

## KURZE MITTEILUNGEN

Bis am 20. des Monats bei der Redaktion eingehende kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht  
Es werden auch Manuskripte aus dem Auslande angenommen

## Hydratationsenergie des NaCl-Ionenpaares\*

Wenn man die Bedeutung der Hydratationsenergie des Ionenpaares<sup>1</sup> kennt, kann man sich nur wundern, wie wenig Anstrengungen bisher unternommen wurden, sie zu bestimmen. Es überrascht aber noch mehr, daß sie oft bedenkenlos gleich Null gesetzt wurde.

Die elektrostatische Berechnung kann, in Anlehnung an die Berechnung von BERNAL und FOWLER<sup>2</sup> für die freien Ionen, in fünf Teile geteilt werden:

$$H_s^{MX} = \sum H_{e\mu} + \sum H_{\mu\mu} + \sum H_{rep} + H'_{diss} + \sum H_w.$$

1. Anziehung der Ionen auf die umliegenden Wasserdipole,  $H_{e\mu}$ . Die vorliegende Rechnung beschränkt sich auf die erste Schale, weil das Ionenpaar ja ebenfalls einen Dipol darstellt und die Dipol-Dipol-Energie mit der dritten Potenz des Abstandes abfällt. Hingegen wurde die Abstoßung zwischen einem Ion und den Solvatmolekülen des Partnerions berücksichtigt. Ebenso berücksichtigt wurde der induzierte Dipol.

$$H_{e\mu} = -N e \mu / a_{ij}^2 - a e / a_{ij}^3.$$

Dabei bedeuten  $N$  die Loschmidtsche Zahl,  $e$  eine Elementarladung,  $\mu$  der Dipol eines Wassermoleküles,  $a_{ij}$  der Kernabstand zwischen den Teilchen  $i$  und  $j$ , und  $a$  die Polarisierbarkeit der Wassermoleküle.

2. Die gegenseitige Abstoßung der Wassermoleküle der Hydratschale wurde nach einer Gleichung von BUCKINGHAM<sup>3</sup> berechnet:

$$H_{\mu\mu} = N \mu_i \mu_j (2 \cos \theta_1 \cos \theta_2 + \sin \theta_1 \sin \theta_2 \cos \zeta) / a_{ij}^3.$$

Die Winkel  $\theta_1$ ,  $\theta_2$  und  $\zeta$  bestimmen die räumliche Anordnung der Dipole zueinander.

3. Das Abstoßungspotential wurde wie üblich 12. Ordnung angenommen:

$$H_{rep} = NB / a_{ij}^{12}.$$

$B$  ist eine Konstante.

4. Der Kernabstand zwischen dem Anion und dem Kation ist in der Gasphase kleiner als im Kristall. Da die Sublimationsenergie nahezu gleich der Solvatationsenergie des Ionenpaares ist, greifen in beiden Fällen gleich große Kräfte an der NaCl-Bindung an. Beim Übergang von der Gasphase in die Lösung muß sie gestreckt

werden. Die dazu notwendige Energie wurde mit einer Coulombschen Gleichung berechnet:

$$H'_{diss} = (1/a_g - 1/a_k).$$

$a_g$  ist der Kernabstand in der Gasphase,  $a_k$  derjenige im Kristall.

5. Die Wassermoleküle müssen von der Struktur des umgebenden Wassergitters losgelöst werden. Die Verdampfungswärme von Wasser ist bei 20° 10,5 kcal/Mol. Die Wassermoleküle der Hydratschale werden sich jedoch in die Struktur des umgebenden Wassers so einfügen, daß dadurch ein Maximum an Energie gewonnen wird. Nehmen wir an, daß jedes Molekül der Hydratschale eine Wasserstoffbrücke wiederherstellt, so wird  $H_w$  etwa 8 kcal/Mol. Die Resultate sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Elektrostatisch berechnete Hydratationsenthalpie des NaCl-Ionenpaares

Koordinationszahl	Kernabstand Å	$H_s^{MX}$ kcal/Mol
2	2,48	-23,3
4	2,54	-52,0
6	2,65	-61,4
8	2,70	-78,8
10	2,76	-98,2
11	5,52	-88,1
$n_M + n_X$	$\infty$	-54,6

Von besonderem Interesse ist der Übergang vom innigen zum lösungsmittelgetrennten Ionenpaar. Das elfte Hydratmolekül muß sich zwischen die Ionen drängen. Das Wasser ist jedoch kein Kontinuum, es kann nicht zwischen die Ionen fließen und den Zwischenraum ausfüllen. Zwischen den Ionen entsteht also anfänglich ein Vakuum. Da die Dielektrizitätskonstante anfänglich gleich 1 ist, muß für diesen ersten Schritt eine enorm große Coulombsche Energie überwunden werden. Um die beiden Ionen so weit zu trennen, daß ein Wassermolekül zwischen ihnen Platz findet, sind etwa 30 kcal/Mol notwendig. Dies würde bedeuten, daß in Lösung nur Ionenpaare vorhanden sein könnten, weil die Aktivierungsenergie des Zerfalls so groß ist, daß dieser unwahrscheinlich wird. Freie Ionen kämen allenfalls im Meerwasser vor; dieses würde sich daher anders verhalten als eine im Labor hergestellte Lösung gleichen Gehaltes. Zweifellos existiert ein energetisch günstiger Mechanismus, der eine Aktivierungsenergie in einem vernünftigen Rahmen erlaubt,

\* Vorläufige Mitteilung. Vorgetragen an der Sommersammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft am 3. Oktober 1964 in Zürich.

<sup>1</sup> R. HÜMBELIN, *Electrochim. Acta* 9 (1964) 685.

<sup>2</sup> J. D. BERNAL und R. H. FOWLER, *J. Chem. Physics* 1 (1933) 515.

<sup>3</sup> A. D. BUCKINGHAM, *Quart. Rev.* 13 (1959) 183.

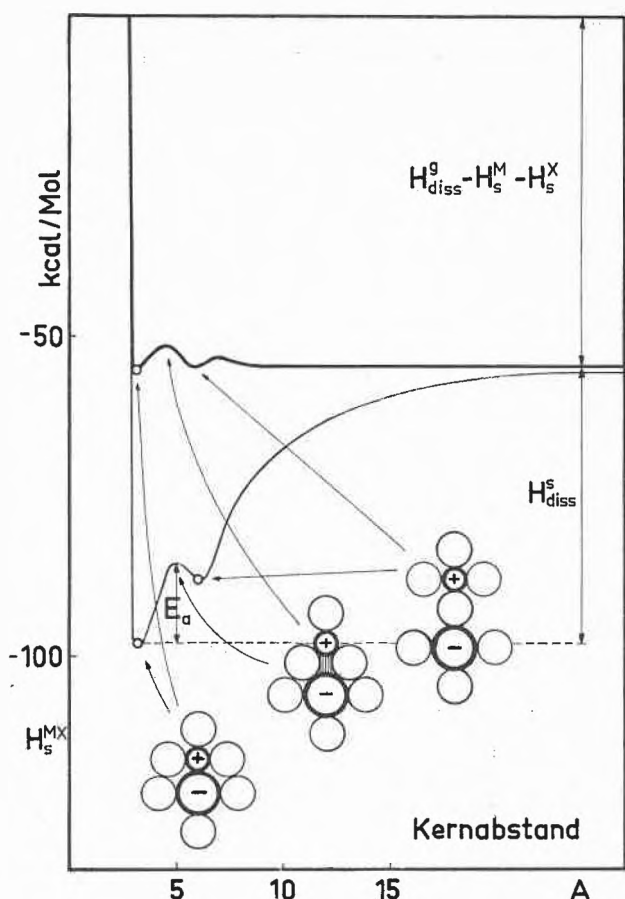


Abb. 1. Energiediagramm der Dissoziation in Lösung

— elektrostatisch berechnet, — aus thermodynamischen Daten abgeschätzt. Die Werte beziehen sich auf das Ionenpaar in der Gasphase, so daß die Minima die Hydratationsenergien der Ionenpaare darstellen. Beim Übergang vom innigen zum lösungsmittelgetrennten Ionenpaar entsteht anfänglich zwischen den Ionen ein Vakuum (im mittleren Modell schraffiert gezeichnet). Dadurch muß für diesen Schritt eine große Coulombsche Energie,  $E_a$ , aufgewendet werden

Bisher wurde das Lösungsmittel meistens als Kontinuum betrachtet und in der Folge angenommen, das Ionenpaar könne gar nicht genau definiert werden, weil der Übergang vom Ionenpaar zum freien Ion ein kontinuierlicher sei. Die Lösungsmittelmoleküle sind jedoch meistens größer als die Ionen, so daß, wie immer auch der Mechanismus sei, bei der Dissoziation eine größere oder kleinere Energiebarriere überwunden werden muß. Diese molekulartheoretische Betrachtungsweise zeigt, daß das innige Ionenpaar ein relativ beständiger und gut definierbarer Körper ist. Erst dadurch wird eine thermodynamische Bestimmung der Hydratationsenergie des Ionenpaares sinnvoll.

In einer gesättigten Lösung muß die Aktivität auf beiden Seiten der Kristalloberfläche gleich sein:

$$(MX_s) = (MX_{krist})$$

Der absolute Aktivitätskoeffizient<sup>1</sup> des Ionenpaares muß entsprechend der Definition von G. N. LEWIS<sup>4</sup> eine Funk-

tion der freien (oder Gibbs-) Energie der Solvation des Ionenpaares,  $G_s^{MX}$ , sein:

$$\ln f_{MX_s} = -G_s^{MX}/RT$$

Analog ist der absolute Aktivitätskoeffizient der Salzmoleküle im Kristall eine Funktion der freien Sublimationsenergie des Monomeren,  $G_{subl}^{MX}$ :

$$\ln f_{krist} = -G_{subl}^{MX}/RT$$

Aus diesen drei Gleichungen ergibt sich sofort eine explizite Gleichung für die freie Solvatationsenergie:

$$G_s^{MX} = G_{subl}^{MX} + RT \ln [MX_s]/[MX_{krist}],$$

welche in einer handlicheren Form lautet:

$$G_s^{MX} = G_{subl}^{MX} + RT \ln c_s M d_s / d_k (c_s M + 1000),$$

wobei  $c_s$  die Sättigungskonzentration des Salzes in Mol pro 1000 g Lösungsmittel,  $M$  sein Molekulargewicht,  $d_s$  die Dichte der gesättigten Lösung und  $d_k$  die Dichte des Kristalls ist. Die letzten Gleichungen gelten natürlich nur, wenn die gesättigte Lösung vollständig gepaart ist. Allerdings bewirkt ein Dissoziationsgrad von 90% nur eine Änderung von 1,3 kcal/Mol.

Wenn die Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit bekannt ist, kann auch die Enthalpie der Solvation des Ionenpaares berechnet werden:

$$\begin{aligned} H_s^{MX} &= G_s^{MX} - \partial G_s^{MX} / \partial T \\ &= H_{subl}^{MX} - RT^2 \partial (\ln [MX_s]) / \partial T. \end{aligned}$$

Zum Vergleich kann die Solvatationsenthalpie aus der Lösungswärme  $L$  unter Annahme vollständiger Assoziation berechnet werden:

$$H_s^{MX} = H_{subl}^{MX} - L$$

Tabelle 2. Hydratationsenergie des NaCl-Ionenpaares

$G_s^{NaCl}$	-45,7 kcal/Mol
$H_s^{NaCl}$ aus Löslichkeit	-54,0 kcal/Mol
$H_s^{NaCl}$ aus Lösungswärme	-55,2 kcal/Mol

Diese beiden Methoden zur Berechnung der Enthalpie hängen in ganz verschiedener Weise von vereinfachenden Annahmen ab. Die gute Übereinstimmung in Tabelle 2 darf wohl als Rechtfertigung dieser Annahmen gelten. Die thermodynamisch ermittelten Werte liegen etwa 43 kcal/Mol höher als der elektrostatische. Es läßt sich aber leicht zeigen, daß der wahre Wert nicht viel niedriger sein kann als der thermodynamische. Wählt man für die Hydratmoleküle die Verdampfungsentropie von Eis und für das sogenannte freie Wasser die bekannte Entropie von Wasser, so wird die freie Energie nach der elektrostatischen Berechnung noch größer als

<sup>4</sup> G. N. LEWIS, Z. Physik. Chem. 61 (1907/08) 129.

die Enthalpie. Berechnet man mit diesem Wert die freie Energie der Dissoziation in Lösung:

$$G_{diss}^s = G_{diss}^g - G_s^M - G_s^X + G_s^{MX},$$

die freie Energie der Dissoziation in der Gasphase,  $G_{diss}^g$ , und die freien Energien der Hydratation der beiden Ionen,  $G_s^M$  und  $G_s^X$ , sind bekannt<sup>5, 6</sup>, und daraus die Gleichgewichtskonstante:

$$\ln K = G_{diss}^s / RT,$$

<sup>5</sup> R. HÜMBELIN, in Vorbereitung.

<sup>6</sup> L. BENJAMIN und V. GOLD, *Trans. Faraday Soc.* 50 (1954) 797.

so findet man, daß Kochsalz in Lösung vollständig assoziiert sein müßte. In diesem Fall gelten aber die für die thermodynamische Rechnung verwendeten Gleichungen. Dieser Widerspruch tritt nur dann nicht auf, wenn der wahre Wert nicht viel unter dem thermodynamischen liegt. Andererseits zeigt die elektrostatische Berechnung, so ungenau sie auch sein mag, daß der wahre Wert auch nicht höher sein kann als der thermodynamische, so daß dieser, mit einer Fehlergrenze von  $\pm 2$  kcal/Mol, als verbindlich betrachtet werden darf.

R. HÜMBELIN  
Sandoz AG, Basel

## Recherches préliminaires sur la structure de la partie glucidique des caséino-glycopeptides\*

### Résumé

Quelques expériences préliminaires concernant le groupement prosthétique glucidique des caséino-glycopeptides sont décrites: l'acide sialique et le galactose occupent une position «externe» par rapport à la galactosamine sans doute liée à la partie peptidique.

La caséine entière de vache privée de sa fraction  $\kappa$  est pratiquement dépourvue de sucres<sup>1</sup>. Ce fait suggère que probablement tous les sucres se trouvent localisés dans la caséine  $\kappa$  qui est la seule fraction glycoprotéique importante de la caséine. Sous l'effet de la présure, à pH 6,8, même en absence d'ions Ca, la caséine  $\kappa$  donne naissance à deux fractions: l'une, insoluble, appelée paracaséine  $\kappa$ ; l'autre, très soluble, appelée «caséino-glycopeptide  $\kappa$ ». Rappelons que la présure agit sur la seule fraction  $\kappa$  de la caséine entière, qui est ainsi le véritable substrat de l'enzyme<sup>3</sup>. Le caséino-glycopeptide  $\kappa$  contient la majeure partie des sucres de la caséine, à savoir, du galactose, de la galactosamine et de l'acide neuraminique; le caséino-glycopeptide est donc la fraction glucidique la plus importante de la caséine<sup>4</sup>. L'étude de son groupement prosthétique glucidique peut être abordée en travaillant soit avec la caséine soit avec le caséino-glycopeptide: quelques expériences préliminaires ont été effectuées en faisant appel à des méthodes chimiques (action de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N; action de l'acide périodique) ou à une méthode enzymatique (action de la neuraminidase).

### Composition en sucres des CGP

Le tableau 1 indique la composition en sucres des caséino-glycopeptides (CGP) de vache (provenant de la

caséine  $\kappa$ ), de brebis (provenant de la caséine entière) et de chèvre (provenant de la caséine entière): les rapports moléculaires ont été calculés en admettant que les poids moléculaires des CGP sont de l'ordre de 8000. Les CGP de brebis et de chèvre contiennent un mélange des acides N-acétyl- et N-glycolyl-neuraminiques.

Tableau 1. Composition en sucres de trois caséino-glycopeptides en % de substance sèche;  $r$  = rapport moléculaire calculé en fixant le poids moléculaire des CGP égal à 8000

Caséino-glycopeptide	Galactosamine*		Galactose**		Acide sialique***	
	%	$r$	%	$r$	%	$r$
CGP $\kappa$ de vache	6,5	2,9	6,0	2,7	10,2	2,8
CGP de brebis	2,4	1,0	2,1	0,9	1,0	0,3
CGP de chèvre	3,4	1,5	3,6	1,6	2,8	0,7

\* Selon RONDLE et MORGAN<sup>5</sup>.

\*\* Selon SCHULTZE et coll.<sup>6</sup>

\*\*\* Exprimé en acide N-acétylneuraminique (PM 309), dosage selon WARREN après hydrolyse acide<sup>7</sup>.

### Action de la neuraminidase sur la caséine $\kappa$ et les CGP

Lorsque l'on fait agir la neuraminidase de *V. cholerae*, à pH 6 (solution tampon de phosphates 0,03 M) pendant 3 heures à 37°, sur une solution à 1% de caséine  $\kappa$  de vache ou de l'un des trois CGP mentionnés dans le tableau 1, la totalité des acides neuraminiques est libérée: l'acide neuraminique occupe donc une position terminale.

### Action du périodate de K sur la caséine $\kappa$

A une solution à 1% de caséine  $\kappa$  de vache dans une solution tampon de phosphates 0,05 M; pH 7; contenant

<sup>5</sup> C. J. RONDLE et W. T. J. MORGAN, *Biochem. J.* 61 (1955) 586.

<sup>6</sup> H. E. SCHULTZE, R. SCHMIEDTBERGER et R. HAUPT, *Biochem. Z.* 329 (1958) 490.

<sup>7</sup> L. WARREN, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1971.

\* Reçu le 10 octobre 1964.

<sup>1</sup> C. ALAIS, Thèse Sci., Paris 1962; C. ALAIS et P. JOLLÈS, *Lait* 44 (1964) 138.

<sup>2</sup> P. JOLLÈS, C. ALAIS et J. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta* 51 (1961) 309.

<sup>3</sup> D. F. WAUGH et P. H. VON HIPPEL, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 4576.

<sup>4</sup> C. ALAIS et P. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta* 51 (1961) 315.

du KCl (0,15 M), on ajoute du périodate de K (35 mg  $\text{KIO}_4$  pour 100 mg de caséine  $\kappa$ ); 80% de l'acide sialique sont détruits en 30 minutes à température ordinaire; par contre, les teneurs en galactose et en galactosamine demeurent constantes.

#### Action de la neuraminidase suivie de celle du périodate de K sur la caséine $\kappa$

On fait agir cette fois le périodate de K sur une solution de caséine  $\kappa$  préalablement incubée avec de la neuraminidase, donc privée de l'acide sialique terminal. Après 30 minutes à température ordinaire, 40% de galactose ont disparu: par contre, la teneur en galactosamine demeure constante. Il semble donc que ce soit le galactose qui après le départ de l'acide sialique occupe une position «externe».

#### Action de l'acide sulfurique 0,1 N sur les CGP

Les CGP de vache ( $\kappa$ ), de brebis et de chèvre sont hydrolysés pendant 6 heures à 100° avec  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 N<sup>8,9</sup>. L'hydrolysât est dessalifié puis chromatographié sur papier Whatman n° 1 dans le solvant *n*-butanol-acide acétique-eau (4:1:5, v/v). Deux substances ont pu être identifiées avec le réactif à l'oxalate d'aniline: le galactose libre (très abondant) et une substance peu abondante de  $R_{\text{GlNH}_2} = 0,82$ . Il n'a pas été possible de caractériser de la galactosamine libre.

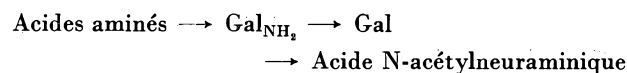
D'autre part, la substance de  $R_f = 0$  a été éluee du papier puis analysée. Elle contient de nombreux acides aminés et de la galactosamine (liée aux acides aminés); par contre, il n'a pas été possible de déceler la présence de galactose. Ces expériences montrent que c'est le galactose qui, après la destruction de l'acide sialique, occupe une position «externe»; par contre, c'est la

galactosamine qui semble être directement liée à la partie peptidique.

#### Conclusion

La labilité particulière des acides sialiques et du galactose permet de placer ces composés en position «externe» par rapport à la galactosamine plus «interne». Ces trois glucides se trouvent en proportions équimoléculaires dans le CGP de vache. Dans les deux autres CGP, la galactosamine et le galactose se trouvent en proportions équimoléculaires, par contre, les résultats du dosage des acides sialiques indiquent qu'il y a 2 à 3 fois moins de résidus de ces composants; mais il s'agit de substances particulièrement labiles: le dosage, dans des matières qui en contiennent très peu, manque de précision.

Des recherches ultérieures devront déterminer si le groupement prosthétique du CGP de vache est formé par trois enchaînements identiques:



ou par une seule chaîne contenant les 9 résidus glucidiques groupés 3 par 3. La nature de la liaison entre la partie peptidique et la galactosamine qui, d'après nos expériences, ne semble pas être du type ester, est également en cours d'étude.

En ce qui concerne les CGP de brebis et de chèvre, de nouvelles déterminations des composants glucidiques seront faites afin de préciser les rapports moléculaires.

Ce travail a bénéficié en partie d'une subvention du U.S. Department of Agriculture (grant FG-Fr-112).

PIERRE JOLLÈS, CHARLES ALAIS, ARLETTE ADAM,  
ANTOINE DELFOUR et JACQUELINE JOLLÈS

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences,  
96, Boulevard Raspail, Paris VI<sup>e</sup>  
et Institut de Biochimie, Faculté des Sciences,  
Orsay (Seine et Oise)

<sup>8</sup> J. MONTREUIL et A. CHOSSON, *C. R. Acad. Sci.* 255 (1962) 3071.

<sup>9</sup> J. MONTREUIL, G. SPIK et A. CHOSSON, *C. R. Acad. Sci.* 255 (1962) 3493.

## Enol- und Inoläther-Additionen an 2-Acetyl-1,4-benzochinon\*

Chinone, die mit elektronenziehenden Gruppen substituiert sind, addieren unter mildesten Bedingungen anionische Moleküle. Besonders wertvoll sind die Reaktionen dann, wenn sie zu einer neuen C-C-Verknüpfung führen. Von solchen Reaktionen beschrieben wir bisher Umsetzungen mit Furanen sowie mit 3,4-Dimethoxythiophen und Acetessigester<sup>1</sup>. In der vorliegenden, vorläufigen Mitteilung seien erste Resultate aus Untersu-

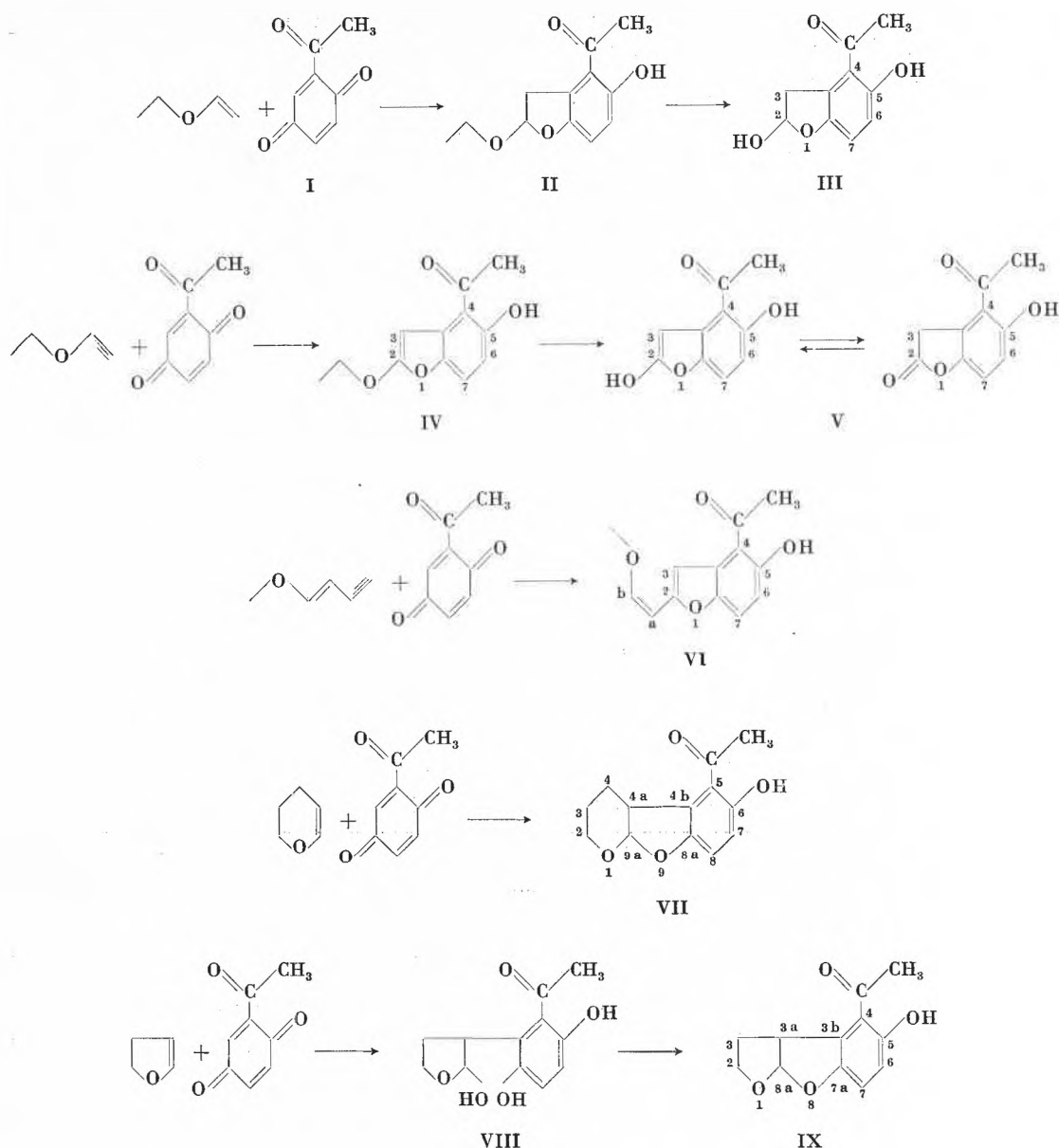
chungen über die Additionsfähigkeit von Enoläthern an Acetylbenzochinon mitgeteilt (siehe Formelschema).

Löst man Acetylbenzochinon (I) in überschüssigem, reinem Äthylvinyläther, so tritt eine exotherme Reaktion ein. Das entstandene Acetal (II), ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ), kann aus der Reaktionslösung durch Vakuumdestillation isoliert werden, doch ist es einfacher, die Reinigung mit der Spaltung zum Halbacetal (III), ( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ ), durch Chromatographie an Kieselgel zu kombinieren. Letzteres ist gelb, kristallisiert ( $F = 135^\circ$ ), es reduziert Tollens-Reagens in der Kälte momentan und färbt die Epidermis stark gelb.

In gleicher Weise setzt sich Äthoxyacetylen mit (I) um. Das entstandene kristallisierte, gelbe Acetal (IV),

\* Eingegangen am 14. Oktober 1964.

<sup>1</sup> C. H. EUGSTER und P. BOSSHARD, *Chimia* 15 (1961) 528, 16 (1962) 45; *Angew. Chem.* 1963, 102; *Helv. Chim. Acta* 46 (1963) 815; C. H. EUGSTER und R. GOOD, *Chimia* 16 (1962) 343; P. BOSSHARD, S. FUMAGALLI, R. GOOD, W. TRUEB, W. V. PHILIPSBORN und C. H. EUGSTER, *Helv. Chim. Acta* 47 (1964) 769.



( $C_{12}H_{12}O_4$ ), ( $F = 120$  bis  $121^\circ$ ), ist wesentlich hydrolysebeständiger als das Acetal (II), obwohl es formal ein Ketenacetal darstellt. Chromatographie an Kieselgel oder Behandlung mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure führen zu keiner Ätherspaltung, hingegen erfolgt diese leicht durch Kochen mit Essigsäure-Acetat-Puffer in Äthanol-Wasser<sup>2</sup>. Die Hydrolyse dürfte über eine säurekatalysierte, nucleophile Additionsreaktion, eventuell mit intermediärer Ringöffnung, ablaufen. Das gelbe 4-Acetyl-5-hydroxy-cumaranon-(2) (V), ( $C_{10}H_8O_4$ ,

$F = 186$  bis  $186,5^\circ$ ), liegt nach IR-, UV- sowie NMR-Spektren (siehe Tabellen 1, 2, 3) in der Form des Lactons vor. Besonders charakteristisch ist seine hohe Carbonylfrequenz ( $1808\text{ cm}^{-1}$  in Chloroform), wie sie auch bei andern  $\gamma$ -Enollactonen gefunden worden ist.

Die Kondensation von Acetylbenzochinon mit reinem, frisch destilliertem 4-Methoxy-buten(3)-in-(1) erfolgt gleichfalls unter erheblicher Wärmeentwicklung. Aus dem Reaktionsgemisch haben wir bisher zwei kristallisierte, isomere Produkte ( $C_{13}H_{12}O_4$ , A,  $F = 125^\circ$ , B,  $F = 128^\circ$ ) isoliert, von denen A die Struktur (VI) besitzt. Demnach hat sich der aktivierende Einfluß der Methoxygruppe über die Acetylenbindung hinaus erstreckt. Die Zuordnung der *cis*-Konfiguration an der Doppelbindung in der Seitenkette stützt sich auf das

<sup>2</sup> S.M. McELVAIN und E.L. ENGELHARDT, *J. Amer. Chem. Soc.* 66 (1944) 1077, haben ähnliche Resistenz an 2-Äthoxy-5-hydroxybenzofuran (Kondensationsprodukt aus Benzo-1,4-chinon und Ketenacetal) festgestellt.

NMR-Spektrum (siehe Tabelle 3). Überraschend leicht addieren auch zyklische Enoläther an (I). Bisher wurden 2,3-Dihydropyran und 2,3-Dihydrofuran eingesetzt. In ersterem Fall entsteht durch einfaches Stehenlassen der Komponenten die Verbindung (VII), ( $C_{13}H_{14}O_4$ , gelbe Prismen,  $F = 76$  bis  $77^\circ$ ), im zweiten Fall analog die Verbindung (IX), ( $C_{12}H_{12}O_4$ , goldgelbe Prismen,  $F = 125$  bis  $126^\circ$ ). Beim Arbeiten mit Benzol als Lösungsmittel konnte ein Zwischenprodukt (VIII) isoliert werden. Es

ist dunkler gelb, schwerlöslich in Benzol, Äther, Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff. (Die Produkte VII und IX sind darin viel leichter löslich.) VIII besitzt die Summenformel  $C_{12}H_{14}O_5$  ( $F = 156$  bis  $157^\circ$ ), reduziert Tollens-Reagens momentan und läßt sich durch Stehenlassen in Eisessig in nahezu quantitativer Ausbeute in IX überführen, womit seine Struktur gesichert ist. In der Folge haben wir solche Kondensationen meist in Eisessig als Lösungsmittel durchgeführt.

Tabelle 1. UV-Spektren  
Lösungsmittel: Äthanol 95%

Verbindung	$\lambda_{max}$ (log $\epsilon_{max}$ )			$\lambda_{min}$ (log $\epsilon_{min}$ )	
III	232 (4,12)	256 (3,85)	369 (3,55)	251 (3,83)	284 (2,33)
IV	230 (4,15)	302 (4,02)	368 (3,82)	258 (<2,0)	332 (3,46)
V	234 (4,12)	~250 (3,9)	351 (3,54)	278 (<2,0)	
VI	254 (4,14)	317 (4,18)	379 (4,13)	225 (3,84)	265 (3,88)
VII	234 (4,10)	257 (3,81)	374 (3,52)	253 (3,79)	282 (2,02)
IX	232 (3,96)	~255 (3,6)	358 (3,46)	284 (<2,0)	

Tabelle 2. IR-Spektren  
(Auswahl wichtiger Banden)

Verbindung	Banden ( $cm^{-1}$ )	Lösungsmittel
III	3623, 3333 (Halbacetal-OH), 1639 (CO geb.), 1370 ( $COCH_3$ )	$CHCl_3$
IV	1637 (CO geb.), 1592, 1481 (Benzofuran), 1379 ( $COCH_3$ )	$CCl_4$
V	1808 (Cumaranon), 1645 (CO geb.), 1366 ( $COCH_3$ )	$CHCl_3$
VI	1661 (Doppelbindung), 1639 (CO geb.), 1592, 1563, 1488 (Benzofuran), ~1372 ( $COCH_3$ )	$CCl_4$
VII	1645 (CO geb.), 1368 ( $COCH_3$ )	$CCl_4$
VIII	3610, 3289 (OH), 1653 (CO geb.)	KBr
IX	1639 (CO geb.), 1366 ( $COCH_3$ )	$CCl_4$

Tabelle 3. NMR-Spektren  
(Auswahl von Signalen)

Angaben in Hz (gemessen am Varian-A-60-MHz-Spektrometer), Koppelungskonstanten sind in Klammern angegeben

Verbindung	$COCH_3$ s	OH s	Ar-H	Weitere wichtige Signale	Lösungsmittel
III	158		402 (9), d, H-6 418 (9), d, H-7	365, m, H-2	$CD_3COCD_3$
IV	158	767	397 (9), d, H-6 440 (9), d, H-7	338, s, H-3	$CDCl_3$
V	169		431 (9), d, H-6 450 (9), d, H-7	260, s, $H_2-3$	$CF_3COOH$
VI	163	778	406 (9), d, H-6 448 (9), d, H-7	233, s, $H_a-(OCH_3)$ 420, s, H-3; 324 (6), d, H-a; 382 (6), d, H-b	$CDCl_3$
VII	154	700	397 (9), d, H-7 412 (9), d, H-8	192, m, H-4a 338 (5), d, H-9a	$CCl_4$
IX	163		408 (9), d, H-6 421 (9), d, H-7	383 (6), d, H-8a	$CDCl_3$

Einzelne Signale im NMR und deren Werte sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Ihre eingehende Besprechung erfolgt später in der ausführlichen Arbeit. Hervorzuheben sind hier vor allem die Koppelung von H-3 und H-7 in der Verbindung IV und V sowie die abnormal tiefe Lage des Acetalprotons an C-9a bzw. C-8a der Verbindungen VII bzw. IX, worauf bereits BARTON *et al.*<sup>3</sup> hingewiesen haben.

**Bemerkungen:** Vorstehende Beispiele belegen erneut die Leichtigkeit, mit der Acylchinone mit den verschiedensten Substraten in Reaktion treten können. Hervorzuheben sind die zum Teil recht guten Ausbeuten (z. B. bei IX 60 bis 65% der Theorie an chromatographiertem und umkristallisiertem Produkt), die den präparativen Aspekt dieser Reaktionen betonen. Der neue Weg eröffnet einen unmittelbaren Zugang zu funktionell substituierten und auf andere Art und Weise wohl nur schwer zugänglichen Benzofuranderivaten. Die beiden zyklischen Verbindungen VII (5-Acetyl-6-hydroxy-tetrahydro-benzofuro [2,3-b]-pyran) und IX (4-Acetyl-5-

hydroxy-tetra-hydro-furo[2,3-b]-benzofuran) scheinen unseres Wissens die ersten synthetisch zugänglichen Vertreter dieser interessanten Ringsysteme zu sein. In dehydrierter Form ist das Furo[2,3-b]-furan-System seit kurzem in Naturprodukten (z. B. in Clerodin<sup>3</sup>, Stigmamocystin<sup>4</sup> sowie in den Aflatoxinen<sup>5</sup>) festgestellt und zum Teil durch Hydrierung in das vorliegende System übergeführt worden. Wir selbst haben es in einem Umwandlungsprodukt von Coleon A festgestellt<sup>6</sup>.

Weitere Arbeiten über Additionsreaktionen an Acylchinonen sind bei uns im Gange. Die ausführliche Mitteilung wird in *Helv. Chim. Acta* publiziert werden.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds (Gesuch Nr. 2378) für die finanzielle Unterstützung der Arbeiten an Acylchinonen.

<sup>4</sup> E. BULLOCK, J. C. ROBERTS und J. G. UNDERWOOD, *J. Chem. Soc.* 1962, 4179.

<sup>5</sup> K. K. CHEUNG und G. A. SIM, *Nature* 201, 1185 (1964); T. ASAO, G. BÜCHI, M. M. ABDEL-KADER, S. B. CHANG, E. L. WICK und G. N. WOGAN, *J. Amer. Chem. Soc.* 85 (1963) 1706 und hierin zitierte frühere Arbeiten.

<sup>6</sup> C. H. EUGSTER und D. KARANATSIOS, erscheint in *Helv. Chim. Acta*; vorgetragen am 25. September 1964 an der Universität Göttingen.

<sup>3</sup> G. A. SIM, T. A. HAMOR, I. C. PAUL und J. MONTEATH ROBERTSON, *Proc. Chem. Soc.* 1961, 75; D. H. R. BARTON, H. T. CHEUNG, A. D. CROSS, L. M. JACKMAN und M. MARTIN SMITH, *ibid.* 1961, 76; *J. Chem. Soc.* 1961, 5061.

C. H. EUGSTER und P. KUSER

Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich

## Dünnschichtchromatographische Untersuchung von Imipramin

### Summary

Thin layer chromatography applied to commercial imipramine (Tofranil®) demonstrates the presence of less than 0.2% impurity.

These impurities consist of eight compounds. The concentration of no single entity exceeds 0.05%.

Highly fluorescent N-substituted acridines are present in amounts of less than 0.1%.

On the basis of pharmacologic studies, these impurities could not lead to unfavorable side effects at the level in which they are present in commercial Tofranil®.

Die in den letzten Jahren entwickelten hochempfindlichen analytischen Methoden haben die Nachweisgrenze für viele Substanzen beträchtlich gesenkt. Insbesondere sind mittels der chromatographischen Untersuchungsmethoden Bereiche erschlossen worden, die der klassischen Analytik im allgemeinen nicht zugänglich waren. Diese veränderte Situation hat unter anderem dazu geführt, daß organische Begleit-substanzen, die naturgemäß auch in «reinen» Verbindungen nicht fehlen, verhältnismäßig leicht und in günstigen Fällen bis in den p. p. m.-Bereich herab nachweisbar geworden sind, woraus sich neue Möglichkeiten und Impulse für die Untersuchung derartiger Spuren ergeben.

Tabelle 1. Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Begleitsubstanzen in Imipramin

	R <sub>f</sub> -Werte in		Identifikation			Erfassungsgrenze in $\gamma$
	A	B	1	2	3	
I	0,27	0,63	—	blau	dunkel*	10 <sup>-2</sup>
II	0,35	0,32	—	blau	dunkel*	10 <sup>-2</sup>
III	0,04	0,23	—	blau	dunkel*	10 <sup>-2</sup>
IV	0,82	0,80	—	blau	dunkel*	10 <sup>-2</sup>
V	0,49	0,37	—	blau**	gelb	10 <sup>-3</sup>
VI	0,13	0,60	—	—	grüngelb	10 <sup>-3</sup>
IX	0,03	0,68	grüngelb	—	grüngelb	10 <sup>-3</sup>
X	0,09	0,41	blau	—	blau	10 <sup>-3</sup>
XI	0,49	0,68	—	—	grüngelb	10 <sup>-3</sup>

Schicht: Kieselgel G neutral (Merck)  
 Laufstrecke: 10 cm  
 Fließmittel A: Eisessig/Essigester/Wasser/konz. HCl (35/55/5/5)  
 Fließmittel B: Benzol/Essigester/Äthanol/konz. Ammoniak (50/50/10/5), leichte Phase. (Ein ähnliches Fließmittel haben W. PAULUS *et al.*, *Arzneimittel-Forsch.* 13 [1963] 609 beschrieben)  
 Auftragsmenge: 25–200  $\gamma$  (in frisch bereiteter äthanolischer Lösung)  
 Identifikation: 1 Im UV-Licht (366 m $\mu$ )  
 2 Nach Ansprühen mit Dichromat-Schwefelsäure (0,5% K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> in 20 prozentiger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) im sichtbaren Licht  
 3 Nach Ansprühen, im UV-Licht (366 m $\mu$ )

\* Später gelb (Imipramin zeigt in größerer Konzentration zunächst einen blau fluoreszierenden Fleck mit dunklem Rand).

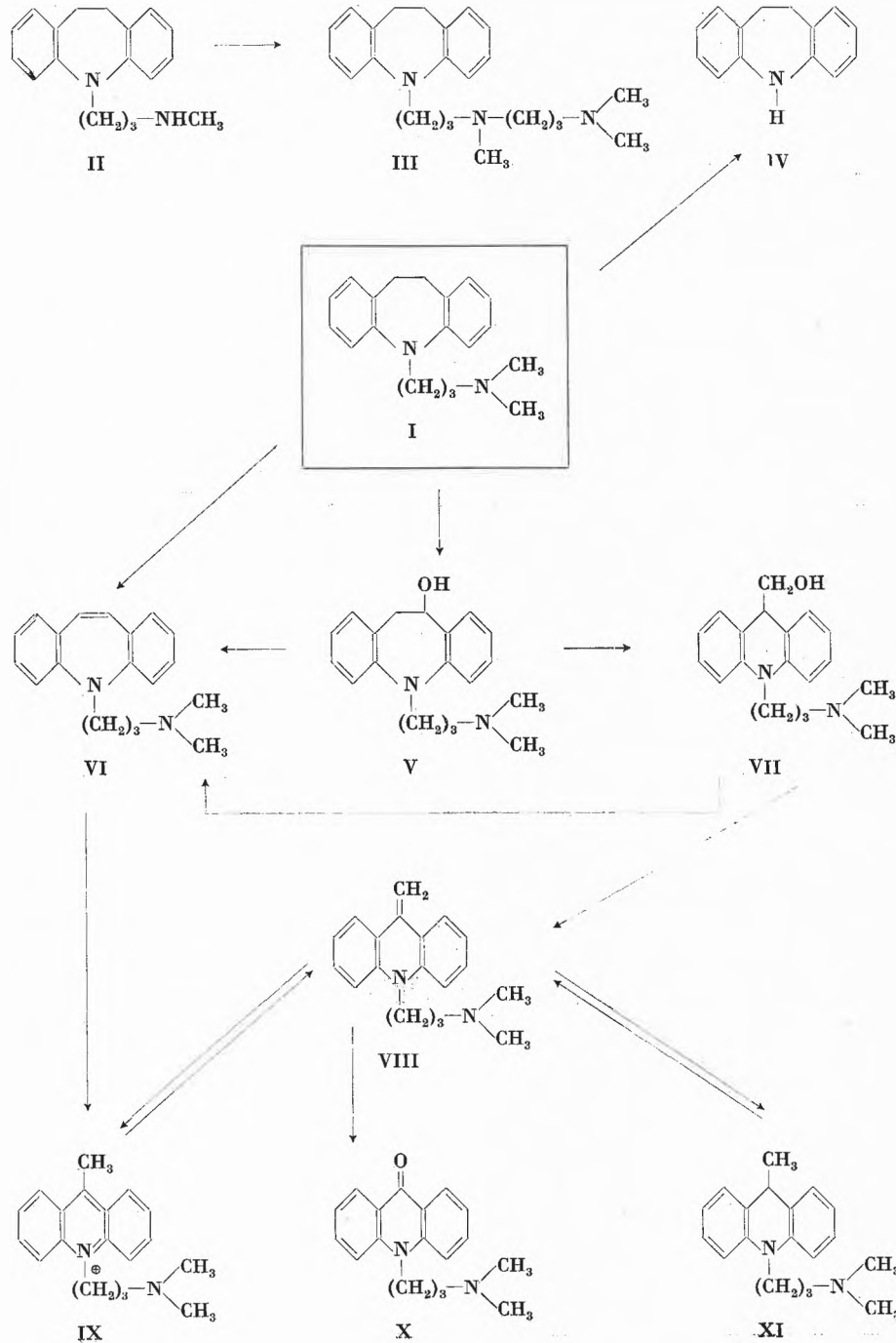
\*\* Nur nach Chromatographie im Fließmittel B.

Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung von Imipramin (I)<sup>1</sup> lassen sich nach dem Besprühen der Platten mit einem Oxydationsmittel außer dem Hauptfleck verschiedene blau angefärbte bzw. im UV-Licht stark fluoreszierende Nebenflecken feststellen

<sup>1</sup> Imipramin ist N-( $\gamma$ -Dimethylaminopropyl)-iminodibenzyl, sein Hydrochlorid die Wirksubstanz von Tofranil® (registrierte Marke der J.R. Geigy AG).

(Tabelle 1). Es war für uns von Wichtigkeit, Art und Menge dieser Neben- und Folgeprodukte zu bestimmen.

Versuche, die Wirksubstanz durch wiederholte Kristallisation oder die freie Base durch Destillation weiter zu reinigen, führten nicht zu einem chromatographisch einheitlichen Produkt. Auch die Herstellung von I aus extrem gereinigten Zwischenprodukten brachte nur eine geringfügige Verbesserung. Erst durch vorsichtige





Säulenchromatographie an Alox gelang es, ein Produkt zu erhalten, das im Dünnschichtchromatogramm keine Nebenflecken mehr zeigte. Dies beweist zugleich, daß die Nebenflecken keine chromatographischen Artefakte von Imipramin darstellen. Wird andererseits nach obigem Verfahren gereinigtes, einheitliches Imipramin-Hydrochlorid in Gegenwart von Luft feucht und warm aufbewahrt, so treten bei der Dünnschichtchromatographie erneut die fluoreszierenden Nebenflecken in Erscheinung. Bei diesen muß es sich also um genuine Folgeprodukte handeln. Der Vergleich (Spektren, Dünnschichtchromatogramm) der mittels Säulenchromatographie angereicherten Neben- und Folgeprodukte (total etwa 0,2%) mit teils bekannten, teils eigens zu diesem Zweck hergestellten Verbindungen ermöglichte die Identifizierung der einzelnen Komponenten als II, III, IV, V, VI, IX, X und XI.

Die Entstehung der beiden Nebenprodukte II und III findet ihre Erklärung in der Tatsache, daß das zur Synthese verwendete  $\gamma$ -Dimethylaminopropylchlorid geringe Mengen  $\gamma$ -Methylaminopropylchlorid enthält. Bei der Kondensation dieser Beimengung mit Iminodibenzyl (IV) entsteht II, das zu III weiterreagieren kann. Andererseits ist das in sehr geringer Menge auftretende Iminodibenzyl (IV) auf eine auch in anderem Zusammenhang bereits beobachtete Abspaltung der Seitenkette<sup>2</sup> des Imipramins zurückzuführen. Nach Belastung von Imipramin tritt der Nebenleck IV tatsächlich vermehrt in Erscheinung.

Bei den weiteren identifizierten Nebenflecken V, VI, IX, X und XI handelt es sich um Oxydations- und/oder Umlagerungsprodukte von Imipramin, deren Entstehung besonders in Lösung oder bei feuchtwarmem Lagern von Imipramin-Hydrochlorid zu erkennen ist. Für ihre Bildung kann angenommen werden, daß aus Imipramin I durch Hydroxylierung in Benzylstellung 10-Hydroxy-imipramin (V) entsteht. Eine Wasserabspaltung aus V oder eine direkte Dehydrierung von I könnte für das Entstehen des Iminostilbenderivates VI verantwortlich sein. Sowohl V als auch VI erleiden in saurem Milieu eine Ringverengung zu IX, wobei allenfalls intermediär VII und VIII entstehen könnte. Beide Verbindungen konnten allerdings – vermutlich wegen ihrer hohen Instabilität – als Folgeprodukte nicht nachgewiesen werden. Bei Anwesenheit von Luft wird IX in neutraler oder alkalischer Umgebung (über VIII) zum

Acridonderivat X oxydiert, während bei Luftausschluß das 9-Methylacridanderivat XI entsteht.

Diese Umwandlungen ließen sich durch eine Reihe chemischer Reaktionen weitgehend sichern. In saurem Milieu konnte V in VI übergeführt werden, das seinerseits beim Erwärmen in starker Säure IX lieferte. Beim Belüften einer salzsauren alkoholischen Lösung von XI entstanden hauptsächlich IX und X, während IX und XI in alkalischem Milieu X lieferten. Die Oxydation von XI zu IX, die bei der Chromatographie im Fließmittel A nahezu quantitativ stattfindet, kann durch Zusatz eines Antioxydants verhindert werden. Dementsprechend ist in Imipramin-Hydrochlorid-Lösungen, die zur Stabilisierung Ascorbinsäure enthalten, Fleck IX im Fließmittel A (vgl. Tabelle 2) stark abgeschwächt, während gleichzeitig ein Doppelfleck V/XI verstärkt auftritt. Demnach dürfte IX weitgehend ein chromatographisches Artefakt von XI im sauren Fließmittel darstellen.

Tabelle 2. Gehalt an Begleitsubstanzen in Tofranil®-Wirksubstanz (Durchschnittswert in %)

II	0,04
III	0,04
IV	0,01
V	0,01
VI	0,03
IX/XI*	0,06
X**	0,01

\* IX und XI wurden gemeinsam abgeschätzt (nach Luftoxydation von XI zu IX auf der Platte).

\*\* Nur in Tofranil®-Dragées.

Mit Hilfe der synthetisierten Verbindungen konnten die in Imipramin enthaltenen Verunreinigungen semiquantitativ bestimmt werden. In Tabelle 2 ist der Gehalt an Neben- und Folgeprodukten als Durchschnittswert einer größeren Zahl von Tofranil®-Wirksubstanzmustern angegeben. Durchaus vergleichbare Verhältnisse liegen in Tofranil®-Ampullen und -Dragées vor.

Die pharmakologische Prüfung ergab keine Anhaltspunkte, daß die im DC in Spuren nachgewiesenen Substanzen ungünstige Nebenwirkungen auslösen könnten.

K. ADANK und W. HAMMERSCHMIDT

Wissenschaftliche Laboratorien  
der J. R. Geigy AG, Basel

<sup>2</sup> W. SCHINDLER und F. HÄFLICER, *Helv. Chim. Acta* 37 (1954) 472.