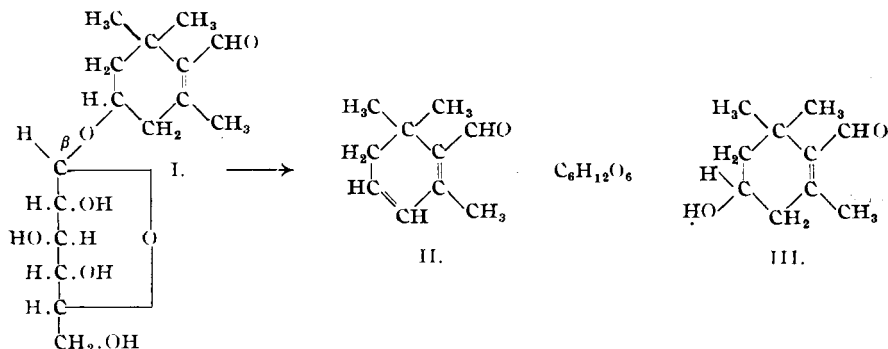


### 31. Richard Kuhn und Irmentraut Löw: Über das Androtermon von *Chlamydomonas eugametos*; linksdrehender 4-Oxy-2.6.6-trimethyl- $\Delta^1$ -tetrahydrobenzaldehyd.

[Aus d. Kaiser Wilhelm-Institut f. Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie; vorgetragen im Kolloquium dieses Instituts am 25. 11. 1940.]

(Eingegangen am 23. Dezember 1940.)

Pikrocrocine (I), der Bitterstoff des Safrans, wird sowohl durch verd. Säure als auch durch verd. Lauge in *d*-Glucose und 2.6.6-Trimethyl- $\Delta^{1,3}$ -dihydrobenzaldehyd (Safranal, II) gespalten<sup>1)</sup>.



Die Konstitution des Safranal ist einerseits durch Oxydation zu *asymm.* Dimethylbernsteinsäure, andererseits durch partielle katalytische Hydrierung zu  $\beta$ -Cyclocitral bewiesen worden. Daß im Pikrocrocine ein  $\beta$ -Glucosid vorliegt und daß der Glucoserest am C-Atom 4 haftet, das bei den einfacheren Xanthophyllen eine OH-Gruppe trägt, konnte wahrscheinlich gemacht werden.

1) Spaltung des Pikrocrocins durch HCl und durch KOH. Da es, auch bei Terpenglucosiden, ganz ungewöhnlich ist, daß ein Glucosid sowohl durch Säure als auch durch Lauge so glatt gespalten wird und daß dabei im Aglucon eine neue Doppelbindung auftritt, haben wir die Kinetik dieser „Hydrolyse“ genauer untersucht. Wir hofften unter günstigen Umständen durch reaktionskinetische Messungen entscheiden zu können, ob die Spaltung direkt nach der Gleichung  $C_{16}H_{26}O_7 \rightarrow C_{10}H_{14}O + C_6H_{12}O_6$  verläuft oder ob sie sich in 2 Stufen abspielt: 1) echte Hydrolyse unter Aufnahme von Wasser und Bildung eines Hydroxyaldehyds  $C_{16}H_{26}O_7 + H_2O \rightarrow C_{10}H_{16}O_2 + C_6H_{12}O_6$ , 2) Zerfall des Hydroxyaldehyds in Safranal und Wasser  $C_{10}H_{16}O_2 \rightarrow C_{10}H_{14}O + H_2O$ . Ungünstig für eine kinetische Untersuchung war der Umstand, daß sich eine wäßrige Lösung von Pikrocrocine, die man mit HCl oder KOH spaltet, stark trübt, weil das auftretende Safranal in Wasser nur sehr wenig löslich ist. Aus diesem Grunde haben wir alle Messungen in 50-vol.-proz. Alkohol ausgeführt. Günstig für die Verfolgung des Reaktionsverlaufs war die verhältnismäßig starke Änderung des optischen Drehungsvermögens (Pikrocrocine  $[\alpha]_D: -58^\circ$ ; *d*-Glucose  $[\alpha]_D: +52.5^\circ$ , Safranal  $[\alpha]_D: \pm 0^\circ$ ).

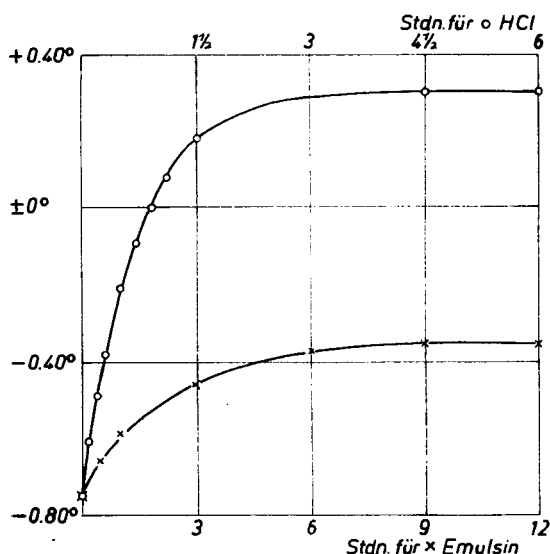
Das Ergebnis der im Versuchsteil angeführten polarimetrischen Messungen läßt sich wie folgt zusammenfassen: Obwohl die Spaltung des Pikrocrocins durch Alkali viel rascher verläuft als die Säurehydrolyse und für die präparative Darstellung von Safranal besonders geeignet ist<sup>1)</sup>, sind doch so hohe

<sup>1)</sup> R. Kuhn u. A. Winterstein, B. **67**, 344 [1934].

OH'-Konzentrationen erforderlich, daß die Glucose schon weitgehend zerstört wird und man durch Verfolgung des Drehungsvermögens keine auswertbaren Reaktionskonstanten erhalten kann. Demgegenüber verläuft die Spaltung durch HCl in 50-proz. Alkohol streng nach dem Gesetz für monomolekulare Reaktionen  $k = 1/t \cdot \log a/(a-x)$ . Die Abhängigkeit der Reaktionskonstanten von der HCl-Konzentration ist in Tafel 2 angegeben. Der Temperaturkoeffizient wurde gemessen und daraus nach Sv. Arrhenius<sup>2)</sup> die Aktivierungsenergie A berechnet.

$$A = \frac{\log k_2 - \log k_1}{0.4343} \times \frac{R \times T_1 \times T_2}{(T_2 - T_1)}$$

Wir fanden  $A = 7590 \text{ cal/Mol.}$  zwischen  $29.9^\circ$  und  $19.5^\circ \text{ C.}$ ,  $A = 11380 \text{ cal/Mol.}$  zwischen  $19.5$  und  $9.0^\circ \text{ C.}$  Anhaltspunkte für die intermediäre Anhäufung eines Reaktionszwischenproduktes erbrachten diese Versuche nicht.



Abbild. 1. Änderung des Drehungsvermögens bei der Spaltung von Pikrocrocine durch HCl (o) und durch Emulsin (x).

2) Spaltung durch Emulsin. Einen entscheidenden Fortschritt brachte die Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse. Pikrocrocine ist, wie wir gefunden haben, durch Emulsin spaltbar. Verfolgt man diesen Vorgang polarimetrisch, so findet man, daß im Gegensatz zu den Versuchen mit HCl nicht der dem Drehungsvermögen der  $\alpha$ - $\beta$ -D-Glucose entsprechende Endwert erreicht wird; die enzymatische Spaltung scheint früher zum Stillstand zu kommen (Abbild. 1). Schüttelt man einen Versuchsansatz mit Emulsin nach Erreichen dieses Endwertes mit Äther aus, so findet man die

Ätherlösung stark linksdrehend. Nach dem Trocknen und Verjagen des Lösungsmittels hinterbleibt ein zähflüssiges Öl, das im Hochvakuum destilliert werden kann. In ihm liegt der 4-Oxy-2.6.6-trimethyl- $\Delta^1$ -tetrahydrobenzaldehyd (III) vor. Die Linksdrehung des neuen Oxyaldehyds ( $[\alpha]_D^{20} = -87^\circ$ ) erklärt, warum die Hydrolyse des Pikrocrocins durch Emulsin — polarimetrisch gemessen — so anders verläuft, als die Spaltung durch HCl (Abbild. 1).

3. Eigenschaften des Oxyaldehyds. Das Oxy- $\beta$ -cyclocitral (III) ist nicht nur durch seine optische Aktivität, sondern auch durch seine viel größere Wasserlöslichkeit vom Dehydro- $\beta$ -cyclocitral (II) leicht unterscheidbar. Die gute Löslichkeit des Oxyaldehyds in Wasser bewirkt, daß eine wäßrige

<sup>2)</sup> Ztschr. physik. Chem. 4, 226 [1889].

Pikrocrocine-Lösung bei der Spaltung durch Emulsin völlig klar bleibt, während sie sich bei Spaltung durch HCl infolge Abscheidung des Dehydroaldehyds alsbald trübt (Demonstrationsversuch). Um den Oxyaldehyd seiner wäßrigen Lösung zu entziehen, muß man 5 bis 6 mal mit Äther ausschütteln; der Dehydroaldehyd geht aus Wasser schon bei einmaligem Durchschütteln quantitativ in Äther.

Der linksdrehende 4-Oxy-2.6.6-trimethyl- $\Delta^1$ -tetrahydrobenzaldehyd, dessen Absorptionsspektrum in Abbild. 2 dargestellt ist, ist seiner Formel gemäß ein Analogon des Acetaldots, und zwar das cyclisierte Aldol des  $\beta$ -Methyl-crotonaldehyds (Methylbutenals). Die  $\alpha$ - $\beta$ -ständige Doppelbindung überträgt die reaktivierende Wirkung der Carbonylgruppe bis auf das  $\delta$ -ständige Hydroxyl, so daß die Eigenschaften denjenigen eines  $\beta$ -Oxyaldehyds gleichen. So versteht man, daß das Oxy- $\beta$ -cyclocitral (III) unter der Einwirkung von Säure leicht Wasser abspaltet (Analogie: Aldol  $\rightarrow$  Crotonaldehyd), daß es aber auch dazu neigt in paraldolartige Körper überzugehen. Überdies findet sich das Bestreben des  $\beta$ -Cyclocitrals durch Autoxydation in  $\beta$ -Cyclogeraniumsäure überzugehen, beim Oxyaldehyd wieder. Es handelt sich also um einen Stoff, der nicht nur gegen  $H^+$  und  $OH^-$ , sondern auch gegen Hitze und Luft empfindlich ist! Bei den Elementaranalysen konnten demgemäß die für  $C_{10}H_{18}O_2$  berechneten Kohlenstoffwerte noch nicht ganz erreicht werden.

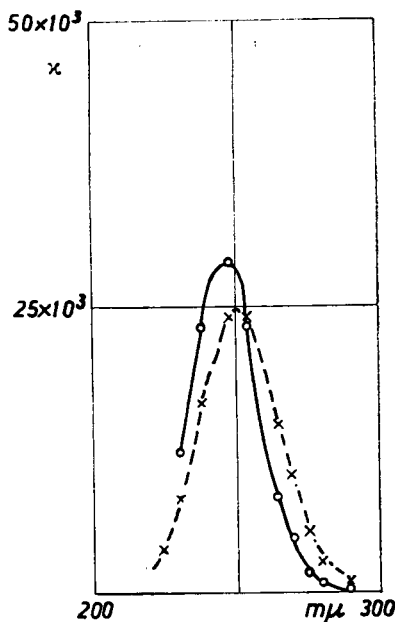


Abbildung 2. Absorptionsspektren des 4-Oxy-2.6.6-trimethyl- $\Delta^1$ -tetrahydrobenzaldehyds in absol. Alkohol (o) und des Pikrocrocins in Wasser (x).

Abszissen: Wellenlängen in  $m\mu$

Ordinaten:  $\times = \frac{2.30}{c \times d} \log \frac{I_0}{I}$

Tafel 1.

Eigenschaften	4-Oxy-2.6.6-trimethyl- $\Delta^1$ -tetrahydrobenzaldehyd	2.6.6-Trimethyl- $\Delta^{1,3}$ -dihydrobenzaldehyd
Sdp. (0.001 mm), Temp. des Luftbades	$\sim 80^\circ$	$\sim 60^\circ$
$[\alpha]_D^{20}$ in 96-proz. Alkohol	$-87^\circ$	$\pm 0^\circ$
$n_D^{20}$	1.5178	1.5281
Geruch	blumig	streng
Löslichkeit in Wasser	leicht	schwer
Flüchtigkeit mit Wasserdampf	schwer	leicht
Schmp. des Thiosemicarbazons	$191^\circ$	$191^\circ$
$[\alpha]_D^{20}$ des Thiosemicarbazons (Alkohol)	$-64^\circ$	$\pm 0^\circ$
Absorptionsbande des Thiosemicarbazons (Alkohol)	305 $m\mu$	340 $m\mu$
		15*

Um so wichtiger war es, ein gut krystallisierendes Derivat des Oxyaldehyds ausfindig zu machen. Wir fanden ein solches im Thiosemicarbazon, das schneeweiße Stäbchen vom Schmp. 191° darstellt. Seine Zusammensetzung entspricht der Formel  $C_{11}H_{19}ON_3S$ . Unterwirft man das Thiosemicarbazon des Oxyaldehyds bei Gegenwart von verd. Schwefelsäure der Wasserdampfdestillation, so geht Safranal über, das als Thiosemicarbazon<sup>3)</sup>  $C_{11}H_{17}N_3S$  vom Schmp. 191° und  $[\alpha]_D: \pm 0^0$  identifiziert wurde. Die Absorptionsspektren der beiden Thiosemicarbazone sind in Abbild. 3 dargestellt.

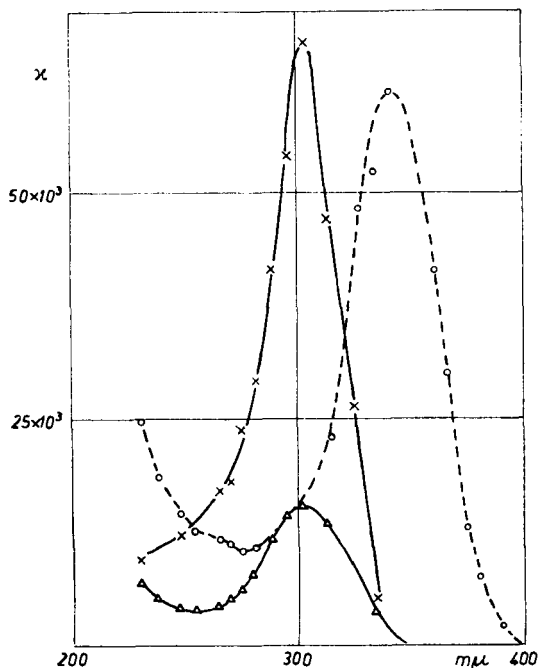


Abbildung 3. Absorptionsspektren der Thiosemicarbazone von 4-Oxy-2.6.6-trimethyl- $\Delta^1$ -tetrahydrobenzaldehyd ( $\times$ ), von Safranal (o) und von  $\beta$ -Cyclocitral ( $\Delta$ ) in Alkohol.

Die Isolierung des Oxyaldehyds mit Hilfe von Emulsin bot eine Möglichkeit, die eingangs aufgeworfene Frage, ob die Spaltung des Pikrocrocins durch HCl einstufig oder zweistufig verläuft, näher zu prüfen. Zu diesem Zweck haben wir polarimetrisch die Geschwindigkeit gemessen, mit der in 50-vol. proz. Alkohol bei verschiedenen HCl-Konzentrationen der Oxyaldehyd sein Drehungsvermögen verliert. Die graphische Darstellung der in Tafel 2 zusammengefaßten Meßreihen führt zu dem höchst auffallenden Ergebnis, daß unter gleichen Bedingungen die Abspaltung von Glucose aus Pikrocrocins und die Abspaltung von Wasser aus dem Oxyaldehyd genau gleich schnell verlaufen (Abbild. 4). Nur bei den kleinsten angewandten HCl-Konzentrationen (0.5—1.0-n)

ist die Reaktionskonstante für die Pikrocrocinspaltung deutlich größer als die Konstante für die Inaktivierung des Oxyaldehyds. Dies spricht dafür, daß die HCl-Spaltung des Pikrocrocins nicht über den Oxyaldehyd verläuft, sondern unmittelbar zum Safranal führt. Für die Spaltung durch KOH gilt dasselbe: während beim Pikrocrocins z. B. durch 0.007-n KOH nach 120 Min. eine Drehungsänderung von 0.32° eintrat, war beim Oxyaldehyd durch 1.5-n KOH selbst nach 480 Min. noch keine Drehungsänderung erkennbar, obwohl sich die Lösung schon braunstichig gefärbt hatte. Der 4-Oxy-2.6.6-trimethyl- $\Delta^1$ -tetrahydrobenzaldehyd tritt also nur bei der enzymatischen Spaltung auf.

<sup>3)</sup> R. Kuhn u. G. Wendt, B. **69**, 1549 [1936].

Tafel 2.

Hydrolyse von Pikrocrocin und Inaktivierung von Oxy- $\beta$ -cyclocitral durch HCl in 50-proz. Äthylalkohol.

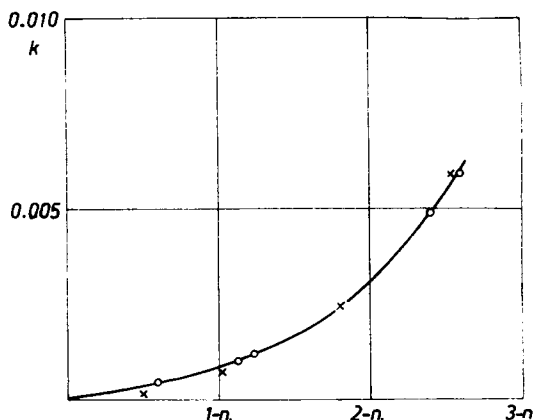
Nr.	Substrat	Temperatur ° C	HCl	$k = 1/t \times \log \frac{a}{a-x}$
1	Pikrocrocine .....	29.9	2.58-n.	0.00590 *)
2	Pikrocrocine .....	29.9	2.39-n.	0.00490
3	Pikrocrocine .....	29.9	1.23-n.	0.00125
4	Pikrocrocine .....	29.9	1.14-n.	0.00107 *)
5	Pikrocrocine .....	29.9	0.61-n.	0.00050 *)
6	Pikrocrocine .....	19.5	2.58-n.	0.00238
7	Pikrocrocine .....	9.0	2.58-n.	0.00056
8	Oxyaldehyd .....	30.0	2.53-n.	0.00592 *)
9	Oxyaldehyd .....	30.0	1.80-n.	0.00246 *)
10	Oxyaldehyd .....	30.0	1.02-n.	0.00075 *)
11	Oxyaldehyd .....	30.0	0.51-n.	0.00017
12	Oxyaldehyd .....	20.0	2.55-n.	0.00181 *)

Die mit \*) versehenen Zahlen sind Mittelwerte aus 2 Meßreihen.

Destilliert man den Oxyaldehyd in Gegenwart von gesättigtem Barytwasser mit Wasserdampf, so geht Safranal über. Als Arrhenius-Konstante für die Inaktivierung des Oxyaldehyds durch 2.55-n HCl in 50-proz. Alkohol fanden wir  $A = 10\,600$  (zwischen 30 und 20°). Dieser Wert ist etwas höher als derjenige für die Spaltung von Pikrocrocine durch 2.58-n. HCl ( $A = 7600$  cal/Mol.). Zum Vergleich sei erwähnt, daß für die HCl-Hydrolyse von Rohrzucker  $A = 12\,800$  und von Maltose  $A = 17100$  cal/Mol. gefunden wurde.

Die Spaltbarkeit durch Emulsin erbringt eine neue Stütze für die bereits angenommene  $\beta$ -glucosidische Natur des Pikrocrocins. Die Haftstelle der Glucose am C-Atom 4 ist die einzige, die den Eigenschaften des Oxyaldehyds Rechnung trägt. Die Konstitutionsformel des

Pikrocrocins (I) kann somit in allen Einzelheiten als gesichert gelten. Die Linksdrehung des neuen Oxyaldehyds paßt gut zu den mit A. Winterstein<sup>1)</sup> entwickelten Vorstellungen über die Biogenese des Safran-Bitterstoffes, weil die natürlichen Xanthophylle, soweit sie optische Aktivität erkennen lassen, linksdrehend sind.



Abbild. 4. Abszissen; Konz. des HCl in 50-vol.-proz. Alkohol (Normalität).

Ordinaten: Reaktionskonstanten  $k = 1/t \times \log \frac{a}{a-x}$  für die Spaltung des Pikrocrocins (o) und für die Inaktivierung des Oxyaldehyds (x).

4. Termon-Wirksamkeit. Die ♂-Zellen von *Chlamydomonas eugametos f. synoica* werden durch ein Filtrat von ♂-Gameten mit ♀-Gameten kopulationsfähig d. h. männlich<sup>4)</sup>. Der im Filtrat der ♂-Zellen nachweisbare geschlechtsbestimmende Stoff ist ätherlöslich und mit Wasserdampf flüchtig; er kann durch Safranal ersetzt werden, von dem je Zelle 10—20 Molekeln benötigt werden<sup>5)</sup>. Für die Ausscheidung des Androtermions durch die ♂-Gameten verantwortlich ist ein pikrocrocinspaltendes Ferment, das sich nur in den männlichen Zellen findet und in den weiblichen fehlt<sup>6)</sup>. Dieses Ferment kann mit der  $\beta$ -Glucosidase des Emulsins nicht identisch sein, da seine Affinität zum Substrat von ganz anderer Größenordnung ist. Qualitativ betrachtet, handelt es sich aber auch in den Zellen der Grünalge um eine  $\beta$ -Glucosidase, so daß zu erwarten war, daß das natürliche Androtermon mit dem bei der Emulsinspaltung des Pikrocrocins entdeckten Oxyaldehyd identisch ist. Hr. Dr. F. Moewus hat daher den linksdrehenden 4-Oxy-2.6.6-trimethyl- $\Delta^1$ -tetrahydrobenzaldehyd im Androtermontest vergleichend mit Safranal geprüft.

Die Grenze der Wirksamkeit, bei der nach 25—30 Min. Einwirkungs-dauer noch fast alle *Synoica*-Zellen mit weiblichen Gameten ( $\varnothing^1$ ) kopulationsfähig wurden, war erreicht, wenn 20.25 mg Safranal in  $3 \times 10^{12}$  ccm Wasser gelöst waren. In 1 ccm mit  $2 \times 10^6$  Gameten waren dann  $6.75 \times 10^{-12}$  mg Safranal, entsprechend  $2.73 \times 10^7$  Molekeln Safranal vorhanden, d. h. 13 Molekeln Dehydroaldehyd/Zelle, was mit den früher gefundenen Werten von 10—20 Molekeln/Zelle gut übereinstimmt.

Beim Oxyaldehyd würde die Grenze der Wirksamkeit erst erreicht, als 22.75 mg auf  $3 \times 10^{13}$  ccm Wasser verdünnt waren. Auf  $2 \times 10^6$  Gameten/ccm kamen somit  $7.58 \times 10^{-13}$  mg =  $2.7 \times 10^6$  Molekeln, d. h. 1.35 Molekeln Oxyaldehyd je Zelle. Der Oxyaldehyd ist also 10-mal wirksamer als der Dehydroaldehyd. Es ist sehr naheliegend, daraus zu schließen, daß im linksdrehenden 4-Oxy-2.6.6-trimethyl- $\Delta^1$ -tetrahydrobenzaldehyd das wahre Androtermon von *Chlamydomonas eugametos* vorliegt. Das optisch inaktive Safranal tritt vermutlich unter physiologischen Bedingungen in den Zellen der Grünalge nicht auf; es erscheint als Kunstprodukt, das seine Entstehung der Einwirkung von Säure oder von Lauge verdankt; daß es noch, wenn auch schwächer, als Androtermon wirkt, beruht möglicherweise darauf, daß es in den Gameten durch Anlagerung von Wasser teilweise in den Oxyaldehyd überzugehen vermag<sup>7)</sup>. Die absolute Wirksamkeit des Oxyaldehyds als Termon (1.3 Molekeln/Zelle) reicht an die Wirksamkeit des Crocins als Beweglichkeitsstoff<sup>8)</sup> (1.2 Molekeln/Zelle) heran. Man kann sagen, daß bei *Chlamydomonas eugametos f. synoica* 1 Molekel genügt um 1 Zwitterzelle männlich zu machen.

### Beschreibung der Versuche.

#### A. Präparativer Teil.

2 g Pikrocrocine wurden in 60 ccm  $m/_{10}$ -Phosphatpuffer von  $p_H$  6.0 gelöst und mit 40 ccm Emulsin-Lösung versetzt. Die Ferment-Lösung war

<sup>4)</sup> F. Moewus, Biol. Zbl. **60**, 143 [1940].

<sup>5)</sup> R. Kuhn, F. Moewus u. G. Wendt, B. **72**, 1702 [1939].

<sup>6)</sup> R. Kuhn u. F. Moewus, B. **73**, 547 [1940].

<sup>7)</sup> Vergl. die Hydratation von Crotonaldehyd zu Acetaldehyd unter der katalytischen Einwirkung von Sarkosin nach W. Langenbeck u. R. Sauerbier, B. **70**, 1540 [1937].

<sup>8)</sup> R. Kuhn, F. Moewus u. D. Jerchel, B. **71**, 1541 [1938].

durch 2-stdg. Schütteln von 10 g Emulsin (E. Merck) mit 100 ccm Wasser und Zentrifugieren dargestellt.

Der Ansatz blieb 42 Stdn. bei 27° stehen. Hierauf wurde 5- bis 6-mal mit je 20 ccm Äther ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und unter Stickstoff mit Widmer-Spirale verdampft. Es hinterblieb etwa 1 g eines zähen Öls, das unter 0.001 mm bei 90—100° (Luftbad) destilliert wurde. Das Destillat war schwach gelbstichig grün gefärbt. Die Ausbeute betrug 0.5 g. Die Hälfte des Materials blieb als harzähnliche Masse in der Kugel zurück, aus der sich auch durch weitere Steigerung der Temperatur (bis 120°) kein Oxyaldehyd mehr gewinnen ließ. Bei Wiederholung der Destillation ging der Oxyaldehyd unter 0.001 mm schon bei 80—90° (Luftbad) als wasserhelles, zähflüssiges Öl über. Der undestillierbare Rückstand war bei der zweiten Destillation erheblich geringer. Ganz farblos gingen nur die ersten 0.15 g über, die folgenden 0.30 g waren wieder grünstichig gelb. Es ist zweckmäßig, möglichst rasch zu destillieren.

2 Präparate aus verschiedenen Ansätzen zeigten  $n_D^{20}$  1.5180 und  $n_D^{20}$  1.5178.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $(-3.43^\circ \times 100/4.075 \times 1)$ ,  $(-0.41^\circ \times 100/0.470 \times 1) = -84.2^\circ, -87.2^\circ$  (96-proz. Alkohol).

3.740, 3.910 mg Sbst.: 9.55, 10.02 mg  $\text{CO}_2$ , 3.21, 3.39 mg  $\text{H}_2\text{O}$ . — 6.331 mg Sbst.: 1.12 ccm  $\text{CH}_4$  (0°, 760 mm).

$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$  (168.1). Ber. C 71.39, H 9.58, akt. H 1.00.  
Gef. „ 69.64, 69.89, „ 9.60, 9.70, akt. H 1.05.

Das Oxy- $\beta$ -cyclocitral unterliegt ähnlich wie  $\beta$ -Cyclocitral an der Luft der Autoxydation. 2 frisch destillierte Präparate enthielten laut Äquivalentsgewichtsbestimmung 5% und 10% Säure.

0.40 g 1-mal destillierter Oxyaldehyd wurden in 7.5 ccm Alkohol gelöst, mit 0.24 g Thiosemicarbazid in 4 ccm Wasser versetzt und 24 Stdn. bei 37° aufbewahrt. Der nach dem Verdampfen hintergebliebene Rückstand wurde aus Methanol-Wasser in schönen, häufig gekreuzten Stäbchen vom Schmp. 189—190° (Berl, unter Zers.) erhalten.  $[\alpha]_D^{19}$ :  $(-0.22^\circ \times 100/0.358 \times 1) = -62^\circ$  (96-proz. Alkohol). Für ein Präparat vom Schmp. 191—192° (Berl) fanden wir:  $[\alpha]_D^{19}$ :  $(-0.28^\circ \times 100/0.443 \times 1) = -64^\circ$  (96-proz. Alkohol).

3.770 mg Sbst.: 7.675 mg  $\text{CO}_2$ , 2.74 mg  $\text{H}_2\text{O}$ . — 4.199 mg Sbst.: 0.606 ccm  $\text{N}_2$  (21°, 761 mm).

$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{ON}_3\text{S}$  (241.2). Ber. C 54.72, H 7.98, N 17.41. Gef. C 55.52, H 8.13, N 16.78.

Auch nach wiederholten Krystallisationen aus Methanol-Wasser und Trocknung bei 100° (1 mm) wurden zu tiefe N-Werte erhalten. Besonders schön krystallisiert das Thiosemicarbazon aus Chloroform, dem man in der Hitze einige Tropfen Methanol zusetzt bis eben Lösung eintritt. Man erhält so schneeweiße Stäbchen vom Schmp. 190.5—191.5° (Berl, Zers.). Aber auch solche Präparate weisen zu tiefen N-Gehalt auf, weil sie selbst nach 5-stdg. Trocknen bei 140° (1 mm) noch etwa  $\frac{1}{5}$  Mol. Chloroform festhalten. Rechnet man auf Grund des analytisch festgestellten Chlorgehalts auf chloroformfreie Substanz um, so findet man gute Übereinstimmung mit den für  $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{ON}_3\text{S}$  berechneten Werten:

$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{ON}_3\text{S}$  (241.2). Ber. C 54.7, H 8.0, N 17.4. Gef. C 54.2, H 7.9, N 17.2.

Die gefundenen Werte, aus denen diese Zahlen abgeleitet sind, waren:

3.940, 3.800 mg Sbst.: 7.26, 6.93 mg  $\text{CO}_2$ , 2.50, 2.44 mg  $\text{H}_2\text{O}$ . — 3.190 mg Sbst.: 0.430 ccm  $\text{N}_2$  (22°, 754 mm). — 5.690, 5.950 mg Sbst.: 1.915, 1.915 mg AgCl.

$5\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{ON}_3\text{S} \cdot \text{CHCl}_3$  (1325.5). Ber. C 50.70, H 7.31, N 15.84, Cl 8.04.

Gef. „ 50.25, 49.74, „ 7.10, 7.18, „ 15.48, „ 8.31, 7.96.

Wenn man das aus Chloroform-Methanol frisch krystallisierte Thiosemicarbazon mit Benzol am absteigenden Kühler kocht, (100 ccm abdestilliert) wird das Krystall-Chloroform verdrängt. Anscheinend wird es durch Krystall-Benzol ersetzt, denn der C-Gehalt steigt dabei um 8%, wobei hervorzuheben ist, daß auch für die folgenden Analysen bei 140° (1 mm) getrocknet war.

3.840 mg Sbst.: 8.19 mg CO<sub>2</sub>, 2.74 mg H<sub>2</sub>O. — 3.186 mg Sbst.: 0.448 ccm N<sub>2</sub> (21°, 739 mm).

3 C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>ON<sub>3</sub>S, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> (801.3). Ber. C 58.40, H 7.92, N 15.72. Gef. C 58.17, H 7.98, N 15.88.

0.20 g Thiosemicarbazon (Schmp. 192°) wurden mit 20 ccm 2-n. Schwefelsäure der Wasserdampfdestillation unterworfen bis 300 ccm übergegangen waren. Gleich zu Beginn sammelten sich an der Oberfläche des Destillats ölige Tropfen, die nach Safranal rochen. Diese wurden in Äther aufgenommen und auf Thiosemicarbazon verarbeitet, das aus Methanol-Wasser in gelbstichigen Stäbchen erhalten wurde, die sich als optisch inaktiv erwiesen. Schmp. 191° (Zers.). Die Mischprobe mit dem Thiosemicarbazon des linksdrehenden Oxyaldehyds vom Schmp. 191° schmolz bei ~172°.

3.695 mg Sbst.: 8.10 mg CO<sub>2</sub>, 2.54 mg H<sub>2</sub>O. — 2.980 mg Sbst.: 0.496 ccm N<sub>2</sub> (22°, 749 mm).

C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>S (223.1). Ber. C 59.14, H 7.68, N 18.82. Gef. C 59.79, H 7.69, N 18.98.

$[\alpha]_D^{20}$ : ( $\pm 0.01^\circ \times 100$ ): (2.5  $\times$  1) =  $\pm 0.4^\circ$  (95-proz. Alkohol).

## B. Kinetischer Teil.

Das für die folgenden Messungen verwandte Pikrocrocine verdanken wir der Chemischen Fabrik E. Merck, Darmstadt, die es in freundlicher Weise aus spanischem Safran nach der mit A. Winterstein<sup>1)</sup> angegebenen Vorschrift dargestellt hatte. Das vor 2 Jahren isolierte Präparat schmolz zu Beginn unserer Versuche bei 150° und zeigte  $[\alpha]_D^{20}$ : ( $-0.68^\circ \times 100/1.17 \times 1$ ) =  $-58.0^\circ$  (50-proz. Alkohol). Im Verlaufe der Versuche sank der Schmp. auf 145° und das Drehungsvermögen auf  $[\alpha]_D^{20}$ : ( $-0.71^\circ \times 100/1.25 \times 1$ ) =  $-57.0^\circ$  (50-proz. Alkohol). Lösungsmittel für alle kinetischen Versuche war 50-proz. Alkohol.

1) Hydrolyse mit 0.03-n. KOH. 50.1 mg  
Per. Schmp. 150° in 4 ccm; 29.9°.

2) Hydrolyse mit 0.015-n. KOH.  
49.5 Per. Schmp. 150° in 4 ccm; 29.9°.

Min.	$\alpha^\circ$	% Sp.	k
0	-0.59	—	—
5	-0.43	26	0.0026
10	-0.29	49	0.0029
15	-0.17	69	0.0034
20	-0.10	80.5	0.0035
25	-0.05	88.5	0.0038
30	+0.02	—	—
35	+0.01	—	—

Min.	$\alpha^\circ$	% Sp.	k
0	-0.68	—	—
10	-0.52	21.9	0.0107
15	-0.46	30.2	0.0104
20	-0.40	38.4	0.0105
30	-0.32	49.3	0.0099
40	-0.26	57.5	0.0093
50	-0.21	64.3	0.0090
60	-0.16	71.2	0.0086
80	-0.10	79.5	0.0086
100	-0.05	86.3	0.0089
120	-0.02	90.3	—
$\infty$	-0.05	—	—



3) Kontrolle: *d*-Glucose mit 0.015-*n*. KOH.  
28.2 mg Glucose in 4 ccm; 29.9°.

Min.	$\alpha^0$
0	—
5	+0.37
20	+0.36
90	+0.31
150	+0.27
210	+0.23
270	+0.20
1110	+0.13 (20°)

4) Hydrolyse mit 0.007-*n*. KOH.  
49.8 mg Per. Schmp. 150° in 4 ccm; 29.9°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.71	—	—
20	-0.60	14.5	0.0034
50	-0.52	25	0.0025
95	-0.43	36.8	0.0020
120	-0.39	42.2	0.0020
150	-0.35	47.4	0.0019
180	-0.32	51.3	0.0017
210	-0.30	53.9	0.0016
250	-0.28	56.6	0.0014
300	-0.25	60.6	0.0013
410	-0.21	65.8	0.0012
$\infty$	+0.05	—	—

5) Hydrolyse mit 2.58-*n*. HCl. 29.9°;  
50.3 mg Per. Schmp. 145° in 4 ccm.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.71	—	—
10	-0.59	11.9	0.0055
20	-0.48	22.8	0.0056
30	-0.38	32.7	0.0057
40	-0.30	40.6	0.0057
50	-0.22	48.5	0.0058
60	-0.14	56.5	0.0060
75	-0.07	63.5	0.0059
90	0.00	70.3	0.0059
120	+0.10	80.2	0.0059
150	+0.17	87.2	0.0059
$\infty$	+0.30	—	0.0058

6) Hydrolyse mit 2.58-*n*. HCl. 19.5°;  
48.7 mg Per. Schmp. 145° in 4 ccm.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.70	—	—
10	-0.64	6	0.0027
20	-0.58	12	0.0028
30	-0.54	16	0.0025
45	-0.49	21	0.0023
60	-0.44	26	0.0022
90	-0.33	37	0.0022
120	-0.25	45	0.0024
180	-0.11	59	0.0022
270	+0.05	75	0.0022
390	+0.17	87	0.0023
$\infty$	+0.30	—	0.00238

7) Hydrolyse mit 2.58-*n*. HCl. 9.0°;  
51.0 mg Per. Schmp. 145° in 4 ccm.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.75	—	—
45	-0.70	4.7	0.00045
90	-0.64	10.3	0.00052
120	-0.60	14.0	0.00054
150	-0.56	17.8	0.00056
180	-0.53	20.7	0.00056
240	-0.46	27.1	0.00057
360	-0.35	37.4	0.00056
480	-0.25	46.8	0.00057
600	-0.16	55.1	0.00058
660	-0.12	58.0	0.00057
$\infty$	+0.32	—	0.00056

8) Hydrolyse mit 2.58-*n*. HCl. 29.9°;  
51.4 mg Per. Schmp. 145° in 4 ccm.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.75	—	—
10	-0.61	13.1	0.00605
15	-0.55	18.7	0.00600
20	-0.49	24.3	0.00610
30	-0.38	34.6	0.00620
40	-0.30	42.1	0.00590
60	-0.15	56.1	0.00600
80	-0.04	66.3	0.00590
100	+0.05	74.7	0.00600
120	+0.10	79.5	0.00570
150	+0.18	86.9	0.00590
$\infty$	+0.32	—	0.00600

## 9) Hydrolyse mit 2.39-n. HCl.

50.4 mg Per. Schmp. 145° in 4 ccm; 29.9°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.72	—	—
10	-0.62	10.3	0.00475
20	-0.52	19.4	0.00470
30	-0.42	29.1	0.00597
40	-0.35	35.9	0.00484
50	-0.27	43.7	0.00498
60	-0.20	50.5	0.00508
70	-0.15	55.3	0.00500
80	-0.10	60.2	0.00501
100	-0.01	69.0	0.00500
120	0.04	73.8	0.00485
$\infty$	0.31	—	0.00490

## 10) Hydrolyse mit 1.23-n. HCl.

50.0 mg Per. Schmp. 145° in 4 ccm; 29.9°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.72	—	—
40	-0.62	9.8	0.00108
60	-0.56	15.7	0.00123
90	-0.49	22.6	0.00123
120	-0.43	28.4	0.00121
150	-0.37	34.3	0.00122
180	-0.31	40.2	0.00124
270	-0.16	54.9	0.00128
360	-0.07	63.7	0.00122
420	0.02	72.5	0.00133
510	0.09	79.4	0.00134
$\infty$	0.30	—	0.00125

## 11) Hydrolyse mit 1.14-n. HCl.

51.4 mg Per. Schmp. 145° in 4 ccm; 29.9°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.71	—	—
30	-0.64	6.9	0.00103
70	-0.56	14.9	0.00100
100	-0.49	21.8	0.00107
130	-0.44	26.7	0.00103
330	-0.15	55.1	0.00107
390	-0.08	62.3	0.00109
450	-0.02	68.3	0.00109
510	0.02	72.3	0.00109
570	0.05	75.2	0.00106
$\infty$	0.30	—	0.00106

## 12) Hydrolyse mit 1.14-n. HCl.

51.3 mg Per. Schmp. 145° in 4 ccm; 29.9°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.71	—	—
60	-0.54	16.6	0.00131
90	-0.48	22.8	0.00125
210	-0.30	40.6	0.00107
270	-0.24	46.5	0.00101
330	-0.18	52.5	0.00098
390	-0.11	59.4	0.00101
480	-0.02	68.3	0.00104
510	0.01	71.3	0.00106
570	0.04	74.3	0.00103
$\infty$	0.30	—	0.00108

## 13) Hydrolyse mit 0.61-n. HCl.

50.7 mg Per. Schmp. 145° in 4 ccm; 29.9°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.71	—	—
60	-0.63	7.9	0.00058
150	-0.55	15.9	0.00049
180	-0.52	18.8	0.00050
210	-0.49	21.8	0.00050
240	-0.47	23.8	0.00049
300	-0.43	27.8	0.00047
510	-0.29	41.6	0.00046
600	-0.24	46.5	0.00045
660	-0.20	50.5	0.00046
720	-0.16	54.4	0.00047
$\infty$	0.30	—	0.00049

## 14) Hydrolyse mit 0.61-n. HCl.

50.8 mg Per. Schmp. 145° in 4 ccm; 29.9°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.71	—	—
30	-0.66	5.0	0.00073
60	-0.64	6.9	0.00050
120	-0.58	12.8	0.00048
150	-0.55	15.8	0.00049
360	-0.38	32.7	0.00047
390	-0.34	33.7	0.00045
420	-0.33	37.7	0.00049
450	-0.30	40.7	0.00050
480	-0.28	42.6	0.00050
510	-0.27	43.7	0.00049
$\infty$	0.31	—	0.00051

15) Rohrzucker mit 1.2-n. HCl.  
50.6 mg Saccharose in 4 ccm W./A. 1:1; 29.9°

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	+0.85	—	—
5	+0.71	14.6	0.0137
10	+0.59	27.1	0.0137
15	+0.47	39.6	0.0146
20	+0.37	50.0	0.0152
25	+0.30	57.3	0.0148
30	+0.23	64.6	0.0151
35	+0.18	69.8	0.0148
40	+0.13	75.0	0.0151
50	+0.05	83.3	0.0156
60	+0.00	88.6	0.0158
$\infty$	-0.11	—	0.0148

16) Rohrzucker mit 0.6-n. HCl.  
51.5 mg Saccharose in 4 ccm W./A. 1:1; 29.9°

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	+0.87	—	—
5	+0.81	6.1	0.0054
10	+0.75	12.2	0.0057
15	+0.71	16.2	0.0050
20	+0.67	20.2	0.0049
30	+0.59	28.3	0.0048
40	+0.51	36.4	0.0049
60	+0.39	48.6	0.0048
90	+0.25	62.3	0.0047
120	+0.13	74.8	0.0050
180	+0.00	88.0	0.0051
$\infty$	-0.12	—	0.0050

17) Rohrzucker mit 0.3-n. HCl.  
49.8 mg Saccharose in 4 ccm W./A. 1:1; 29.9°

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	+0.85	—	—
5	+0.82	3.1	0.0027
10	+0.81	4.2	0.0018
20	+0.77	8.3	0.0019
30	+0.74	11.4	0.0018
60	+0.64	21.9	0.0018
90	+0.54	32.3	0.0019
120	+0.46	40.6	0.0019
150	+0.40	46.9	0.0018
180	+0.33	54.2	0.0019
240	+0.22	65.6	0.0019
$\infty$	-0.11	—	0.0019

18) Rohrzucker mit 0.15-n. HCl.  
48.9 mg Saccharose in 4 ccm W./A. 1:1; 29.9°

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	+0.83	—	—
10	+0.81	2.2	0.00090
30	+0.78	5.4	0.00080
120	+0.65	19.3	0.00079
150	+0.60	24.8	0.00083
180	+0.55	30.1	0.00086
210	+0.51	34.4	0.00087
270	+0.44	41.9	0.00087
490	+0.25	62.4	0.00089
570	+0.19	68.8	0.00089
660	+0.13	75.3	0.00092
$\infty$	-0.10	—	0.00086

Nach den Vergleichsversuchen 15 bis 18 gilt auch für die Rohrzuckerhydrolyse in 50-proz. Alkohol, daß die monomolekularen Reaktionskonstanten k schneller als die HCl-Konzentration ansteigen.

19) Inaktivierung durch 2.53-n. HCl.  
20.7 mg Oxyaldehyd in 4 ccm; 30.0°

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.50	—	—
6	-0.46	8	0.00600
10	-0.44	12	0.00555
15	-0.41	18	0.00574
20	-0.38	24	0.00547
30	-0.33	34	0.00602
45	-0.27	46	0.00594
60	-0.22	56	0.00594
75	-0.18	64	0.00593
90	-0.15	70	0.00582
120	-0.10	80	0.00583
$\infty$	0.00	—	0.00582

20) Inaktivierung durch 2.53-n. HCl.  
22.0 mg Oxyaldehyd in 4 ccm; 30.0°

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	-0.53	—	—
5	-0.49	7.6	0.00680
10	-0.46	13.2	0.00610
15	-0.43	18.9	0.00607
20	-0.40	24.6	0.00610
30	-0.35	34.0	0.00600
45	-0.29	45.3	0.00583
60	-0.24	54.7	0.00573
75	-0.18	66.1	0.00627
90	-0.15	71.7	0.00610
120	-0.10	81.2	0.00604
$\infty$	0.00	—	0.00603

21) Inaktivierung durch 1.80-n. HCl.

22.36 mg Oxyaldehyd in 4 ccm; 30.0°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	—0.54	—	—
10	—0.51	5.6	0.00245
15	—0.49	9.3	0.00280
20	—0.48	11.1	0.00255
30	—0.46	14.8	0.00234
60	—0.37	31.5	0.00244
90	—0.32	40.8	0.00251
120	—0.28	48.2	0.00238
180	—0.20	63.0	0.00240
240	—0.16	70.4	0.00222
$\infty$	0.00	—	0.00250

22) Inaktivierung durch 1.80-n. HCl.

22.0 mg Oxyaldehyd in 4 ccm; 30.0°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	—0.53	—	—
10	—0.50	5.7	0.00250
20	—0.47	11.3	0.00255
30	—0.45	11.1	0.00236
60	—0.38	28.3	0.00242
90	—0.33	37.8	0.00229
120	—0.26	54.8	0.00286
180	—0.20	62.3	0.00236
240	—0.14	73.5	0.00240
360	—0.10	81.2	0.00202
$\infty$	0.00	—	0.00242

23) Inaktivierung durch 1.01-n. HCl.

22.1 mg Oxyaldehyd in 4 ccm; 30.0°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	—0.53	—	—
150	—0.41	22.7	0.000743
240	—0.35	34.0	0.000750
330	—0.30	43.4	0.000748
420	—0.25	52.8	0.000776
510	—0.22	58.6	0.000751
630	—0.18	66.0	0.000742
$\infty$	0.00	—	0.000732

24) Inaktivierung durch 1.01-n. HCl.

21.1 mg Oxyaldehyd in 4 ccm; 30.0°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	—0.51	—	—
135	—0.39	21.6	0.000782
270	—0.32	37.3	0.000753
360	—0.28	45.1	0.000723
450	—0.24	52.9	0.000728
570	—0.19	62.7	0.000754
660	—0.16	68.7	0.000764
$\infty$	0.00	—	0.000751

25) Inaktivierung durch 2.55-n. HCl.

21.9 mg Oxyaldehyd in 4 ccm; 20.0°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	—0.53	—	—
35	—0.46	13.4	0.00177
60	—0.42	20.8	0.00170
120	—0.32	39.7	0.00183
150	—0.28	47.2	0.00185
180	—0.25	52.8	0.00181
300	—0.15	71.7	0.00183
360	—0.12	77.3	0.00178
450	—0.08	85.0	0.00183
$\infty$	0.00	—	0.00180

26) Inaktivierung durch 2.55-n. HCl.

22.2 mg Oxyaldehyd in 4 ccm; 20.0°.

Min.	$\alpha^0$	% Sp.	k
0	—0.53	—	—
30	—0.47	11.3	0.00173
60	—0.42	20.8	0.00170
120	—0.31	39.7	0.00183
150	—0.28	47.2	0.00185
180	—0.24	54.7	0.00191
300	—0.15	71.7	0.00183
360	—0.11	79.2	0.00189
420	—0.08	85.0	0.00183
$\infty$	0.00	—	0.00182

Das angewandte Emulsionspräparat spaltete Amygdalin etwa 120-mal rascher als Pikrocrocine (Vergleich der Halbwertszeiten):

27) Pikrocrocine-Emulsinspaltung.  $T = 30^\circ$ ,  
1 dm/20°.

Ansatz: Pikrocrocine in 1.5 ccm  $m_{10}$ -Phosphatpuffer  $p_H$  6.0 + 1 ccm 10-proz. Emulsin (zentrifugiert); gestoppt mit 2.5 ccm 5-proz. Sublimat; zentrifugiert.

Die  $\alpha$ -Werte sind für die Eigendrehung des Emulsins korrigiert.

28) Amygdalin-Emulsinspaltung.  $T = 30^\circ$ ,  
1 dm/20°.

Ansatz: Amygdalin in 1.5 ccm  $m_{10}$ -Phosphatpuffer  $p_H$  6.0 + 1 ccm 0.2-proz. Emulsin (zentrifugiert) + 2.5 ccm 5-proz. Sublimat zum Stoppen; zentrifugiert.

Für 0 Min. war  $\alpha$  (korr.) — 0.32°.

Pikrocrocine mg	Min.	$\alpha^\circ$ korr.	Amygdalin mg	Min.	$\alpha^\circ$ korr.
50.5	0	—0.52	50.3	10	—0.24
50.3	10	—0.49	50.3	20	—0.17
50.5	30	—0.46	50.3	30	—0.11
51.3	1 × 60	—0.44	50.4	45	0.00
50.2	3 × 60	—0.32	50.4	60	+0.07
50.0	6 × 60	—0.26	50.4	90	+0.17
50.4	9 × 60	—0.24	50.3	120	+0.22
50.4	12 × 60	—0.23	50.04	$\infty$	+0.37

### 32. Josef Lindner: Reingewinnung von Substanzen durch Teilverflüssigung und Warmabsaugen.

[Aus dem Pharmaz.-chem. Institut d. Universität Innsbruck.]

(Eingegangen am 6. Dezember 1940.)

Unter „Teilverflüssigung und Warmabsaugen“ soll ein Arbeitsvorgang zur Isolierung und Reinigung von Substanzen verstanden werden, bei dem ein unscharf schmelzender Ausgangsstoff in Berührung mit einem porösen Körper bis zur teilweisen Verflüssigung erwärmt und das Hauptprodukt durch Aufsaugen des verflüssigten Anteiles von Begleitsubstanzen befreit wird. Dieser Vorgang hat in einer Reihe von Arbeiten<sup>1)</sup>, bei denen es auf die Reingewinnung und Untersuchung in kleiner Menge auftretender Verbindungen ankam, wertvolle Dienste geleistet. Die kleinen Substanzmengen wurden zu diesem Zwecke in dünner Schicht auf Tonscherben aufgetragen oder zwischen zwei Scherben eingepreßt und so bis zur teilweisen Verflüssigung erwärmt. Der einfache Kunstgriff, etwa dem Warmauspressen oder dem Schwitzverfahren in der Stearin- und Paraffinfabrikation verwandt, scheint für analytische oder präparative Zwecke in der vorliegenden Art bisher nicht angewendet worden zu sein, und die kurzen Hinweise in den oben erwähnten Arbeiten haben bei den Organikern und Analytikern kaum Beachtung gefunden. In unmittelbarer Aussprache auf das Reinigungsverfahren in meinen Arbeiten aufmerksam gemacht, hat es aber jüngst L. Kofler in einer seinen Arbeitsbehelfen angepaßten Ausführungsform an kleinen Substanzmengen zum Zwecke der Identifizierung durch Mikroschmelzpunktsbestimmung mit Erfolg erprobt und mit R. Wannenmacher<sup>2)</sup> in den „Berichten“ beschrieben.

<sup>1)</sup> J. Lindner u. Mitarbb., Monatsh. Chem. **44**, 337 [1923]; **46**, 231 [1925]; **72**, 330, 354, 361 [1939].

<sup>2)</sup> B. **73**, 1388 [1940].