

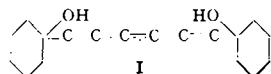
Darstellung von Triacetylen-Verbindungen

Von Dr. F. BOHLMANN

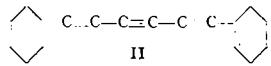
Organisch-Chemisches Institut der T. H. Braunschweig

Nachdem kürzlich einige Diacetylen-Verbindungen beschrieben werden konnten¹⁾, gelang jetzt auch die Synthese von Triacetylen-Verbindungen.

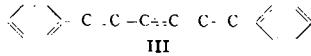
Durch Kondensation von Carbonyl-Verbindungen mit Triacetylen lassen sich Diole vom Typ I darstellen:



Die Verbindung schmilzt bei 164° und zeigt Absorptionsmaxima bei 259, 275, 290, 312 m μ ($\epsilon = 190, 217, 230, 155$) (in Methanol). Wasserabspaltung mit p-Toluolsulfosäure führt zu dem bei 71° schmelzenden Kohlenwasserstoff II:



Die Substanz zeigt Maxima bei 236, 254, 272, 290, 308, 330, 354 m μ ($\epsilon = 49500, 69000, 59500, 11000, 19500, 25400, 18400$) (in Äther). 1,6-Diphenyl-hexadien-2,4-diol-1,6 wurde mit Thionylchlorid in das Dichlorid überführt, und dieses durch Abspaltung von 2 Mol HCl in das bei 91° schmelzende Diphenyl-triacetylen(III):



Das Spektrum ist ähnlich dem von II, $\lambda_{\text{max.}} = 255, 265, 282, 310, 333, 358$, m μ ($\epsilon = 83500, 68200, 56200, 24200, 35700, 24900$) (in Methanol). Durch Kondensation von Benzophenon mit Triacetylen wurde das gleiche Diol vom Fp. 158° erhalten, wie das soeben in einem Kolloquiumsreferat von R. Kuhn²⁾ beschriebene. Die ausführlichen Ergebnisse sowie die Darstellung weiterer Verbindungen und die Diskussion der spektralen Verhältnisse erscheinen in Kürze an anderer Stelle.

Eingegangen am 10. April 1951 [A 350]

Über Additionsverbindungen von Heterocyclen mit Formamid, Harnstoff und Thioharnstoff

Von Dr. B. WENDT und Dr. W. RIED

Aus der wissenschaftl. Abtlg. der Dr. C. Schleussner-Photowerke, Frankfurt/M. und dem Organ.-Chem. Institut der Universität Frankfurt/M.

Es wurde beobachtet, daß eine Anzahl von Heterocyclen mit Formamid und konz., wässrigen Harnstoff- und Thioharnstoff-Lösungen gut kristallisierte Additionsverbindungen geben. Die Addukte mit Formamid bilden sich meistens schwerer als die mit den Harnstoffen. Die Herstellung der Molekельverbindungen ist äußerst einfach. Bringt man z. B. Chinolin mit Formamid zusammen, so kristallisiert fast augenblicklich die Additionsverbindung aus. Die Addukte sind ausgezeichnet kristallisiert und ergeben oft Kristalle beachtlicher Größe. Die Reaktion findet unter leichter Selbsterwärmung des Gemisches statt. Die Addukte lassen sich meist aus wenig Methanol umkristallisieren. Beim Erhitzen zerfallen sie in die Komponenten, dagegen beim Erwärmen in Wasser. Die Heterocyclen scheiden sich dann als Öle ab, während sich Formamid und Harnstoff mit dem Wasser vermischen. Die Analyse der Verbindungen ergab, daß es sich um echte Molekельverbindungen handelt, bei denen auf 1 Mol Heterocycle 1 Mol Formamid bzw. Harnstoff kommt. Es handelt sich hierbei offenbar um einen andersartigen Verbindungstyp als bei

Heterocyclen	Formamid	Harnstoff	Thioharnstoff
Chinolin	kein Addukt	Addukt	Addukt
Benzthiazol	" "	"	"
Chinaldin	Addukt	"	"
Lepidin	"	"	"
2-Methylbenzthiazol	"	"	"
2-Methylbenzoxazol	"	"	"
2-Methylchinoxalin	"	"	"
2-Methylbenzelenazol	"	"	"
2-Äthylbenzthiazol	"	"	"
6-Methylchinolin	kein Addukt	"	"
2-Methylmerkaptobenzthiazol	" "	"	"
2-Propylbenzthiazol	Addukt	"	"
2-Propenylbenzthiazol ...	kein Addukt	kein Addukt	kein Addukt
2-Methyl-naphthothiazol ..	Addukt	Addukt	Addukt
2-Methyl- β -naphthooxazol ..	"	"	"
Nikotin	kein Addukt	kein Addukt	kein Addukt

Tabelle 1

¹⁾ F. Bohlmann, diese Ztschr. 63, 149 [1951].

²⁾ R. Kuhn, diese Ztschr. 63, 173 [1951].

den von W. Schlenk jr. beschriebenen Harnstoff-Additionsverbindungen mit aliphatischen Komponenten¹⁾.

Röntgenuntersuchungen sollen die Verhältnisse im Kristall näher klären.

Die neuen Addukte erlauben es oftmals, Gemische von Heterocyclen, wie sie häufig in technischen Produkten vorliegen, zu trennen. So geben Heterocyclen mit α -ständiger gesättigter Seitenkette glatt Addukte, während bei α -ständigen ungesättigten Seitenketten die Adduktbildung ausbleibt.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über mögliche Molekельverbindungen. Eine ausführliche Besprechung der neuen Verbindungsklasse wird an anderer Stelle erfolgen.

Mit Dimethylformamid blieb bei allen Heterocyclen die Adduktbildung aus.

Eingeg. am 9. April 1951 [A 351]

Die Bedeutung der Hyaluronidase für Befruchtung und Fortpflanzung*

Von Priv.-Doz. Dr. K. WALLENFELS, Tutzing/Obb.

Biochemisches Laboratorium Tutzing der C. F. Boehringer u. Soehne G.m.b.H., Mannheim-Waldhof

Die zusammenfassende Darstellung über die Chemie, biologische Bedeutung und klinische Anwendung der Hyaluronidase von H. Gibian¹⁾ gibt mir Veranlassung, einige in Zusammenhang mit der Befruchtung diskutierte Fragen zu ergänzen bzw. klarzustellen.

Die bei der tierischen Befruchtung, d. h. bei der Vereinigung von Samenzelle und Eizelle zur entwicklungsähnlichen Zygote beobachtbaren Erscheinungen und wirksamen Stoffe sind durch die umfangreichen Arbeiten der Arbeitskreise um F. R. Lillie, M. Hartmann, R. Kuhn, A. Tyler und J. Runnström im Prinzip bekannt geworden. Diese Untersuchungen wurden fast ausschließlich an meist primitiven, im Wasser lebenden Tieren ausgeführt, doch handelt es sich dabei um Prinzipien, welche ihrer Natur nach im Gesamtbereich getrennt geschlechtlicher Lebewesen gültig sein müssen. Es ist festzustellen, daß die Hyaluronidase nicht zum Komplex dieser als Fertilisine bzw. Gamone bezeichneten Stoffe gehört. Sie stellt im Gegensatz zu diesen eine relativ junge Errungenschaft im Evolutionsprozeß dar, welche mit dem Übergang vom Leben im Wasser zum Leben am Land in Zusammenhang steht. Dieser machte verschiedeneartige zusätzliche Prinzipien zur Sicherstellung der Fortpflanzung notwendig. Mit dieser Betrachtung stimmt es überein, daß man nur bei Säugetieren und nicht einmal bei allen das Vorkommen von Hyaluronidase im Sperma beobachtet, ebenso wie auch die Einbettung der Eizellen in ein Gel aus Hyaluronsäure keine allgemeine Erscheinung ist (s. Tabelle).

Species	Hyaluronidase-Gehalt d. Spermatis.	Ovocumulus	Lit.
Rind	sehr hoch	sehr klein	²⁾
Opossum	kein	kein	²⁾
Kaninchen	sehr hoch	sehr groß	²⁾
Pferd	kein	groß und dicht	^{4a)}
Hund	niedrig oder kein	sehr groß	^{4a)}
Esel	kein	groß	^{4a)}
Ratte	hoch	sehr groß	²⁾
Schaf	hoch	kein	²⁾
Huhn	kein	kein	²⁾
Reptilien	kein	kein	³⁾
Mensch	niedrig	groß	²⁾
Seeigel	kein	kein	⁴⁾

Bei den meisten Säugetieren sind die Eier beim Verlassen des Eierstocks von dicht gepackten Follikelzellen umgeben, welche zwei deutlich unterscheidbare Hülle bilden (Bild 1): Eine innere, die *corona radiata*



Bild 1. Schematische Darstellung des Säugetier-Eies

¹⁾ Vgl. diese Ztschr. 62, 299 [1950]; Liebigs Ann. Chem. 565, 204 [1949].

²⁾ Die im folgenden vertretene Anschauung wurde im wesentlichen bei dem von der Union internationale des sciences biologiques in Mailand im Juni 1948 veranstalteten Symposium über „Wechselwirkung zwischen Ei und Spermatoziden und Parthenogenese“ gewonnen. Sie beruht auf Vorträgen von J. W. Rowlands und M. C. Chang und auf ausführlichen persönlichen Diskussionen mit J. W. Rowlands, M. C. Chang, A. Walton, J. Runnström und G. Favilli.

³⁾ H. Gibian, diese Ztschr. 63, 105 [1951].

⁴⁾ I. W. Rowlands, pers. Mitt.

⁵⁾ G. I. M. Swyer, Nature [London] 160, 433 [1947].

⁶⁾ K. Wallenfels, unveröff. Vers. [1941]; J. Runnström, L. Monné, L. Broman, Arkiv. Zool. 35 A, No. 3, 1 [1943]; A. Tyler, Physiol. Rev. 28, 208 [1948]; dagegen: A. Monroy, A. Ruffo, Nature [London] 169, 603 [1947].

⁷⁾ R. Vignocchi, Boll. Soc. Med. Chir. Modena, No. 4 [1945].

und eine äußere, weniger dicht mit Follikelzellen erfüllte, den *cumulus oophorus*. In diesem sind die Zellen durch eine gallertige Masse zusammengehalten, welche ein Gel aus Hyaluronsäure darstellt. Die Tatsache, daß das Säugetierei in diesem gelatinösen Schleimklumpen eingebettet ist, wurde schon 1826 durch von Baer⁵) entdeckt. Später wurde dieselbe Beobachtung bei der großen Mehrzahl der Säugetierspezies wiederholt. Schon 1912 wurde von Long⁶) beobachtet, daß der *cumulus* sich auflöst, wenn man eine Suspension lebender Spermatozoen zufügt und daß die Eier innerhalb kurzer Zeit von den im *cumulus* befindlichen Follikelzellen entblößt werden. Die Annahme von Long, daß es sich hierbei um eine Wirkung der lebenden Spermatozoen handelt, wurde später von Jamane⁷) und von Pincus und Enzmann⁸) revidiert, die zeigen konnten, daß auch Filtrate von Spermatozoen, welche vorher durch Erhitzen auf 40–45° getötet wurden, eine derartige Wirkung besitzen. Die Beobachtung, daß auch Pankreatin und gereinigtes Trypsin⁹) zur Auflösung des *cumulus* geeignet sind, führte zur Annahme, daß es sich bei dem, den *cumulus* lösenden Faktor um ein proteolytisches Ferment der Spermatozoen handelt. Doch ist es bemerkenswert, daß proteolytische Fermente nicht nur den Schleimklumpen des *cumulus*, sondern auch die Follikelzellen der *corona radiata* und sogar das Ei selbst angreifen, während der Spermaextrakt bzw. – wie später Mc Clean und Rowlands¹⁰) entdeckten – gereinigte Hyaluronidase-Präparate nur eine Auflösung des *cumulus* zur Folge haben und weder die *corona radiata* noch die Follikelzellen oder die *zona pellucida* des Eies verändern. Damit ist klargestellt, daß die Hyaluronidase nur die äußere der beiden das Ei schützenden Hülle entfernt. Bei der Passage des befruchteten Eies durch die Tube wird dieses jedoch auch von der viel dichten gepackten Hülle der *corona radiata* entblößt („Tubefaktor“). Swyer¹¹) beobachtete, daß ein Kaninchenei, dessen *cumulus* *in vitro* durch Hyaluronidase entfernt war und welches mit intakter *corona radiata* in den Eileiter eines anderen Kaninchens implantiert wurde, innerhalb weniger Stunden von Follikelzellen entblößt wurde. Da Extrakte aus Eileiter keinerlei Wirkung auf die Entfernung der *corona radiata* besaßen, wurde der Schluß gezogen, daß diese im Verlauf der Passage des Eies durch den dicht mit Cilien besetzten Eileiter mechanisch entfernt wird. Daß der *cumulus oophorus* und die *corona radiata* durch verschiedene Mechanismen dispergiert werden, zeigt auch die Tatsache, daß bei gewissen Carnivoren, z. B. bei Fuchs, Hund und Katze die *corona* noch längere Zeit nach der Befruchtung am Ei haften bleibt, sogar dann noch, wenn die Teilungen des Eies schon begonnen haben.

Verdünnungseffekt:

Bei der als Beweis für die biologische Wichtigkeit der Hyaluronidase für die Befruchtung hauptsächlich herangezogenen Tatsache, daß verdünnte Spermensuspensionen in ihrer befruchtenden Wirkung durch Zusatz von Hyaluronidase-Präparaten gesteigert werden können, ist es wichtig, das Verhalten von Spermatozoen bei der Verdünnung in Betracht zu ziehen. Beweglichkeit, Atmung und befruchtende Kraft von Sperma werden durch Verdünnung stark beeinträchtigt. Z. B. bleibt Kaninchensperma in Bakers Lösung in einer Konzentration von 20 Millionen Zellen/cm³ für 2–3 Tage bei Zimmertemperatur voll beweglich, während dasselbe Sperma in einer Verdünnung von 400 000 Zellen/cm³ innerhalb von 1–2 h bewegungslos wird. Dieser Verlust an Beweglichkeit läßt sich durch Stärke, Glykogen, Serumprotein, Eiklar und Eidotter weitgehend verhindern¹¹). Die gleiche Wirkung besitzt das von Spermatozoen befreite Samenplasma. Hierbei ist es ohne Bedeutung, ob es Hyaluronidase enthält oder nicht¹²). Diese Beobachtungen lassen es zweifelhaft erscheinen, ob die berichteten höheren Befruchtungserfolge bei der Verdünnung von Sperma mit Hodenextrakten oder Samenplasma tatsächlich nur auf dem Gehalt an Hyaluronidase beruhen. Dementsprechend konnte Chang¹²) zeigen, daß weitgehend gereinigte Hyaluronidase keinerlei die Befruchtung fördernde Effekt bei Kaninchen besitzt. Die Bedeutung der Hyaluronidase für die Dispersion des *cumulus* besteht ohne Zweifel. Es ist jedoch keineswegs geklärt, ob der Auflösung des *cumulus* eine wesentliche Bedeutung für die Befruchtung, d. h. für das Eindringen eines Spermatozoons in die Eizelle, zukommt. So beobachteten Leonard, Perlman und Kurzrok¹³), daß Eier von Ratten, die 12–16 h nach natürlicher Begattung dem Eileiter entnommen wurden, noch völlig im *cumulus* eingebettet waren. Nach der Ablösung desselben durch Hyaluronidase entdeckten sie jedoch, daß bereits Spermatozoen in die *zona pellucida* eingedrungen waren.

Vielleicht läßt sich die Bedeutung der Hyaluronidase für die Fortpflanzung besser verstehen, wenn man annimmt, daß sie die Passage des befruchteten Eies durch die *tuba Fallopiae* ermöglicht oder erleichtert¹⁴). Dies würde in Übereinstimmung mit der Betrachtung dieses Enzyms als eine relativ späte Errungenschaft im Evolutionsprozeß stehen.

Eingeg. am 18. März 1951

[A 345]

- ⁵) K. E. v. Baer: Entwicklungsgeschichte d. Tiere I, Königsberg 1828.
⁶) J. A. Long, Univers. Calif. Publ. Zool. 9, 105 [1912].
⁷) I. Jamane, Cytologia 1, 394 [1930]; 6, 474 [1935].
⁸) G. Pincus u. E. V. Enzmann, J. exptl. Zool. 73, 195 [1936].
⁹) D. Mc. Clean u. I. W. Rowlands, Nature [London] 160, 627 [1942].
¹⁰) G. I. M. Swyer, ebenda 159, 873 [1947].
¹¹) C. W. Emmens u. G. I. M. Swyer, Conference on Infertility, Cambridge 1948, p. 15.
¹²) M. C. Chang, Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 70, 32 [1949].
¹³) S. L. Leonard, P. L. Perlman u. R. Kurzrok, ebenda 66, 517 [1947].
¹⁴) A. Walton, Diskussionsbemerkung z. Vortrag v. I. W. Rowlands, 1. Intern. Kongreß f. Physio-Pathologie d. tier. Fortpflanzung u. künstl. Be-samung, Mailand 1948.

Eine chromatographisch-kolorimetrische Methode zur Bestimmung kleinster Mengen Säuren

Von Dr. H. GRASSHOF, Eschwege

Aus dem Wissenschaftlichen Laboratorium der Firma M. Woelm, Eschwege

Schon lange wird die Adsorption von Farbstoffen an Aluminiumoxyd untersucht¹). Setzt man Säure zu, wird der Adsorptionsgrad bei basischen Farbstoffen herabgesetzt, bei sauren Farbstoffen aber erhöht^{2, 3}). Entspricht beobachtet man, daß aus Wasser basische Farbstoffe bevorzugt an basischem (Na-haltigem), saure Farbstoffe bevorzugt an saurem (mit Säure behandeltem) Aluminiumoxyd aufgenommen werden^{3, 4}). Alkalifreies Aluminiumoxyd adsorbiert weder basische noch saure Farbstoffsalze⁵). Durch Säure-Behandlung wird es aber zu einem Austauscher für saure Farbstoffe. Wie gezeigt wird, hängt die aufgenommene Menge von der angewandten Menge Säure ab. Der Farbstoff läßt sich mit verdünnter Natronlauge eluieren und in der erhaltenen Lösung kolorimetrisch bestimmen.

In ein Absorptionsröhren (10 mm lichte Weite, 10 cm Länge, oben eine reichlich 10 cm³ fassende Erweiterung) werden auf ein kleines Wattepolster 3,5 g alkalifreies Aluminiumoxyd⁶) trocken eingefüllt. Die Einwaage ist nötig, da beim Eluieren mit Natronlauge diese durch das am Oxyd haftende Wasser verdünnt wird und der Farbton einer Orangelösung von der Stärke der Lauge abhängt. Dann werden 10 cm³ der zu bestimmenden Säurelösung auf die Säule gegeben und, nachdem sie versickert sind, 10 cm³ einer etwa m/100 Orangelösung (s. u.). Am oberen Rande bildet sich eine Zone, die um so länger ist, je mehr Säure vorgelegt wurde. Der überschüssige Farbstoff erfüllt die ganze Säule und wird leicht mit Wasser ausgewaschen, wodurch die Zone bestehen bleibt. Es werden erst 5 cm³, dann 10 cm³ dest. Wasser angewandt. Gegen Ende läuft das Filtrat farblos ab. Ist es restlos abgetropft, werden 2 cm³ und nach deren Einsickern 10 cm³ n/10 Natronlauge auf die Säule pipettiert. Die Unterteilung der Natronlauge ebenso wie vorher des Waschwassers in 2 Anteile ist notwendig, weil beim ersten Male die überstehende Flüssigkeit etwas von dem Farbstoff enthält, der sonst niemals ins Filtrat gelangen würde; beim zweiten Male ist die überstehende Flüssigkeit farblos. Die Filtrate werden zusammen in einem trockenen Kolben aufgefangen.

Kolorimetriert wird mit dem Kolorimeter nach Dr. Lange in einer 10 cm³-Küvette. Zur Einstellung des Null-Punktes dient eine mit der Blindprobe gefüllte 10 cm³-Küvette (Blindprobe: 10 cm³ kohlensäurefreies Wasser oder gleich die Farbstofflösung auf die trockene Säule gegeben und wie üblich gewaschen und eluiert). Zur Festlegung der Skala wird die verwendete Orange-Lösung in einer 100 cm³-Küvette auf 90 Skalenteile eingestellt. Die Vergleichsküvette von 100 cm³ ist mit Wasser gefüllt.

Orangelösung: 5 g „Orange GG konz. bes. rein“ von Cassella werden in 1 l dest. Wasser aufgelöst und durch eine Säule aus alkalifreiem Aluminiumoxyd filtriert, wobei das zuerst anfallende farblose Filtrat verworfen wird. Für 250 cm³-Lösung werden 65 g Aluminiumoxyd angewandt bei einer Säulenhöhe von 28 cm. Nach der Reinigung wird durch Verdünnung mit dest. Wasser auf 4,6 g pro l eingestellt, so daß bei einem Molgewicht von 452,5 des (theoretisch reinen) Farbstoffes eine etwa m/100 Lösung vorliegt.

Die chromatographische Reinigung der Lösung ist notwendig, da der rohe Farbstoff saure Bestandteile enthält, die am alkalifreien Aluminiumoxyd haften bleiben. Aus der gereinigten Lösung werden vom alkalifreien Aluminiumoxyd nur Spuren adsorbiert. Der niedrige Blindwert (etwa 5 Skalenteile gegenüber Wasser) bleibt bei Orange GG bei nicht allzu langer Aufbewahrung praktisch konstant.

Der große Durchmesser der Röhren (10 mm) wurde gewählt, um hohe Durchlaufgeschwindigkeiten zu erzielen und um für die höchsten Säurewerte noch ausreichende Mengen Aluminiumoxyd einzufüllen zu können. Für sehr kleine Säuremengen wird man engere Röhren wählen.

Es wurden für Essigsäure (Kurve 1), Salzsäure, Schwefelsäure (Kurve 2) und Kohlensäure (Kurve 3) Eichkurven aufgestellt (Bild 1).

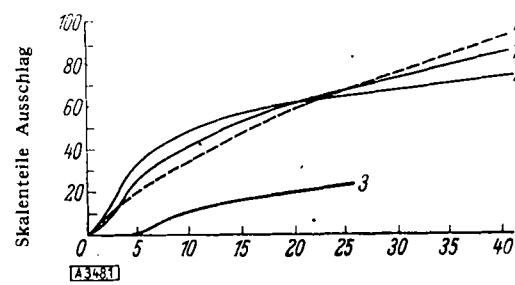


Bild 1. cm³ n/1000 Saure, m/10000 Orange

Eine konz. Säurelösung wurde mit kohlensäure-freiem Wasser so verdünnt, daß die angegebenen Säuremengen sich immer in 10 cm³ befinden. Auf 10 cm³ einer unbekannten zu bestimmenden Lösung ist dann die Eichkurve in jedem Falle anzuwenden. Bei anderen Volumina muß man mit abweichenden Ergebnissen rechnen. So ergeben z. B. bei Essigsäure 10 cm³ n/100 41 Skalenteile, 1 cm³ n/100 44 Skalenteile und 0,1 cm³ n/10 48 Skalenteile Ausschlag am Kolorimeter; bei 500 cm³ n/50000 wurde jedoch praktisch derselbe Wert wie bei 10 cm³ n/1000 gefunden.

Kurve 4 gibt den Zusammenhang zwischen Skalenteilen und der Menge an Orange an, die in cm³ einer m/10000 Lösung ausgedrückt ist. Bei ihrer Aufstellung wurde der Farbstoff in jeweils 10 cm³ dest. Wasser gelöst, dem so viel Alkali zugesetzt war, wie sich im Filtrat befindet, wenn man 12 cm³ n/10 NaOH durch 3,5 g feuchtes, alkalifreies Al₂O₃ filtriert.

Die Kurve für Salzsäure liegt zwischen den Kurven für Essigsäure und Schwefelsäure. Eine Säure wird offenbar um so schlechter vom Aluminiumoxyd adsorbiert, je schwächer sie ist; deshalb liegen die Werte der schwachen Kohlensäure am niedrigsten, bei sehr geringen

¹) Eine Zusammenstellung älterer Arbeiten befindet sich in: F. Krczil: Aktive Tonerde, ihre Herstellung und Anwendung. Stuttgart 1938, S. 114–119.

²) G. F. Hättig und A. Peter, Kolloid-Z. 54, 146 [1931].

³) N. A. Yajnik, D. N. Goyle, I. Das u. I. R. Jain, Kolloid-Z. 77, 99 [1936].

⁴) G. Hesse u. O. Sauter, Naturwiss. 34, 251 [1947].

⁵) H. Grasshof, diese Ztschr. 63, 96 [1951].

⁶) „Aluminiumoxyd alkalifrei“ der Fa. M. Woelm, Fabrik chem.-pharmazeut. Präparate, Eschwege.