

Fig. 3.—Two nerve fibre strands in the pars tuberalis showing typical degenerative appearances - granular masses and beaded fragments ( $\downarrow$ ). The position of the strands is indicated in Figure 1 by 3  $\downarrow$ . GC - gland cell cords of the pars tuberalis, I - infundibulum. Cat. Bielschowsky-Gros.  $\times 1000$ .

fibres of the infundibulum were broken up into loose nerve fibre fragments and granular masses. Such granular masses and beaded fragments ( $\downarrow$ ) can be followed from the infundibulum (I) continuously into the pars tuberalis between the gland cell cords (GC), as is convincingly demonstrated in Figure 3. Some damage of the gland cells caused by the lesion is indicated by the heavy impregnation of the cell cords.

The results of the present investigation indicate that considerable number of hypothalamic nerve fibres pass

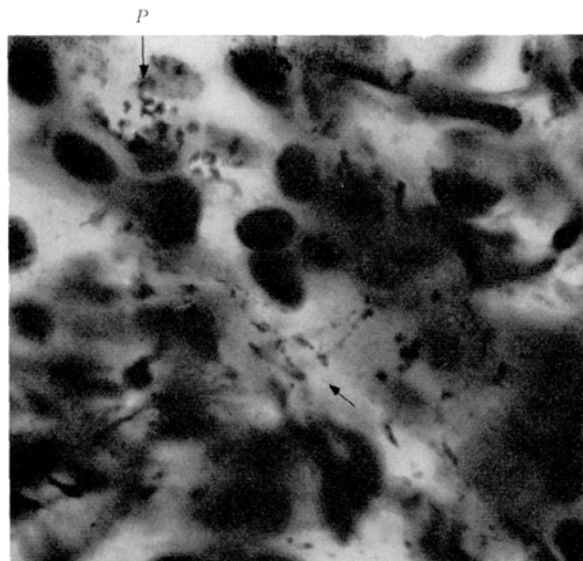


Fig. 4.—Beaded fragments ( $\downarrow$ ) among the gland cells of the pars tuberalis, showing similar arrangement as degenerating nerves. The structures are probably processes of connective tissue cells. P - precipitate of silver on the surface of the slide. Cat. Bielschowsky-Gros.  $\times 1000$ .

from the infundibulum into pia-arachnoid tissue and into different parts of the pars tuberalis, contrary to the general opinion that few or no such fibres exist.

Granular masses could also be found among the gland cells in the dorsal pars tuberalis of the experimental animal, but not in the pars tuberalis of normal animals. At the present time, it is not possible to determine exactly the nature of these structures. Beaded fragments among the gland cells of the pars tuberalis (Figure 4), which could be easily interpreted as degenerating nerve fibres, are probably processes of connective tissue cells. Such connective tissue cells could be found in the dorsal pars tuberalis of the operated animal.

J. METUZALS

Zoologisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Groningen, Haren (Nederland), August 18, 1958.

#### Zusammenfassung

Mit der Bielschowsky-Gros-Methode wurden bei Katzen Nervenfasern untersucht, die vom Infundibulum in die Pars tuberalis ziehen. Die Befunde an normalen Tieren und an einer Katze mit einer Hypothalamus-Läsion zeigen, dass eine beachtliche Zahl hypothalamischer Fasern in verschiedene Teile der Pars tuberalis, sowie in das Gewebe der Pia und der Arachnoidea übergehen.

Bei der operierten Katze wurde das Degenerationsbild der in den dorsalen Teil der Pars tuberalis ziehenden Hypothalamus-Fasern beschrieben.

## Informations - Informationen - Informazioni - Notes

### STUDIORUM PROGRESSUS

#### Sur le dédoublement par entraînement. La notion de sursaturation «rémanente»

Par G. AMIARD<sup>1</sup>

Une variante du dédoublement spontané des racémiques par cristallisation, récemment appelée dédouble-

ment par *entraînement*<sup>2</sup>, consiste à provoquer la cristallisation dans une solution renfermant un excès de l'énantiomorphe désiré<sup>3-7</sup>. Si l'opération est conduite dans certaines conditions, on recueille une quantité de cristaux de

<sup>2</sup> G. AMIARD, Bull. Soc. chim. France 1956, 447.

<sup>3</sup> F. ST. KIPPING et W. J. POPE, J. chem. Soc. 75, 36 (1899).

<sup>4</sup> E. DARMOIS, C. R. Acad. Sci. 237, 124 (1953).

<sup>5</sup> A. WERNER, Ber. deutsch. chem. Ges. 47, 2171 (1914).

<sup>6</sup> R. DUCHINSKY, Festschrift Emil Barends, 375 (1936).

<sup>7</sup> E. CALZAVARA, B. F. 763374 du 23, 1. 33.

<sup>1</sup> Services de Recherches Roussel-Uclaf, Paris, le 29 juillet 1958.

l'isomère optique choisi supérieure à l'excès utilisé. La solution renferme alors un excès de l'autre antipode.

Le mécanisme d'un dédoublement par entraînement a déjà fait l'objet d'explications qui s'appuient sur les diagrammes de solubilité<sup>6</sup>. Cependant, des études récentes de VELLUZ et de nous-même, développées dans notre laboratoire et effectuées plus particulièrement avec le DL-thréo 1-*p*-nitrophényl 2-amino propane 1,3-diol<sup>8,9</sup> et la DL-thréonine<sup>8,10</sup>, ont mis en lumière l'importance dans de tels dédoublements de deux facteurs qui semblaient avoir été négligés jusque-là: sursaturation rémanente et entraînement de la cristallisation.

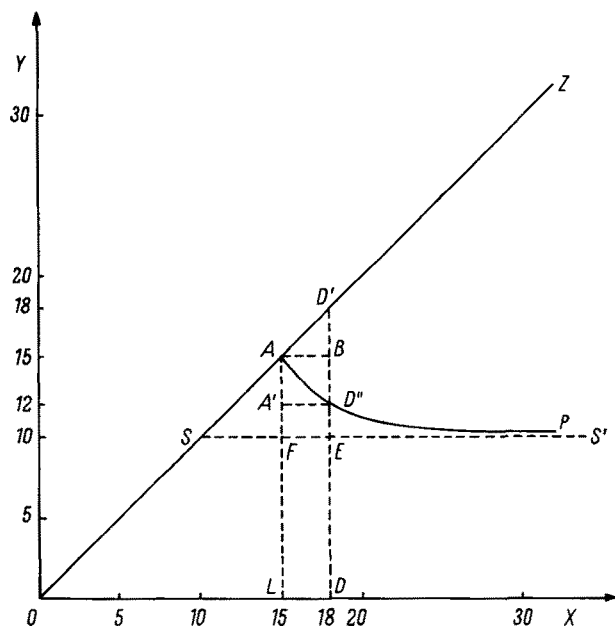


Fig. 1

On constate lors des déterminations de solubilité d'un corps cristallisé que l'équilibre entre les phases liquide et solide est parfois très long à atteindre<sup>6,11</sup>. C'est ce retard qui explique que, dans les cas du thréo 1-*p*-nitrophényl 2-amino propane 1,3-diol et de la thréonine, la quantité de produit qui reste en solution après un temps de cristallisation déterminé est supérieure à la solubilité et varie selon la quantité de corps dissous initialement<sup>8,10</sup> (Fig. 1). Cette variation de la quantité de corps dissous suivant la quantité de corps introduit met en évidence le phénomène d'entraînement de la cristallisation. En effet, plus la quantité initialement dissoute est grande, plus la cristallisation est complète dans un temps déterminé, ce qui permet de se rapprocher davantage de l'état d'équilibre de saturation. L'augmentation de la quantité de corps dissous détermine donc une augmentation de la vitesse de cristallisation. Ce résultat est compatible avec la formule de NOYES et WHITNEY, qui a été donnée sous la forme suivante<sup>12,13</sup>:

$$dc/dt = KS (C_{\text{sat}} - C)$$

<sup>8</sup> L. VELLUZ, G. AMIARD et R. JOLY, Bull. Soc. chim. France 1953, 342.

<sup>9</sup> Il s'agit de la base libre correspondant au chloramphénicol. L'application de la méthode à l'échelle industrielle porte actuellement sur plus de 150 tonnes de racémique (B. F. 1 067 283 du 28. 11. 52; U.S.P. 2 734 919 du 25. 2. 53; D.R.P. 938 670 du 16. 6. 53).

<sup>10</sup> L. VELLUZ et G. AMIARD, Bull. Soc. chim. France 1953, 903.

<sup>11</sup> R. D. VOLD et M. J. VOLD in A. WEISSBERGER, *Technique of Organic Chemistry*, 2<sup>e</sup> éd., vol. I (Interscience, New York 1949), p. 307.

<sup>12</sup> J. D. JENKINS, J. Amer. chem. Soc. 47, 903 (1925).

<sup>13</sup> R. S. TIPSON in A. WEISSBERGER, *Technique of Organic Chemistry*, vol. III (Interscience, New York 1950), p. 381.

La vitesse de cristallisation dépend du degré de sursaturation de la solution ( $C_{\text{sat}} - C$ ) et de l'aire  $S$  de la surface des cristaux exposée à l'accroissement. L'augmentation de la quantité de corps dissous initialement agit en augmentant le degré de sursaturation et l'aire des cristaux, car pour un même degré de sursaturation la surface des cristaux sera d'autant plus grande qu'il y aura eu plus de produit introduit initialement. La courbe AP (Fig. 1) représente donc les états de sursaturation rémanente du corps dissous, en présence de ses cristaux, à température constante et au bout d'un temps déterminé, en fonction de la quantité  $X$  de corps dissous initialement. L'asymptote  $SS'$  correspond à la solubilité.

Il faut cependant distinguer ces états de sursaturation rémanente des états de sursaturation métastable d'Ostwald-Miers qui concernent des solutions sursaturées en corps dissous en l'absence de germes cristallins et dont la concentration n'est pas suffisante pour provoquer la formation spontanée de ces germes<sup>14</sup>. La notion de sursaturation métastable a été mise à profit pour l'obtention de gros cristaux<sup>15</sup>. Pour une même température, la sursaturation métastable est supérieure à la sursaturation rémanente. On le constate d'ailleurs expérimentalement. En effet, lorsqu'on dissout des quantités croissantes de corps à 80° dans des volumes égaux de solvant et qu'on refroidit ensuite à 20°, la cristallisation n'a lieu au début qu'après amorçage et très lentement. Mais, à partir d'une certaine valeur de la quantité de corps introduit qui correspond à la limite de sursaturation métastable, l'amorçage de la cristallisation devient spontané et la cristallisation est rapide.

La considération des données précédentes permet de donner une interprétation du dédoublement par entraînement. Prenons le cas le plus simple où, à la température choisie, il y a séparation par cristallisation d'un conglomerat, les deux énantiomorphes se comportant comme deux corps différents non susceptibles de se combiner ni de syncrystalliser. La cristallisation de l'un n'est pas amorcée par les germes cristallins de l'autre.

On dissout, à 80°, une quantité de racémique<sup>16</sup> de façon que les concentrations en corps  $L$  et en corps  $D$  soient chacune égale à  $OL$  sur la Figure 1. Le point représentatif de l'isomère lévogyre avant cristallisation est alors en  $A$ . On dissout de plus une quantité excédentaire de l'isomère dextrogyre égale à  $LD$ . La quantité totale de corps dextrogyre en solution est alors  $OD$  et le point représentatif est  $D'$  avant cristallisation. On refroidit la solution à 20° et provoque la cristallisation. Le corps lévogyre ne cristallise pas, il reste en sursaturation rémanente même en présence de ses germes cristallins puisque le point représentatif  $A$  est sur la courbe  $AP$ . Le corps dextrogyre cristallise jusqu'à ce que le point représentatif  $D'$  qui se déplace alors sur  $D'D$  atteigne la courbe de sursaturation rémanente en  $D''$ . La quantité de corps dextrogyre cristallisée est donc représentée par  $D'D''$ . Elle est supérieure à l'excès de corps droit représenté par  $D'B = AB = LD$ . La quantité cristallisée supplémentaire  $BD''$  correspond au dédoublement partiel du racémique mis en œuvre. En solution, il reste  $DD''$  de corps droit et  $LA$  de corps gauche donc un excès  $A'A$  de corps gauche correspondant à la partie de racémique dédoublee. Si l'on a choisi la grandeur de l'excès en corps droit  $LD$  de façon que  $D'B = BD''$ , il suffit de rajouter à la solution, après séparation du corps

<sup>14</sup> R. S. TIPSON, in A. WEISSBERGER, *Technique of Organic Chemistry*, vol. III (Interscience, New York 1950), p. 368.

<sup>15</sup> A. NEUHAUS, *Chemie-Ingenieur Technik* 28, 155 (1956).

<sup>16</sup> Pour abrégé, nous appelons ici racémique le mélange en parties égales de corps droit et de corps gauche sans que cela implique qu'il s'agisse du racémique vrai.

droit cristallisé, à 20°, une quantité de racémique égale à la quantité de corps droit séparée D'D' et de dissoudre par chauffage à 80° pour se retrouver dans les conditions inverses des précédentes. Le corps gauche ayant alors son point représentatif en D' et le corps droit en A, la cristallisation à 20° fournira D'D'' de corps gauche. Il suffira de recharger chaque fois en racémique pour poursuivre l'opération en séparant alternativement du corps lévogyre et du corps dextrogyre. Un exemple de ce procédé est fourni par le dédoublement de la DL-thréonine<sup>2</sup> où OL = 15 g pour 100 g d'eau, OD = 18 g pour 100 g d'eau, LD = 3 g, D'D'' = 6 g.

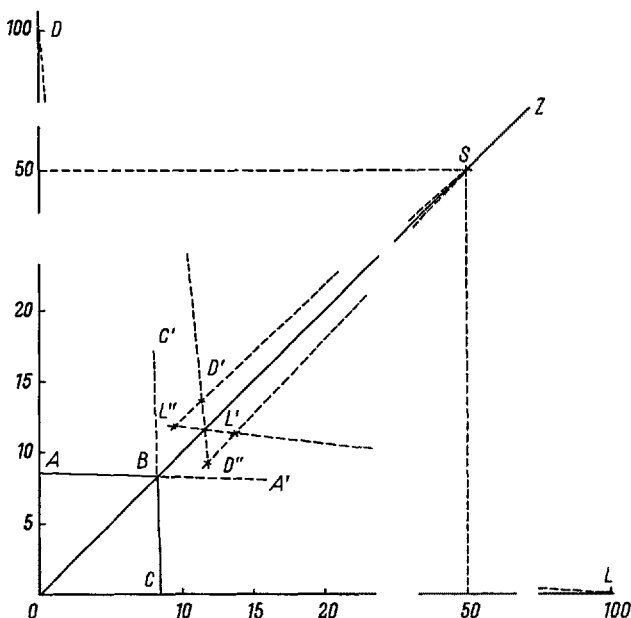


Fig. 2

En bref, la méthode consiste à faire cristalliser, à une température déterminée, une solution dans laquelle un énantiomorphe est à la limite supérieure de la sursaturation rémanente et l'autre en excès déterminé par rapport au premier. Le premier isomère reste en sursaturation rémanente, le second cristallise en quantité double de l'excès.

On peut aussi suivre un tel dédoublement sur les isothermes de solubilité selon BAKHUIS ROOZEBOOM<sup>17</sup>. On porte en ordonnée les concentrations pondérales en corps droit, c'est-à-dire la masse en grammes de corps droit pour 100 g de solution et en abscisse les concentrations pondérales en corps gauche. On trace la courbe de solubilité à 20° du corps droit dans le solvant renfermant des quantités croissantes de corps gauche, ce qui fournit la branche AB (Figure 2). De même, la solubilité à 20° du corps gauche dans une solution de corps droit de concentration croissante est CB symétrique de AB par rapport à la bissectrice OZ de l'angle DOL. En B, la solution saturée renferme autant de corps droit que de corps gauche. Les courbes telles que AB sont des isothermes dont les coordonnées des points indiquent la composition des solutions saturées en corps D à la température de l'isotherme. Elles déterminent une région DABZ qui représente la zone de cristallisation de l'isomère D lorsque le refroidissement est suffisamment lent pour que les équilibres de saturation soient respectés à chaque température. Inversement, la région LCBZ est la zone de cristallisation du corps lévogyre.

Si le refroidissement est rapide, les équilibres n'ont plus le temps de s'établir et l'on crée des états de sursaturation dont les points représentatifs sont situés sur les prolongements BA' et BC' des isothermes de solubilité AB et BC. La branche BA' représente l'influence du corps L en sursaturation sur la solubilité du corps D et BC' l'influence du corps D en sursaturation sur la solubilité du corps L.

On peut représenter sur un tel diagramme le dédoublement de la thréonine déjà étudié sur la Figure 1. La composition initiale de la solution à 80° est représentée par le point D' aussi bien sur la Figure 1 que sur la Figure 2. On refroidit à 20° et amorce la cristallisation du corps droit. Celui-ci cristallise seul. Le point représentatif se déplace de D' en D'' sur les deux diagrammes. On remarque sur la Figure 2 que D'' est situé légèrement au-dessus de BA', ce qui correspond à la sursaturation rémanente ED'' de la Figure 1. L'addition de racémique après séparation de l'isomère D et la dissolution à 80° déplacent le point représentatif de D'' en L' sur D'S. Le point L' étant symétrique de D' par rapport à la bissectrice OZ, on se trouve dans les conditions inverses aux précédentes. Par refroidissement à 20°, on fait cristalliser l'isomère L en suivant L'L''. Une nouvelle addition de racémique nous ramène, suivant L'D' au point initial D', ce qui boucle le cycle.

DUCHINSKY<sup>8</sup> a expliqué le dédoublement du monochlorhydrate d'histidine racémique sur de tels diagrammes. Ce cas est plus complexe à cause de l'existence d'un racémique vrai, mais le dédoublement peut être quand même réalisé grâce aux états de sursaturation. L'auteur mentionne «l'établissement de faux équilibres d'une stabilité étonnante pouvant durer quelques heures.» Néanmoins, il n'a pas mis en évidence l'influence de la quantité de corps dissous initialement sur l'entraînement de la cristallisation qui, cependant, est le facteur prépondérant dans un tel dédoublement.

On peut donc maintenant faire ressortir la différence fondamentale qui existe entre le dédoublement spontané et le dédoublement par entraînement. Dans le premier cas, les deux énantiomorphes offrent la même sursaturation dans le milieu expérimenté. Si l'un des deux cristallise soit spontanément, soit par amorçage, l'autre reste en sursaturation instable car il suffit de la présence ou de la formation d'un germe pour qu'il cristallise à son tour en quantité égale. Dans le deuxième cas, l'inégalité des sursaturations est à la base du procédé. Un des énantiomorphes seulement, celui qui est en excès, peut cristalliser, l'autre reste en solution, même en présence de ses germes cristallins. Ce qui caractérise le deuxième procédé est donc bien l'entraînement de la cristallisation par l'excès de l'isomère optique choisi.

### Zusammenfassung

Durch abwechselnde Übersättigungen und darauf folgende Kristallisationen bei variierender Temperatur konnten gewisse Razemate in ihre optischen Antipoden gespalten werden. Im Falle des Chloramphenicols ist das gesetzmässige Gelingen der genannten Prozeduren sehr bemerkenswert. Diese sogenannte «methode de dédoublement par entraînement» wird begründet durch den Begriff der *remanenten* Übersättigung. Da diese im umgekehrten Verhältnis zur Menge jedes eingesetzten Enantiomeren variiert, kristallisiert das überschüssige Enantiomere, wogegen das andere, selbst bei Anwesenheit der eigenen Impfkristalle, in der Übersättigung bleibt. Die beschriebenen Erscheinungen sind durch Löslichkeitskurven darstellbar.

<sup>17</sup> H. W. BAKHUIS ROOZEBOOM, Z. physikal. Chem. 28, 494 (1899).