunkte (Punkte der beginnenden Zersetzung) sind diese Verbindungen charakterisiert. Mit der mehrfachen Diphenylsubstitution wird die Löslichkeit in Wasser geringer. Während TTC noch sehr leicht löslich ist, gelingt es schon vom Tetrazoliumsalz VI nur noch 0,1proz. wäßrige Lösungen herzustellen.

Für biologische Anwendungen war es von Interesse, orientierende Versuche über die Giftigkeit der verschiedenen Tetrazoliumsalze anzustellen. Dieser Aufgabe unterzog sich H. Querner vom Zoologischen Institut der Universität

Heidelberg. Die Grenzen der Verträglichkeit von TTC sowohl bei intraperitonealer als auch bei intravenöser Applikation gehen aus Tab. 5 hervor.

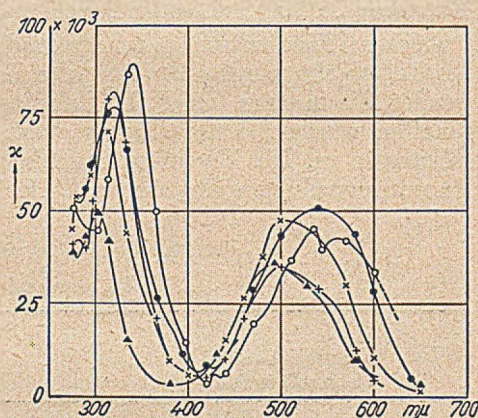


Fig. 1. Absorptionsspektren von Formazanen in Benzol

▼——▼ I; +——+ III; ×——× V;
●——● VII; ○——○ IX.

¹⁴⁾ A. 347, 381 (1906).

Tab. 5. Orientierende Bestimmung der Verträglichkeit von TTC für die Maus

TTC wurde in Ringer-Lösung gelöst, intraperitoneal wurden je 0,5 ccm, intravenös 0,1 und 0,2 ccm davon gespritzt.

mg TTC/g Maus	Zahl der Mäuse im Versuch	gestorben	Lebensdauer nach der Applikation
intraperitoneal			
0,005—0,010	8	1	90 Stunden
0,011—0,020	11	5	5—41 »
0,021—0,030	9	9	1—6 »
0,031—0,070	8	8	¼—1. Stunde
intravenös			
0,0005—0,005	3	0	0,009 nach 14 Std.
0,005—0,02	3	3	0,010 » 11 »
			0,020 » 2 »

Sie liegen bei etwa 20 γ pro Gramm Maus im ersten, bei etwa 5 γ pro Gramm Maus im zweiten Fall. Als Dauerdosis wurden über 21 Tage 6 γ pro g i. p. vertragen. Die mikroskopische Betrachtung der i. p. gespritzten, kurz nach dem Tode seziierten Tiere zeigte Ablagerung von Formazan im Fettgewebe der Bauchhöhle.

Auch an *Fischen* wurden orientierende Giftigkeitsversuche angestellt. Als Testobjekt wurden 20 Tage alte Barben (*Barbus conchoniuis*) verwendet, die in einer von F. E. Lehmann¹⁵⁾ angegebenen Zuchtlösung gehalten wurden; dieser Lösung setzte man das zu prüfende Tetrazoliumsalz zu. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 verzeichnet. Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich, daß die Toxicität mit der aromatischen

Tab. 6. Orientierende Giftigkeitsversuche an Fischen (*Barbus conchoniuis*)

Konz.	Methyl-diphenyl-tetrazoliumchlorid	Subst.:					X
		TTC	IV	VI	VIII		
Zahl der Tage, nach denen von 6 Fischen 4 tot waren							
0,1 %	4	1	2	—	—	—	nicht
0,05 %	4	2	2	—	4	4	genügend
0,01 %	8	5	2	*)	5	5	löslich

*) alle 6 Tiere starben

Kontrolle: Am 12. Tage lebten in den Kontrollansätzen ohne Substanz noch 4 oder mehr Tiere.

¹⁵⁾ Revue Suisse 55, 1 (1948): 50 Teile m/50 MgSO₄, 130 Teile m/50 CaCl₂, 16 Teile m/50 NaCl, 4 Teile m/50 KCl.

Substitution zunimmt. Methyl-diphenyl-tetrazoliumchlorid ist deutlich weniger toxisch als TTC und die untersuchten Diphenylhomologen. Interessant ist die Beobachtung, daß die letzteren (insbesondere VI) im Gegensatz zu TTC konservierend auf die toten Fischorganismen wirkten.

Wir danken Frau Dr. J. Hausser für die Messung der Absorptionsspektren sowie Herrn Dr. F. Richter vom Beilstein-Institut für seine Ratschläge zur Nomenklatur.

Beschreibung der Versuche¹⁶⁾

1. Metallkomplexe des Triphenylformazans

Aus käuflichem Triphenyltetrazoliumchlorid¹¹⁾ läßt sich reines Triphenylformazan (I) durch Reduktion mit Ascorbinsäure erhalten. Versetzt man eine Lösung von 500 mg TTC in 20 ccm Wasser mit einer Lösung von 300 mg Ascorbinsäure in 5 ccm Wasser, so scheidet sich sofort nach Zusatz einiger Tropfen 2nNaOH das Formazan aus. Nach einmaliger Kristallisation aus Aceton zeigte es den Schmp. 172—174°.

Fügt man zur methanolischen Lösung von Triphenylformazan eine alkoholische Lösung von Kupferacetat, so scheiden sich nach einigen Minuten nahezu schwarze Nadeln aus vom Schmp. 233—234°.

$C_{38}H_{30}N_8Cu$ (662,3)	Ber. N 16,92	Cu 9,64
	Gef. » 16,61	» 9,93

In gleicher Weise entstanden die Kobalt- und Nickel-Verbindungen des Triphenylformazans mit den Schmp. 147—150° und 292—294°.

$C_{38}H_{30}N_8Co$ (657,6)	Ber. C 69,40	H 4,60	N 17,04
	Gef. » 69,66	» 4,66	» 16,62

$C_{38}H_{30}N_8Ni$ (657,4)	Ber. » 69,43	» 4,60	» 17,05
	Gef. » 69,93	» 4,92	» 16,95

2. 2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid (II)

Um besonders reines Triphenyltetrazoliumchlorid zu erhalten, kristallisiert man das durch Dehydrierung aus dem Formazan erhaltene oder auch das käufliche Tetrazoliumsalz aus 25 Teilen Pyridin mit einigen Tropfen Äther und im Anschluß daran aus 15 Teilen Alkohol + 15 Teilen Äther, die man in kleinen Anteilen zugibt, um und erhält so rein weiße Kristallnadelchen vom Schmp. 265—258°.

Versetzt man eine alkoholische Lösung von reinstem TTC mit in Alkohol gelöstem Ammoniumrhodanid, fällt sofort das Rhodanid in gelben Nadelchen aus. Kristallisation aus Alkohol/Äther. Schmp. 134—136°.

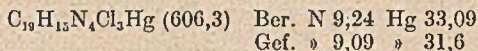
$C_{30}H_{15}N_5S$ (357,4)	Ber. N 19,60	Gef. N 20,02
----------------------------	--------------	--------------

Das in Wasser außerordentlich schwer lösliche Pikrat kristallisiert aus Äthanol in herrlichen gelben Nadeln vom Schmp. 186—188°.

$C_{22}H_{17}N_7O_7$ (527,4)	Ber. C 56,93	H 3,24	N 18,59
	Gef. » 56,87,	56,92	» 3,41, 3,42
			» 19,04

¹⁶⁾ Alle Schmelzpunkte wurden im Berl-Block durchgeführt.

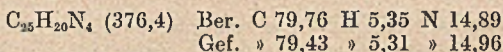
Versetzt man eine wäßrige Lösung von TTC in der Wärme mit gesättigter wäßriger *Sublimatlösung*, so scheidet sich das *Doppelsalz* in Kristallblättchen aus. Kristallisation aus 50proz. Alkohol führt zu analysenreiner Substanz vom Schmp. 235—237°.



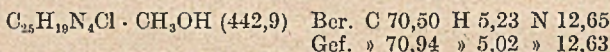
Gibt man zu einer Lösung von 1 mg TTC in 1 ccm Wasser 5 Tropfen 2n-NaOH, 2 Tropfen einer 1proz. kolloidalen Palladium-Lösung und 1 Tropfen 25proz. wäßriger Formalin-Lösung, dann tritt schlagartig Rotfärbung und Triphenylformazan als Niederschlag auf (vgl. S. 202).

3. *C-Diphenyl-N,N'-diphenyl-formazan* (III)

8,4 g p-Phenyl-benzaldehyd-phenylhydrazon¹⁴), gelöst in 20 ccm Pyridin und 400 ccm Methanol, werden bei 0° unter Zusatz von 17 g krist. Natriumacetat mit der Diazoniumsalzlösung aus 2,8 g Anilin unter gutem Rühren versetzt. Nach 6 Stunden kann man 10 g Formazan in fester Form gewinnen. Die Kristallisation erfolgt aus Aceton/Wasser; so erhält man 5 g nadelförmig kristallisierende, tiefrote Substanz vom Schmp. 194—195°.

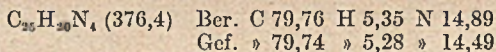


5-p-Diphenyl-2,3-diphenyl-tetrazoliumchlorid (IV). 2 g von III werden in 80 ccm Chloroform der Dehydrierung mit Amylnitrit unterworfen. Das Tetrazoliumsalz kristallisiert aus der Reaktionslösung in weißen Nadeln aus, die Kristallisation wird durch Ätherzusatz vervollständigt, aus Methanol/Äther kristallisiert erhält man 1 g zur Analyse. Schmp. 220—222°. Trocknung bei 110°/14 mm.

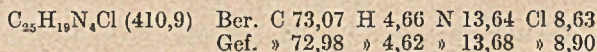


4. *C-Phenyl-N-p-diphenyl-N'-phenyl-formazan* (V)

Aus 9 g Benzaldehydphenylhydrazon und der Diazoniumsalzlösung aus 9,4 g p-Aminobiphenyl-hydrochlorid¹⁷) entstanden unter den üblichen Bedingungen 5 g reines Formazan aus Aceton/Wasser in tiefroten Nadeln vom Schmp. 167—168°¹⁸). Zum Unterschied wurde bei der Diazotierung das Natriumnitrit hier jedoch in fester Form auf einmal zugegeben, dadurch wurde ein einheitlicher Reaktionsverlauf gewährleistet.



2-Phenyl-3-p-diphenyl-5-phenyl-tetrazoliumchlorid (VI). Die Dehydrierung von 3 g des Formazans V mit Amylnitrit in Chloroform ergab 2 g Tetrazoliumsalz. Es wurde aus Alkohol/Äther kristallisiert und hatte den Schmp. 242—243°.



¹⁷) 4-Nitro-biphenyl: J. Elks, J. W. Haworth, D. H. Hey, Chem. Soc. 1940, 1284. Die Reduktion zu 4-Aminobiphenyl wurde mit Wasserstoff und Raney-Nickel bei Zimmertemperatur und 100 Atm. Druck in Autoklaven durchgeführt.

¹⁸) F. 174° aus Chloroform (Alkohol), E. Wedekind, A. 300, 253 (1897).

5. *C-Phenyl-N,N'-bis-p-diphenylformazan* (VII)

Das als Ausgangsmaterial benötigte *p-Hydrazino-biphenyl* wurde auf folgendem Wege erhalten: 20 g *p*-Biphenylamin-hydrochlorid wurden entsprechend der Vorschrift zur Darstellung von diazotiertem *p*-Nitroanilin zunächst mit 60 cem HCl (1,19) und 160 cem Wasser in einer Reibschale verrieben; sodann auf 0° abgekühlt und mit 10 g NaNO₂ diazotiert, überschüssiges Nitrit wurde mit Hornstoff zerstört. Die so erhaltene Diazoniumsalzlösung wird zu eisgekühlter Natriumsulfatlösung (aus 300 cem techn. Bisulfatlösung (d = 1,345) und 100 cem 2n-NaOH gegeben. Nach ½stündigem Stehen im Eisbad wurde 3 Std. auf dem Dampfbad erwärmt, dabei langsam mit 2n-NaOH alkalisch gemacht und mit 300 cem Methanol versetzt. Nach heißer Filtration und Ansäuern mit conc. HCl fällt das Hydrochlorid des Biphenylhydrazins als rein weiße Substanz aus. Ausbeute 6—10 g.

Durch Zusammenbringen von 2 g Biphenylhydrazin-hydrochlorid und 1 g Benzaldehyd in Äthylalkohol wurde nach Umkristallisation aus Alkohol/Wasser 1 g reine *Benzaldehyd-biphenylhydrazon* vom Schmp. 126° erhalten.

Die Kupplung von 0,95 g Hydrazon mit dem Diazoniumsalz aus 0,6 g Biphenylamin führte zu 0,2 g aus Aceton in violettroten Nadeln anfallendem Formazan vom Schmp. 172—173°.

C₃₁H₃₄N₄ (452,5) Ber. C 82,27 H 5,35 N 12,38
Gef. » 82,20 » 5,91 » 11,97

5-*Phenyl-2,3-bis-p-diphenyl-tetrazoliumchlorid* (VIII). Die Dehydrierung von 2,5 g des Formazans VII mit Amylnitrit in Chloroform mit anschließender Umkristallisation aus Alkohol/Äther ergab 0,8 g in Nadeln kristallisierendes Tetrazoliumsalz, eine reine, weiße Substanz vom Schmp. 271—273°.

C₃₁H₂₃N₄Cl (487) Ber. C 76,45 H 4,76 N 11,51
Gef. » 76,53 » 5,05 » 11,39

6. *N,N',C-Tris-p-diphenylformazan* (IX)

Aus 0,9 g *p*-Phenylbenzaldehyd und 1 g *p*-Hydrazinodiphenyl-hydrochlorid wurde 0,6 g des Hydrazons mit dem Schmp. 104—105° dargestellt.

1,7 g dieses Hydrazons, in 70 cem Pyridin gelöst, wurden mit dem aus 0,95 g Biphenylamin-hydrochlorid entstandenen Diazoniumsalz, gelöst in möglichst wenig Wasser, gekuppelt. So erhielt man nach Umkristallisation aus Aceton 0,6 g analysenreines Formazan (a) in metallisch glänzenden, schwarzroten Nadeln vom Schmp. 190—193°. Die Kristallisation aus Benzol führte zu einem analysenreinen Produkt (b) vom Schmp. 211—213°, aus Chloroform zu einem solchen (c) vom Schmp. 214—216°.

C₃₇H₃₈N₄ (528,61) Ber. C 84,05 H 5,34 N 10,60
Gef. (a) » 83,96 » 5,29 » 10,53
(b) » 83,99 » 5,44 » 10,34
(c) » 83,96 » 5,79 » 10,66

2,3,5-*Tris-p-diphenyl-Tetrazoliumchlorid* (X). Aus 1 g von IX erhielt man nach der Dehydrierung mit Amylnitrit und dreimaliger Kristallisation aus Alkohol/Äther 0,8 g schwach gelblich gefärbtes, in feinsten Nadeln kristallisierendes Tetrazoliumsalz vom Schmp. 220—221°. Die Trocknung wurde bei 140°/14 mm durchgeführt. Dieses Tetrazoliumsalz ist in Wasser schwer löslich.

C₃₇H₃₇N₄Cl · H₂O (581,1) Ber. C 76,47 H 5,03 N 9,64
Gef. » 76,34, 76,66, 76,42 » 5,49, 5,18, 4,92 » 9,47, 9,61

Über Diformazane und Ditetrazoliumsalsze

Von Dietrich Jerchel und Hans Fischer

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg,
Institut für Chemie)

Mit 1 Figur im Text.

(Eingegangen am 9. März 1949)

Dem Wunsche folgend, für biologische Zwecke Indikatorsubstanzen vom Typ des Triphenyltetrazoliumchlorids (TTC), jedoch mit andersartigen Substituenten, darzustellen, um damit vielleicht zu für den tierischen Organismus weniger toxischen und auch tiefer färbenden Substanzen zu kommen, wurde eine Reihe von Ditetrazoliumsalsen synthetisiert (Tab. 1). Die Erwartung, daß diese Tetrazoliumsalsen mit zwei quartären Stickstoffatomen im Molekül für eine biologische Anwendung noch genügend wasserlöslich sein würden, bestätigte sich. Die aus ihnen

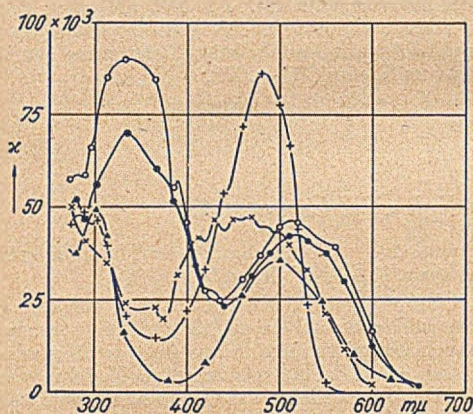


Fig. 1. Absorptionsspektren
von Diformazanen

+ — + I; × — × III; ● — ● V;
○ — ○ VII; ▲ — ▲ Triphenylformazan

entstehenden Diformazane zeichnen sich durch sehr tiefe rote Farbe und geringe Löslichkeit aus. Die Absorptionskurven sind auf Fig. 1 dargestellt. Auf Grund der genannten Eigenschaften ist mit einer besonderen Eignung als Indikatorsubstanz zu rechnen.

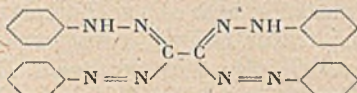
Die Darstellung des in diese Arbeit aufgenommenen 5,5'-Dimethyl-3,3'-diphenyl-2,2'-di-p-diphenylen-ditetrazoliumchlorids (X) wurde bereits von R. Kuhn und E. Ludolph¹⁾ beschrieben. Eine Verbindung des gleichen Typs, das 5,5',3,3'-Tetraphenyl-2,2'-di-p-diphenylen-ditetrazoliumchlorid,

benützte vor kurzem W. Antopol, S. Glaubach und L. Goldman²⁾ für Versuche an tierischem Gewebe, Bakterien und Zwiebelwurzelspitzen. Die letztgenannte Verbindung wird als weniger toxisch gegenüber tierischen Zellen im Vergleich mit TTC bezeichnet.

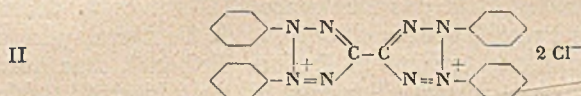
¹⁾ Diplomarbeit E. Ludolph, Universität Heidelberg (Nov. 1947).

²⁾ Public Health Reports 63, 1231 (1948).

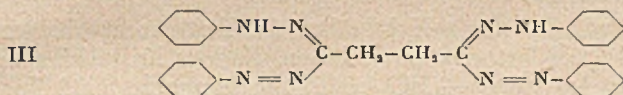
Tab. 1. Diformazane und Ditetrazoliumchloride³⁾



N,N',N'',N'''-Tetraphenyl-C,C'-diformazyl; Smp. 208—210°

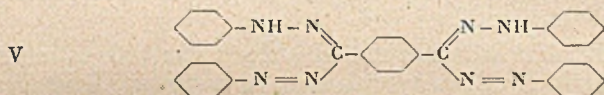


2,3,2',3'-Tetraphenyl-5,5'-ditetrazoliumchlorid; Smp. 265—268°.



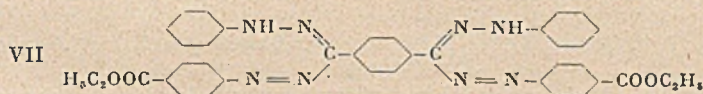
N,N',N'',N'''-Tetraphenyl-C,C'-äthylen-diformazan; Smp. 148—149°

IV. Ditetrazoliumchlorid; Smp. 262° (Rhodanid Smp. 168°)



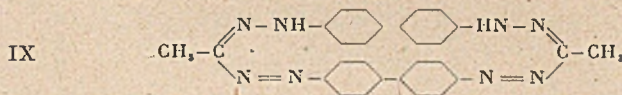
N,N',N'',N'''-Tetraphenyl-C,C'-p-phenylen-diformazan; Smp. 208—210°

VI. Ditetrazoliumchlorid; Smp. 273—274°



N,N''-Diphenyl-N',N'''-bis-(4-carbäthoxy-phenyl)-C,C'-p-phenylen-diformazan;
Smp. 224—225°

VIII. Ditetrazoliumchlorid; Smp. 322°



C,C'-Dimethyl-N,N''-diphenyl-N',N'''-p-diphenylen-diformazan; Smp. 197°

X. Ditetrazoliumchlorid; Smp. 243°

³⁾ Die für die Tetrazoliumsalsze angegebenen Schmelzpunkte geben gleichzeitig die Temperatur der beginnenden Zersetzung an.

Aus Lävylinsäure und diazotiertem Anilin erhielten wir das einfachste, bereits bekannte Diformazan⁴⁾; über sein schön kristallisierendes Hydrochlorid wurde es gereinigt. Zur Dehydrierung wurde das Hydrochlorid mit Bleitetraacetat behandelt. Aus dem erhaltenen Ditetrazoliumsals II ließ sich (selbst bei 140°/14 mm) 1 Mol HCl und 1 Mol H₂O nicht entfernen.

Der als Ausgangsmaterial für das Diformazan III benötigte Succinaldehyd wurde aus Pyrrol⁵⁾ gewonnen und in sein Diphenylhydrazon übergeführt. Die Kupplung erfolgte in Pyridin/Methanol. Das durch Dehydrierung entstehende Ditetrazoliumsals IV hielt bis 150° 3 Mol. Kristallwasser fest, das aus dem Dichlorid erhaltene Dirhodanid zeichnete sich durch besondere Schwerlöslichkeit aus.

Terephtalaldehyd, der aus p-Xylol über die Tetrabromverbindung dargestellt wurde,⁶⁾ liefert das in violetten Nadeln kristallisierende Diformazan V. Mit Amylnitrit + HCl erhält man daraus das mit 2 Molen H₂O kristallisierende Ditetrazoliumsals VI.

Vom Diphenylhydrazon des gleichen Dialdehyds ausgehend, führte die Kupplung mit dem Diazoniumsals des p-Aminobenzoessäureesters zum Diformazan VII, welches sich durch Dehydrierung in das dazugehörige Ditetrazoliumsals VIII überführen ließ.

Das Formazan IX erhielt man durch Kupplung von tetrazotiertem Benzidin mit Benzaldehyddiphenylhydrazon in tiefroten Kristallen. Die Dehydrierung erfolgte mit Amylnitrit und führte zu dem mit 2 Mol H₂O kristallisierenden Ditetrazoliumsals X²⁾.

An Fischen (*Barbus conchoniuis*, etwa 20 Tage alt) führte Herr H. Querner am Zoologischen Institut der Universität Heidelberg orien-

Tab. 3. Vergleichende Toxicitätsuntersuchungen am Fisch *Barbus conchoniuis*

Als Lösungsmittel für die zu prüfenden Substanzen wurde das Salzgemisch nach F. E. Lehmann⁷⁾ verwendet.

Konz.	Substanz:			
	TTC	IV	VI	VIII
	Zahl der Tage, nach denen von 6 Fischen 4 tot waren			
0,1 %	1	9	1	2
0,05 %	2	9	5	7
0,01 %	5	10	7	9

Kontrolle: Am 12. Tage lebten in den Kontrollansätzen ohne Substanz noch 4 oder mehr Tiere.

⁴⁾ E. Bamberger, J. Müller, J. pr. 64, 215 (1901).

⁵⁾ C. Harries, Ber. 35, 1183 (1902). — R. Willstätter, W. Heubner, Ber. 40, 3871 (1907).

⁶⁾ P. Ruggli, E. Girod, Helv. 27, 1468 (1944); Org. Synth. 20, 92 (1940).

⁷⁾ Revue Suisse 55, 1 (1948).

tierende Untersuchungen über die Verträglichkeit der Tetrazoliumverbindungen durch (Tab. 3).

Diese Untersuchungen geben einen Hinweis darauf, daß das sich vom Succindialdehyd ableitende Ditetrazoliumsals IV hier die *ungiftigste* Substanz ist. Dann folgen die Substanzen VIII, VI; TTC ist toxischer als alle untersuchten Ditetrazoliumsalse.

Sowohl TTC als auch die Tetrazoliumsalse VIII und X wurden von den Herren H.-J. Bielig und H. Querner⁸⁾ an der Biologischen Anstalt Helgoland, z. Z. List/Sylt, für biologische Beobachtungen an *Hydrozoen*, *Anthozoen*, *Anneliden* (Entwicklungsstadien bis Trochophora-Larve), *Mollusken* und *Seeigeln* (Entwicklungsstadien bis zum Pluteus) verwendet. Die Versuche wurden in Meerwasser angestellt. Auch an diesen Objekten konnte man eine Abnahme der Giftigkeit von TTC und X über die mitgeprüften Äthyl- und Methylphenyltetrazoliumchloride zur Substanz VIII, dem Derivat des Terephthaldialdehyds, feststellen. So entwickelten sich z. B. befruchtete Seeigeleier in vergleichbaren Zeiten bis zur annähernd normalen Gastrula nur noch in 0,01proz. TTC- bzw. 0,05proz. X-Lösung, aber sogar in 0,2proz. VIII-Lösung.

Wir danken Frau Dr. J. Hausser für die Messung von Absorptionsspektren und Herrn Dr. F. Richter vom Beilstein-Institut für seine Ratschläge zur Nomenklatur der beschriebenen Verbindungen.

Beschreibung der Versuche⁹⁾

1. *N,N',N'',N'''-Tetraphenyl-C,C'-diformazyl* (I)

Der Vorschrift von E. Bamberger und J. Müller⁴⁾ folgend, wurden aus 58 g Lävulinsäure und 47 g Anilin 44 g rohes Diformazyl dargestellt. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Chloroform/Äthylalkohol erhielt man 1,5 g der reinen Verbindung in metallisch glänzenden Blättchen vom Smp. 208—210°.

Kocht man 22 g des Rohproduktes mit 1 l Wasser, filtriert heiß, nimmt den Rückstand in Äthylalkohol auf und gibt 250 cem Salzsäure 1 : 1 hinzu, so kristallisieren 11 g des Hydrochlorids in schönen, roten Blättchen vom Zersp. 245° aus.

2,3,2',3'-Tetraphenyl-5,5'-ditetrazoliumchlorid (II). 1,2 g Tetraphenyl-diformazylhydrochlorid wurden in 70 cem Chloroform aufgeschlämmt. Hierzu wurden auf einmal 2,2 g Bleitetracetat hinzugefügt. Nach einigen Minuten war die Lösung farblos. Das Chloroform wurde i. V. abgedampft, der Rückstand in 30 cem Äthylalkohol autgenommen, das Blei durch Einleiten von HCl-Gas als Chlorid ausgefällt, abfiltriert und etwa zur Hälfte eingedampft. Nach Versetzen mit 80 cem abs. Äther scheidet sich das Ditetrazoliumsals ab. Zweimalige Kristallisation aus Alkohol/Äther führte zu 200 mg eines Präparates vom Smp. 265—268°. Die Trocknung zur Analyse erfolgte bei 140°/14 mm.

$C_{26}H_{20}N_8Cl_2 \cdot 2HCl \cdot H_2O$ (606,36) Ber. C 51,50 H 3,99 N 18,48
Gef. » 51,69 » 4,07 » 18,27

2. *N,N',N'',N'''-Tetraphenyl-C,C'-äthylen-diformazan* (III)

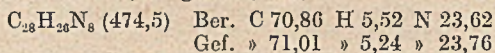
Succindialdehyd konnte nach C. Harries⁵⁾ und R. Willstätter⁵⁾ als Diphenylhydrazon vom Smp. 108—109° aus Pyrrol gewonnen werden. Auf Isolierung des freien Aldehyds wurde verzichtet. Die nach der Spaltung des Aldoxims erhaltene

⁸⁾ Zschr. f. Naturforsch. **3b** (1949) im Druck.

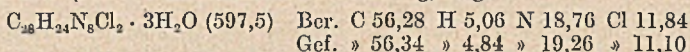
⁹⁾ Alle Schmelzpunkte wurden im Berl.-Block bestimmt.

wäßrige Dialdehydlösung wurde mit Phenylhydrazin in Alkohol versetzt. Nach Erhitzen bis zum Sieden und Wiedererkalten scheidet sich das Dihydrazon in Kristallnadeln aus. Aus 33,5 g Pyrrol wurden 8 g des analysenreinen Dihydrazons erhalten.

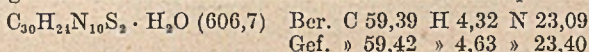
1,3 g Succindialdehyd-diphenylhydrazon und 2,5 g krist. Natriumacetat wurden in 100 ccm Methanol unter Zusatz von 15 ccm Pyridin gelöst. Zu dieser auf -5° abgekühlten Lösung wurde das in wenig Wasser gelöste Diazoniumchlorid aus 0,9 g Anilin unter guter Rührung und Kühlung zugegeben. Nach Versetzen mit 100 ccm Wasser fiel das Diformazan als roter Niederschlag aus. 1,5 g in Nadeln kristallisiertes Diformazan vom Smp. 148—149° ergaben sich nach zweimaliger Umkristallisation aus Äthanol/Essigester (4 : 1).



Ditetrazoliumchlorid IV. 1,2 g Diformazan III wurden der Dehydrierung mit 2,2 g Bleitetraacetat in Chloroform unterworfen. Wir erhielten 0,3 g des mit 3 Molen Wasser kristallisierenden Tetrazoliumsalzes, das nach Trocknung bei $110^{\circ}/14$ mm den Smp. 262° (bei 150° Kristallwasserentbindung) zeigte.

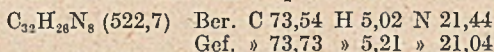


Versetzte man die wäßrige Lösung des Chlorids mit einer Lösung von Ammoniumrhodanid in Wasser, dann fiel das *Dirhodanid* in Form eines gelbbraunen Niederschlages aus. Aus Alkohol kristallisiert hatte es den Smp. 165° .

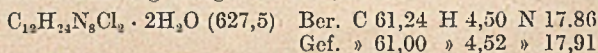


3. N,N',N'',N'''-Tetraphenyl-C,C'-p-phenylen-diformazan (V)

Aus 10 g Terephtalaldehyd-di-phenylhydrazon⁶⁾ vom Smp. $263-265^{\circ}$ wurden in 700 ccm Pyridin und 200 ccm Äthanol nach Zugabe der berechneten Menge an diazotiertem Anilin 15 g rohes Diformazan erhalten. Nach verlustreicher Kristallisation aus Pyridin/Wasser und Benzol/Benzin erhält man das analysenreine Formazan in violettroten Kristallnadeln vom Smp. $208-210^{\circ}$.



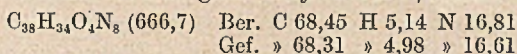
Ditetrazoliumchlorid VI. Die Dehydrierung des unter 3 beschriebenen Diformazans wurde mittels Amylnitrit + HCl vorgenommen. Dazu wurden 1 g davon in 100 ccm Chloroform gelöst und mit 1 g Amylnitrit versetzt. Nach kurzem Darüberleiten von HCl-Gas entfärbte sich die Lösung. Nach einigen Stunden dampft man das Chloroform bis auf 30 ccm ab und versetzt mit trockenem Äther. Dabei fällt das Ditetrazoliumsalz aus. Dreimalige Kristallisation aus Äthanol/Äther führte zu 700 mg analysenreinem, weißem, kristallisierendem Ditetrazoliumsalz vom Smp. $273-274^{\circ}$. Die Trocknung erfolgte bei $140^{\circ}/14$ mm.



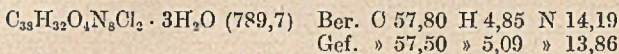
4. N,N''-Diphenyl-N',N'''-bis(4-carbäthoxy-phenyl)-C,C'-p-phenylen-diformazan (VII)

3,1 g Teraphtalaldehyd-diphenylhydrazon wurden in 400 ccm Pyridin und 200 ccm Methanol unter Zusatz von krist. Natriumacetat mit der berechneten Menge an diazotiertem p-Aminobenzoesäure-äthylester gekuppelt. Nach der Kristallisation

des Rohproduktes aus Pyridin/Wasser konnten 3 g reines Formazan vom Smp. 224—225° erhalten werden. Trocknung zur Analyse bei 140°/14 mm.

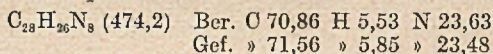


Ditetrazoliumchlorid VIII. Unter Verwendung von Amylnitrit + HCl als Dehydrierungsmittel erhielt man aus VII dieses Ditetrazoliumsals aus Alkohol in würfelförmlichen, weißen Krystallen vom Smp. 322°. Zur Analyse wurde bei 140°/14 mm getrocknet.

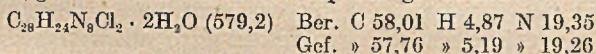


5. *C,C'*-Dimethyl-*N,N''*-diphenyl-*N',N'''*-*p*-diphenylen-di-formazan²) (IX)

Aus 26 g Acetaldehyd-phenylhydrazon, die in 350 ccm Alkohol und 200 ccm Pyridin gelöst waren, und dem in Wasser gelösten Tetrazoliumsals aus 16 g Benzidin konnte das Di-formazan als tiefrote, teilkristallisierte Substanz erhalten werden. Durch mehrmalige Extraktion mit Alkohol wurden Nebenprodukte entfernt. Die Ausfällung aus acetonsicher Lösung mit Wasser führte zu 17 g des Di-formazans, tiefrote Kristalle vom Smp. 197°.



*Ditetrazoliumchlorid*²) X. 13,7 g des Di-formazans IX wurden in Chloroform mit Amylnitrit + HCl dehydriert. Nach Behandlung der alkoholischen Lösung mit Tierkohle und Versetzen mit Äther wurden 12 g des Ditetrazoliumsals in hygroskopischen, gelblichen Kristallen von Smp. 245° gewonnen.



Über den aeroben Phosphatbedarf der Hefe

II. Die Umsetzung von Butylalkohol und Butyraldehyd

Von Feodor Lynen und Helmut Holzer¹⁾

(Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Laboratoriums
der Universität München)

Mit 9 Figuren im Text

(Eingegangen am 14. Februar 1949)²⁾

Wie der eine von uns im Jahre 1940 beobachtete³⁾, ist die *aerobe Oxydation von Äthylalkohol* in der Hefe mit einer *Phosphorylierung* verknüpft, die sich darin zu erkennen gibt, daß während des Atmungsprozesses der größte Teil des anorganischen Phosphats der Zelle in or-

¹⁾ Dissertation München 1948.

²⁾ Über die vorliegende Untersuchung wurde am 1. Oktober 1948 auf der Tagung der Physiologischen Chemiker zu Frankfurt (Main) vorgetragen.

³⁾ F. Lynen, A. 546, 120 (1941).

ganische Bindung übergeht und erst wieder in Freiheit gesetzt wird, wenn das Substrat verbraucht ist. Um diese Erscheinung zu deuten, wurde die Annahme gemacht, daß in den Atmungsprozeß Dehydrierungsvorgänge eingeschaltet sind, die unter *Aufnahme anorganischen Phosphats* zu phosphorylierten Oxydationsprodukten führen, analog der von O. Warburg und W. Christian⁴⁾ aufgeklärten Dehydrierung des d-Glycerinaldehyd-3-phosphats zum d-Glycerinsäure-1,3-diphosphat. Die phosphorylierten Produkte, deren Phosphatgruppe im Sinne der Einteilung F. Lipmanns⁵⁾ als „energiereiches Phosphat“ vorliegt, übertragen diese dann in enzymatischer Reaktion zunächst auf Adenosindiphosphat und von dort auf die verschiedensten Stoffe in der Zelle^{5,6)}.

Da die vollständige Verbrennung des Alkohols, die über die Stufe der Essigsäure⁷⁾ und daran anschließend über die Glieder des „Citronensäure-Cyclus“ erfolgt⁸⁾, viele Zwischenprodukte einschließt, war zunächst eine genaue Lokalisierung des Phosphorylierungsvorganges an bestimmten Punkten der Reaktionskette nicht möglich. Immerhin ließ sich durch Versuche mit zugesetzter Essigsäure doch schon beweisen, daß bei ihrem Abbau, d. h. im Citronensäure-Cyclus Phosphat gebunden wird und damit eine Brücke schlagen zu den Untersuchungen von H. Kalckar⁹⁾, V. A. Belitzer¹⁰⁾, I. Banga, S. Ochoa und R. Peters¹¹⁾ sowie S. P. Colowick, M. Welch und C. F. Cori¹²⁾, die an tierischen Geweben zum gleichen Ergebnis führten und seither beträchtlich ausgebaut wurden. Ob daneben auch bei der einleitenden Oxydation des Alkohols zur Essigsäure Phosphat gebunden wird, mußte zunächst ungeklärt bleiben, wengleich auch die Vermutung ausgesprochen wurde, daß die Dehydrierung des Acetaldehyds unter Beteiligung von Phosphorsäure verläuft.

Um diese Lücke zu schließen, nahmen wir das Studium der *aeroben Dehydrierung* von *Butylalkohol* in Angriff. Während beim Äthylalkohol die schnelle Oxydation der Essigsäure den ersten Dehydrierungsakt verdeckt und auch beim Propylalkohol die zunächst gebildete Propionsäure in geringem Umfang weiter verändert wird¹³⁾, macht beim Butylalkohol der Abbau auf der Stufe der Buttersäure halt. Mithin bietet sich hier die

⁴⁾ Bio. Z. 303, 40 (1939).

⁵⁾ Adv. Enzym. 1, 99 (1941).

⁶⁾ F. Lynen, Naturw. 30, 398 (1942), vgl. auch H. M. Kalckar, Chem. Rev. 28, 71 (1941).

⁷⁾ Durch Versuche mit deuterierter Essigsäure ließ sich beweisen, daß normale Essigsäure intermediär auftritt (unveröffentlicht).

⁸⁾ F. Lynen und Mitarb., A. 541, 203 (1939); 552, 270 (1942); 554, 40 (1943); 558, 47 (1947); vgl. auch S. Weinhouse und R. H. Millington, Am. 69, 3089 (1947).

⁹⁾ Enzym. 2, 47 (1937); 5, 365 (1939).

¹⁰⁾ Enzym. 6, 1 (1939); Biochimia 4, 519 (1939) Zit. nach C. 1941, I, 1313.

¹¹⁾ Bioch. Jl. 33, 1980 (1939).

¹²⁾ Jl. biol. chem. 133, 359, 641 (1940), 137, 343 (1940).

¹³⁾ O. L. Mayrhofer, Diplom-Arbeit München 1948.

Möglichkeit, die beiden Dehydrierungsstufen: Alkohol—Aldehyd und Aldehyd—Säure isoliert, ohne die komplizierten Folgereaktionen zu studieren. Und da bei der Oxydation des Butylalkohols in der Hefe dieselben Fermente beteiligt sind wie bei jener der niederen Homologen¹⁴⁾, lassen sich die Ergebnisse ohne weiteres übertragen.

I. Versuche mit Butylalkohol

Um zunächst die optimalen Versuchsbedingungen zu erkennen, wurde Butylalkohol verschiedener Konzentration mit Hefe umgesetzt. Dabei wird nach Gleichung (1) pro Molekel Butylalkohol *eine* Molekel Sauerstoff verbraucht.



Bei Konzentrationen bis $m/66$ ist die Umsatzgeschwindigkeit gleich; höhere Konzentrationen hemmen (Fig. 1).

Hier ließ sich auch die Frage experimentell entscheiden, ob durch den Alkohol die Selbstatmung der Hefe unterbunden wird oder nicht. Denn bei der Dehydrierung des Alkohols nach Gleichung (1) entsteht keine Kohlensäure; wird also CO_2 gefunden, dann kann es nur aus der Selbstatmung stammen. Wir fanden, unter Verwendung der für solche Zwecke hervorragend geeigneten Reaktionsgefäße nach Dixon-Keilin¹⁵⁾, daß die Oxydation des Butylalkohols die Selbstatmung zwar nicht zum Verschwinden bringt, aber immerhin auf 40% des normalen Wertes einschränkt.

Nachdem wir uns noch überzeugt hatten, daß die Geschwindigkeit der Butylalkohol-Dehydrierung in Phosphat- und Bicarbonat-Puffer bei p_{H} 7,4 die gleiche ist, wurden in letzterem die Änderungen im säurelöslichen Phosphat der Hefezelle verfolgt. Das Ergebnis zeigt Fig. 2.

Das anorganische Phosphat nimmt in den ersten Minuten kräftig ab — bis auf etwa 40% des Ausgangswertes —, das leicht-hydrolysierbare Phosphat dagegen, zu welchem Adenosindi- und -triphosphat gehören, zeigt einen vorübergehenden Anstieg, während im schwer-hydrolysier-

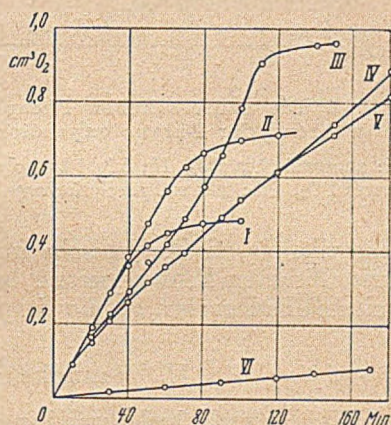


Fig. 1.
Hefe mit Butylalkohol aerob

40 mg verarmte Hefe in 2 ccm $\frac{m}{15}$ Phosphat, p_{H} 6,8; $T = 25^\circ$. Butylalkohol: I: $\frac{m}{100}$, II: $\frac{m}{66}$, III: $\frac{m}{50}$, IV: $\frac{m}{25}$, V: $\frac{m}{12,5}$, VI: ohne. Für die Oxydation des zugesetzten Alkohols zur Butter-säure werden 448, 678, 896, 1792 bzw. 3584 $\text{mm}^3 \text{O}_2$ benötigt.

¹⁴⁾ H. von Euler, E. Adler und H. Hellström, H. 241, 239 (1936).

¹⁵⁾ M. Dixon, Manometric Methods, Cambridge (1934).

baren Phosphat keine wesentlichen Änderungen in Erscheinung treten. Es sind also hier genau dieselben Veränderungen wahrzunehmen wie bei der Oxydation der Glucose, des Äthylalkohols und der Essigsäure oder bei der alkoholischen Gärung: anorganisches Phosphat wird gebunden und über leicht-hydrolysierbares Phosphat dann im wesentlichen in säure-

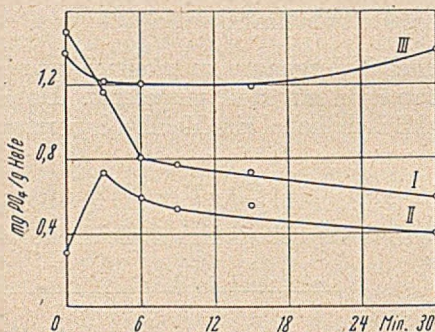


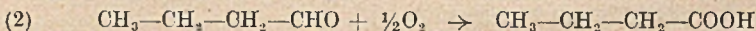
Fig. 2. Die säurelöslichen Phosphate während der Butanoloxydation.

I: anorganisches PO₄, II: leicht-hydrolysierbares PO₄, III: schwer-hydrolysierbares PO₄.

unlösliche Verbindungen übergeführt. Damit ist aber eindeutig bewiesen, daß auch die aerobe Dehydrierung eines Alkohols zur Säure in der Hefe mit einer Phosphorylierung verknüpft ist. Wäre nun im Sinne der eingangs erwähnten Vorstellung diese Phosphatbindung ausschließlich an eine dehydrierende Veränderung des Substrats gebunden, so käme hierfür nur die Dehydrierung des Aldehyds zur Säure in Frage. Denn die Dehydrierung des Alkohols zum Aldehyd, wobei Co-dehydrase I den Wasserstoff übernimmt, verläuft ohne Phosphorylierung, wie die Versuche von E. Negelein und H. I. Wulff¹⁶⁾ am kristallisierten Fermentprotein beweisen und dann auch thermodynamische Überlegungen, auf die wir später noch zu sprechen kommen werden.

II. Versuche mit Butyraldehyd

Wird Butyraldehyd durch Sauerstoff zu Buttersäure dehydriert, dann wird pro Molekel Aldehyd eine halbe Molekel Sauerstoff verbraucht.



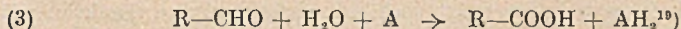
Wie Figur 3 zeigt, wird diese Sauerstoffmenge im Endeffekt tatsächlich aufgenommen. Die Reaktion erfolgt aber nicht linear, sondern in zwei Phasen. Einer ersten Phase mit geringer Atmung, die je nach der zugesetzten Aldehydmenge 35, 70 oder 140 Minuten anhält, folgt eine zweite Phase schnellen Sauerstoffverbrauchs, die zur vollständigen Oxydation führt. Diese eigenartige Kinetik ließ sich nun dahingehend aufklären, daß zunächst, obwohl Sauerstoff zugegen ist, Butyraldehyd durch Dismutation zu Säure und Alkohol verändert wird. Diese Phase ohne Sauerstoffverbrauch dauert an, solange noch nachweisbare Mengen Aldehyd in der Lösung vorhanden sind. Erst nach seinem Verschwinden tritt

¹⁶⁾ Bio. Z. 293, 351 (1937).

dann der Sauerstoff auf den Plan und wird zur Dehydrierung des in der Dismutationsphase gebildeten Butylalkohols, wie in den Versuchen des vorhergehenden Abschnitts, rasch verbraucht.

Diese Beobachtung am Butyraldehyd steht im Einklang mit gleichartigen Befunden K. Heickens¹⁷⁾ über den aeroben Umsatz von Acetaldehyd durch Hefe. Wir sehen aber im Gegensatz zu Heicken darin keinen Beweis, daß Aldehyde von Hefe ausschließlich durch Dismutation im Sinne C. Neubergs, unter der Wirkung einer spezifischen Mutase, wie etwa des tierischen Ferments¹⁸⁾, verändert werden. Vielmehr möchten wir einer Vorstellung den Vorzug geben, die zwischen Oxydations- und Mutase-Reaktion keinen prinzipiellen Unterschied macht und damit dem allgemeinen Mechanismus der biologischen Oxydo-reduktion, wie er sich heute darbietet, besser gerecht wird.

Demnach erfolgt in beiden Fällen zunächst Dehydrierung des Aldehyds zur Säure, die am spezifischen Ferment durch Reaktion mit der — heute noch unbekannt — Wirkungsgruppe zustande kommt. Wird die reduzierte Wirkungsgruppe mit AH_2 bezeichnet, dann läßt sich die stöchiometrische Zwischenreaktion am Ferment wie folgt formulieren:



Erst jetzt scheiden sich beide Wege; während beim *Dismutationsvorgang* der Wasserstoff von AH_2 auf Codehydrase I (Pyr⁺)²⁰⁾ und von dort am Protein der Alkohol-Dehydrase auf eine zweite Molekel *Aldehyd* übertragen wird, erfolgt beim *Oxydationsvorgang* die Dehydrierung von AH_2 durch molekularen *Sauerstoff*, wobei die Glieder der wasserstoff- bzw. elektronenübertragenden Fermentkette aus gelbem Ferment, Cytochrom und Cytochrom-Oxydase die Reaktion vermitteln.

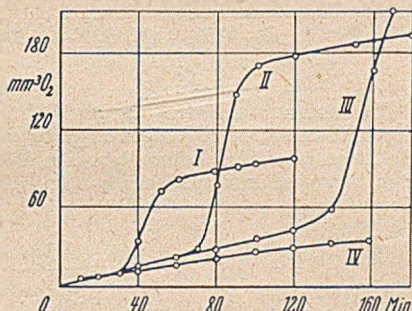


Fig. 3. Hefe mit Butyraldehyd aerob

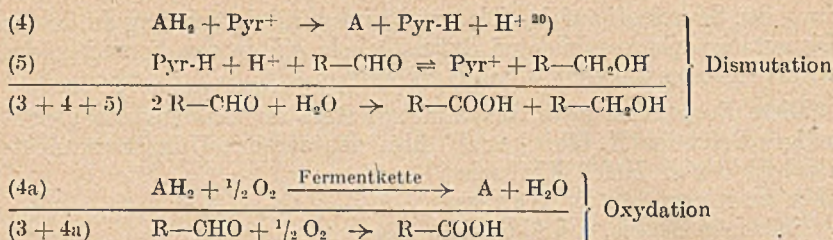
80 mg verarmte Hefe in 2 ccm $\frac{m}{15}$ -Phosphat, Γ_{II} 7,4; $T = 25^\circ$. Butyraldehyd I: $\frac{m}{300}$; II: $\frac{m}{150}$; III: $\frac{m}{75}$; IV: ohne. Für die Oxydation des zugesetzten Aldehyds zur Buttersäure werden 75, 150 bzw. 300 mm^3 O_2 benötigt.

¹⁷⁾ A. 534, 68 (1938), vgl. auch die Arbeiten C. Neubergs und seiner Schule über Aldehyd-Dismutation an Essigbakterien, Naturw. 13, 993 (1925).

¹⁸⁾ M. Dixon, Erg. Enzymf. 8, 217 (1939). Vgl. dagegen Nachtrag S. 228.

¹⁹⁾ Dabei ist die Annahme gemacht worden, daß die Dehydrierung am Hydrat des Aldehyds einsetzt. F. Lipmann [Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 7, 248 (1939)] weist aber mit Recht darauf hin, daß bei derartigen Reaktionen in der Zelle häufig das Wasser durch Phosphorsäure ersetzt wird. Dies könnte auch hier der Fall sein.

²⁰⁾ Dabei wurde die Annahme gemacht, daß A nicht identisch ist mit Codehydrase I. Andernfalls wären Gleichungen (3) und (4) entsprechend miteinander zu kombinieren.



Um nun zu verstehen, warum auch in Gegenwart von Sauerstoff der Aldehyd durch Dismutation und nicht oxydativ verändert wird, müssen wir die umkehrbare Reaktion (5) näher betrachten. Die Messungen am reinen Protein der Alkohol-Dehydroase haben nämlich ergeben, daß die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion

$$K' = \frac{c_{\text{Alkohol}} \cdot c_{\text{Pyr}^+} \text{ }^{21)}}{c_{\text{Aldehyd}} \cdot c_{\text{Pyr-H}}}$$

im physiologischen p_{H} -Bereich Werte von 800 bis 8000 annimmt^{14,16)}, das Gleichgewicht also ganz überwiegend auf der Seite von Alkohol und Codehydrase liegt. Dennach muß in Gegenwart von Aldehyd in der Zelle gebildete Hydro-Codehydrase, z. B. bei den Reaktionen (3) und (4), mit Aldehyd in Reaktion treten, und zwar momentan, da das Ferment in der Hefe, wie es die Gärkraft kundtut, in hoher Wirksamkeit vorliegt. Folglich können die Fermentkette und damit auch der Sauerstoff nicht oder nur in untergeordnetem Maß zum Zuge kommen; der Aldehyd wird mit hin auch unter aeroben Bedingungen dismutiert.

Ist jedoch der Aldehyd verbraucht bzw. nur noch in jener verschwindend kleinen Konzentration zugegen, die im Gleichgewichtszustand dem nun vorhandenen, während der Dismutation gebildeten Alkohol entspricht, dann tritt Umschaltung zur Atmung ein. Die Hydro-Codehydrase-Konzentration in der Zelle steigt an, die Fermentkette tritt in Funktion und der Wasserstoff aus Reaktion (3) und auch aus Reaktion (5), die ja nunmehr von rechts nach links abläuft, wird zur Reaktion mit dem Sauerstoff gebracht.

Ein gewichtiges Argument für die Realität unsrer Deutung sehen wir in der Tatsache, daß aus Butyraldehyd sowohl unter aeroben, vor allem aber unter anaeroben Bedingungen *mehr* Butylalkohol gebildet wird als Buttersäure (Tab. 1), während unter der Wirkung einer Mutase beide in gleicher Menge hätten entstehen müssen. Der Aldehyd war eben ganz allgemein als Wasserstoffacceptor in Funktion getreten und hatte auch Wasserstoff aufgenommen, der durch Dehydrierung von Reservestoffen der Hefe verfügbar wird.

²¹⁾ von Euler und Mitarb. haben nicht berücksichtigt, daß an der Gleichgewichtsreaktion (5) auch H^+ teilnimmt und den Wert der Konstanten K' ausgesprochen p_{H} -abhängig gefunden. Führt man nachträglich die H^+ -Konzentration ein, dann ergibt sich aus den Messungen im Stockholmer Laboratorium eine neue Konstante $K = \frac{K'}{c_{\text{H}^+}}$, die nahezu p_{H} -unabhängig ist und einen Wert von etwa $2,5 \cdot 10^{11}$ besitzt.

Aus der Tabelle wird noch ein zweites Phänomen deutlich. Abgesehen davon, daß unter Luft nahezu doppelt soviel Buttersäure entsteht wie unter Stickstoff, ist aerob auch die Ausbeute an Butylalkohol gegenüber dem anaeroben Versuch um etwa 20% erhöht. Diese Erscheinung, die in gleicher Weise schon vor vielen Jahren beim Umsatz von Acetaldehyd durch Hefe²²⁾ oder Essigbakterien²³⁾ beobachtet wurde, kann nur durch

Tab. 1. 3,2 g verarmte Hefe in 80 ccm 0,08 m-Phosphat, p_{H_2} 7,4, mit 0,7 mMol Butyraldehyd; $T = 25^\circ$; Versuchsdauer 40 Minuten

Gasphase	mMol Butyraldehyd verbr.	mMol Buttersäure gef.	mMol Butylalkohol gef.
Luft	0,457	0,180	0,211
Stickstoff	0,318	0,093	0,185
Luft	0,348	0,136	0,184
Stickstoff	0,200	0,079	0,146

eine direkte Wirkung des Sauerstoffs auf die Aldehyd-Dehydrierung im Sinne einer Aktivierung gedeutet werden. Damit wird unter aeroben Bedingungen nicht nur mehr Buttersäure gebildet, sondern auch gleichzeitig mehr Wasserstoff zur Reduktion des Aldehyds verfügbar.

Im übrigen muß Butyraldehyd aber auch direkt *hemmend* ins Atmungssystem eingreifen. Dies geht aus Atmungsversuchen mit Acetat hervor, dessen Abbau durch Butyraldehyd deutlich verlangsamt wird, und auch aus den Versuchen mit Butyraldehyd allein, deren Ergebnis in Fig. 3 schon wiedergegeben wurde. Wenn wir z. B. Kurve II herausgreifen, dann liegt nach 100 Minuten, wie der Sauerstoffverbrauch belegt, der gesamte eingesetzte Aldehyd in oxydierter Form als Säure vor. Davon wurden während der Dismutationsphase, d. h. während 70 Minuten, im Maximum die Hälfte (vgl. Tab. 1) gebildet, der Rest in den folgenden 30 Minuten. Dies bedeutet aber, daß in der zweiten Phase, während der Oxydation des Butylalkohols, wo Butyraldehyd nur intermediär in kleiner Konzentration auftritt und sofort weiter dehydriert wird, diese Dehydrierung mehr als doppelt so schnell erfolgt wie während der Dismutationsphase.

Der Grad dieser Hemmung, die schon bei sehr kleinen Aldehydkonzentrationen in Erscheinung treten muß, ist oberhalb m/300-Butyraldehyd von der Konzentration unabhängig. Denn nur dann kann man verstehen, warum bei einer Erhöhung der Aldehydmenge auf das Doppelte oder Vierfache die Dismutationsphase auf das Doppelte oder Vierfache verlängert wird (Fig. 3).

Als wir im Anschluß an diese kinetischen Messungen die *säurelöslichen Phosphate* der Hefe während des Umsatzes von *Butyraldehyd* analy-

²²⁾ H. Wieland und B. Claren, A. 492, 208 (1932).

²³⁾ F. Windisch, Bio. Z. 250, 466 (1932).

sierten, mußten wir zu unsrer Überraschung feststellen, daß weder anaerob noch aerob Veränderungen²⁴⁾ eintreten (Tab. 2).

Tab. 2

Min.	0	5	10	15	20	30	
anorg. PO ₄	1,50	1,47	1,40	1,44	—	1,47	} aerob
leicht-hydr.	0,55	0,48	0,51	0,47	—	0,58	
schwer-hydr.	0,63	—	0,69	0,61	—	—	
anorg. PO ₄	1,80	—	1,82	—	1,80	—	} anaerob
leicht-hydr.	0,49	—	0,51	—	0,46	—	
schwer-hydr.	0,47	—	0,47	—	0,50	—	

Nun ist aber dieses Ergebnis nicht direkt mit jenem beim Umsatz von Butylalkohol zu vergleichen, denn die entscheidende Reaktion, die Dehydrierung des Aldehyds zur Säure, erfolgt in den Versuchen mit Aldehyd, vor allem unter anaeroben Bedingungen, wesentlich langsamer als in jenen mit Alkohol. Aus diesem Grunde wurde noch die *anaerobe Dismutation des Acetaldehyds*²⁵⁾ in die Untersuchung mit einbezogen, der von

Tab. 3

	μMol Säure/Std. pro 80 mg Hefe	In % des Butanol-Umsatzes
Butylalkohol	20,0	100
Butyraldehyd aerob	7,1	36
„ anaerob	3,3	17
Acetaldehyd anaerob	7,6	38

Tab. 4

Min.	0	15	27
anorg. PO ₄ ²⁴⁾	1,60	1,51	1,63
leicht-hydr. ²⁶⁾	0,41	0,30	0,34
schwer-hydr. ²⁶⁾	0,51	0,46	0,40

Hefe unter den gleichen Bedingungen etwa doppelt so schnell umgesetzt wird wie das höhere Homologe. Wie aus Tab. 3 zu ersehen ist, welcher Mittelwerte der Säurebildung aus mehreren manometrischen Messungen zugrunde liegen, erreicht damit der anaerobe Umsatz des Acetaldehyds zwar die aerobe Umsatzgröße des Butyraldehyds, aber bei weitem nicht jene des Alkohols. Es ist daher nicht verwunderlich, daß auch hier keine Änderungen im Phosphatgehalt der Hefe eintreten (Tab. 4).

²⁴⁾ Schwankungsbreite der Bestimmungen bei anorg. PO₄ ± 6%.

²⁵⁾ Komplikationen, wie sie beim aeroben Umsatz des Acetaldehyds infolge Oxydation der zunächst gebildeten Essigsäure entstünden, sind anaerob nicht zu befürchten, da unter Stickstoff Essigsäure quantitativ liegenbleibt²²⁾.

²⁶⁾ Die relativ größeren Schwankungen in diesen Fraktionen sind darauf zurückzuführen, daß es sich hier um Differenzwerte handelt.

Will man daher die Dismutation von Butyr- oder Acetaldehyd und die Oxydation des Butylalkohols unter wirklich vergleichbaren Bedingungen studieren, dann bleibt keine andere Möglichkeit, als durch Zugabe von Atmungsgiften, wie Blausäure oder Schwefelwasserstoff, den Alkoholumsatz künstlich auf mindestens 35 % zu erniedrigen.

III. Versuche mit Butylalkohol und Schwermetallgiften

Wie O. Warburg²⁷⁾ entdeckte, beruht die Giftwirkung der Blausäure bei der Atmung auf einer Reaktion mit Cytochrom-Oxydase. Durch Cyanid wird damit die Fermentkette der Atmung an ihrem dem Sauerstoff zugewandten Ende außer Funktion gesetzt und damit auch die Reaktion am anderen Ende, die Dehydrierung der biologischen Substrate, verhindert. Wie sich Blausäure in unserem Fall auf die Oxydation des Butylalkohols auswirkt, zeigt Figur 4.

In den ersten 10–20 Minuten ist eine mit der Cyanidkonzentration parallel gehende Hemmung der Atmung festzustellen, dann findet langsam eine Enthemmung statt. Dieser Effekt, den bereits H. Wieland und A. Bertho²⁸⁾ bei der aeroben Dehydrierung von Äthylalkohol durch Essigbakterien beobachteten und aufklären konnten, ist auf die Bildung eines Cyanhydrins aus Blausäure und dem bei der Dehydrierung intermediär auftretenden Aldehyd zurückzuführen. Durch die Bindung der Blausäure als Cyanhydrin wird sie der Komplexbindung mit dem Eisen der Oxydase entzogen, so daß die Oxydation des Alkohols mit zunehmender Geschwindigkeit ablaufen kann.

Bemerkenswert ist dabei, daß die Enthemmung nicht bis zum Erreichen der unbeeinflussten Atmungsgröße, ohne Blausäure, fortschreitet, sondern bei einem niedrigeren Wert stehenbleibt. Während Wieland und Bertho diesen Hemmungsrest auf eine Wirkung des Cyanhydrins zurückführten, möchten wir eher glauben, daß er der freien Blausäure zukommt, die in der wäßrigen Lösung im Gleichgewicht mit freiem Aldehyd und Cyanhydrin steht. Darüber soll aber erst in einer demnächst erscheinenden Veröffentlichung eingehender berichtet werden.

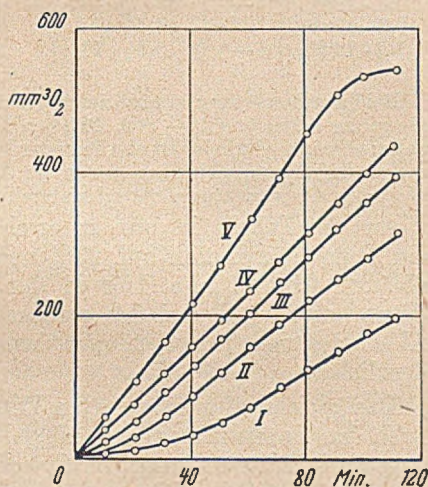


Fig. 4. Butylalkohol und Blausäure
40 mg verarmte Hefe in 2ccm $\frac{m}{15}$ -Phosphat,
pH 7,4, $\frac{m}{75}$ -Butylalkohol; T = 25°.
Blausäure I: $4 \cdot 10^{-4}$ m, II: $2 \cdot 10^{-4}$ m,
III: $1 \cdot 10^{-4}$ m, IV: $0,5 \cdot 10^{-4}$ m, V: ohne.

²⁷⁾ O. Warburg, Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Berlin 1946.

²⁸⁾ A. 467, 95 (1928).

Als daher die Phosphorylierung in Gegenwart von Blausäure gemessen wurde, mußte in einem Kontrollansatz gleicher Zusammensetzung die Atmung laufend verfolgt und das Ausmaß der Hemmung durch Interpolation auf den Zeitpunkt der Phosphatanalyse ermittelt werden. Die auf diese Weise gefundenen Werte sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Tab. 5

HCN	mm ³ O ₂ verbraucht			PO ₄ -Best. nach Min.	Mittlere Atmung mm ³ O ₂ / 10 Min.	in % d. ungeh. Wertes	anorg. PO ₄ Abnahme in % d. Anf. Wertes
	0-10'	10-20'	20-30'				
0	84	84	84	10	84	100	55
0,5 · 10 ⁻⁴	—	49	—	15	49	58	46
0,8 · 10 ⁻⁴	32,5	43,5	—	10	37,9	45	35
1,5 · 10 ⁻⁴	—	16,8	21,8	20	19,3	23	21

Bei ihrer Bewertung ist noch zu berücksichtigen, daß die mittlere Hemmung über die ganze Versuchszeit — vom Zugeben des Alkohols bis zum Abstoppen mit Trichloressigsäure — größer ist als die in der Tabelle aufgeführten Hemmungswerte. Da zudem die Phosphatbindung hinter der Atmung nachhinkt (vgl. Fig. 2), sind die Werte für die prozentuale Phosphatabnahme als Minimalwerte zu betrachten.

Aus der Tabelle ist nun zu ersehen, daß sogar bei einer Hemmung der Butanoloxydation auf 23% noch eine kräftige Phosphorylierung abläuft. Obwohl also hier in der Zeiteinheit beträchtlich weniger Säure entsteht als bei der aeroben bzw. anaeroben Dismutation der Aldehyde (vgl. Tab. 3), nimmt das anorganische Phosphat in der Zelle deutlich ab.

Das gleiche Ergebnis hatten Versuche mit *Schwefelwasserstoff*, der nach den Untersuchungen E. Negeleins²⁹⁾ in kleinen Konzentrationen genau wie Blausäure nur die Cytochrom-Oxydase vergiftet. In unsern Versuchen war Schwefelwasserstoff der Blausäure sogar überlegen, da er in wäßriger Lösung bei neutraler Reaktion nicht in merklichem Umfang mit Acet- oder Butyraldehyd reagiert und somit bei Versuchen mit Butylalkohol auch während längerer Versuchszeiten *keine* Enthemmung eintritt (Fig. 5). Infolge dieser Indifferenz gegenüber Aldehyd war es möglich, nicht nur die Oxydation des Alkohols, sondern auch die anaerobe Dismutation von Acetaldehyd in Gegenwart des Gifts zu studieren³⁰⁾. Das Ergebnis dieser Versuche, bei welchen die Säurebildung manometrisch, durch Austreiben von CO₂ aus Bicarbonat gemessen wurde, ist in Fig. 5 wiedergegeben. Dieselbe Sulfidkonzentration, welche die aerobe Dehydrierung des Alkohols um 74% hemmt, ist auf die Geschwindigkeit des Dismutationsvorgangs ohne Einfluß und auch bei Zugabe der doppelten Menge ist noch kein Effekt zu sehen.

²⁹⁾ Bio. Z. 165, 203 (1925).

³⁰⁾ Wegen der sofort eintretenden Cyanhydrinbildung wären analoge Versuche mit Blausäure sinnlos gewesen.

Wir überzeugten uns am Ende des Versuchs, daß während der Dismutation des Acetaldehyds H_2S nicht verbraucht worden war. Denn es wäre ja denkbar, daß Aldehyd und H_2S mit Thio-aldehyd im Gleichgewicht stehen, der dann „phytochemisch“ zum Mercaptan reduziert würde, wie dies C. Neuberg und F. F. Nord²¹⁾ beobachteten.

Im übrigen können O_2 -Verbrauch und CO_2 -Bildung ohne weiteres miteinander verglichen werden, da beim Atmungsvorgang aus Alkohol pro Molekel O_2 eine Molekel Säure gebildet wird und bei der Dismutation jede Molekel Säure eine Molekel CO_2 in Freiheit setzt. Man kann daher die Geschwindigkeit der Säurebildung direkt aus der Figur ablesen und wird erkennen, daß in Gegenwart von $5 \cdot 10^{-6} m-Na_2S$ aerob aus Butanol weniger Säure entsteht als anaerob aus Aldehyd.

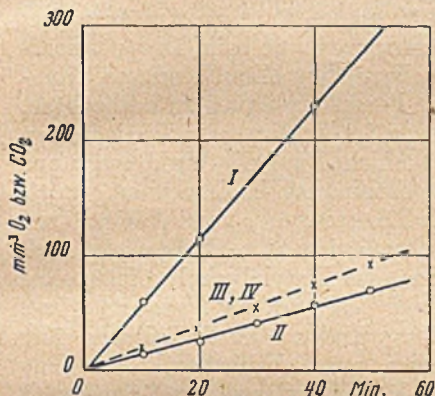


Fig. 5. Butylalkohol und Acetaldehyd mit Schwefelwasserstoff

40 mg verarmte Hefe in 2 ccm $\frac{m}{15}$ -Phosphat + $\frac{m}{75}$ Butylalkohol (I, II) bzw. $\frac{m}{33}$ Bicarbonat + $\frac{m}{50}$ Acetaldehyd (III, IV); Gas: Luft (I, II) bzw. N_2-CO_2 (III, IV); p_H 7,4; $T = 25^\circ$. Na_2S zugesetzt II, III: 0,1 μ Mol, IV: 0,2 μ Mol.

Die Phosphatanalysen aus mehreren Versuchsreihen sind in Tab. 6 zusammengestellt. Die Größe der Hemmung wurde wiederum in einem Kontrollansatz manometrisch ermittelt. Zum Unterschied gegenüber den Versuchen mit Blausäure wurde hier aber parallel dazu, in Gegen-

Tab. 6

H_2S (Mole/l)	Butylalkohol aerob			Acetaldehyd anaerob	
	Atmungsgröße (in % d. ungeh. Wertes)	mg anorg. PO_4 /g Hefe 0 Min.	10 Min.	mg anorg. PO_4 /g Hefe 0 Min.	10 Min.
$1,2 \cdot 10^{-6}$	15	2,00 (100)	1,70 (85)	2,38 (100)	2,31 (97)
$0,8 \cdot 10^{-6}$	25,5	1,87 (100)	1,00 (54)	2,06 (100)	2,12 (103)

Die Zahlen in Klammern bedeuten anorg. PO_4 in % des Anfangswertes, vor Zugabe des Substrats. Der Unterschied im Anfangswert bei Alkohol und Acetaldehyd ist auf die Verschiedenheit der Gasphase zurückzuführen; aerob besteht auch nach dem Verarmen der Hefe noch eine Selbstatmung, während anaerob eine Selbstgärung nicht mehr in Erscheinung tritt²²⁾. Die Selbstatmung ist aber andererseits mit einer Phosphorylierung verknüpft³⁾.

²¹⁾ B. 47, 2264 (1919); 52, 1207 (1919).

wart der gleichen Sulfidkonzentration, auch noch die Dismutation des Acetaldehyds analytisch verfolgt und damit Atmungs- und Dismutationsvorgang unter *genau gleichen Bedingungen* studiert. Dies erschien uns notwendig, um den Einwand zu entkräften, daß die zugesetzten Gifte außer über die Cytochrom-Oxydase auch noch direkt in die Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge der Hefezelle eingreifen könnten.

Aber auch diese Versuche mit Schwefelwasserstoff ergaben nichts Neues; obwohl Sulfid eine kräftige Hemmung der Alkoholoxydation hervorrief, in einem Fall sogar um 85%, nahm in allen Ansätzen das anorganische Phosphat deutlich ab. Hingegen war beim Dismutationsvorgang, wie in den vorhergehenden Versuchen ohne Hemmstoff nunmehr auch in seiner Gegenwart, keine Phosphorylierung zu beobachten. Es dürfte somit erwiesen sein, daß unter den vorliegenden Bedingungen bei der Wasserstoffübertragung vom Aldehyd auf die Wirkungsgruppe der Aldehyd-Dehydrase keine Phosphatbindung in Erscheinung tritt. Nachdem aber auch die Wasserstoffübertragung vom Alkohol auf Codehydrase I ohne Beteiligung anorganischen Phosphats erfolgt (vgl. S. 216), kann die bei der Oxydation des Butylalkohols eintretende *Phosphorylierung nur im Zusammenhang stehen mit der Wasserstoff- bzw. Elektronenübertragung von den Wirkungsgruppen der Dehydrasen über die Fermentkette zum Sauerstoff*. Denn unsere Versuche haben ohne Zweifel gezeigt, daß immer dann eine Phosphorylierung in Erscheinung tritt, wenn Sauerstoff verbraucht wird; dies war der Fall beim aeroben Umsatz von Butylalkohol, auch in Gegenwart der Hemmstoffe. Dagegen unterliegt das anorganische Phosphat beim Dismutationsvorgang, wie der aeroben Reaktion mit Butyraldehyd oder der anaeroben Reaktion mit Acetaldehyd, bei welchem der Wasserstoff anstatt auf Sauerstoff auf Aldehyd übertragen wird, keiner Veränderung.

Ob aber nicht doch auch bei der Dehydrierung des Aldehyds Phosphorsäure gebunden wird, darüber läßt sich noch keine endgültige Aussage machen. Zwar ist sicher, daß eine solche Beteiligung von Phosphorsäure sich nicht auf die Konzentration des anorganischen Phosphats auswirkt. Aber nachdem in Hefe *Acetylphosphat* schnell gespalten wird, wie aus Versuchen mit zerriebener oder durch Einfrieren plasmolyzierter Hefe hervorgeht, muß die Bildung von Acetylphosphat bei der Acetaldehyd-Dehydrierung ohne Änderung des Niveaus an anorganischem Phosphat als möglich erachtet werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß E. R. Stadtman und H. A. Barker³¹⁾ bei der Dehydrierung von Acetaldehyd mittels zellfreier Extrakte aus *Clostridium kluyveri* Acetylphosphat nachweisen konnten.

IV. Diskussion

Die russischen Biochemiker V. H. Belitzer und E. T. Tsibakova¹⁰⁾ haben als erste die Vermutung ausgesprochen, daß die aerobe Phosphorylierung zum Teil mit dem Wasserstoff- bzw. Elektronentransport

³¹⁾ Jl. biol. chem. 174, 1039 (1948).

von den Dehydrasen zum Sauerstoff im Zusammenhang steht. Denn sie hatten beobachtet, daß im Herzmuskelbrei bei Gegenwart von Kreatin die Aufnahme von einer Molekel Sauerstoff verknüpft ist mit der Veresterung von 4 bis 7 Molekeln anorganischen Phosphats zu Kreatinphosphat. Ein derartig hoher Wirkungsgrad wäre aber nicht zu erklären, wenn nur die primäre Dehydrierung der Substrate am spezifischen Ferment unter Phosphatbindung abliefe. Unabhängig davon kam S. Ochoa³²⁾ auf Grund ähnlicher Beobachtungen zum gleichen Ergebnis; auch er fand bei Verwendung von Brenztraubensäure oder α -Ketoglutarensäure als Substrat, daß pro Dehydrierungsvorgang, d. h. für je 2 Wasserstoffatome, die vom Substrat abgelöst und auf Sauerstoff übertragen werden, drei Phosphatbindungen entstehen³³⁾. War somit zwar indirekt erschlossen, daß an der Fermentkette Phosphat gebunden werden muß, so fehlte bis vor kurzem noch der direkte experimentelle Nachweis. Ein Versuch S. Ochoas, diese Phosphorylierung bei der enzymatischen Oxydation von Hydro-Codehydrase nachzuweisen, hatte sogar ein negatives Ergebnis.

In einer kurzen Notiz aus letzter Zeit, die uns erst nach Abschluß der experimentellen Arbeit zur Kenntnis kam, gelang nun M. Friedkin und A. L. Lehninger³⁴⁾ unter Verwendung einer Enzymfraktion aus Rattenleber der überzeugende Nachweis, daß bei der aeroben Oxydation von Hydro-Codehydrase mit P³² markiertes anorganisches Phosphat in organische Bindung übergeführt wird. Unsere Versuche stellen eine Bestätigung der amerikanischen Arbeit dar und beweisen darüber hinaus, daß auch in der Hefe die aerobe Phosphorylierung zum Teil in der Fermentkette zustande kommt.

Um etwas über die Reaktionsschritte zu erfahren, an denen in unserem Atmungssystem prinzipiell „energiereiche Phosphatbindungen“ — mit einer potentiellen Energie von etwa 11 Kcal — erzeugt werden könnten, sollen die Potentiale der einzelnen Oxydo-Reduktionssysteme (Tab. 7) betrachtet werden.

Wollte man eine exakte Aussage über die freie Reaktionsenergie (ΔF) eines Vorganges machen, der sich aus der Potentialdifferenz (ΔE) der beiden am Vorgang beteiligten Systeme berechnen läßt, dann wäre es natürlich notwendig, das jeweilige Verhältnis von oxydierter zu reduzierter Stufe zu kennen und daraus die effektiven Potentialwerte zu berechnen. Aber zu einer ersten Orientierung ist es durchaus günstig, mit den Normalpotentialen E'_0 selbst zu rechnen, wie es in den beiden letzten Spalten der Tabelle geschehen ist. Dies um so eher, als die Glieder der Fermentkette selbst im stationären Zustand der Atmung überwiegend in der oxydierten Form vorliegen und somit das Verhältnis: c_{ox}/c_{red} durchwegs in der gleichen Richtung verschoben ist. Der größte Fehler dürfte mithin am oberen und unteren Ende der Potentialskala (Tab. 7) auftreten, wo die biologischen Substrate bzw. der Sauerstoff in Reaktion treten. Aber auch hier ist der Fehler nicht bedeutend. Denn für die freie

³²⁾ J. l. biol. chem. 138, 751 (1941).

³³⁾ J. l. biol. chem. 151, 493 (1943); 155, 87 (1944).

³⁴⁾ J. l. biol. chem. 174, 757 (1948).

Energie der Reaktion zwischen Cytochrom c und Sauerstoff unter Konzentrationsbedingungen, wie sie in der Zelle herrschen könnten (O_2 -Druck: 0,01 atm.; Cytochrom $e_{ox} : Cytochrom e_{red} = 10 : 1$) errechnet sich ein ΔF -Wert von $-10,4$ Kcal, während aus der Differenz der Normalpotentiale ein Wert von $-12,5$ Kcal resultiert.

Tab. 7

	E'_0 ³⁵⁾ in Volt (p_H 7,0)	ΔE	ΔF ³⁶⁾ (in Kcal)	
Acetaldehyd(+ H_2O) \rightleftharpoons Essigsäure ³⁷⁾	-0,47	} -0,31 -0,19 +0,12 -0,22	-14 -9 +5 -10	} $n=2$ ³⁸⁾
Äthylalkohol \rightleftharpoons Acetaldehyd ³⁷⁾	-0,16			
Hydro-Codehydrase \rightleftharpoons Codehydrase	-0,28			
Leuko-Flavinferment \rightleftharpoons Flavinferment	-0,06			
$Fe^{++} \rightleftharpoons Fe^{+++}$ {	Cytochrom b	-0,04	-0,32	} $n=1$ ³⁸⁾
	Cytochrom c	+0,27	-0,02	
	Cytochrom a	+0,29		
	Cytochrom-Oxydase	?		
$2 OH^- \rightleftharpoons O_2$	+0,81			-12

Zunächst kann man aus der Tabelle entnehmen, daß die Dismutationsreaktion des Aldehyds zu Säure und Alkohol eine stark „exergonische“ ³⁸⁾ Reaktion ist, d. h. mit einer starken Abnahme der freien Energie verbunden ist, und somit vom thermodynamischen Gesichtspunkt aus mit der Erzeugung einer energiereichen Phosphatbindung, im Endeffekt der Bildung von Adenosintriphosphat, verknüpft sein könnte ³⁹⁾. Dagegen ist aus dem gleichen Grund eine solche Koppelung bei der Wasserstoffverschiebung von Alkohol auf Codehydrase unmöglich. In der Fermentkette selbst könnten energiereiche Phosphatbindungen erzeugen die Wasserstoff- bzw. Elektronenübertragungen von den Codehydrasen auf die gelben Fermente, von dort auf Cytochrom c, wie auch von Cytochrom b auf Cytochrom c, und schließlich die Reaktion zwischen Cytochrom-Oxydase und Sauerstoff, wenn man die Annahme machen darf, daß das

³⁵⁾ Die Potentialwerte wurden der ausgezeichneten Übersicht H. M. Kalckars ⁵⁾ entnommen.

³⁶⁾ Freie Energie: $\Delta F = \Delta E \cdot n \cdot 23,074$ (vgl. W. Franke in E. Bamann und K. Myrbäck, Methoden der Fermentforschung, S. 847. Leipzig 1941).

³⁷⁾ Die Redoxpotentiale der Systeme Butylalkohol \rightleftharpoons Butyraldehyd und Butyraldehyd \rightleftharpoons Buttersäure dürften nicht sehr verschieden sein von jenen der niederen Homologen, wie aus den Daten W. Frankes (Tab. Biol. Per. 5, 124 (1935)) über die verschiedenen Bildungsenergien hervorgeht.

³⁸⁾ C. D. Coryell, Science 92, 380 (1940).

³⁹⁾ Es sei darauf hingewiesen, daß ja der Oxydoreduktionsvorgang der alkoholischen Gärung eine gemischte Dismutation zwischen zwei verschiedenen Aldehyden ist und dabei tatsächlich eine energiereiche Acylphosphat-Bindung aufgebaut wird.

Normalpotential der Oxydase nicht sehr verschieden ist von jenem des Cytochrom a, mit dem es auch im Absorptionsspektrum große Verwandtschaft zeigt⁴⁰).

An welcher Stelle das anorganische Phosphat in der Fermentkette tatsächlich eingreift, muß weiterer Forschung vorbehalten bleiben. Eines kann man aber schon heute mit einiger Bestimmtheit sagen, nämlich, daß zwischen Cytochrom b und O₂ zumindest *eine* energiereiche Phosphatbindung erzeugt wird. Wie in verschiedenen Laboratorien gefunden wurde^{10, 12, 32}), ist im Gewebsbrei die aerobe Dehydrierung der Bernsteinsäure zur Fumarsäure mit einer Phosphorylierung verknüpft. Nachdem sich die Argumente verdichten, die für eine Identität der Succinodehydrase mit Cytochrom b sprechen⁴¹), letzteres aber in seinem Redox-Potential $E'_0 = -0,04$ Volt nicht wesentlich verschieden ist vom Potential des Succinat-Fumarat-Systems $E'_0 = 0$ Volt, kann bei der stöchiometrischen Reaktion zwischen Succinat und Dehydrase unmöglich eine energiereiche Phosphatbindung aufgebaut werden, sondern erst bei der Elektronenüberführung vom Cytochrom b weiter zum Sauerstoff.

Die Art und Weise, wie die energiereichen Phosphatbindungen beim Elektronentransport über die Fermentkette zustande kommen, ist noch unbekannt. Immerhin scheint es eine Besonderheit dieser Phosphorylierung zu sein, daß die Elektronen auch transportiert werden können, ohne daß Phosphat gebunden wird; denn sowohl V. H. Belitzer¹⁰) wie auch M. Friedkin und A. L. Lehninger³¹) haben beobachtet, daß diese Phosphorylierung bei der Behandlung des Enzymsystems mit Wasser oder beim Altern verschwindet, ohne daß dabei die Atmungsfähigkeit des Systems beeinträchtigt würde. Darin unterscheidet sich diese „Fermentketten-Phosphorylierung“ prinzipiell von der Phosphatbindung, die beim primären Dehydrierungsakt am Substrat eintreten kann. Denn diese Dehydrierungsreaktionen, wie etwa die Dehydrierung des Phosphoglycerinaldehyds am Ferment der Hefe⁴) oder jene der Brenztraubensäure am Ferment der Milchsäurebakterien⁴²), kommen überhaupt nicht zustande, wenn kein Phosphat⁴³) zugegen ist. Da die aerobe Phosphorylierung auch diese Vorgänge mit einschließt, erscheint es uns zweckmäßig, sie mit „Substrat-Phosphorylierung“ zu bezeichnen, um sie damit von der „Fermentketten-Phosphorylierung“ abzugrenzen.

Um die Existenz und die Labilität der „Fermentketten-Phosphorylierung“ zu erklären, könnte man daran denken, daß hier das Eiweiß der Fermente im Spiele ist. Unter diesem Gesichtspunkt wird man daher

⁴⁰) D. Keilin und E. F. Hartree, Proc. Roy. Soc. B. 127, 167 (1939).

⁴¹) S. J. Bach, M. Dixon und L. G. Zervas, Bioch. J., 40, 229 (1946). — E. G. Ball, C. B. Anfinsen und O. Cooper, J. biol. ch. 168, 257 (1947). — E. C. Slater, Nature 161, 405 (1948).

⁴²) F. Lipmann, Enzym. 4, 65 (1937).

⁴³) oder Arsenat.

einer Vorstellung von W. Schmitt⁴¹⁾ Beachtung schenken, wonach die Proteine der Oxydationsfermente durch das mesomere System einer „Amidkette“, wie sie mittels Wasserstoffbindungen in der gefalteten Peptidkette zustande kommt, die Elektronen zur Wirkungsgruppe hin- und von ihr wegtransportieren und dabei Phosphat aufnehmen können.

Nachtrag bei der Korrektur: In einer Veröffentlichung aus allerletzter Zeit führt E. Racker [Jl. biol. chem. 177, 883 (1949)] den Nachweis, daß die bisher als einheitlich angesehene Aldehyd-Mutase der Leber¹⁸⁾ tatsächlich aus zwei verschiedenen Fermenten besteht, einer spezifischen Aldehyd-Dehydrase und einer Aldehyd-Hydrase (= Alkohol-Dehydrase), deren gemeinsame prosthetische Gruppe Codehydrase I ist. Somit ist für die Leber der hier für die Hefe (S. 217) diskutierte Mechanismus der Aldehyd-Dismutation bewiesen. Im übrigen verläuft die Dehydrierung des Aldehyds am Leberferment ohne Beteiligung anorganischen Phosphats.

Beschreibung der Versuche

Allgemeine Methodik

Zu den Versuchen diente *Branntweinhefe* der Hefefabrik Oberkotzau, vorm. Scheibe & Scherdel, die im allgemeinen durch 3—5stünd. Schütteln unter Sauerstoff verarmt worden war. *Sauerstoffverbrauch* und *Säurebildung* wurden manometrisch in kegelförmigen Warburg-Gefäßen, Volumen etwa 20 ccm, gemessen, wobei sich die Substrate im allgemeinen in der seitlichen Birne befanden und erst nach Temperatúrausgleich in den Hauptraum zur Hefe herübergeholt wurden. Bei der Messung des O₂-Verbrauchs nach der direkten Methode in Phosphatpuffer unter Luft befand sich Natronlauge im Einsatz der Gefäße; nur in den Versuchen mit Blausäure oder H₂S war der Einsatz leer. Diese Vereinfachung ist bei Atmungsversuchen mit Butylalkohol zulässig, da bei seiner Dehydrierung durch Hefe kein CO₂ gebildet wird. Die Säurebildung wurde in Bicarbonat-CO₂-Puffer verfolgt wobei als Gasmischungen 95% O₂ + 5% CO₂ bzw. 95% N₂ + 5% CO₂ dienten⁴²⁾.

Um bei den *Phosphatbestimmungen* an Hefe reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurden einige systematische Messungen ausgeführt, die auszugsweise mitgeteilt seien. Prinzipiell wurde die zu untersuchende Hefesuspension (Puffer: Bicarbonat-CO₂) in Trichloressigsäurelösung pipettiert und dadurch die enzymatischen Vorgänge abgestoppt. Nach Zentrifugieren wurde im klaren Filtrat das Phosphat kolorimetrisch nach M. Martland und R. Robison⁴³⁾ bestimmt. Leicht-hydrolysierbares Phosphat ist das in n-HCl bei 100° während 7 Minuten abgespaltene Phosphat, während schwer-hydrolysierbares Phosphat den erst bei der Veraschung frei werdenden Anteil umfaßt. Gesamtphosphat ist Phosphat nach Veraschung. Die Phosphatwerte sind durchwegs in mg PO₄ pro g Hefe (*jeucht*) angegeben.

Erfolgte die Umrechnung der gemessenen Extinktionen auf Phosphat nicht mit einer einmalig aufgestellten Eichkurve, wie dies bei Relativmessungen der Fall war, sondern sollten absolute Werte ermittelt werden, so wurden bei jeder Meßreihe 2 bis 3 Eichwerte mit bekannten Phosphatmengen mit aufgenommen. Die zu ver-

⁴¹⁾ Z. Naturf. im Druck.

⁴²⁾ Die Gasmischungen verdanken wir dem freundlichen Entgegenkommen der Fa. Lindt, München-Höllriegelskreuth. Wir möchten ihr, insbesondere Herrn Direktor Ph. Borchardt und Herrn Frauscher auch an dieser Stelle bestens dafür danken.

⁴³⁾ Bioch. Jl. 20, 848 (1926).

schiedenen Zeiten mit dem verwendeten *Pulfrich*-Photometer (Zeiß, Jena) aufgenommenen Eichkurven zeigten nämlich Differenzen bis zu $\pm 8\%$, die durch den Wechsel der Temperatur während der Entwicklung der Färbung, verschiedene Lampenspannung usw. bedingt sind.

1. Variation der Trichloressigsäure (TES)-Konzentration

2proz. Hefesuspension + 12proz. TES bis zur gewünschten Endkonzentration zugesetzt; Einwirkungszeit 10 Minuten; T = 18°.

TES-Konz. in %	2	4	6	8
anorg. PO ₄ :	0,21	0,81	1,31	1,40

2. Einwirkungszeit der TES auf die Hefesuspension

6 ccm 4proz. Hefesuspension + 3 ccm 20proz. TES (Endkonz. 6,7%) bei Zimmertemperatur aufbewahrt, nach den angegebenen Zeiten zentrifugiert und im Filtrat Phosphat bestimmt.

nach Min.	anorg. PO ₄	leicht-hydr. PO ₄
3	1,59	0,52
13	1,73	0,70
23	1,73	0,88

Wird das Filtrat nach dem Zentrifugieren 4 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, dann nimmt das anorg. PO₄ um 9—11% zu.

3. Temperatureinfluß bei der TES-Einwirkung

2proz. Hefesuspension mit dem gleichen Volumen 12proz. TES bei der angegebenen Temperatur versetzt. Aus diesen Ansätzen wurden Proben von 6 ccm in 4 ccm m-Na-acetat pipettiert, damit die Säure abgestumpft, und sofort zentrifugiert. Die Versuchsreihen bei 0, 18 und 30° wurden gleichzeitig mit derselben Hefesuspension angesetzt.

anorg. PO ₄ nach Min.	5	15	30	60	189	215	274	300
0°	1,13	1,32	1,35	—	—	1,50	—	1,53
18°	1,76	1,81	1,89	—	—	—	—	—
30°	1,79	1,86	1,86	2,03	2,22	—	2,36	—

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß steigende Mengen TES steigende Mengen Phosphat aus den Hefezellen herauslösen. Bei Konzentrationen über 5% ist diese Zunahme aber nur gering und insbesondere bleibt dann das Verhältnis anorg. PO₄ : Gesamt-PO₄ annähernd konstant, so daß Messungen im TES-Konzentrationsbereich 5—8% reelle Aussagen über das Verhältnis der Phosphatfraktionen in der Hefezelle erlauben.

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Phosphatmessungen wurde durchgehend wie folgt gearbeitet: TES-Endkonz. 6,67%, T =

14—22° (Zimmertemperatur), Einwirkungszeit der TES (bis zum Zentrifugieren der Proben) 8—14 Minuten.

Die strikte Einhaltung dieser Versuchsbedingungen ermöglichte Ergebnisse, deren Reproduzierbarkeit in den Grenzen ± 3 bis 6% liegt.

I. Versuche mit Butylalkohol

Das verwandte Präparat war n-Butylalkohol von Schering-Kahlbaum. Das Ergebnis eines Atmungsversuchs mit verschiedenen Mengen Butanol ist in Fig. 1 zu sehen.

Wirkung der Butanoloxydation auf die Leeratmung

In den Hauptraum von 4 Dixon-Keilin-Gefäßen⁴⁵⁾ (Vol. 14—16 ccm), deren Hohlstopfen mit Natronlauge gefüllt waren, wurden je 40 mg frische Hefe in 2 ccm m/15-Phosphat-Puffer, p_H 7,4 gegeben, der in 2 Gefäßen noch m/75-Butanol enthielt. In der seitlichen Birne befand sich 1 ccm 20proz. Trichloroessigsäure. Die Gefäße wurden zur gleichen Zeit beschickt und gleichzeitig im Schüttel-Thermostaten von 30° versenkt. Nach Temperaturlausgleich (5 Min.) wurden die Hähne geschlossen und nach weiteren 10 Minuten in je einem Gefäß mit und ohne Butanol die Trichloroessigsäure eingekippt. Dadurch enzym. Reaktion zum Stillstand gebracht und etwa gebundenes CO₂ ausgetrieben. In den beiden anderen Gefäßen wurde die Trichloroessigsäure 40 Minuten später zugekippt. Nunmehr wurde die Natronlauge durch Eindrehen des Hohlstopfens in den Einsatz gebracht, damit das CO₂ der Gasphase absorbiert und aus der Druckabnahme das vorhandene CO₂ berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengestellt. Dort ist auch die Druckabnahme während 10—50 Minuten aufgeführt, die ein Maß für den Sauerstoffverbrauch bei der Butanolatmung ist.

Tab. 8

Gefäßvolumen ccm	13,8	14,95	16,05	15,4
m/75-Butanol	—	—	+	+
TES zugesetzt nach Min.	10	50	10	50
Druckabnahme während 10—50 Min. in mm Brodieclösung	—	23	—	200
mm ³ CO ₂	125	235	85	132
in 40 Min. geb. CO ₂ :	110		47	

Vergleich der Butanolatmung in Phosphat- und Bicarbonat-Puffer

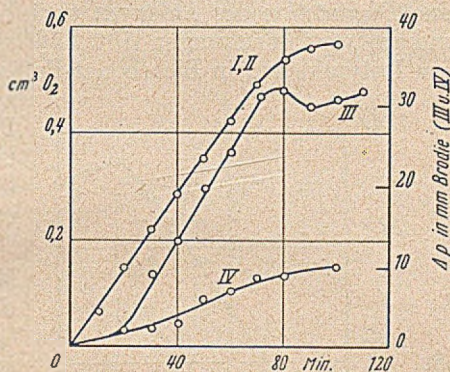
Erfolgt die Oxydation des Butylalkohols in Bicarbonat-CO₂-Puffer, so setzt die aus 1 Mol Alkohol gebildete Buttersäure 1 Mol CO₂ in Freiheit. Da gleichzeitig nach der Oxydationsgleichung für Butylalkohol 1 Mol Sauerstoff aufgenommen wird, sollte keine Volumänderung eintreten. Da aber CO₂ in viel höherem Maße wasserlöslich ($\alpha^{23^\circ} = 0,759$) als O₂ ($\alpha^{26^\circ} = 0,0283$) und sich beide Gase auf Lösung und Gasphase verteilen, nimmt das Gasvolumen bei der Reaktion ab (vgl. „Gefäßpaarmethode“ von O. Warburg⁴⁷⁾). Tritt daher bei der manometrischen Messung keine Druckabnahme mehr ein, so wird damit das Ende der Reaktion angezeigt.

⁴⁷⁾ F. Dickens in E. Bamann und K. Myrbäck. Die Methoden der Fermentforschung S. 1002. Leipzig 1941.

Ein auf dieser Überlegung aufgebauter Vergleich der Butanoloxydation in Phosphatpuffer bei p_{H} 6,8 und 7,4 und in Bicarbonatpuffer bei p_{H} 7,4 ergab (Fig. 6), daß die Reaktion überall mit der gleichen Geschwindigkeit abläuft. Dies ist daran zu erkennen, daß die Knickpunkte der Kurven zeitlich gleich liegen.

Fig. 6. Butylalkohol in Phosphat- und Bicarbonat-Puffer

Je 40 mg verarmte Hefe in 2 cem m/15-Phosphat p_{H} 6,8 (I) bzw. 7,4 (II) oder m/33-Na-bicarbonat p_{H} 7,4 (III, IV). $T = 25^{\circ}$. Gas: Luft (I, II) bzw. 95% $\text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$ (III, IV). I—III: m/75 Butylalkohol, der in den Gefäßen gleichzeitig aus der seitlichen Birne eingekippt wurde. Die linke Ordinate gilt für die Sauerstoffaufnahme (I, II), die rechte für die Druckabnahme (III, IV) [v_{Gas} : III = 16,44 cm^3 ; IV = 17,41 cm^3].



Die säurelöslichen Phosphate der Hefe während der Butanoloxydation

In einem mit Gummistopfen verschlossenen 500-cem-Erlenmeyer-Kolben wurden 1,4 g verarmte Hefe in 70 cem 0,03 m-Na-bicarbonat unter $\text{O}_2\text{-CO}_2$ mechanisch bei $T = 25^{\circ}$ geschüttelt. Zur Phosphatbestimmung wurden je 10 cem entnommen und zu 5 cem 20proz. TES gegeben. Nach jeder Probeentnahme wurde der Gasraum kurz mit dem Gasgemisch durchspült. Das Ergebnis einer Bestimmung aus fünf gleichartigen Versuchen ist in Fig. 2 zu sehen, wobei der Nullwert dem Zustand vor Zugabe des Substrats entspricht.

Nach Verbrauch des zugesetzten Alkohols stellt sich zwar nicht momentan, aber doch allmählich wieder der ursprüngliche Zustand ein. Dies ergab ein Versuch mit 4 g verarmter Hefe in 100 cem m/75-Butanol enthaltenden Bicarbonat-Puffer, wo nach 40 Minuten der zugesetzte Alkohol verbraucht war. Sonst wie oben.

Min.	0	30	60	120
anorg. PO_4	1,95	0,76	1,15	1,43
Gesamt- PO_4	3,30	1,38	2,65	2,50

II. Versuche mit Butyraldehyd

Die Darstellung des Butyraldehyds erfolgte durch CrO_3 -Oxydation von n-Butylalkohol nach Ch. Weizmann und S. F. Garrad⁴⁸⁾; er wurde über die kristallisierte Aldehyd-Ammoniakverbindung⁴⁹⁾ gereinigt und nach Destillation sofort in Wasser gelöst. Die m/6-wäßrige Lösung kann im Eisschrank aufbewahrt werden. Da aber mit der Zeit merkliche Autoxydation zur Säure eintritt, soll die Lösung nach etwa einem Monat erneuert werden.

⁴⁸⁾ Soc. 117, 328 (1920).

⁴⁹⁾ A. Lipp, A. 211, 344 (1882).

Aerobe Umsetzung von Butyraldehyd

Die Atmung von Hefe mit Butyraldehyd ist in Fig. 3 wiedergegeben. Wie dort erwähnt, ist die erste Phase geringer Sauerstoffaufnahme auf eine *Dismutation* des Aldehyds zurückzuführen, die sich manometrisch und analytisch nachweisen läßt. Läßt man nämlich den aeroben Umsatz von Butyraldehyd in Bicarbonat-Puffer vor sich gehen, dann tritt, wie

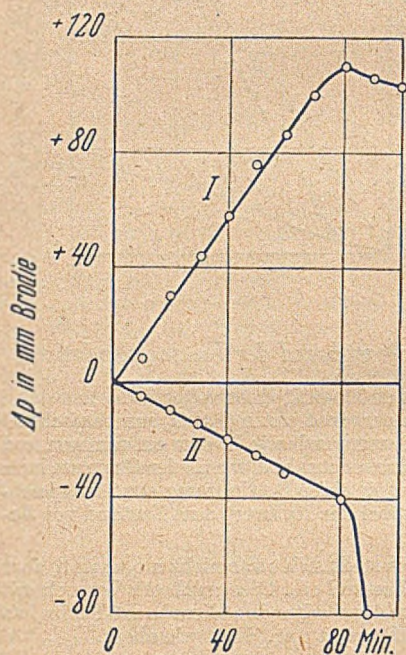


Fig. 7. Butyraldehyd aerob in Bicarbonat- und Phosphat-Puffer

80 mg verarmte Hefe in 2 cem $\frac{m}{33}$ -Bicarbonat (I) bzw. $\frac{m}{15}$ -Phosphat (II), p_H 7,4; $\frac{m}{120}$ -Butyraldehyd; $T = 25^\circ$. I: 95% O_2 + 5% CO_2 ; II: Luft (v_{gas} : I = 16,02 cm^3 ; II = 16,53 cm^3).

Eis kühlt oder daß man den Aldehyd erst nachher in die seitliche Birne einfüllt und sofort mit dem Glasstopfen verschließt.

Daß der Aldehyd tatsächlich zu Beginn der zweiten Phase (Oxydationsphase) praktisch verschwunden ist, ließ sich auf analytischem Weg beweisen.

Zu diesem Zweck wurden 4,8 g verarmte Hefe in 80 cem $m/15$ -Phosphat-Puffer, p_H 7,4, der 1,07 mMol Butyraldehyd enthielt, im verschlossenen Erlenmeyer-Kolben unter Sauerstoff geschüttelt; $T = 25^\circ$. Nach 5, 20, 40, 60 und 80 Minuten wurden

aus Fig. 7 hervorgeht, in der ersten Phase eine starke Volumzunahme ein, die beim Einsetzen der Butanoloxydation nach 80 Minuten in eine Abnahme übergeht.

Bei der Dismutation wird pro Mol umgesetzten Aldehyds $\frac{1}{2}$ Mol Säure gebildet, die aus Bicarbonat $\frac{1}{2}$ Mol CO_2 in Freiheit setzt. Dies ist die Ursache der Volumzunahme. In der zweiten Phase wird pro Mol gebildeter Säure 1 Mol Sauerstoff aufgenommen, da jetzt der bei der Dismutation gebildete Butylalkohol der normalen Oxydation anheimfällt. Das Gasvolumen nimmt nunmehr ab, da CO_2 in Wasser löslicher ist als O_2 (vgl. S. 230). Des weiteren zeigt die zeitlich gleiche Lage der Knickpunkte in den beiden Kurven, daß die Reaktion in Phosphat- und Bicarbonat-Puffer mit gleicher Geschwindigkeit verläuft.

Bei der praktischen Ausführung dieses Versuchs ist zu beachten, daß während des Durchleitens der Gas-mischung durch das Barcroft-Warburg-Gefäß keine Aldehydverluste eintreten. Dies kann dadurch vermieden werden, daß man das komplett beschickte und am Manometer angeschlossene Gefäß während des Ausspülens mit der Gas-mischung mit

Proben von je 10 ccm entnommen. Davon wurden jeweils 2 ccm sofort in Barcroft-Warburg-Gefäße pipettiert und der weitere Umsatz manometrisch verfolgt. Die Sauerstoffaufnahme der einzelnen Proben ist aus Fig. 8 zu ersehen, wobei am ersten Meßpunkt einer Reihe der Hahn des Manometers geschlossen wurde.

Aus den restlichen 8 ccm wurde die Hefe durch Zentrifugieren abgetrennt und in der überstehenden Lösung der noch vorhandene *Aldehyd* jodometrisch nach S. W. Clausen⁵⁰⁾ bestimmt. Die ermittelten Mengen sind in Prozent des zugesetzten Aldehyds ebenfalls in Fig. 8 eingetragen.

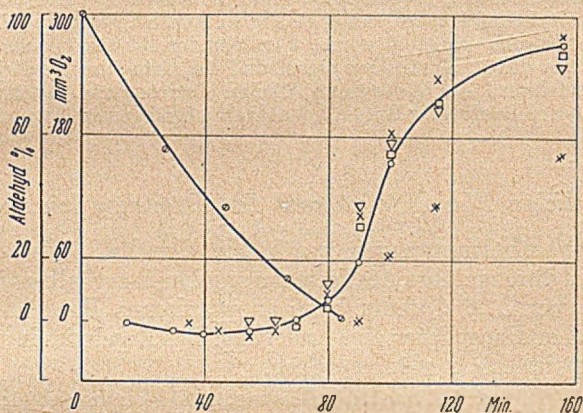


Fig. 8. Atmung und Butyraldehydverbrauch

O₂-Verbrauch nach 5 Minuten: ○, 20 Minuten: ×, 40 Minuten: ▽, 60 Minuten: ◻, 80 Minuten: *, % Butyraldehyd: ◉.

Aus einem Vergleich der beiden Kurven ergibt sich sehr überzeugend, daß der Beginn der Oxydationsphase mit dem Verschwinden des Butyraldehyds aus der Lösung zusammenfällt. Dieser Augenblick war nach etwa 80 Minuten erreicht, was aus dem geringeren Sauerstoffverbrauch der letzten Probe ersichtlich ist; hier war beim Schließen des Manometerhahns die Oxydationsphase schon erreicht und folglich ein Teil des Alkohols bereits verbraucht.

Überdies ergibt sich der gleichartige Reaktionsablauf im großen Gefäß wie in den Manometer-Gefäßen daraus, daß die zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben denselben zeitlichen Verlauf der Atmung zeigen.

Bilanz des Butyraldehyd-Umsatzes aerob und anaerob

Zusammensetzung der Ansätze vgl. Tab. 1. Am Versuchsende die Hefe abzentrifugiert; 4 ccm der überstehenden Lösung zur *Aldehydbestimmung* nach Clausen⁵⁰⁾, 50 ccm zur *Buttersäure*-Bestimmung nach T. E. M. Friedemann⁵¹⁾ und 20 ccm zur *Butylalkohol*-Bestimmung verwandt. Um hier zunächst den Aldehyd zu entfernen,

⁵⁰⁾ JI. biol. chem. 52, 263 (1922); 73, 335 (1927).

⁵¹⁾ JI. biol. chem. 123, 161 (1938).

werden 15 ccm 0,02m-Dinitrophenylhydrazin in 2n-HCl zugesetzt, die Fällung nach 2 Stunden bei Zimmertemperatur abfiltriert und dreimal mit je 2 ccm Wasser gewaschen. Vom Filtrat das halbe Volumen abdestilliert, das Destillat neutralisiert und durch wiederholtes Destillieren (jeweils $\frac{1}{2}$ Volumen) auf 8—9 ccm konzentriert. In dieser Lösung wurde der Butylalkohol manometrisch durch Messung des Sauerstoffverbrauchs mit verarmter Hefe bestimmt. Zu diesem Zweck 2 ccm Destillat und 0,6 ccm m/5-Phosphat-Puffer, Γ_{II} 7,4 in den Hauptraum eines Warburg-Gefäßes gegeben; 0,4 ccm 10proz. Hefesuspension in die Birne und nach Temperatureausgleich und Schließen des Manometerhahns in den Hauptraum herübergeholt. Im Einsatz NaOH; $T = 25^\circ$. Aus dem gemessenen O_2 -Verbrauch wurde der vorhandene Butylalkohol berechnet (vgl. Fig 1). Die Selbstatmung der Hefe, die in einer Parallelprobe ermittelt wurde, kam vor der Berechnung in Abzug. Wir überzeugten uns durch Kontrollversuche, daß bei dem hier beschriebenen Anreicherungsverfahren keine Verluste an Alkohol eintreten und die manometrische Bestimmung bei mehr als 500 γ Butylalkohol hinreichend genaue Ergebnisse ($\pm 5\%$) liefert.

Die säurelöslichen Phosphate während der Umsetzung von Butyraldehyd

Die Phosphatbestimmungen wurden in derselben Weise wie beim Butylalkohol durchgeführt. 10 Versuche ergaben innerhalb einer Schwankungsbreite von $\pm 6\%$ weder beim anorganischen Phosphat noch bei den organischen Phosphaten eine Änderung. Das Ergebnis eines typischen Versuches ist in Tab. 2 wiedergegeben.

4 g verarmte Hefe auf 100 ccm Gesamtlösung; m/150-Butyraldehyd; Bicarbonat- CO_2 -Puffer, Γ_{II} 7,4. Gasraum: O_2 - CO_2 bzw. N_2 - CO_2 . Die Hefesuspension wurde vor Zugabe des Aldehyds 10 Minuten im Thermostaten unter Durchleiten der Gasmischung geschüttelt. Nunmehr die Aldehydlösung zugesetzt und das Gefäß verschlossen. Zur Vermeidung von Aldehydverlusten bei der Entnahme der Proben wurde nur der Gasraum, nicht aber die Lösung kurz mit der Gasmischung durchgespült.

Manometrische Bestimmung der Säurebildung aus Butyraldehyd, aerob und anaerob

Die gebildete Buttersäure wurde manometrisch durch Messung der aus Bicarbonat in Freiheit gesetzten Kohlensäure verfolgt. Dabei mußte im *aeroben* Versuch auch der O_2 -Verbrauch ermittelt werden, was in einem Parallelansatz in Phosphat-Puffer geschah. Dieses vereinfachte Verfahren kann hier angewandt werden, weil die Atmung während der Dismutationsphase gering ist und sich außerdem ergeben hatte, daß die Umsetzung des Aldehyds in Phosphat- und Bicarbonat-Puffer mit gleicher Geschwindigkeit erfolgt (vgl. Fig. 7). Die Einzelheiten einer derartigen Messung sind aus Tab. 9 ersichtlich; Mittelwerte aus mehreren derartigen Messungen sind in Tab. 3 zusammengestellt worden.

Die Messungen beim anaeroben Umsatz von *Acetaldehyd* wurden in derselben Weise wie beim Butyraldehyd ausgeführt. Bei der Phosphatanalyse (vgl. Tab. 4) war die Aldehydkonzentration zu Versuchsbeginn m/75.

Tab. 9. Pro Gefäß 80 mg verarmte Hefe, m/75-Butyraldehyd, $v_F = 2,0$ ccm, $T = 25^\circ$, p_H 7,8.

	I	II	III
Gasraum	Luft	O ₂ -CO ₂	N ₂ -CO ₂
Puffer	m/15-Phosphat	m/17-NaHCO ₃	m/17-NaHCO ₃
Gefäßkonstante	$k_{O_2} = 1,47$	$k_{CO_2} = 1,70$ $k_{O_2} = 1,56$	$k_{CO_2} = 1,70$
Δp während 60 Min.	— 3	+ 87	+ 45
Δp_{CO_2} in mm Brodie		$37 + 6 \cdot \frac{1,47}{1,56} = 93$	45
v_{CO_2} in mm ³		+ 158	+ 76,5

III. Versuche mit Butylalkohol und Schwermetallgiften

a) Versuche mit Blausäure

Atmungshemmung vgl. Fig. 4.

Für die Phosphorylierung mit Butylalkohol und Blausäure diente der allgemeine Ansatz wie bei Butylalkohol allein (S. 231), mit dem Unterschied, daß noch Blausäure zugesetzt wurde. Es wurde die Phosphatabnahme bis zu einem gewissen Zeitpunkt bestimmt und parallel dazu in Proben, die mit derselben Hefe von gleicher Konzentration wie die Hauptansätze versehen waren, die Atmung gemessen. Da hier Phosphat-Puffer in Anwendung kam, in den Hauptansätzen aber Bicarbonat-Puffer, haben wir uns in Kontrollversuchen davon überzeugt, daß auch in Gegenwart von Blausäure der Umsatz in beiden Pufferlösungen der gleiche ist (vgl. S. 230). Ergebnis der Phosphatanalyse vgl. Tab. 5.

b) Versuche mit Schwefelwasserstoff

Schwefelwasserstoff wurde in Form von Na₂S (wäßrige Lösung) zugesetzt. Die Konzentration der Lösung an freiem H₂S, das wegen der leichten Diffusion durch die Hefemembran allein wirksam ist, läßt sich folgendermaßen berechnen.

Das zugesetzte Na₂S (= ΣS) tritt in gepufferter Lösung teilweise mit H⁺ zu HS⁻ und H₂S zusammen, von denen sich letzteres bei der absol. Temperatur T gemäß der Bunsenschen Gleichung auf die Lösung (Volumen = v_F) und den Gasraum (= v_G) verteilt. Es gilt also:

$$\Sigma S = S^- + HS^- + (H_2S)_F + (H_2S)_G, \quad (1)$$

und

$$\frac{(H_2S)_F}{v_F} = \alpha \cdot \frac{(H_2S)_G}{v_G \cdot \frac{273}{T}}, \quad (2)$$

oder umgeformt

$$(H_2S)_F \cdot \frac{v_G \cdot \frac{273}{T} + \alpha \cdot v_F}{\alpha \cdot v_F} = (H_2S)_G + (H_2S)_F = \Sigma S - HS^- - S^- \quad (2a)$$

wobei α der Bunsensche Absorptionskoeffizient für H_2S ist. Nach dem Massenwirkungsgesetz gilt für die Dissoziation des H_2S :

$$\frac{c_{\text{H}^+} \cdot \text{HS}^-}{(\text{H}_2\text{S})_F} = k_1 \quad (3) \quad \text{und} \quad \frac{c_{\text{H}^+} \cdot \text{S}^{2-}}{\text{HS}^-} = k_2 \quad (4)$$

wo k_1 und k_2 die beiden Dissoziationskonstanten des H_2S sind. Um diese Gleichungen in eine geeignete Form zu bringen, wird Gl. (3) einmal mit c_{H^+} und einmal mit Gl. (4) multipliziert,

$$\frac{(c_{\text{H}^+})^2 \cdot \text{HS}^-}{(\text{H}_2\text{S})_F} = k_1 \cdot c_{\text{H}^+} \quad (3a) \quad \text{und} \quad \frac{(c_{\text{H}^+})^2 \cdot \text{S}^{2-}}{(\text{H}_2\text{S})_F} = k_1 \cdot k_2 \quad (4a)$$

Gl. (3a) und (4a) dann addiert:

$$(c_{\text{H}^+})^2 \cdot (\text{HS}^- + \text{S}^{2-}) = (\text{H}_2\text{S})_F \cdot (k_1 \cdot c_{\text{H}^+} + k_1 \cdot k_2) \quad (5)$$

und Gl. (5) von $(c_{\text{H}^+})^2 \cdot \Sigma \text{S}$ subtrahiert:

$$(c_{\text{H}^+})^2 \cdot (\Sigma \text{S} - \text{HS}^- - \text{S}^{2-}) = (c_{\text{H}^+})^2 \cdot \Sigma \text{S} - (\text{H}_2\text{S})_F \cdot (k_1 \cdot c_{\text{H}^+} + k_1 \cdot k_2) \quad (6)$$

Nun läßt sich Gl. (2a) in (6) einsetzen; wird noch durch ΣS dividiert, so ergibt sich:

$$\frac{(\text{H}_2\text{S})_F}{\Sigma \text{S}} \cdot (c_{\text{H}^+})^2 \cdot \frac{v_G \cdot \frac{273}{T} + \alpha \cdot v_F}{\alpha \cdot v_F} = (c_{\text{H}^+})^2 - \frac{(\text{H}_2\text{S})_F}{\Sigma \text{S}} \cdot (k_1 \cdot c_{\text{H}^+} + k_1 \cdot k_2)$$

und daraus:

$$\frac{(\text{H}_2\text{S})_F}{\Sigma \text{S}} = \frac{(c_{\text{H}^+})^2}{(c_{\text{H}^+})^2 \cdot \frac{v_G \cdot \frac{273}{T} + \alpha \cdot v_F}{\alpha \cdot v_F} + k_1 \cdot c_{\text{H}^+} + k_1 \cdot k_2}; \quad (7)$$

Hier bedeutet $\frac{(\text{H}_2\text{S})_F}{\Sigma \text{S}}$ den Bruchteile des zugesetzten Na_2S , der in Lösung als freies H_2S vorliegt. Werden das zugesetzte Na_2S in mMol und die Volumina in cem angegeben, dann erhält man durch Division von $(\text{H}_2\text{S})_F$ durch v_F die molare H_2S -Konzentration in der Lösung.

Bei 25° sind $k_1 = 9,1 \cdot 10^{-8}$ und $k_2 = 1,1 \cdot 10^{-12}$. Demnach läßt sich in unsern Versuchen, die bei pH 7,4 ($c_{\text{H}^+} = 3,98 \cdot 10^{-8}$) ausgeführt wurden, $k_1 \cdot k_2$ gegenüber den beiden ersten Gliedern des Nenners vernachlässigen, so daß Gl. (7) die vereinfachte Form annimmt.

$$\frac{(\text{H}_2\text{S})_F}{\Sigma \text{S}} = \frac{c_{\text{H}^+}}{c_{\text{H}^+} \cdot \frac{v_G \cdot \frac{273}{T} + \alpha \cdot v_F}{\alpha \cdot v_F} + k_1}; \quad (8)$$

Mit ihrer Hilfe läßt sich berechnen, daß im Atmungsversuch von Fig. 5, wo: $v_G = 16,8$ cem, $v_F = 2,0$ cem und $\alpha^{25^\circ} = 2,282$ waren, von den zugesetzten 10^{-4} mMol Na_2S in der Lösung 15% als freies H_2S vorlagen, die Konzentration also $7,5 \cdot 10^{-6}$ m- H_2S war. Im Gasraum befanden sich 50% des eingesetzten Schwefels.

Manometrische Messung des Umsatzes von Butylalkohol bzw. Acetaldehyd in Gegenwart von Na_2S

Die Zusammensetzung der Ansätze geht aus der Unterschrift zu Fig. 5 hervor. Bei der Beschickung des Warburg-Gefäßes für den anaeroben Versuch ist darauf zu achten, daß weder Aldehyd- noch H_2S -Verluste eintreten. Um dies zu verhindern, wurden zunächst nur Hefe, Bicarbonat und Wasser in den Hauptraum des Gefäßes gegeben und nach Aufsetzen des Manometers unter Schütteln und Durchleiten von $\text{N}_2\text{-CO}_2$ im Thermostaten mit der Gasmischung gesättigt. Hierauf wurde das Gefäß bei angeschlossenem Manometer in ein hohes Becherglas gebracht, durch welches $\text{N}_2\text{-CO}_2$ geleitet wurde, der Schliffstopfen in dieser Atmosphäre kurz geöffnet und währenddem Acetaldehyd sowie Na_2S -Lösung in die Birne einpipettiert. Anschließend wurde das Gefäß wieder im Thermostaten versenkt und nach Mischen des Inhalts von Seitengefäß und Hauptraum mit den Ablesungen begonnen.

Phosphorylierung in Gegenwart von Schwefelwasserstoff

Bei Versuchen mit Schwefelwasserstoff ist zu berücksichtigen, daß sich das Gas auf Lösung und Gasraum verteilt. Will man daher 2 Versuche miteinander vergleichen, so muß, gleiches p_{H} vorausgesetzt, das Verhältnis von Lösung und Gasraum das gleiche sein. Diese Bedingung war in allen Versuchen dieses Abschnitts erfüllt, wo die Phosphatbestimmung in einem größeren Ansatz durchgeführt werden mußte und parallel dazu die Umsatzgröße in der Warburg-Apparatur zur Messung kam.

Manometrische Messung. $v_{\text{F}} = 2 \text{ ccm}$, $T = 25^\circ$, $p_{\text{H}} 7,4$;

aerob mit Butanol: m/15-Phosphat, 0,02 bzw. 0,03 ccm m/100- Na_2S ; 0,16 ccm m/6-Butylalkohol (Endkonz. m/75) aus der Birne nach Schließen des Manometerhahns (20 Min. im Thermostaten) zugesetzt. Gas: Luft. Ohne H_2S wurden von 40 mg Hefe in 10 Minuten $50 \text{ mm}^3 \text{ O}_2$ verbraucht. Die Hemmung durch H_2S ist aus Tab. 6 zu ersehen.

anaerob mit Acetaldehyd: 0,03 m-Bicarbonat, m/50-Acetaldehyd, Gas: 95% $\text{N}_2 + 5\% \text{ CO}_2$; Säurebildung: 30–35% jener bei Butanol ungemindert. 10^{-4} und $3 \cdot 10^{-4}$ -m- Na_2S haben keinen Einfluß.

Ansatz für die Phosphatbestimmungen. 0,03m- NaHCO_3 , 40mg verarmte Hefe pro 2 ccm Endlösung, m/75-Butanol bzw. m/50-Acetaldehyd, 8 bzw. $5 \cdot 10^{-6}$ -m- Na_2S ; $T = 25^\circ$. Der Versuch wurde durch Zugabe der Substrate in Gang gebracht; nach 10 Minuten Schütteln wurden 10 ccm zur Phosphatbestimmung entnommen. Damit bei der Probeentnahme keine Verluste an H_2S eintreten, wurden die Versuche in einem Reaktionsgefäß, wie es Fig. 9 wiedergibt, durchgeführt.

Eine Saugflasche von 345 ccm Inhalt wird mit Hefe, Pufferlösung und Wasser (insges. 50 ccm) beschickt. Bei geschlossenem Quetschhahn Q_1 und geöffnetem Hahn D wird bei B die Gasmischung durch das Reaktionsgefäß geleitet und die Luft

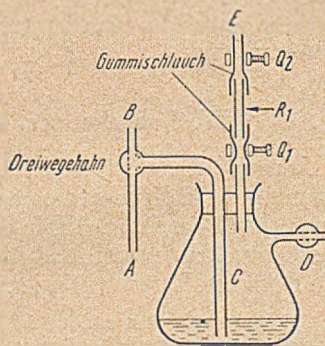


Fig. 9

vollständig verdrängt. Dabei ist ein Druckregler vorgeschaltet, der nicht gezeichnet ist. Nach etwa 15 Minuten wird D geschlossen und die beiden Quetschhähne Q_1 und Q_2 geöffnet, um auch das kurze Glasrohr R_1 mit der Gasmischung auszuspielen. Nun wird bei E eine Pipette aufgesetzt, damit die Öffnung E verschlossen, so daß nunmehr das Gas durch den Druckregler ausströmt, Q_1 geschlossen und die Sulfid-Lösung (etwa 0,5 ccm) aus der Pipette in das Rohr R_1 eingefüllt. Q_2 wird ebenfalls geschlossen und die Pipette entfernt. Auf die gleiche Weise wird ein zweites Rohr R_2 , das in der Figur nicht gezeichnet ist, mit der Butanol- bzw. Acetaldehydlösung (3 bzw. 0,7 ccm) beschickt. Man schließt den Dreiwegehahn und läßt durch Öffnen von Q_1 die Sulfidlösung in das Reaktionsgefäß einfließen; durch Neigen des Gefäßes wird R_1 mit der Hefesuspension ausgespült. Um die Nullprobe zu entnehmen, wird nunmehr die Gaszuführung über den Druckregler bei D angeschlossen, dieser Hahn geöffnet und der Dreiwegehahn in die Stellung C—A gebracht. Die Reaktionsflüssigkeit fließt durch das zu einer Spitze ausgezogene Kapillarrohr A aus. Man verwirft die ersten 3—5 ccm und läßt dann genau 10 ccm in einen mit 5 ccm 20proz. Trichloressigsäure beschickten 15-cm-Meßkolben einfließen, d. h. füllt diesen bis zur Marke auf. Der Dreiwegehahn wird in die Stellung A—B gebracht und D geschlossen. Nun leitet man den Gasstrom bei B ein, verdrängt damit die Flüssigkeit und Luft aus der Kapillare und dreht dann den Dreiwegehahn in die Stellung B—C. Jetzt wird die noch im Rohr C befindliche Flüssigkeit in das Reaktionsgefäß zurückgedrückt. Durch Öffnen des entsprechenden Quetschhahns und Ausspielen des Rohres R_2 wird nunmehr das Substrat zur Hefesuspension gegeben und damit der Versuch in Gang gebracht. Nach 10 Minuten wird wiederum eine Probe zur Phosphatbestimmung entnommen, was in der gleichen Weise geschieht wie zur Zeit 0.

Das Verhältnis $v_G : v_F$ im Schüttelkolben entsprach zwischen 0 und 10 Minuten auf etwa 2% genau den Verhältnissen im Warburg-Gefäß, in welchem parallel dazu die Umsatzgröße gemessen wurde.

Das Ergebnis unserer Messungen zeigt Tab. 6. Die Abnahme des anorganischen Phosphats im aeroben Versuch mit Butylalkohol ist auf das Substrat und nicht etwa auf das Natriumsulfid zurückzuführen, denn in einem Kontrollversuch, bei welchem z. Z. 0 anstelle des Alkohols nur Wasser zugesetzt wurde, trat innerhalb 10 Minuten keine Phosphatänderung ein.

IV. Hydrolyse von Acetylphosphat durch zerriebene Hefe

Lebende Hefe ist gegenüber Acetylphosphat wirkungslos; dies ist zweifellos auf die Undurchlässigkeit der Hefemembran zurückzuführen, denn durch zerriebene Hefe oder durch Einfrieren in flüssiger Luft plasmolysierte Hefe wird Acetylphosphat rasch gespalten. Im folgenden sei als Beleg ein Versuch mit zerriebener Hefe wiedergegeben.

3,5 g frische Hefe wurden mit 3,5 g Glaspulver und 3 ccm m/5-Phosphat, Γ_{11} 6,2, in einer Porzellanreibschale mit elektrischem Antrieb 10 Minuten lang bei tiefer Temperatur zerrieben und dabei 40% der eingesetzten Hefe aufgeschlossen⁶². Es wurden 8 ccm m/10-Acetat-Puffer, Γ_{11} 5,4, zugesetzt und das Ganze gut durchgeschüttelt.

⁶²) Durch Messung der Gärkraft des ausgewaschenen Rückstands ermittelt; H. Leuchs, noch nicht veröffentlichte Versuche.

1,5 ccm dieser Suspension mit 0,1 ccm 0,035m-K-acetyl-phosphat⁵³) versetzt und 20 Minuten lang bei 30° geschüttelt. Wie die Acetylphosphat-Bestimmung nach F. Lipmann und L. C. Tuttle⁵⁴) ergab, waren während dieser Zeit 72% des eingesetzten Anhydrids gespalten worden. Dies bedeutet, daß 115 mg zerriebene Hefe bei 30° in der Stunde 7,5 μ Mole Acetylphosphat hydrolysieren.

Somit erfolgt die Spaltung des Acylphosphats mit einer Geschwindigkeit, die von der gleichen Größenordnung ist wie die anaerobe Dismutation von Acetaldehyd durch lebende Hefe, wo mit der gleichen Hefemenge in 1 Stunde bei 25° 10,8 μ Mole Essigsäure entstehen.

Ob das acetylphosphatspaltende Ferment der Hefe identisch ist mit dem Ferment der tierischen Gewebe, das F. Lipmann⁵³) entdeckt hat, kann vorerst noch nicht entschieden werden.

Wir haben auch versucht, während der aeroben Dehydrierung von Butylalkohol mit Hilfe der Reaktion von Lipmann und Tuttle⁵⁴) Acylphosphat nachzuweisen, mit dem Ergebnis, daß maximal 3% des als anorganisch bestimmbar Phosphats Acylphosphat sein könnten. Über diese Versuche soll aber erst in anderem Zusammenhang ausführlicher berichtet werden.

Die Oberflächenspannung aliphatischer Oxysäureester

Von Hermann Engelhard, Heinz Schilfarth und Heinz-Günther Kaul

(Mit 3 Figuren im Text)

(Eingegangen am 9. März 1949)

In dieser Arbeit werden eine Reihe von Oxysäureestern rein hergestellt und ihre Oberflächenspannung sowie die ihrer Lösungen gemessen.

Die Herstellung der Ester erfolgte nach den üblichen Verfahren. Lediglich bei der Herstellung der Hydracrylsäureester sind besondere Vorsichtsmaßnahmen erforderlich, da schon geringste Spuren von Schwefelsäure die Bildung von Acrylsäureestern verursachen. Die Hydracrylsäure selbst wurde aus Äthylencyanhydrin gewonnen. Sie ist nicht destillierbar im Gegensatz zu ihren Estern.

Die Messungen der Oberflächenspannung wurden bei 20° nach der Methode des maximalen Blasendrucks¹) mit dem Kapillarimeter nach Dr. Cassel mit Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die Meßwerte sind

⁵³) F. Lynen, B. 73, 367 (1940). — F. Lipmann, Adv. Enzym. 6, 231 (1946).

⁵⁴) Jl. biol. chem. 159, 21 (1945).

¹) Prinzip nach S. Sudgen, Chem. Soc. 121, 858 (1922).

in der Tab. 1 und in Fig. 1 zusammengefaßt. In den Tab. 2 und 3 sind außerdem die gemessenen Siedepunkte und Dichten der untersuchten Substanzen aufgeführt.

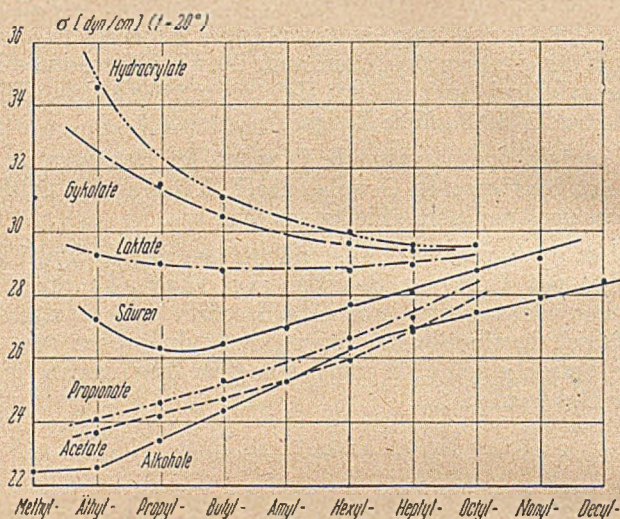


Fig. 1

Tab. 1. Oberflächenspannung in dyn/cm

	Äthyl	Propyl	Butyl	Hexyl	Heptyl
Essigsäure	23,69	24,28	24,72	25,92	26,89
Propionsäure	24,12	24,61	25,38	26,60	27,28
Glykolsäure	—	31,55	30,43	29,66	29,40
Milchsäure	29,20	29,00	28,80	28,86	28,88
Hydracrylsäure	34,52	—	31,10	30,10	29,54

Tab. 2. Siedepunkte

	Äthyl	Propyl	Butyl	Hexyl	Heptyl
Essigsäure	—	101,8/765	124,5/765	169—169,2/763	191/760
Propionsäure ..	—	22—122,3/755	145—146/755	73—74/10	124—125/14
Glykolsäure ..	—	72,3/14	84/14	106—107/12	124—125/14
Milchsäure ..	—	170—172/760	81—81,3/14	105—106/12	118—118,7/11
Hydracrylsäure ..	91—92/19	—	116—118/20	141—142/18	140—144/11

Tab. 3. Spez. Gewichte bei 20°

	Äthyl	Propyl	Butyl	Hexyl	Heptyl
Essigsäure	0,8993	0,8851	0,8809	0,8729	0,8690
Propionsäure	0,8907	0,8806	0,8758	0,8709	0,8671
Glykolsäure	—	1,0526	1,0233	0,9950	0,9855
Milchsäure	—	1,0027	0,9832	0,9544	0,9441
Hydraerylsäure	1,0605	—	1,0046	0,9615	0,9315

Wie Fig. 1 zeigt, in die auch die bekannten und teilweise nachgeprüften Oberflächenspannungswerte der reinen Alkohole und Säuren mit aufgenommen sind, erhöht die Einführung einer Oxygruppe die Oberflächenspannung vor allem der niederen Glieder erheblich, und zwar zeigt sich OH in β - wirksamer als in α -Stellung. Mit Verlängerung der Esterkette wird der Einfluß der OH-Gruppe immer geringer, so daß man sogar ein Absinken der Oberflächenspannung beobachtet, das sich in geringem Maße auch schon bei den normalen Säureestern zeigt. Die Oberflächenspannungswerte werden damit immer gleichmäßiger und paraffinähnlicher. Errechnet man die molaren Oberflächenspannungswerte, so gehen trotz der erheblichen Unterschiede im Gang der spez. Gewichte (Säuren und Ester fallend, Alkohole steigend) alle Kurven nahezu in Gerade über (Fig. 2).

Zum besseren Vergleich ist hier auf der Abszisse die Anzahl der C-Atome im Molekül eingetragen. Damit rücken die Reihen mit nur einer Hydroxyl- bzw. Carbonylgruppe, also die Alkohole, Essigsäure- und Propionsäureester, auf eine Gerade zusammen, wenn man den Estersauerstoff außer Betracht läßt. Die Säuren mit Hydroxyl und einem freien Sauerstoff am gleichen C-Atom liegen

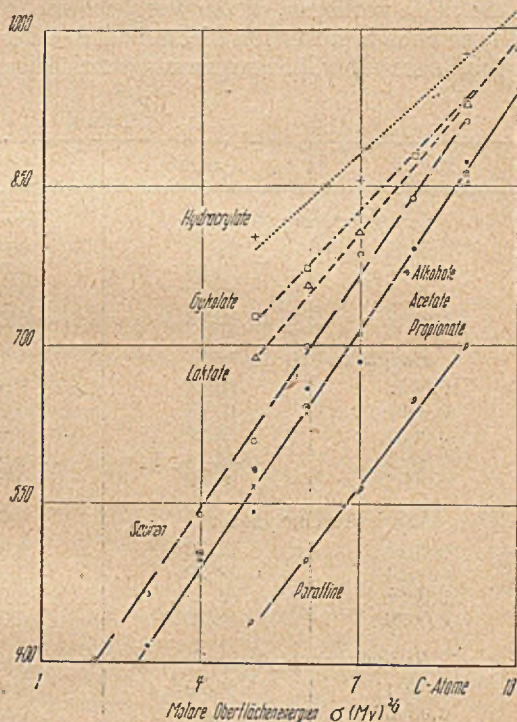


Fig. 2

die Reihen mit nur einer Hydroxyl- bzw. Carbonylgruppe, also die Alkohole, Essigsäure- und Propionsäureester, auf eine Gerade zusammen, wenn man den Estersauerstoff außer Betracht läßt. Die Säuren mit Hydroxyl und einem freien Sauerstoff am gleichen C-Atom liegen

etwas darüber. Tritt die Hydroxylgruppe an ein zweites C-Atom, also in α - oder in β -Stellung, so erhöht sich die Oberflächenenergie weiter, wobei es noch von Bedeutung ist, ob die Hydroxylgruppe endständig ist. Alle Geraden zeigen ein Zusammengehen bzw. Überschneiden bei höheren Gliedern. Diese Verringerung der Unterschiede ist ein Maß für die Annäherung der Reihen an die Paraffine, wenn auch ein Zusammenlaufen mit den ebenfalls eingezeichneten Paraffinen nicht erfolgt.

Die Anfangswerte der Reihen müssen ein Maß für die strukturellen Besonderheiten der Reihen sein und sich daher auch in anderen Eigenschaften der gleichen Moleküle erkennen lassen. Man findet daher auch bei den Estern die gleiche Reihenfolge bei den Verdampfungswärmen, während die Alkohole und Säuren, da sie nicht in übereinstimmenden Zuständen vorliegen, diesen Vergleich nicht erlauben. Daß die gleichen Kräfte auch in Lösungen wirksam sind, erkennt man, wenn man aus den gefundenen Oberflächenspannungsniedrigungen von Wasser (Tab. 4)

Tab. 4

Mol / L.	dyn / cm	Mol / L.	dyn / cm
Essigsäurepropylester		Propionsäurepropylester	
0,0024	71,28	0,0035	69,34
0,0035	70,75	0,0041	68,79
0,0047	70,02	0,0057	67,52
0,0057	69,49	0,0065	67,06
Essigsäurebutylester		Propionsäurebutylester	
0,0022	69,58	0,0022	67,72
0,0027	69,38	0,0029	66,06
0,0031	68,26	0,0031	65,56
0,0042	66,94	0,0041	63,90
0,0068	64,88	0,0057	61,06
Essigsäurehexylester		Propionsäurehexylester	
0,0013	65,32	0,00072	66,64
0,0014	64,29	0,00073	66,58
0,0021	61,18	0,00097	65,03
0,0029	58,72	0,00010	64,29
Essigsäureheptylester		Hydracrylsäurebutylester	
0,00041	68,99	0,0019	70,75
0,00057	67,02	0,0028	69,90
0,00064	66,73	0,0034	67,82
0,00096	63,41	0,0054	67,82
Hydracrylsäureäthylester		Hydracrylsäurehexylester	
0,0027	72,04	0,0008	64,88
0,0034	71,85	0,0012	61,65
0,0051	71,55	0,0022	56,95
0,0059	71,30	0,0050	49,27

die Tangenten-Logarithmen der Neigungswinkel ermittelt und diese wiederum gegen die Anzahl der C-Atome im Molekül aufträgt.

Es ergibt sich in den Anfangswerten die gleiche Reihenfolge, natürlich im umgekehrten Sinne, da die Substanz mit geringster Oberflächenspannung die des Wassers am stärksten erniedrigt. Man findet jedoch keine Parallelität, wie sie Merckel²⁾ gefunden hatte und wie sie der strengen Gültigkeit der Traube-Regel entsprechen würde, sondern ein Zusammenlaufen und Überschneiden bei höheren Gliedern in ähnlicher Weise wie bei den molaren Oberflächenenergien, ohne daß man bei der Schwierigkeit der Messungen dem Gang der Kurven im einzelnen zuviel Gewicht beilegen dürfte.

Besser als der Gleichung von Szyzko wski³⁾ genügen die gefundenen Werte der Oberflächenspannungserniedrigung der theoretisch besser begründeten Formel von Volmer⁴⁾.

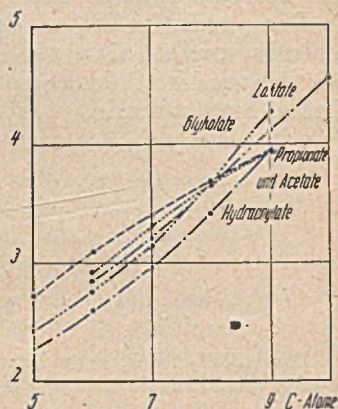


Fig. 3

$$\sigma_M - \sigma_L = \frac{RT \cdot c}{k + \beta c}$$

(σ_M = Oberflächenspannung, Lösungsmittel.
 σ_L = Oberflächenspannung, Lösung.
 c = Konzentration.
 k und β = Konstanten.)

Errechnet man aus der Konstanten β dieser Formel den mittleren Platzbedarf einer Molekel in der Oberfläche gleich $\frac{2\beta}{N}$ so erhält man ziemlich gleichmäßig für alle Glieder 20 \AA^2 , also einen Platzbedarf, wie er für ein Paraffin ermittelt wurde, das senkrecht bzw. nahezu senkrecht zur Oberfläche steht. Läge eine derartige Anordnung streng vor, so könnten sich die Dipolgruppen dieser Verbindungen in der Oberfläche fast nie bemerkbar machen. Bei ihrem starken Einfluß kann daher die senkrechte Einstellung nur der wahrscheinlichste Fall bei genügend tiefen Temperaturen sein, der durch die Wärmebewegung immer wieder aufgehoben wird. Auch bei den reinen Flüssigkeiten kann bei dem starken Einfluß der Dipole eine Lage der Moleküle senkrecht zur Oberfläche nur als wahr-

²⁾ Kolloidchem. Beitr. 45, 424 (1937).

³⁾ Z. phys. Chem. 64, 385 (1908).

⁴⁾ Z. phys. Chem. 115, 253 (1925).

scheinlichster Fall bei genügend tiefen Temperaturen angenommen werden. Abnorme Eötvös-Konstanten nehmen daher auch mit Erhöhung der Temperatur immer mehr Normalwerte an.

Der spezifische Einfluß der Struktur auf die molaren Oberflächenenergien macht diese vielleicht zu einer Strukturanalyse wertvoll, ähnlich wie der mit der Langmuir-Pockels-Waage ermittelte Flächenbedarf benutzt wurde.

Berichtigung

Band 562, S. 131, erste Zeile muß es heißen: Bis[p-isocyanato-phenyl]-1,1-cyclohexan. Konstitution: $C_6H_{10}[C_6H_4NCO]_2$.

(Abgeschlossen am 26. Mai 1949)



FONDS ZUR FÖRDERUNG DER CHEMIE

Der „Fonds zur Förderung der Chemie“ in der „Gesellschaft Deutscher Chemiker“, der unter anderem die Aufgaben der zur Zeit nicht aktionsfähigen „Justus-von-Liebig-Gesellschaft zur Förderung des chemischen Unterrichts“ übernommen hat, ist für das Jahr 1949/50 wieder in der Lage, Stipendien an überdurchschnittlich begabte junge Chemiker zu vergeben. In erster Linie kommen Herren in Frage, die kurz zuvor promoviert haben und in Ausnahmefällen auch bedürftige Doktoranden.

Anträge können nur von Hochschullehrern unter Beifügung des Lebenslaufes und einer kurzen Skizzierung der beabsichtigten Forschungsarbeit der Betreffenden eingereicht werden und sind zu richten an

Professor Otto Bayer · (22c) Leverkusen-Bayerwerk

Nächster Meldetermin: 15. Juni 1949




Nervomед

Unschädliches Sedativum
und Nerventonicum
mit Bromsalzen
und Pflanzenextrakten.

Philopharm

Chem.-pharm. Fabrik, Quedlinburg / Harz



SOEBEN ERSCHIEN

F. A. HENGLEIN

Grundriß der Chemischen Technik

*Ein Lehrbuch für Studierende der Chemie und des Ingenieurfaches,
ein Übersichtsbuch für Chemiker und Ingenieure im Beruf.*

4. und 5. neubearbeitete Auflage 1949 — gr. 4° — 636 Seiten
mit 2 mehrfarbigen und 3 einfarbigen Tafeln sowie 300 Abbildungen im Text
und 70 Tabellen. — In Halbleinen DM 34,—.

Die Vorzüge des Buches sind der flüssige Stil, die lebendige Darstellung und die klare Anordnung des ungeheuren Stoffes. In einem ersten Teil „Allgemeine Technologie“ werden die chemisch-technischen Reaktionen, Arbeitsmethoden, Apparaturen, Anlagen und Fabriken behandelt. Am Ende dieses Abschnittes wird ein Hinweis auf den Aufbau und die Bedeutung der deutschen chemischen Industrie und die Weltkonzerne der chemischen Industrie gegeben. In dem zweiten speziellen Teil werden die chemisch-technische Erzeugung von Stoffen, Veredelung von Rohstoffen der leblosen und der lebenden Natur, und die Verarbeitung von Erzeugnissen der chemischen Industrie und die Anwendung ihrer Verfahrenstechnik zur Erzeugung von Gebrauchsgütern beschrieben.

Schon gleich nach Erscheinen der 1. Auflage wurde in den Besprechungen der Fachzeitschriften darauf hingewiesen, daß sich das Buch durch seine Vielseitigkeit und durch das Bestreben, immer die allgemeinen Zusammenhänge im Auge zu behalten, vorteilhaft auszeichne. Wesentliche Änderungen und eine beträchtliche Erweiterung des Umfangs sind die Merkmale dieser neubearbeiteten Auflage. Dies entspricht der raschen Entwicklung der Chemischen Technik in den letzten Jahren. Weniger wichtige oder alte Verfahren wurden kürzer behandelt, die neuesten Verfahren dagegen, über die sich im Schrifttum nur verstreut Mitteilungen finden, eingehend beschrieben. Obwohl neue Abschnitte eingefügt worden sind, konnte doch die frühere bewährte Grundeinteilung beibehalten werden. So wird sicherlich auch diese neue Bearbeitung des Werkes viele Freunde und Leser finden.

VERLAG CHEMIE, GMBH · WEINHEIM/BERGSTR.

Vor kurzem erschienen

Beiheft zu der Zeitschrift
»Angewandte Chemie«

Nr. 55

BEITRÄGE ZUR OXYDATION VON CELLULOSE MIT STICKSTOFFDIOXYD

Von Dr. Oskar Pfeiffer und Dr. Deodata
Krüger† · 1949 · 85 Seiten mit 33 Ab-
bildungen und 28 Tabellen im Text
Kart. DM 9,—

Es wird die Oxydation von Fasern aus
regenerierter Cellulose mit Stickstoffdioxid
und ihre textile Auswirkung behandelt. Der
erste Teil von Dr. O. Pfeiffer und Mitarbei-
tern enthält Untersuchungen über den Re-
aktionsverlauf und die Fasereigenschaften.
Im zweiten Teil beschreibt Dr. Deodata
Krüger die Salzbildung und die Methoden zur
Charakterisierung von NO_2 -Oxycellu-
losen. (Ein Auszug der Arbeit erschien in
»Angewandte Chemie« 59, 276 [1947].)

VERLAG CHEMIE, GMBH
WEINHEIM/BERGSTR.

Säureschutzbau

seit 35 Jahren!

Wir bauen

Behälterauskleidungen jeder Art

Spezialität:

Säurefeste Fußböden, Wandbeläge
In bewährter Qualität und Ausführung

Liefern

Normalsteine, Normalplatten,
Formplatten, Spezial-Säureklitte,
Sekurit-Säurelack, Sekuritklitte

Kostenlose Beratung

Auf Wunsch Ingenieurbesuch

Friedrich Rößler

Fabrik säurefester Produkte
Bensheim/Bergstraße

Außer anderen sofort lieferbaren schweizerischen Büchern, deren Liste Sie bei uns an-
fordern wollen, bieten wir an:

F. L. BREUSCH

Lehrbuch der gesamten Chemie

1948, Gr. 8°, IV, 604 Seiten mit 86 Figuren, in Leinen gebunden DM 32,—

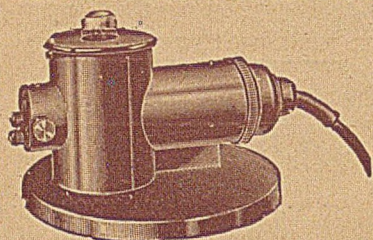
In der „CHIMIA“ 1949, Nr. 1 wurde das Werk wie folgt besprochen:

„Das vorliegende Buch stellt die erste deutsche Übersetzung des Werkes von F. L. Breusch (Professor der Chemie und Direktor des II. chemischen [biochemischen] Institutes an der Universität Istanbul) dar, das in türkischer Sprache schon die 3. Auflage erlebt hat. Sein Inhalt entspricht einer zweisemestrigen, wöchentlich vierstündigen Experimentalvorlesung über Chemie vor Studenten der Medizin. Es geht aus von den allgemeinen physikalisch-chemischen Grundlagen und gibt hierauf eine Darstellung der anorganischen und der organischen Chemie, soweit sie vom Mediziner, Pharmazeuten, Naturwissenschaftler und vom Chemiker (in den ersten Semestern) erwartet werden darf. Der Verfasser schält das Wesentliche der gesamten Chemie mit großer Klarheit und sehr übersichtlich heraus. Im ersten mehr physikalisch-chemischen Teil werden modernste Anschauungen vermittelt, während der anorganische und organische Teil eher der klassischen Auffassung folgt.“ H. Mohler.

DEUTSCHE VERSAND- und EXPORT-BUCHHANDLUNG · STUTTGART · Eberhardbau

Das Haus der Auslieferungsstelle fast aller Verleger

Lichtelektrisches Becherglas-Kolorimeter



Neue Zusatzgeräte für automatische Titration,
für Fluoreszenz- und Trübungsmessungen

Verlangen Sie unsere neue Sammeliste

DR. B. LANGE



Spezialfabrik lichtelektrischer Zellen und Apparate

Berlin-Zehlendorf, Hermannstraße 14-18. Telefon 84 81 22

CHEMIKALIEN

für Pharmazie und Technik

REAGENZIEN

in höchster Reinheit

FIXANAL-SUBSTANZEN

für die Maßanalyse

RIEDEL-DE HAËN A.-G.



SEELZE BEI HANNOVER

SÄURESCHUTZBAU
HOTTELET & CO
K.-G.

BERLIN-ZEHLENDORF · MÖLLERPFAD 5 · TEL. 731429