

fleck nachgewiesen. Es zeigte sich, dass sich weiche β -Strahlung sehr gut auf Dünn-schicht-Chromatogrammen messen lässt, da die Absorption der Schichten sehr klein ist.

SUMMARY

Thin-layer chromatography is applied to the separation of ^{234}Th from natural ^{238}U and to the separation of the neutron activation products of NH_4Cl : ^{38}Cl , ^{35}S and ^{32}P .

Institut für anorganische Chemie der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 9. Mitt.: H. SEILER & H. ERLENMEYER, Helv. 47, 264 (1964).

11. Zur Kenntnis der BOHN-SCHMIDT'schen Reaktion

1. Mitteilung

Isolierung und Strukturaufklärung neuartiger Verbindungen aus der Oleumschmelze von α -Hydroxyanthrachinonen

von J. WINKLER¹⁾ und W. JENNY

(20. XI. 64)

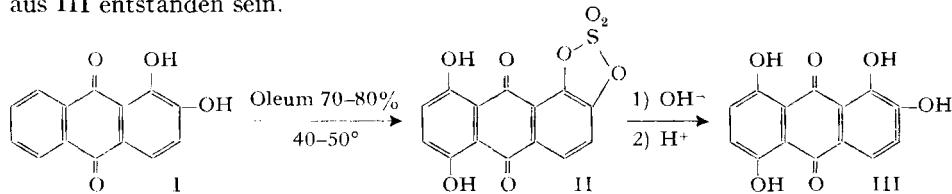
Vor rund 75 Jahren entdeckte R. BOHN die Bildung wertvoller Farbstoffe bei der Einwirkung von hochprozentigem Oleum auf Anthrachinonderivate [1]. Fast gleichzeitig und unabhängig von BOHN stiess auch R. E. SCHMIDT auf die gleiche Reaktion [2]. Er erhielt durch Einwirkung von Oleum mit 70–80% freiem Schwefeltrioxid auf Alizarin einen neuen, Alizarinbordeaux genannten Farbstoff. L. GATTERMANN, welcher auf Anregung von SCHMIDT diesen Farbstoff untersuchte [3], machte die überraschende Feststellung, dass es sich bei Alizarinbordeaux um ein schwefelfreies Hydroxylierungsprodukt, das 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon (Chinalizarin) handelt. Diese Hydroxylierung mit hochprozentigem Oleum ist ganz allgemein auf Anthrachinonderivate mit mindestens einer Hydroxylgruppe in α -Stellung anwendbar [4]. Dass SCHMIDT fast gleichzeitig eine Reihe anderer Methoden zur Einführung von Hydroxylgruppen in Anthrachinone fand [5], führte zu Missverständnissen bezüglich einer sauberen Definition der «BOHN-SCHMIDT'schen Reaktion». Im folgenden sei unter dieser Reaktion die Einwirkung von hochprozentigem Oleum²⁾ auf Hydroxyanthrachinone mit mindestens einer α -ständigen Hydroxylgruppe, bei milden Temperaturen (25–50°) verstanden [6].

Obwohl diese Methode der direkten Hydroxylierung zu den grundlegenden, auch grosstechnischen Reaktionen der Anthrachinonchemie zählt, finden sich in der wis-

¹⁾ Teil der Dissertation J. WINKLER, Universität Bern.

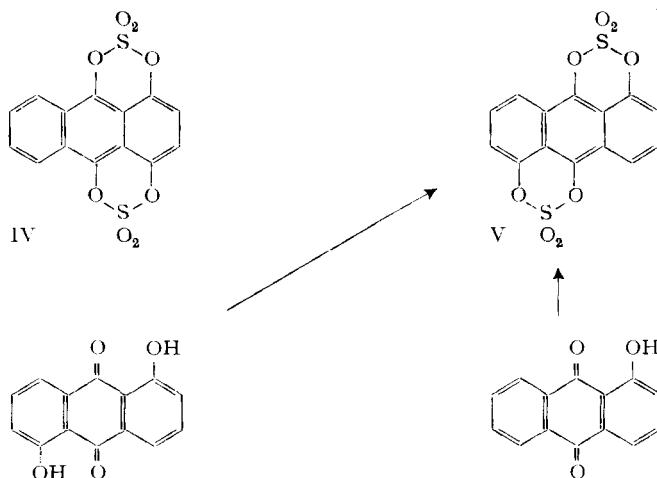
²⁾ BOHN und SCHMIDT verwendeten bei ihren typischen Reaktionen Oleum mit 70–80% freiem SO_3 .

senschaftlichen Literatur nur spärliche Angaben über das Reaktionsgeschehen [7]. Nach GATTERMANN [3] entsteht bei der Überführung von Alizarin (I) in Chinizarin (III) ein neutraler, cyclischer Schwefelsäureester II als Zwischenprodukt. Die Isolierung von II gibt aber keinen Hinweis auf den Reaktionsablauf, denn viele Verbindungen mit benachbarten Hydroxylgruppen ergeben bei der Einwirkung von Oleum cyclische Schwefelsäureester [8]. II könnte also auch in einer Folgereaktion aus III entstanden sein.



Wir haben versucht, einen tieferen Einblick in den Mechanismus der BOHN-SCHMIDT'schen Reaktion zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Isolierung von neuartigen Verbindungen, welche vermutlich im Reaktionsgeschehen eine wichtige Rolle spielen. Ob es sich dabei um Zwischenprodukte oder um Alternativ- oder Nebenprodukte handelt, werden wir in einer nächsten Mitteilung diskutieren.

Oleum und 1,4-Dihydroxyanthrachinon (Chinizarin). Nach kurzer Einwirkung von 74-proz. Oleum auf Chinizarin bei 33–36° oder noch besser von 45-proz. Oleum bei 36–38° erhält man ein Produkt, welches im Dünnenschichtchromatogramm auf Aluminiumoxid, mit Benzol/Tetrachlorkohlenstoff als Laufmittel, eine fast farblose, im langwelligen UV. blau fluoreszierende Verbindung erkennen lässt. Nach chromatographischer Reinigung an Aluminiumoxid ergab die Kristallisation aus Tetrachlorkohlenstoff eine einheitliche, in prachtvollen gelben Nadeln anfallende Verbindung C₁₄H₆O₈S₂ (366,3) mit einer intensiven blauen Fluoreszenz in Lösung. Das Molekular-



³⁾ Die üblichen Methoden der Molekulargewichtsbestimmungen versagten wegen zu geringer Löslichkeit der Substanzen.

gewicht³⁾ wurde massenspektrometrisch zu 366 bestimmt. Das Massenspektrum enthält Fragment-Ionen bei m/e 302 ($= M - SO_2$), m/e 238 ($= M - 2 SO_2$), m/e 210 ($= 238 - CO$) und m/e 182 ($= 238 - 2 CO$). Das IR.-Spektrum zeigt keine Carbonylbande mehr, das UV.-Spektrum ergibt keine Anhaltspunkte für das Vorliegen eines Hydroxyanthrachinons [9]. Die gelbe Verbindung ist, im Gegensatz zu den Hydroxyanthrachinonen, in konz. Schwefelsäure sehr schwerlöslich. Diese Feststellungen lassen vermuten, dass ein Bis-sulfuryldioxy-anthracen⁴⁾ IV vorliege.

Oleum und 1,5-Dihydroxyanthrachinon (Anthrarufin) oder 1-Hydroxyanthrachinon (Erythroxyanthrachinon). Nach der Einwirkung von 45-proz. Oleum auf Anthrarufin konnten wir den mit IV isomeren Körper V entsprechend isolieren. Das Massenspektrum zeigt neben dem Molekel-Ion 366 Fragment-Ionen bei m/e 302 ($= M - SO_2$), m/e 274 ($= M - SO_2 - CO$), m/e 210 ($= M - 2 SO_2 - CO$) und m/e 182 ($= M - 2 SO_2 - 2 CO$), also dieselbe Fragmentierung wie bei IV, aber in etwas anderer Reihenfolge. IR.- und UV.-Spektrum sind mit der Konstitution V verträglich. Bis-sulfuryldioxy-(1,9; 5,10)-anthracen (V) kristallisiert aus Acetanhydrid in blassen, grüngelben, im UV. blau fluoreszierenden Nadeln. In Lösung fluoresziert V intensiv blau wie IV. Auffallend ist wiederum die Schwerlöslichkeit in konz. Schwefelsäure. Im allgemeinen ist V viel weniger löslich als IV.

Aus 1-Hydroxyanthrachinon, dem einfachsten Anthrachinonderivat, welches der BOHN-SCHMIDT'schen Reaktion noch zugänglich ist, erhielten wir nach längerer Einwirkung von 65-proz. Oleum wiederum V.

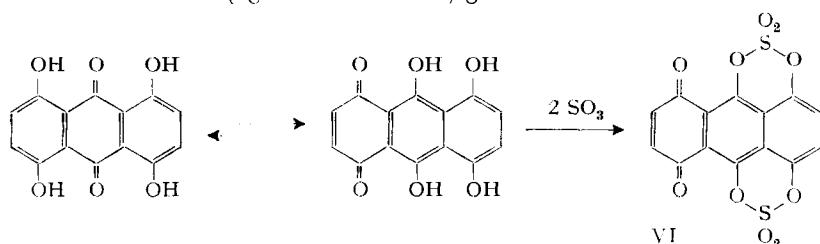
In den aus Chinizarin und Anthrarufin mit Oleum erhaltenen Rohprodukten liess sich dünnsschichtchromatographisch neben IV bzw. V noch ein höher hydroxyliertes Anthrachinonderivat nachweisen, das papierchromatographisch als 1,4,5-Trihydroxyanthrachinon identifiziert wurde.

Oleum und 1,4,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon. Schon nach der Einwirkung von nur 27-proz. Oleum auf 1,4,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon konnte durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxid eine neue Verbindung $C_{14}H_4O_{10}S_2$ (396,3) isoliert werden, die aus Chlorbenzol in schönen gelben Nadelchen kristallisierte und der wir die Konstitution VI des Bis-sulfuryldioxy-(1,9; 4,10)-anthrachinons-(5,8) auf Grund folgender Beobachtung zuteilen: Massenspektrometrisch wurde das Molekulargewicht 396 gefunden; daneben war noch eine Verunreinigung mit Molekulargewicht 412 erkennbar, welche in einer folgenden Mitteilung diskutiert werden soll. Das Massenspektrum zeigt ferner Fragment-Ionen bei m/e 332 ($= M - SO_2$), m/e 268 ($= M - 2 SO_2$), m/e 240 ($= 268 - CO$) und m/e 212 ($= 268 - 2 CO$). Bruttoformel und Fragmentierung deuten auf einen der Verbindung IV ähnlichen Aufbau hin.

Im IR.-Spektrum findet man zwei charakteristische Banden bei $5,97 \mu$ (1675 cm^{-1}) und $6,10 \mu$ (1639 cm^{-1}), welche auch bei 1,4-Naphtochinon und anderen 1,4-Chinonen auftreten [10]. Sie werden den Carbonyl- und $-C=C-$ -Streckschwingungen zugeordnet. Das UV.-Spektrum ist dem von 1,4-Naphtochinon sehr ähnlich.

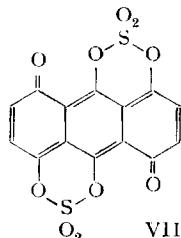
⁴⁾ Nach einer freundlichen Mitteilung von Herrn Prof. Dr. R. WIZINGER (Farbeninstitut der Universität Basel) soll R. E. SCHMIDT in Vorträgen und Diskussionen über den Mechanismus der BOHN-SCHMIDT'schen Reaktion solche Sulfuryldioxyanthracene mit *peri*-Verknüpfung als Glieder im Reaktionsablauf postuliert haben.

Der Übergang von 1,4,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon in VI kann durch Annahme einer Tautomerie (vgl. Formelschema) gedeutet werden:



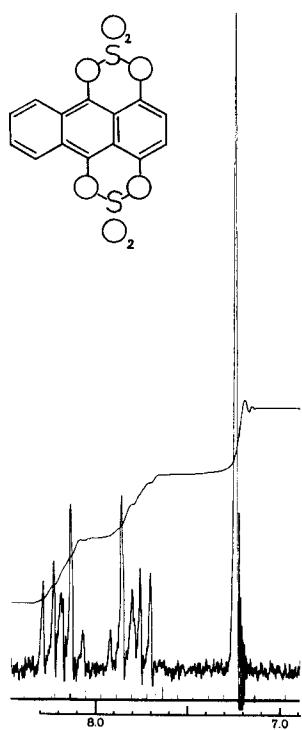
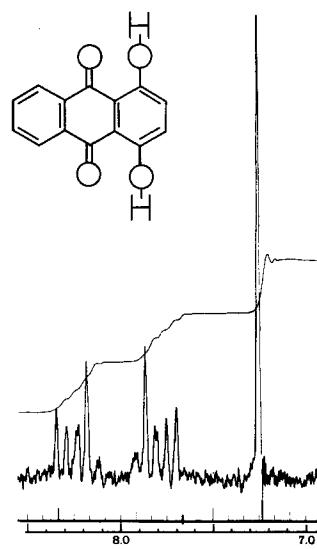
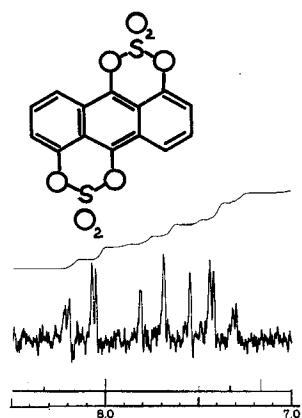
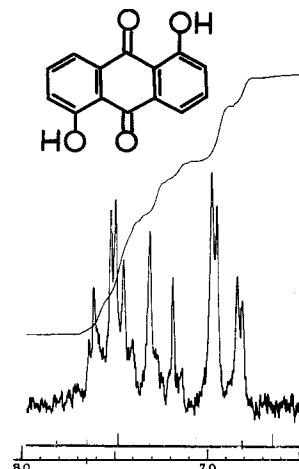
Die NMR.-Spektren bestätigen die postulierten Strukturformeln IV, V und VI (vgl. Fig. 1-4). In Arsentrichlorid gibt IV ein scharfes Signal bei $\delta = 7,28$, welches den beiden äquivalenten Wasserstoffatomen am C-2 und C-3 entspricht. Im Bereich $\delta = 7,7-8,4$ tritt ein typisches A_2B_2 -Spektrum auf, das den vier restlichen Wasserstoffatomen des Bis-sulfuryldioxy-(1,9; 4,10)-anthracens zugeordnet werden kann. Der Schwerpunkt des Signalkomplexes der A-Wasserstoffatome liegt bei $\delta = 8,2$, derjenige der B-Wasserstoffatome bei $\delta = 7,8$. Die Integration der Signale ist mit dieser Interpretation in Übereinstimmung (Fig. 1). Als Vergleich wurde das Spektrum von Chinizarin im gleichen Lösungsmittel aufgenommen (Fig. 2), das wie erwartet, demjenigen von IV sehr ähnlich ist.

Das Spektrum des sehr schwerlöslichen Bis-sulfuryldioxy-(1,9; 5,10)-anthracens (V) wurde im zugeschmolzenen Röhrchen in Arsentrichlorid bei 130° aufgenommen (Fig. 3). Als interner Standard diente Tetramethylammoniumsulfat. Tetramethylsilan konnte wegen seines tiefen Siedepunktes nicht verwendet werden⁵⁾. Zwischen $\delta = 7,3$ und $\delta = 8,2$, findet sich das erwartete ABC-Spektrum der zwei äquivalenten Sätze von je drei benachbarten Wasserstoffatomen. Die geringe Signalhöhe ist auf die ungenügende Löslichkeit zurückzuführen (0,13 statt 0,3 M). Als Modellsubstanz wurde Anthrarufin (1,5-Dihydroxyanthrachinon) in 99-proz. Deuterioschwefelsäure bei 70° aufgenommen (Fig. 4)⁶⁾. Als interner Standard diente gemäß eines Vorschlages von REAVILL [11] ebenfalls Tetramethylammoniumsulfat. Das ABC-Spektrum des Anthrarufins erscheint zwischen $\delta = 6,8$ und $\delta = 7,7$. Das Chinon VI wurde unter gleichen Bedingungen wie V aufgenommen. Das Spektrum enthält zwei scharfe, flächen-gleiche Signale bei $\delta = 7,00$ und $\delta = 7,54$ und bestätigt damit die Formel VI. Die zentrosymmetrische Formel VII ist hiermit ausgeschlossen



⁵⁾ Das Tetramethylammoniumsulfat-Signal tritt in Arsentrichlorid (35°) bei $\delta = 3,24$ auf (Tetramethylsilan $\delta = 0$).

⁶⁾ Die Verbindung war in Arsentrichlorid bei 130° und auch in Arsentrifluorid bei 200° zu wenig löslich.

NMR-SpektrenFig. 1. AsCl_3 35° Fig. 2. AsCl_3 35° Fig. 3. AsCl_3 130° Fig. 4. 99-proz. D_2SO_4 70°

Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden mit einem REICHERT-Smp.-Mikroskop bestimmt und sind korrigiert. – Die IR-, UV-, NMR- und Massenspektren wurden in der Physikalischen Abteilung der CIBA aufgenommen. Die IR.-Spektren⁷⁾ wurden in Nujol mit einem PERKIN-ELMER-Instrument Mod. 221 aufgenommen; die NMR.-Spektren⁷⁾ auf einem VARIAN-A-60-Instrument. – Die Massenspektren⁸⁾ wurden mit einem ATLAS-Massenspektrometer CH4 mit Ofen-Ionenquelle und SEV-Ionen-auffänger aufgenommen (Elektronenenergie 70 eV). Die Proben wurden direkt in der Ionenquelle verdampft. – Die Analysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium (Leitung Dr. W. PADO-WETZ) der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, ausgeführt.

Bis-sulfuryldioxy-(1,9;4,10)-anthracen (IV): 100 g Chinizarin (analysenrein) wurden in 1 kg 45-proz. Oleum bei 30–45° in 15 Min. eingetragen (zeitweise Wasserkühlung). Nach 3 Std. Röhren bei 36–38° wurden unter Kühlung 500 ml 96-proz. Schwefelsäure zugetropt (Höchsttemperatur 45°). Diese Lösung wurde auf 2,2 kg Eis unter zusätzlicher äußerer Kühlung mit Eiswasser zugetropt (Innentemperatur 10–20°; Endkonzentration der Schwefelsäure ca. 50%). Nach 12 Std. Stehen wurde die Suspension auf einer Nutsche von 24 cm Durchmesser (2 Weichfilter) abfiltriert. Rückstand nach Neutralwaschen (Dauer 3 Tage) bei 70–80° im Vakuum getrocknet: 87 g dunkles Pulver.

Chromatographie: 54,0 g an 1,62 kg Aluminiumoxid (CAMAG, Aktivität I, neutral); Säulen-durchmesser 62 mm, Höhe der Schicht 60 cm. Elution nacheinander mit 120 l Tetrachlorkohlenstoff/Benzol (9:1), 25 l Tetrachlorkohlenstoff/Benzol (7:3) und 45 l Benzol (Dauer 21 Tage; Durchflussgeschwindigkeit ca. 2 l/Std.) liefert insgesamt 1,2655 g rotgelbe Kristalle von IV. Aus 185 ml dest. Tetrachlorkohlenstoff 791 mg lange, flache grüngelbe Nadeln, Smp. 243,0–244,0°.

UV.-Spektrum (Hexan): λ_{max} [nm (log ε)]: 260 (4,99), 367 (3,90), 375 (3,90), 387 (4,08), 410 (4,01).

IV sublimiert unzersetzt bei 135°/0,005 Torr. In Hexanlösung zeigt die Substanz noch eine deutlich blaue Fluoreszenz im UV. (350 nm) in einer Konzentration von 1,8 µg/ml Lösung. 0,1 µg (1 Tropfen) reicht für den Nachweis aus.

C ₁₄ H ₆ O ₈ S ₂	Ber. C 45,90 (366,3)	H 1,65 Gef. , , 1,94	O 34,94 ,, 34,78	S 17,51% ,, 17,29%
--	-------------------------	-------------------------	---------------------	-----------------------

Bis-sulfuryldioxy-(1,9;5,10)-anthracen (V). – a: 50,0 g Anthrarufin (analysenrein) unter zeitweiliger Kühlung innert 20 Min. in 500 g 45-proz. Oleum eingetragen; Temperatur während des Eintragens 40–52°. 5 Std. bei 37–40° gerührt. Auf 1,1 kg Eis ausgetragen; Endtemperatur 40°. Filtriert und neutralgewaschen. Trocknung bei 90° im Vakuum: 31,9 g Rohprodukt als dunkles Pulver.

Chromatographie: 20,0 g an 333 g Alox (CAMAG, Aktivität I, neutral); Säulendurchmesser 36 mm, Füllhöhe Alox 35 cm. Mit 17 l Benzol eluiert. Ausbeute: 1,4802 g. Aus 120 ml dest. Acetanhydrid kristallisiert. Trocknung 20 Std. bei 110–115°/0,002 Torr: 1,3433 g lange, blassgrüne Nadeln, Smp. 325–327°/0,01 Torr (Zers.).

UV.-Spektrum (Hexan), Bereich 250–700 nm. λ_{max} [nm (log ε)]: 260 (4,26), 367 (3,11), 387 (3,25), 410 (3,23).

C ₁₄ H ₆ O ₈ S ₂	Ber. C 45,90 (366,3)	H 1,65 Gef. , , 1,56	O 34,94 ,, 35,00	S 17,51% ,, 17,60%
--	-------------------------	-------------------------	---------------------	-----------------------

b): 25,0 g Erythroxyanthrachinon (analysenrein) in 500 g 65-proz. Oleum innert 5 Min. unter Röhren und Wasserkühlung eingetragen; Endtemperatur 32°. 161 Std. bei 30–40° gerührt, dann unter Eiskühlung in 250 ml 96-proz. Schwefelsäure eingetropft. Lösung auf 1 kg Eis gegeben; Endtemperatur 38°. Nach 1 Std. abfiltriert (starker SO₂-Geruch). Nutschendurchmesser 21 cm. Neutralgewaschen. Im Vakuum bei 75° getrocknet: 32,5 g dunkles Pulver.

Chromatographie: 20,0 g an 375 g Alox (CAMAG, Aktivität I, neutral); Säulendurchmesser 36 mm, Füllhöhe Alox 38 cm. Eluiert mit 10 l Benzol: 261 mg grüngelbe Kristalle. Aus dest. Acetanhydrid krist.; getrocknet bei 110–120°/0,005 Torr: 183 mg, Smp. 318–321°/0,01 Torr (Zers.); IR. identisch mit dem der nach a) hergestellten Verbindung (vgl. theoretischer Teil).

Bis-sulfuryldioxy-(1,9;4,10)-anthracenchinon-(5,8) (VI): 112,0 g 1,4,5,8-Tetrahydroxy-anthrachinon in 640 ml 27-proz. Oleum unter Kühlung eingetragen; Höchsttemperatur 34°.

⁷⁾ Herrn Dr. R. F. ZÜRCHER danken wir für die Interpretation der Spektren.

⁸⁾ Wir danken Herrn Dr. H. HÜRZELEER die Diskussion der Massenspektren.

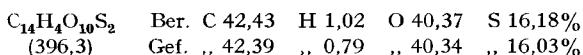
24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Innerhalb 90 Min. in 1400 ml dest. Wasser unter Röhren eingetropft; Außenkühlung Eis/Kochsalz; Temperatur 12–28°. Suspension abfiltriert, Nutscheindurchmesser 25 cm (2 Weichfilter). Konzentration der Schwefelsäure ~ 50%. Filtration und Neutralwaschen benötigten 2 Tage. Trocknen im Vakuum bei 90°: 113 g violettschwarzes Rohprodukt.

Erste Chromatographie: 160 g Rohprodukt in ca. 2,4 l Chlorbenzol aufgekocht, mit 80 g Aluminiumoxid (CAMAG, Aktivität IV, neutral) versetzt, im Rotavapor zur Trockne eingedampft. Erhaltenes Pulver an 4,00 kg Aluminiumoxid (CAMAG, Aktivität III, neutral) chromatographiert; Säulendurchmesser 91 mm, Höhe der Schicht 640 mm. Mit Chloroform eluiert (ca. 2 l/Std.). Gelbe Lösung am Rotavapor abdestilliert und Chloroform wieder auf die Säule gegeben. Nach 230 l Chloroform Chromatographie abgebrochen, da Säule praktisch erschöpft (Dauer 18 Tage). Ausbeute: 27,468 g gelbbraune Substanz.

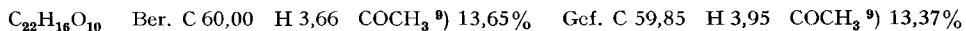
Zweite Chromatographie: 24,0 g Produkt der Alox-Chromatographie in 750 ml dest. Chlorbenzol kochend gelöst, mit 12,0 g Kieselgel (MERCK 0,05–0,20 mm) versetzt. Im Rotavapor zur Trockne eingedampft. Braunes Pulver auf Säule von 4,80 kg Kieselgel in Benzol gegeben. Säulendurchmesser 104 mm, Höhe der Schicht 123 cm. Elution mit Benzol (ca. 2 l/Std.). Eluat im Rotavapor eingedampft, Benzol wieder eingesetzt. Nach 167 l Benzol kam die Lösung praktisch farblos aus der Säule, dann 9 l Benzol/Chloroform 1:1, 9 l Chloroform. Die gelbe Verbindung war nun quantitativ eluiert. In der Säule zurückgebliebene braunschwarze Substanz mit 18 l Äthanol quantitativ herausgelöst. Chromatographiedauer 24 Tage. Gewichtsbilanz der Kieselgelchromatographie: 1) 7,20 g (Benzol); 2) 0,30 g (Bz/Chloroform) (verworfen); 3) 0,14 g (Chloroform) (verworfen); 4) 14,61 g (Äthanol); zusammen 22,25 g.

Erste Fraktion (7,20 g) aus 500 ml dest. Chlorbenzol umkristallisiert: gelbe Nadeln. Abfiltriert und mit Hexan gewaschen. Trocknung 12 Std. bei 55–60°/0,005 Torr: 4,765 g (~ 3% von 160 g Rohprodukt). Smp. 300–305°/0,01 Torr (Zers.). IR.-Spektrum siehe theoretischer Teil.

UV.-Spektrum (Dioxan): λ_{max} [nm (log ε)]: 240 (4,76), 249 (4,60), 255 (4,58), 261 (4,44), 285 (3,92), 325 (3,73), 404 (3,78).



Acetylierung der Fraktion (Äthanolfaktion) (14,61 g): 3,0 g Substanz mit 3,0 g Na-Aacetat (wasserfrei) und 75 ml frisch dest. Acetanhydrid 5 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen im Rotavapor zur Trockne verdampft. Aus ca. 100 ml dest. Benzol umkristallisiert: 1,9 g hellbraune Nadeln, Smp. 243–244°: 1,4,5,8-Tetracetoxyanthracinon.



Wir danken der DR. GADIENT ENGI-STIFTUNG der CIBA für die Gewährung eines Stipendiums (J. W.), sowie der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT für die grosszügige finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

SUMMARY

In the course of an investigation of the BOHN-SCHMIDT reaction, cyclic bis-sulfonic esters of tetrahydroxy-anthracenes have been isolated from solutions of 1-hydroxy-, 1,4-dihydroxy-, 1,5-dihydroxy-, and 1,4,5,8-tetrahydroxy-anthraquinones in high-percent oleum. The constitution of the new compounds is confirmed by UV., IR., NMR. and mass spectra.

Institut für organische Chemie
der Universität Bern
Forschungslaboratorien
der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Farbstoff-Abteilung

^{a)} als CH₃ berechnet.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] DRP 46654, Frdl. Fortschr. Teerfarbenfabr. 2, 111 (1891).
- [2] DRP 60855, Frdl. Fortschr. Teerfarbenfabr. 3, 198 (1896).
- [3] L. GATTERMANN, J. prakt. Chem. [2] 43, 246 (1891); vgl. auch G. O. SCHENK & G. A. SCHMIDT-TOMÉE, Liebigs Ann. Chem. 584, 202 (1953).
- [4] DRP 63693, Frdl. Fortschr. Teerfarbenfabr. 3, 201 (1896); vgl. auch z. B. DRP 62531, *ibid.* 3, 199 (1896); DRP 63692/3, *ibid.* 200; DRP 64418, *ibid.* 205; DRP 65182, *ibid.* 207; DRP 65375, *ibid.* 208; DRP 65453, *ibid.* 209; DRP 67061, *ibid.* 202; DRP 67063, *ibid.* 203; DRP 69013, *ibid.* 204; DRP 69388, *ibid.* 211; DRP 97674, *ibid.* 5, 261 (1901); DRP 155045, *ibid.* 8, 184 (1908); DRP 156960, *ibid.* 254; DRP 161026, *ibid.* 256.
- [5] Vgl. z. B. DRP 62018, Frdl. Fortschr. Teerfarbenfabr. 3, 212 (1896), mit 12 Zusatzpatenten.
- [6] R. E. SCHMIDT, Angew. Chem. 41, 41 (1928).
- [7] R. E. SCHMIDT, J. prakt. Chem. [2] 43, 239 (1891); L. GATTERMANN, *loc. cit.* [3].
- [8] J. LICHTENBERGER & R. LICHTENBERGER, Bull. Soc. chim. France [5] 15, 1002 (1948); J. LICHTENBERGER & R. KIRCHER, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. 229, 1345 (1949); J. LICHTENBERGER & L. DÜRR, Bull. Soc. chim. France [5] 23, 664 (1956); J. LICHTENBERGER & J. HINKY, Bull. Soc. chim. France [5] 28, 1495 (1961).
- [9] T. IKEDA, Y. YAMAMOTO, K. TSUKIDA & S. KANATOMO, J. pharmaceut. Soc. Japan 76, 217 (1956).
- [10] R. T. O'CONNOR, P. VON DER HAAR, E. F. DU PRE, L. E. BROWN & CH. POMINSKI, J. Amer. chem. Soc. 76, 2368 (1954).
- [11] R. E. REAVILL, J. chem. Soc. 1964, 519.

12. Fixation spontanée de la biotine à une protéine dans le sérum humain

par M. Vallotton, U. Hess-Sander et F. Leuthardt

(30 XI 64)

Dès le début des recherches de notre Institut sur la fixation de la biotine aux protéines extraites du foie de poule, nous avions été frappés par l'importance d'une fixation spontanée s'effectuant encore à 4°, sans l'aide d'aucun cofacteur et en quelques secondes [1]. Par la suite nous avons toujours dû tenir compte de cette fixation lors des essais d'incubation, pour le calcul de la proportion d'incorporation enzymatique de ce coenzyme [2]. C'est la raison pour laquelle nous avons continué à nous intéresser – à côté de nos recherches principales – à cette fixation spontanée; cela nous a permis de découvrir qu'une fraction protéique déterminée du sérum humain possédait la propriété de fixer la biotine [3]. Ce sont les résultats obtenus avec le sérum humain que nous rapportons ici plus en détail.

Nous avons recouru à deux méthodes: 1° la dialyse d'équilibrage, 2° la filtration sur gel de dextran (Sephadex).

1° Dialyse d'équilibrage

Méthode: 1 ml de la solution de protéine est mise dans un sac de dialyse que l'on plonge dans un petit ERLENMEYER (12 ml) contenant une solution de NaCl isotonique à laquelle la biotine-[¹⁴C] a été ajoutée. Un agitateur magnétique assure une agitation constante. L'opération s'effectue à 4°. L'équilibre est atteint vers la 12^e heure, mais nous avons toujours attendu 24 à 36 h pour assurer à l'équilibrage une marge suffisante. A la fin de la dialyse, des fractions aliquotes du con-