

denken kann zwischen dem freien und an Kohlenstoff gebundenen Zustand. Ist nun der molekulare Sauerstoff, der *Chlorella* zugeführt wird, isotopisch markiert, während die Kohlensäure nicht markiert ist, so kann man nicht erwarten, daß im Licht mehr markierter Sauerstoff verbraucht wird als im Dunkeln, da im Licht aus räumlichen Gründen der in den Zellen entstehende nicht markierte Sauerstoff schneller verbraucht werden wird als der von außen zuströmende markierte Sauerstoff. Tatsächlich fand *Brown* im Licht keine Zunahme der markierten Atmung oder sogar eine Abnahme der markierten Atmung, das heißt, es verbrauchte dann nicht nur die Lichtatmung, sondern auch die Dunkelatmung bevorzugt den in der Zelle entstehenden, also nicht markierten Sauerstoff. Dies ist ein schönes Beispiel von „*Isotope Discrimination*“.

Auch sonst ist versucht worden, die Lichtatmung während der Belichtung zu messen, zum Beispiel von *J. W. Weigl, P. M. Warrington* und *M. Calvin* (J. Amer. chem. Soc. 73, 5058 [1951]; vgl. auch diese Ztschr. 68, 253 [1956]), die grüne Zellen in markierter Kohlensäure belichteten und erwarteten, daß im Licht in verstärktem Maße nicht markierte Kohlensäure abgegeben werde. Sie fanden keinen Zuwachs an nicht markierter Kohlensäure, ganz in Übereinstimmung mit unseren Erscheinungen, aus denen hervorgeht, daß die Lichtatmung markiert sein muß, wenn die Kohlensäure markiert ist.

Tatsächlich kann die Lichtatmung nur so gemessen werden, wie sie entdeckt worden ist: indem man sie zeitlich von der Sauerstoff-Entwicklung trennt.

eingegangen am 26. September 1957 [A 831]

### Analytisch-technische Untersuchungen

## Eis-Zonenschmelzen

### Neue Methode der Anreicherung geringster Substanzmengen aus wässriger Lösung

Von Dr. H. SCHILDKNECHT und Dipl.-Chem. A. MANNL

Aus dem Institut für organische Chemie der Universität Erlangen

Das bekannte Verfahren der Zonenschmelze anorganischer oder auch organischer fester Substanzen, welches zur Abscheidung bzw. Anreicherung geringer Nebenbestandteile an einem Ende des Untersuchungsmaterials verwendet wird, wurde sinngemäß auf Flüssigkeiten übertragen. Bisher liegen Untersuchungen an Benzol und Wasser vor. Die Flüssigkeiten werden zuerst gefroren und dann wird das entstandene „Eis“ in wandernden Zonen aufgeschmolzen. Die mit einer geeigneten Apparatur erzielten Anreicherungen von Ascorbinsäure, Chinonen, Aldehyden, Enzymen, Bakterien, Bakteriophagen und Plankton in wässriger Phase bzw. von Thiophen in Benzol werden mitgeteilt.

#### Einleitung

Schon sehr alt ist die Methode, wässrige Lösungen durch Ausfrieren des Wassers einzufrieren; dabei wird das übereinstehende Konzentrat von den ausgeschiedenen Eiskristallen durch Absaugen oder auch Zentrifugieren getrennt. Eleganter kann man – nach einer neuen Mitteilung zu schließen<sup>1)</sup> – so verfahren, daß man die Ausgangslösung zuerst ganz einfriert und dann mittels Hochfrequenz partiell wieder auftaut. Die unvermeidbaren Verluste dieser Verfahrensweisen, die u. a. durch Anhaftungen der konzentrierten Lösungen an die Eiskristalle entstehen können, sind aber nur dann unbedeutend, wenn man über genügend Ausgangsmaterial verfügen kann und wenn eine starke Anreicherung aus sehr verdünnten Lösungen nicht nötig ist.

Diese Nachteile zu umgehen und gleichzeitig die Vorteile der erwähnten Verfahren zu wahren, war unser Ziel bei der Entwicklung einer neuen Methode. Sie mußte demnach dem gleichen Prinzip folgen, d. h. durch Ausfrieren von Lösungsmittel die Anreicherung flüchtiger und hitzeempfindlicher Substanzen ermöglichen und sollte gleichzeitig kontinuierlich arbeiten, um verlustlos auch noch wenige Kubikzentimeter einer stark verdünnten Lösung aufarbeiten zu können. Wir gingen von der Überlegung aus, daß das zur Darstellung hochreiner anorganischer<sup>2)</sup> und organi-

scher<sup>3)</sup> Substanzen erfolgreich angewandte Zonenschmelzen sich auch umgekehrt zur Anreicherung kleinster Mengen einem Trägermaterial beigemengter Verbindungen eignen müßte. Auf das in der Biochemie besonders wichtige wässrige System übertragen hieß das also, durch einen künstlich hergestellten Eisbarren, der die anzureichernde Verbindung gleichmäßig verteilt enthält, Schmelzonen in der schon mehrmals beschriebenen Technik<sup>2, 3)</sup> hindurchwandern zu lassen. Die Beimengungen müssen dann in dem zuletzt erstarrnden Ende gelöst, oder wenn die Löslichkeit überschritten wurde, auch suspendiert zu finden sein. Sie können dann aus dieser, je nach Schmelzonenbreite und Form des Schiffchens mehr oder minder stark konzentrierten Lösung, durch Gefriertrocknung in Substanz isoliert werden. Somit stellt das Eis-Zonenschmelzen eine wertvolle Ergänzung zur Gefriertrocknung dar, indem die Ausgangslösung vor dem Gefriertrocknen zuerst auf ein kleines Volumen eingeengt wird. Damit wird vermieden, daß sich geringste Mengen wertvoller Substanzen nach dem Gefriertrocknen auf ein großes Volumen verteilen<sup>4)</sup> und u. U. schon vorher ganz oder teilweise beim Sublimieren des Eises verlustig gehen.

<sup>1)</sup> H. Röck, Naturwissenschaften 41, 425 [1954]. G. Hesse u. H. Schildknecht, diese Ztschr. 68, 641 [1956]. H. Schildknecht, Z. Naturforsch. 12b, 23 [1957].

<sup>2)</sup> F. Patau u. J. Hartmann, diese Ztschr. 69, 197 [1957].

<sup>3)</sup> Herrn Mechanikermeister G. Wening danken wir auch an dieser Stelle für die Herstellung der Apparatur; Dipl.-Chem. R. Nachtrab für die leihweise Überlassung eines Kühlaggregates.

<sup>1)</sup> Chem. Engng. News 34, 6426 [1956].

<sup>2)</sup> J. W. G. Pfann, J. Metals 1, 747, 861 [1952].

## Apparatur<sup>5)</sup> und Arbeitsweise

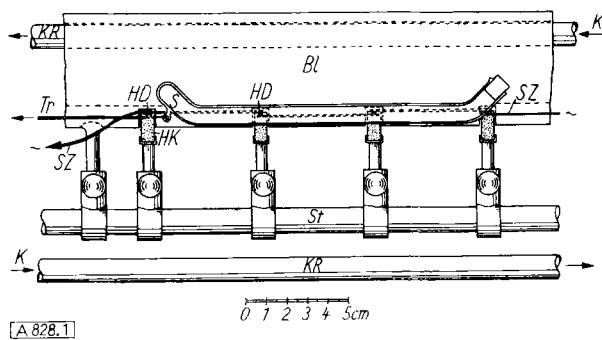


Bild 1

Längsschnitt der Eiszonenschmelzapparatur. KR = Kühlrohr; K = Kühlmittel; Bl = Kühlblech (Cu); HD = Heizdrähte; HK = Heizkörper; SZ = Stromzuführung; Tr = Transportseil; S = Substanzschiffchen; St = Stativ

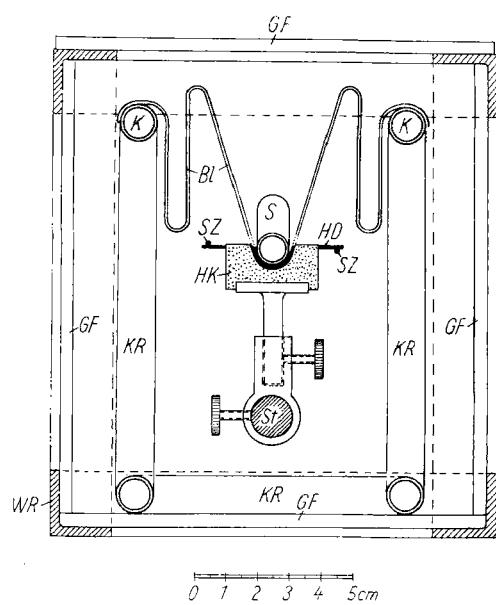


Bild 2

Querschnitt der Eis-Zonenschmelzapparatur. GF = Glasfenster; WR = Winkeleisen-Rahmen, sonst wie bei Bild 1

### 1. Kühlung

Die in das einseitig offene Substanzschiffchen S eingebrachte wäßrige Lösung wird in einem Bad aus Aceton-Trockeneis eingefroren und in das wattenförmige, gefaltete Kühlblech Bl eingelegt. Die Temperatur desselben liegt durchschnittlich bei  $-30^{\circ}\text{C}$  und wird durch ein mit Frigen beschicktes Kühlrohrsystem KR in Verbindung mit einem Kühlaggregat (ca. 800 Kcal) aufrechterhalten. Zur Vermeidung von Eisbeschlag ist die gesamte Apparatur mit Glasfenstern, 5 cm starken Corbanitplatten (Isoliermaterial aus Kunststoffschäum) und Sperrholz verkleidet.

### 2. Heizung

Im Abstand von 1,8 cm sitzt in 0,5 cm breiten Schlitten die Heizung HD. Die 0,5 mm starken Heizdrähte aus Chromnickelstahl ( $0,5 \Omega/\text{m}$ ) sind in die Heizkörper HK aus Speckstein eingekittet. Die Heizkörper sind beweglich auf dem Stativ St angebracht, so daß durch die Veränderung des Abstandes vom Kühlblech die Schmelzzonebreite gut reguliert werden kann. Die Temperatur der Schmelzzone liegt bei eingestelltem Gleichgewicht zwischen 3 und  $4^{\circ}\text{C}$ . Um die Kühlung für tiefschmelzende Lösungsmittel noch wirksamer zu gestalten, wurde versucht, die Widerstandsheizung durch kapazitive Erwärmung zu er-

setzen. Der hierfür geeignete Hochfrequenzsender (27,12 MHz) müßte jedoch sehr kräftig sein, möglichst nicht unter 100 Watt. Dadurch ist aber eine exakte Bündelung des Hochfrequenzfeldes, wie es für scharfbegrenzte Schmelzonen erforderlich wäre, nicht mehr gewährleistet. Wie weit die Anwendung von Mikrowellen vorteilhafter sein wird, sollen weitere Versuche mit einem von der Fa. Elektronik (Darmstadt) freundlicherweise zur Verfügung gestellten Mikrowellensender ergeben.

### 3. Der Transport

Ein außerhalb des Kühlraumes angebrachter Synchronmotor (AEG, SSL 375) zieht das Substanzschiffchen S. Es ist mit diesem durch eine Schnur verbunden, die durch eine Glaskapillare führt; ihr vorgeschaltet befindet sich noch eine Bleikammer (Bild 3). Solche Vorsichtsmaßregeln sind nötig, um einen ungehinderten Transport, ohne Hemmung durch Eisansatz zu gewährleisten.

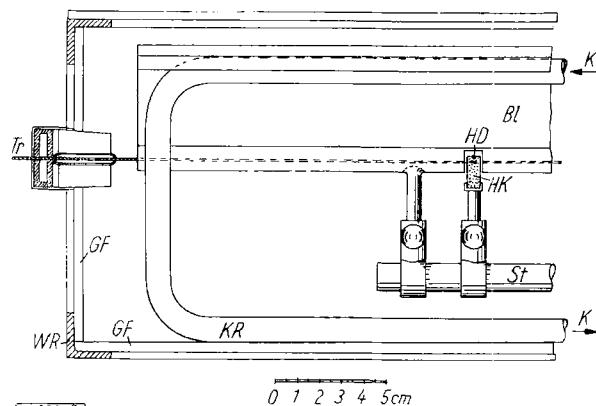


Bild 3  
Vorderes Ende der Eis-Zonenschmelzapparatur mit Schleuse für die Transportseil

Das Substanzschiffchen bewegt sich, in der Kühlwanne liegend, über die quer zur Bewegungsrichtung angebrachten Heizdrähte HD mit einer optimalen Geschwindigkeit von 1 cm/h hinweg. Es ergibt sich daraus, daß beispielsweise für einen Durchgang von 7 Zonen durch ein 11 cm langes Schiffchen 17 h benötigt werden. Selbstverständlich kann bei Anwendung von Substanzröhren mit größerem Durchmesser bei gleichbleibender Wanderungsgeschwindigkeit auch mehr Lösung zonengeschmolzen werden.

### 4. Apparaturtest

Da die Schmelzonenbreite bei farbigen Lösungen besonders gut eingestellt werden kann, wurde die Arbeitsweise der Apparatur mit Methylenblau-, Rhodamin- und Kaliumpermanganat-Lösungen verschiedener Konzentration kontrolliert. Schon nach einmaligem Durchgang durch die Heiz- und Kühlbatterie, d. h. nach 8 Zonen, war der Farbstoff aus einer 0,001 proz. Lösung sichtbar in die letzten 5  $\text{mm}^3$  geschoben worden (Bild 4).



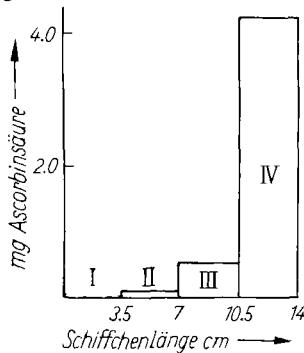
Bild 4  
Anreicherung von Methylenblau am hinteren Ende des Substanzschiffchens. → Laufrichtung der Schmelzzone  
← Laufrichtung des Schiffchens

## Anwendungen

Maßgebend für die hier beschriebenen Versuche war, die Anwendbarkeit des Eiszonenschmelzens für verschiedene Substanzklassen zu untersuchen; berücksichtigt wurden vor allem wasserdampf-flüchtige und hitzeempfindliche Verbindungen, hochmolekulare Substanzen und Suspensionen, z. B. die von Mikroorganismen. Die Lösungen oder Suspensionen waren beim Zonenschmelzen in einem geschlossenen, aus Biegerohr selbst hergestellten Substanzschiffchen eingefroren und wurden nach dem Zonendurchgang auf einer Scheibe Trockeneis samt dem Glasschiffchen in Fraktionen zerschnitten.

### 1. Ascorbinsäure

An einer 0,25 proz. Ascorbinsäure-Lösung konnte bewiesen werden, daß keine Verluste beim Zonenschmelzen eingetreten waren. 87% des Vitamins fanden sich nach dem Durchgang von 14 Zonen im letzten Viertel des Glasschiffchens wieder. Der Rest verteilte sich, wie in Bild 5 aufgezeigt, auf den übrigen Eisbarren. Im Teil III wurden noch 10,9%, im Teil II noch 2% und im Teil I nur noch 0,1% der nach J. Tillmans<sup>6</sup>) bestimmten Ascorbinsäure gefunden.



A828.5

Gleich gut war die Anreicherung aus einer 0,025 proz. Lösung. Es lag deshalb nahe, zu versuchen, ob nicht auch sehr stark verdünnte, in Bezug auf den Nachweis unterhalb der Erfassungsgrenze liegende Lösungen soweit konzentriert werden können, bis ein exakter Nachweis wieder möglich wird. Auch diese Versuche verliefen positiv und ergaben besonders bei den kleinsten Konzentrationen eine sehr gute Anreicherung.

### 2. Chinone und Aldehyde

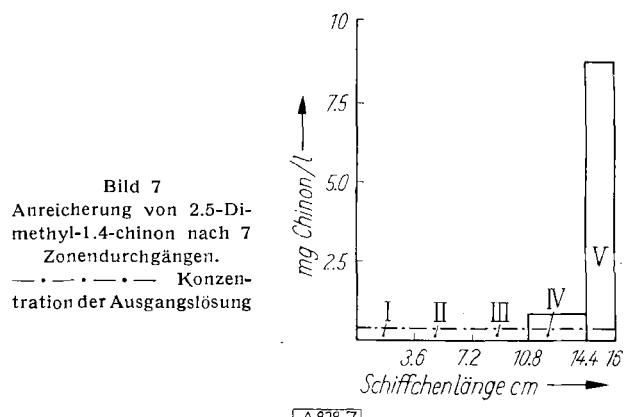
Diese Verbindungen wurden vor allem untersucht, um die Wirksamkeit des Eiszonenschmelzens an wasserdampf-flüchtigen und zum Teil hitzeempfindlichen Substanzen zu erproben. Wir wählten u. a. Stammlösungen von Thymochinon und 2,5-Dimethyl-1,4-chinon, deren Ausgangskonzentrationen unterhalb der spektralphotometrischen Erfassungsgrenze lagen und die auch äußerlich keine Gelbfärbung mehr zeigten. Bereits nach kurzzeitiger Wanderung des mit dieser Lösung beschickten Glasschiffchens über 5 Heizstellen hinweg hatten sich die Chinone soweit angereichert, daß in dem noch flüssigen Ende deutlich die Chinon-Farbe wieder zu erkennen war. Weiterhin war nach 14 Zonendurchgängen das in gesättigter wässriger Lösung vorliegende Thymochinon restlos in den letzten Teil des Glasrohres gewandert (Bild 6) und das 2,5-Dimethyl-1,4-chinon aus 0,0004 proz. Lösung soweit angereichert wor-

den, daß es in den ersten 3 des in 5 Abschnitte aufgeteilten Eisbarrens nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Bild 7).

Ist die Ausgangslösung gesättigt, so fällt an dieser Stelle das Chinon kristallin, in wenige mm<sup>3</sup> Eis eingeschlossen, an und kann also bequem in Substanz isoliert werden (Bild 6).



Bild 6. Anreicherung von Thymochinon aus gesättigter Lösung (1,1 mg/ml) am hinteren, mit Kork verschlossenem Ende des 14 cm langen Substanzschiffchens. In Aufsicht photographiert



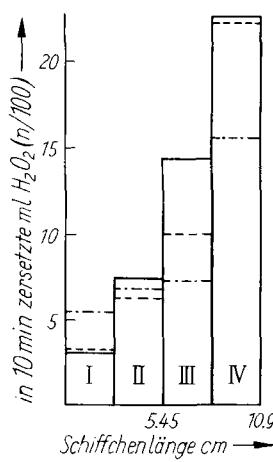
A828.7

Auch Vanillin, als Beispiel eines Naturstoff-aldehyds und  $\beta$ -Indolyllessigsäure als Wuchsstoff, ist in genau der gleichen Weise quantitativ aus hochverdünnten Lösungen wieder gewonnen worden.

### 3. Enzyme

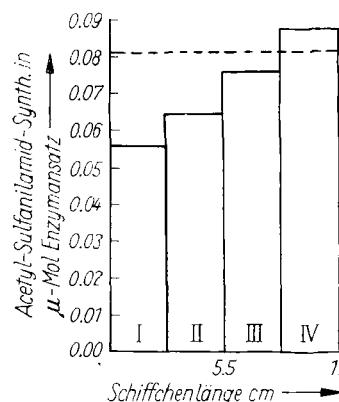
(mit Dr. F. Leuschner).

Das Verhalten dieser hochmolekularen und empfindlichen Substanzen beim Eis-Zonenschmelzen wurde u. a. an der Katalase und der Arylamin-acetylase studiert. Der erwartete Anreicherungseffekt trat in beiden Fällen dann auf, wenn man von konzentrierten Lösungen ausging (Bild 8 und 9).



A828.8

Bild 8  
Verteilung der Katalase<sup>7)</sup> im zonengeschmolzenen Eisbarren nach - - - - 7; - - - 14; — 21 Zonendurchgängen; bestimmt nach Willstätter<sup>8)</sup>; Verlust 15 %. Ausgangskonzentration: 0,2 mg/ml



A828.9

Bild 9  
Konzentrierung des Enzymsystems<sup>9)</sup> mit 13 % Verlust. Die Verteilung wurde durch Bestimmung des Acetyl-Coenzym A nach F. Lynen, E. Reichert und L. Rueff<sup>10)</sup> ermittelt. - - - - Aktivität der Ausgangslösung

<sup>7)</sup> Kristallsuspension 10 mg Enzymprotein im ml der Fa. C. F. Boehringer & Söhne G.m.b.H., Mannheim.

<sup>8)</sup> Untersuchungen über Enzyme, Bd. 1, Berlin 1928, S. 385.

<sup>9)</sup> Nach N. O. Kaplan u. F. Lipmann, J. biol. Chemistry 174, 37 [1948].

<sup>10)</sup> Liebigs Ann. Chem. 574, 1 [1951].

Dagegen ist es nicht gelungen, stark verdünnte Enzymlösungen ohne große Verluste einzuhängen. Hexokinase z. B. — in einer Lösung mit 200  $\gamma$ /ml<sup>11)</sup> angewandt — verlor schon beim Durchlaufen von wenigen Zonen vollständig ihre Aktivität. Diese Inaktivierung kann weder durch die schwache Erwärmung beim Schmelzen, noch durch die tiefe Temperatur, die in der Zonenschmelztröhre herrscht, verursacht sein, da Vergleichslösungen unter genau den gleichen Bedingungen aufbewahrt, keinerlei Verluste ergeben. Eher ist das wiederholte Einfrieren und Auftauen für diesen seltsamen Effekt verantwortlich zu machen; sei es, daß die prosthetische Gruppe abgespalten wird oder die spirale Struktur der Enzymproteide verloren geht<sup>12)</sup>. Für die erste Erklärung sprechen Erfahrungen, die wir mit Methylenblau gemacht haben. Dieser Farbstoff wird schon nach einigen Zonendurchgängen in einen grünen und blauen Anteil zerlegt; beide Fraktionen unterscheiden sich auch papierchromatographisch in ihren  $R_f$ -Werten. Berücksichtigt man jedoch die deutlichen Gestaltänderungen, die wir beim Zonenschmelzen von Plankton-Suspensionen beobachtet haben, so ist man geneigt, mehr die zweite Erklärung zu bevorzugen.

#### 4. Bakterien und Bakteriophagen

(mit Doz. Dr. J. Borneff).

Die erfolgreiche Konzentrierung biologischer Substanzen (Katalase z. B.) ermutigte uns zu Versuchen mit lebendem Material. Dies war schon deswegen angezeigt, um die Grenzen des Verfahrens bei starker Erhöhung des Molekulargewichts kennenzulernen. Zu diesem Zweck haben wir orientierende Untersuchungen mit Bakterien und Bakteriophagen als Virusmodelle unternommen. Zur Anfertigung einer Ausgangslösung wurde ein *E. coli*-Stamm (gramnegative Stäbchen) auf Schrägaragar über 18 h bei 37 °C bebrütet und dann mit physiologischer Kochsalzlösung an Hand des Trübungsgrades auf eine Keimdichte von 1 Milliarde/ml eingestellt. Die daraus durch entsprechende Verdünnung jeweils hergestellte Gebrauchssuspension wurde in den Versuchsröhren mit Aceton/Trockeneis eingefroren und nach dem Zonenschmelzen in kleinere Abschnitte, wie erwähnt, unterteilt. Schon Vorversuche zeigten, daß die Verdünnung mit steriles Leitungswasser zu beträchtlichen Keimverlusten beim Zonenschmelzen führte. Es mußte demnach — wie beim Gefriertrocknen<sup>13)</sup> — der Bakteriensuspension ein Stabilisator zugesetzt werden. Wir benutzten hierfür zunächst 1% Caseinpepton-Lösung mit Zusatz von 7,5% Glucose, womit der Zonenschmelzverlust auf 50% herabgedrückt werden konnte. Jetzt ließ sich auch ein deutlicher Wanderungseffekt nachweisen. Von den 7 bis 8 2,5-cm-langen Abschnitten des Röhrchens fanden wir in den beiden letzten (= 1,0 ml) etwa 50% der überlebenden Keime wieder. D. h., daß beim Durchgang von Schmelzonen durch die eingefrorene Bakteriensuspension gramnegative Keime in erheblichem Umfang mitgeführt werden. Bestimmt wird durch Änderung der Zusammensetzung des Aufschwemmungsmediums, der Wanderungsgeschwindigkeit und der Konzentration die Überlebensrate, wenn erforderlich, noch vergrößert. Über diesbezügliche Versuche soll später berichtet werden.

Wesentlich günstiger hinsichtlich der Anreicherung von Keimen aus wässriger Suspension verliefen die Versuche mit Phagen (nicht-typisierter Coli-Phage, aus Abwasser gezüchtet). So waren bei einem Gesamtverlust von nur

<sup>11)</sup> Hexokinase-Präparat der Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland/Ohio; 28000 K.M.V./g bei 30°C.

<sup>12)</sup> Th. Börsig: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie, 4. Auflage, Leipzig 1954, S. 13.

<sup>13)</sup> K. Neumann, Chem.-Ing.-Technik 29, 267 [1957].

5% nach der Zonenschmelze 85% der überlebenden Phagen lediglich auf die letzten zwei von 4 Abschnitten in 0,5 ml Inhalt verteilt. Durchschnittlich konnte eine drei- bis vierfache Anreicherung erzielt werden, so daß es sich bei den bisher bekannten komplizierten Konzentrierungsverfahren für Phagen lohnen wird, die Versuche in dieser Richtung zu erweitern.

#### 5. Plankton

(mit Dr. H. O. Glenk).

Um allgemein eine Gesamtübersicht der Anwendbarkeit des Eiszonenschmelzens sowohl für gelöste, niedermolekulare Stoffe als auch für suspendiertes, hochmolekulares und lebendes Material zu gewinnen, haben wir die Versuche auf Plankton ausgedehnt. Schon im Hinblick auf die Brauchbarkeit des Anreicherungsverfahrens für Wasseruntersuchungen mußte dies geschehen. Benutzt wurden Wasserproben aus einem kleinen Wasserbecken mit grüner Wasserblüte und einem Fischteich, deren Plankton- und Seston-Gehalt vor und nach dem Zonenschmelzen durch mikroskopische Zählungen ermittelt wurde<sup>14)</sup>. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt dargestellt. Die Grenze der Leistungsfähigkeit des Zonenschmelzverfahrens in der bisherigen Form schien demnach bei einer Partikelgröße von 2–5  $\mu$  erreicht zu sein. Dazu kann gesagt werden, daß durch das wiederholte Einfrieren und Wiederaufauen, also durch die „Mechanik“ des fraktionierten Gefrierens, die Zellen eine starke Deformation erleiden. Selbst bei kleiner Zonenzahl können die einzelnen Planktonformen bis zur Unkenntlichkeit zerstört werden.

Zonenzahl	Zählwerte pro ml Probe		Zählwerte pro ml „angereicherte Probe“	
14	Gesamtseston Plankton		Gesamtseston Plankton	
	15000	3600	ärmste Fraktion:	
			18000	680
			mittlere Fraktion:	
			20000	800
			starkste Anreicherung:	
			26000	320
7	25000	1200	ärmste Fraktion:	
			13000	1200
			mittlere Fraktion:	
			25000	600
			starkste Anreicherung:	
			26000	500

Tabelle 1  
Zonenschmelze von gefrorener Plankton-Suspension

#### 6. Thiophen in Benzol

Abschließend seien Versuche mit Benzol angeführt, um zu zeigen, daß das Verfahren ohne weiteres auf nichtwässrige Lösungsmittel übertragen werden kann. Das im Rohbenzol immer vorhandene Thiophen wandert hierbei mit der Schmelzzone und reichert sich am Ende so stark an, daß die letzten mm<sup>3</sup> der Benzol-Mischung nicht mehr erstarren. Andererseits konnte fast 90% des Benzols vollkommen thiophen-frei wiedergewonnen werden. Am günstigsten liegen die Verhältnisse, wenn die stark mit Thiophen durchmischte Endzone abgeschnitten wird und man die gefrorene Hauptmenge des vorgereinigten Benzols erneut zonenschmilzt. Will man vermeiden, daß sich beim Auftauen das reine Benzol wieder mit dem anliegenden Thiophen durchmischt, so baut man mit Vorteil in das oben beschriebene Glasschiffchen mehrere halbkreisförmige 5 mm hohe „Hürden“ aus Speckstein ein, die während des Schmelzvorganges infolge des schon früher erwähnten Substanztransportes<sup>15)</sup> in Laufrichtung überstiegen wer-

<sup>14)</sup> H. O. Glenk, Sitzungsberichte der Physik.-med. Soc. zu Erlangen, 77, 58 [1954].

<sup>15)</sup> H. Schildknecht, Z. Naturforsch. 12b, 23 [1957].

den. Man erreicht auf diese Art eine Fraktionierung beim Zonenschmelzen eingefrorener, organischer Flüssigkeiten, worüber an anderer Stelle eingehender berichtet wird. Die Reinigung von Benzol bzw. die Anreicherung von Spuren Thiophen darin war auch dann noch sehr gut möglich, wenn die Wanderungsgeschwindigkeit des Substanzschiffchens doppelt so groß wie bei den beschriebenen Versuchen, nämlich 2 cm/h, gewählt wurde. Hier liegt vor allem der Ansatzpunkt für neue Versuche: die Ermittlung der optimalen Geschwindigkeit bei verschiedenen Lösungs-

mittelsystemen zu Zeitersparnis und u. U. zur Erhöhung des Trenneffektes der gelösten Substanzgemische auf Grund ihrer unterschiedlichen Verteilung zwischen fester und flüssiger Phase beim kontinuierlichen Umschmelzen im Eisbarren.

*Herrn Prof. Dr. G. Hesse danken wir sehr für großzügige Förderung, der „Van't Hoff-Stiftung“ für die gewährte Unterstützung, mit der die Untersuchungen ausgeführt worden sind.*

Eingegangen am 7. August 1957 [A 828]

## Zuschriften

### Die Kinetik des thermischen Zerfalls von Perchlorylfluorid

Von Dr. R. GATTI, Dr. J. E. SICRE  
und Prof. Dr. H. J. SCHUMACHER

Facultad de Química y Farmacia, Universidad Nacional de la Plata

Der thermische Zerfall des Perchlorylfluorids  $\text{FCIO}_3$ , aus Fluor und Kaliumchlorat hergestellt<sup>1)</sup>, wurde bei 470–500 °C und bei 5–1000 Torr in Pyrexglas- und Quarzgefäßen eingehend untersucht.

Die Reaktion ist monomolekular und verläuft in Quarzgefäßen völlig homogen, während in Gefäßen aus Pyrexglas ein geringer heterogener Anteil vorhanden ist. Die Geschwindigkeitskonstante ist in diesem Druckbereich druckabhängig.  $k_\infty$  wurde durch Extrapolation aus der  $1/k_p \rightarrow 1/p$ -Kurve gewonnen. Inerte Gase, wie  $\text{SiF}_4$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{Cl}_2$ , dem Reaktionsgemisch zugemischt, erhöhen die Geschwindigkeit, doch ist ihr aktivierender Einfluß erheblich geringer als der des Perchlorylfluorids selbst.

Die Aktivierungsenergie, aus den Temperaturkoeffizienten von  $k_\infty$  berechnet, beträgt  $55,5 \pm 3$  kcal:

$$k_\infty = 4,2 \times 10^{12} \cdot 10^{-\frac{55500}{4,57 T}} \text{ sec}^{-1}$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade, die zur Aktivierung beitragen, aus dem Halbwertsdruck bestimmt, ist 7, falls der Energieübertragungsfaktor (= Desaktivierungsfaktor) gleich 1 gesetzt wird. Rechnet man mit der maximalen Anzahl der Freiheitsgrade  $f=9$ , so erhält  $\gamma = 1,6 \cdot 10^{-2}$ .

Die kritische Zerfallsenergie, berechnet mit  $f=7$ , beträgt dann  $64,6 \pm 3$  kcal. Die Bindungsfestigkeiten der F–Cl wie auch der Cl–O-Bindungen im  $\text{FCIO}_3$  sind offenbar erheblich größer als im  $\text{FCIO}_2$  und  $\text{ClO}_2$ , wie auch aus den geringeren F–Cl- und Cl–O-Abständen von  $\text{FCIO}_3$ <sup>2)</sup> hervorgeht.

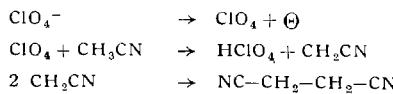
Eingegangen am 22. Juli 1957 [Z 503]

<sup>1)</sup> J. E. Sicre u. H. J. Schumacher, diese Ztschr. 69, 266 [1957].  
<sup>2)</sup> D. R. Lide u. D. E. Mann, J. chem. Physics 25, 1128 [1956].

### Elektrolysen von Perchloraten in Acetonitril

Von Prof. Dr. HANS SCHMIDT und cand. chem. J. NOACK  
I. Chemisches Institut der Humboldt-Universität Berlin

Bei der Elektrolyse von  $\text{AgClO}_4$  in Acetonitril an Pt-Elektroden trat infolge Wasserstoff-Abscheidung ein Defizit der Ag-Abseitung auf. Die Erklärung liegt in der anodischen Bildung von Überchlorsäure gemäß



Bernsteinsäure-dinitril konnte durch Überführung in Pyrrol nachgewiesen werden. Die Bildung von  $\text{HClO}_4$  wurde bewiesen durch 1. saure Reaktion der Elektrolytlösung nach Zusatz von Wasser; 2. Steigerung der kathodischen Silberabscheidung auf 100proz. Stromausbeute durch Zusatz von Pyridin und Diäthylamin; 3. Potentialmessungen in Abhängigkeit von der Elektrolysendauer; 4. Leitfähigkeitsmessungen; 5. Polarographie; 6. UV-Absorptionsmessungen.

Die Bildung von  $\text{HClO}_4$  verläuft quantitativ, wie potentiometrische Titrationen mit Diäthylamin in  $\text{CH}_3\text{CN}$  und Perchlorat-Bestimmungen ergeben. Die Menge an  $\text{HClO}_4$  läßt sich also aus dem Coulometerwert und der kathodischen Silber-Abscheidung berechnen. Die potentiometrisch gefundenen Werte entsprechen den berechneten Menge an  $\text{HClO}_4$ . Die Elektrolyse von  $\text{AgClO}_4$  in

$\text{CH}_3\text{CN}$  gestattet es, wasserfreie Lösungen von  $\text{HClO}_4$  vorgegebenen Gehalts, wie z. B. für potentiometrische Titrationen, herzustellen.

Während bei der Elektrolyse von  $\text{AgClO}_4$  in Pyridin eine Ta-Anode unter Bildung eines Oxyd-Filmes sofort blockiert wird, wird in  $\text{CH}_3\text{CN}$  Tantal anodisch gelöst. Mit  $\text{Ag}(\text{Pyr.})_2\text{ClO}_4$  als Elektrolyt konnte die Verbindung  $\text{TaPyr.}\text{ClO}_4$  isoliert werden, die in  $\text{CH}_3\text{CN}$  schwer, in Pyridin dagegen löslich ist. Die Isolierung der pyridin-freien Verbindung war nicht möglich. Man erhält zwar eine Lösung mit dem Verhältnis  $\text{Ta:ClO}_4^- = 1:1$ , die jedoch nicht beständig ist. Aus der Isolierung des  $\text{TaPyr.}\text{ClO}_4$  folgt, daß Tantal als  $\text{Ta}^+$  anodisch in Lösung geht, und zwar mit einer Stromausbeute von  $\sim 40\%$ . Als Nebenreaktion wird auch hier  $\text{HClO}_4$  gebildet,  $\text{HClO}_4$  wurde wie beim Pt nachgewiesen und bestimmt. Mit Diäthylamin wird neutralisiert und  $\text{TaClO}_4 \cdot (\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}$  gebildet. Die potentiometrische Titration erfaßt die Summe beider Reaktionen. Der Quotient der Differentialquotienten des linearen Anstiegs der Potentialkurven an Pt- und Ta-Elektroden in Abhängigkeit von der Elektrolysendauer ergibt einen mit den Stromausbeutestimmungen übereinstimmenden Wert für die  $\text{HClO}_4$ -Bildung.

Wechselstromelektrolysen ergaben für das  $\text{ClO}_4$ -Radikal eine Lebensdauer von unter  $1/100$  sec. Es bleibt zu untersuchen, ob in anderen Lösungsmitteln eine längere Lebensdauer auftritt und ob unter Verwendung eines Frequenzgenerators genauere Angaben gemacht werden können.

Bei Verwendung von Ag- bzw. Cu-Anoden ergab sich eine 100proz. Stromausbeute in bezug auf Anode und Kathode. Es tritt bei diesen Elektrolysen weder  $\text{Cu}^{2+}$  noch  $\text{Ag}^{2+}$  auf.

Die Untersuchung an Ta-Anoden mit weiteren Anionen sowie in anderen nichtwässrigen Lösungsmitteln und die Versuche mit Perchloraten unter Verwendung anderer Anodenmetalle wie V, Mo, W werden fortgesetzt.

Eingegangen am 24. Juli 1957 [Z 508]

### Synthese eines weiteren Trisaccharides mit verzweigter Kette: 6- $\beta$ -D-Glucosido-maltose (4- $\alpha$ ,6- $\beta$ -Bis-D-glucosido-D-glucose\*)

Von Dr. ALMUTH KLEMER

Organisch-Chemisches Institut der Universität Münster/Westf.

Trisaccharide mit verzweigter Kette wurden bisher niemals als Abbauprodukte der sauren Hydrolyse verzweigtkettiger Polysaccharide isoliert. Kürzlich gelang erstmalig die chemische Synthese eines solchen Trisaccharid-Derivates<sup>1)</sup>. Zur Synthese der 6- $\beta$ -D-Glucosidomaltose (4- $\alpha$ ,6- $\beta$ -Bis-D-glucosido-D-glucose) wird  $\beta$ -Benzyl-maltosid zum  $\beta$ -Benzyl-4',6'-benzal-maltosid (I) umgesetzt,  $F_p: 113-115$  °C;  $[\alpha]_D^{25} = +15,8$  ° (Pyridin;  $c = 1,2$ ). Die Stellung des Benzal-Restes ergibt sich aus der Methylierung und anschließenden Hydrolyse. Es werden 2,3-Dimethyl-D-glucose und 2,3,6-Trimethyl-D-glucose erhalten. I gibt mit Tritylchlorid in Pyridin und nachfolgender Acetylierung  $\beta$ -Benzyl-2,3,2',3'-tetraacetyl-6-trityl-4',6'-benzal-maltosid (II),  $F_p: 204-205$  °C;  $[\alpha]_D^{25} = +7,4$  ° (Chloroform;  $c = 2,5$ ). Die Abspaltung des Trityl-Restes von II mit einer äquivalenten Menge an HBr in Äther führt zum  $\beta$ -Benzyl-2,3,2',3'-tetra-acetyl-4',6'-benzal-maltosid (III),  $F_p: 221$  °C. III wird mit Acetobrom-D-glucose in Chloroform in Gegenwart von Silberoxyd, etwas Jod und wasserfreiem Calciumsulfat kondensiert. Das erhaltene Rohprodukt, bestehend aus dem Trisaccharid-Derivat, nicht umgesetztem III und Folgeprodukten der Acetobrom-D-glucose wird nach Zemplén versetzt und die Benzyl-Reste anschließend hydriert mit  $\text{H}_2/\text{Pd-Mohr}^2$  in Tetrahydrofuran/Wasser ( $p_{\text{H}} 6,8-7$ ) abgespalten. Nach der chromatographischen Trennung des Gemisches an einer Cellulosepulversäule mit