FORTSCHRITTE
DER
CHEMISCHEN FORSCHUNG

HERAUSGEGEBEN VON

F. G. FISCHER
WÜRZBURG

H. W. KOHLSCHÜTTER
DARMSTADT

KL. SCHÄFER
HEIDELBERG

SCHRIFTLEITUNG:

H. MAYER-KAUPP
HEIDELBERG

2. BAND, 1. HEFT

MIT 72 TEXTABBILDUNGEN

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1951

Fortschr.
chem. Forsch.

Preis DM 24.—

Die

„Fortschritte der chemischen Forschung"

erscheinen zwanglos in einzeln berechneten Heften, von denen je vier zu einem Band von etwa 50 Bogen vereinigt werden. Ihre Aufgabe liegt in der Darbietung monographischer Fortschrittsberichte über aktuelle Themen aus allen Gebieten der chemischen Wissenschaft. Hauptgesichtspunkt ist nicht lückenloses Zitieren der vorhandenen Literaturangaben, sondern kritische Sichtung der Literatur und Verdeutlichung der Hauptrichtungen des Fortschritts. Auch wenden sich die Fortschrittsberichte nicht ausschließlich an den Spezialisten, sondern an jeden interessierten Chemiker, der sich über die Entwicklung auf den Nachbargebieten zu unterrichten wünscht. Die Berichterstattung erstreckt sich vorläufig über den Zeitraum der letzten 10 Jahre. Beiträge nichtdeutscher Autoren können in englischer oder französischer Sprache veröffentlicht werden.

In der Regel werden nur angeforderte Beiträge veröffentlicht. Nicht angeforderte Manuskripte werden dem Herausgeberkollegium überwiesen, das über die Annahme entscheidet. Für Anregungen betreffs geeigneter Themen sind die Herausgeber jederzeit dankbar.

Anschriften:

Prof. Dr. F. G. Fischer, (*13a*) *Würzburg, Röntgenring 11* (Organische Chemie und Biochemie).

Prof. Dr. H. W. Kohlschütter, (*16*) *Darmstadt, Eduard-Zintl-Institut der T. H.* (Anorganische Chemie).

Prof. Dr. Kl. Schäfer, (*17a*) *Heidelberg, Plöck 55* (Physikalische Chemie).

Dr. H. Mayer-Kaupp, (*17a*) *Heidelberg, Neuenheimer Landstraße 24* (Springer-Verlag).

Springer-Verlag

Heidelberg
Neuenheimer Landstraße 24
Fernsprecher 24 40

Berlin-Charlottenburg 2
Jebensstraße 1
Fernsprecher 32 20 70

Betriebsvertretungen des Verlages im Ausland:

Lange, Maxwell & Springer Ltd., 41—45 Neal Street, London, W.C. 2
Lange, Maxwell & Springer A.G., Basel, Schützenmattstr. 43

2. Band **Inhaltsverzeichnis.** 1. Heft

Seite

EDSALL, JOHN T., and WALTER B. DANDLIKER, Light scattering in solutions of proteins and other large molecules. Its relation to molecular size and shape and molecular interactions. Mit 9 Textabbildungen 1

BEYERSDORFER, KURT, Anwendung des Elektronenmikroskops in der anorganischen Chemie. Mit 20 Textabbildungen 57

SCHLENK JR., WILHELM, Organische Einschluß-Verbindungen. Mit 32 Textabbildungen 92

MÖLLER, ERNST-FRIEDRICH, Wuchsstoffe u. mikrobiologische Stoffwechselanalyse. Mit 11 Textabbildungen 146

Fortschr. chem. Forsch. Bd. 2. S. 1—56 (1951)

Light Scattering in Solutions of Proteins and Other Large Molecules

Its Relation to Molecular Size and Shape and Molecular Interactions[1].

By

JOHN T. EDSALL and WALTER B. DANDLIKER.[2]

With 9 Figures.

Table of Contents.

page

Introduction 2

Rayleigh's Equations: Definition of Reduced Intensity and Turbidity. . . 3

Scattering from a Dilute Gas 7

Scattering from Liquids and Solids: Concepts Derived from Fluctuation Theory 8

Depolarization and Anisotropy 10

Light Scattering and Osmotic Pressure 12

Polydispersed Systems: Number Average and Weight Average Molecular Weights 13

Molecular Weights of Proteins Determined by Light Scattering 14

Multicomponent Systems of Small Molecules: Effects of Net Charge and of Ionic Strength on Turbidity in Protein Solutions 17

- Definition of Components 18
- Thermodynamic Fluctuation Theory for Multicomponent Systems . . 21
- Application to a Two Component System 22
- Systems of Three and More Components. 23
- Experimental Data for Serum Albumin 25
- Kinetics of Dimer Formation in Reaction of Serum Albumin with Mercurials 29

Scattering from Particles Not Small Compared to the Wavelength. . . . 30

- Scattering from Isotropic Spheres of Arbitrary Size and Refractive Index 31
- Scattering from Particles of Various Shapes, When the Relative Refractive Index is Near Unity. 35
- Interference Functions for Specific Geometric Shapes: Sphere, Ellipsoid, Random Coil and Thin Rod 37

[1] Part of the material in this review was presented in lectures given by J. T. EDSALL in Germany during the summer of 1948 while he was a member of the Unitarian Service Committee Medical Mission to Germany. The present review has been rewritten and expanded to take account of recent developments.

Some of the material in this review is also given, together with much other discussion, in the review by DOTY and EDSALL (1950).

[2] (Public Health Service Research Fellow of the National Institutes of Health, 1948—50).

page
Studies on Large Protein Molecules 39
Polydispersity 41
Effects of Intermolecular Interaction in Systems of Particles of Large Effective Volume 42
Experimental Methods 45
Clarification of Liquids 45
Turbidity by Transmission Measurements 45
Measurements of Reduced Intensity of Scattering 46
Corrections Required to Obtain Absolute Values of Reduced Intensity from Experimental Readings 47
The Use of Working Standards 49
Depolarization Measurements 50
Refractive Index Increments 51
Bibliography 51

Introduction.

The fundamental theory of the molecular scattering of light was given in 1871 by Lord RAYLEIGH, and its extension to solutions by means of the theory of fluctuation was carried out by EINSTEIN in 1910. From RAYLEIGH'S equations it was apparent that the scattering of light by molecules of a gas could be used as a method for the determination of Avogadro's number[1]. It was also apparent, even at this time, that the intensity of light scattering from solutions of large molecules could be used as a method for determining their molecular weights. This conception was applied to proteins with valuable results by PUTZEYS and BROSTEAUX (1935, 1941) who determined the molecular weights of egg albumin, serum albumin and several hemocyanins, with results which were in general in excellent agreement with those obtained from ultracentrifuge measurements and from osmotic pressure. They determined molecular weights on a relative scale, choosing amandin as a standard protein and assuming its molecular weight to be 330,000. Important new developments received much of their impetus from the work of DEBYE (1944, 1947), and his conceptions and his experimental approach have been widely applied to solutions of high polymers and proteins. It is now increasingly apparent that light scattering gives important information, not only concerning molecular weights, but also concerning thermodynamic interactions in solutions of macromolecules. For molecules comparable in dimensions with the wavelength of the light employed, measurements of angular dissymmetry of scattering can be used to determine the absolute dimensions of the molecule. In this article we shall not attempt a comprehensive treatment, but shall emphasize

[1] The work in this field up to 1929 was surveyed in the excellent monograph by CABANNES. The later book by BHAGAVANTAM (1942) also contains much valuable material.

those aspects of the subject with which we have been most directly concerned. Valuable reviews have recently been given by several authors, including ZIMM, STEIN and DOTY (1945), MARK (1948) and OSTER (1948, 1950).

Studies of light scattering also proceeded independently in Germany during the war. STAUDINGER and HAENEL-IMMENDÖRFER (1943) determined the molecular weights of a series of glycogen preparations by turbidity measurements. SCHULZ (1944) — see also SCHULZ and HARBORTH (1948) — considered critically the nature of scattering from elongated molecules, and reported studies on polystyrene and other polymers. NEUGEBAUER (1943) dealt, in an important theoretical study, with the scattering from large elongated molecules. It is interesting to note the close parallelism of thought upon these problems among the workers in Germany and in the United States, at a time when they were cut off from direct contact with one another. The emphasis in this review, however, will be primarily on the study of proteins; apart from the work of PUTZEYS' laboratory in Belgium, this has centered largely in the United States. We shall also give some discussion of the important work of V. K. LAMER and his associates on scattering from monodispersed sols of spherical sulfur particles.

Rayleigh's Equations: Definition of Reduced Intensity and Turbidity.

Before discussing these recent developments, we must consider briefly certain fundamental relations, beginning with the work of RAYLEIGH. A light wave may be considered as an alternating electric field of very high frequency, the direction of the electric intensity varying periodically with the characteristic frequency of the light, while remaining always in a direction perpendicular to the direction of the propagation of the wave [1]. This oscillating electric field induces oscillations of the same frequency in the electrons of any molecule present. These induced electric oscillations set up secondary electromagnetic waves which scatter light, of the same frequency as the incident light, in all directions [2]. The amplitude of the scattered wave is proportional to the polarizability (α_0)

[1] There is of course a magnetic as well as an electric component in any electromagnetic wave, but the effects of the magnetic field are negligible as compared to those of the electric field with respect to the phenomena which we are considering.

[2] The scattering of light of different frequency from that of the incident light (Raman effect) is extremely weak in comparison with the RAYLEIGH scattering of unchanged frequency. We shall, therefore, neglect the Raman effect in this discussion, in spite of its profound importance, in other connections, for the understanding of molecular structure.

of the molecule, where α_0 is defined as the ratio of the induced electric moment (m) to the applied field strength (F). If the molecule is isotropic, α_0 and m are parallel. The intensity of the scattered light is proportional to the square of the amplitude and is therefore also proportional to α_0^2. If the molecule under consideration is small in all its dimensions in comparison to the wavelength (λ) of the light employed, we may consider that all parts of the molecule are scattering in phase. In this case the intensity of the scattering does not depend on the molecular shape; and, if the incident light is unpolarized, the scattered intensity is cylindrically symmetric about the primary beam. The scattered intensity, I_ϑ, from unit volume of the scattering medium, at an angle, ϑ, relative to the forward direction of the primary beam, of intensity I_0, is given by the equation

$$\frac{I_\vartheta}{I_0} = 8\pi^4 \alpha_0^2 (1 + \cos^2 \vartheta)/\lambda^4 b^2 . \quad (1)$$

Here b is the distance from the center of scattering to the observer in the direction under consideration.

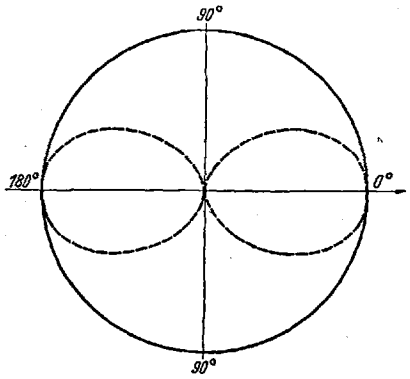


Fig. 1. Scattering from a Small Isotropic Molecule. The molecule is taken as located at the origin. The forward direction of the incident beam of unpolarized light is indicated by the arrow. The relative intensity of the light scattered in any direction in the plane of the paper is given by the intersection of the radius vector, drawn in that direction, with the two curves, each of which is symmetrical about the origin. The intensity of the vertical component (electric vector perpendicular to the plane of the paper) is independent of angle; hence the radius vector defining this component is a circle about the origin. The intensity of the horizontal component, proportional to $\cos^2 \vartheta$, is given by the radius vector drawn to the dotted curve. It becomes equal to the vertical component at $\vartheta = 0°$ (direction of arrow) and vanishes at $\vartheta = 90°$.

If the plane defined by the light source, the scattering object and the observer is horizontal, and if the scattering molecules are small and isotropic, the light scattered at 90° to the incident beam is plane polarized with the electric vector vertical [1]. The intensity of this vertically polarized component is independent of angle. In other directions of scattering, there is also a horizontally polarized component, the intensity of which is proportional to $\cos^2 \vartheta$, so that the total intensity of scattering at any angle is proportional to $1 + \cos^2 \vartheta$, as indicated in equation (1) (see also the diagram of Fig. 1). If the incident light is vertically polarized, then only the vertical component is observed in the scattered light at any angle to the incident beam, in the horizontal plane.

[1] In the following discussion we shall use the term "vertically polarized" to describe plane polarized light in which the plane of vibration of the electric vector is vertical.

It is convenient to define a quantity which, following ZIMM (1948 b), we shall denote as the reduced intensity, namely $I_\vartheta b^2/I_0$. It is dependent only on the nature and state of the scattering material, the angle ϑ at which the scattering is observed, and the wavelength of the light employed. The reduced intensity has the dimensions of a reciprocal length (note that it is defined per unit volume of the scattering medium). We shall employ the symbol V to denote the vertically polarized component of the reduced intensity and H to denote the horizontally polarized component. The symbol R will be employed to denote the total reduced intensity which is the sum of V and H. The subscript ϑ will be used to indicate that the scattering is observed at angle ϑ to the forward direction of the incident beam, and the subscripts u, v, and h to indicate respectively that the incident beam is unpolarized, vertically polarized, or horizontally polarized. Thus $R_{90,v}$ denotes the total reduced intensity for scattering at 90°, when the incident light is vertically polarized. There are certain well known relations between these quantities, often known as the RAYLEIGH reciprocity relations. These have been considered both theoretically and experimentally by KRISHNAN (see for instance KRISHNAN (1938) and the references there given), and have been treated in their most general form by PERRIN (1942). The most important of these relations for our purposes is that

$$H_{\vartheta,v} = V_{\vartheta,h} \tag{2}$$

PERRIN (1942) has shown that this relation holds for scattering from any medium which is macroscopically isotropic – although the individual particles of which it is composed may be anisotropic — and which does not show optical rotation [1].

A beam of unpolarized light of intensity I is equivalent to two plane polarized beams, each of intensity $I/2$, polarized in mutually perpendicular directions, and incoherent in phase. Therefore, for a vertically polarized incident beam of unit intensity, the scattered intensity at 90° in the horizontal plane is twice as great as for an unpolarized incident beam of the same total intensity; for in the latter case, only half the total intensity contributes to scattering in the horizontal plane at 90°. (For further discussion see SINCLAIR (1947).) For a system of small isotropic particles, there is of course no horizontal component in this direction; as will be seen later, this is true also for scattering from iso-

[1] All proteins are optically active; hence protein solutions should, in a rigorous treatment, be considered in terms of the more general equations given by PERRIN for optically active systems. However, the numerical value of the optical rotation in most of the protein systems studied by light scattering is small. Probably they obey equation (2) quite closely, but a critical examination of this point has not, to our knowledge, been undertaken. Investigation of the matter would be desirable.

tropic spheres in general, even when they are not small compared with the wavelength. This discussion may be summarized by the mathematical relations:

$$R_{90,v} = V_{90,v} = 2\,R_{90,u} = 2\,V_{90,u}\,. \tag{3}$$

The determination of the absolute value of the reduced intensity of scattering requires great care in defining the incident beam and the effective volume of liquid from which scattering is observed; several corrections must be made in the readings directly obtained, depending on the geometry of the system and the refractive indices of the scattering medium and its surroundings. These are discussed more fully in the section on Experimental Methods. Particularly careful measurements of the reduced intensity of benzene have recently been carried out by C. I. CARR (1949) in ZIMM's laboratory at Berkeley, California. These give, at $\lambda_0 = 5460$ Å, $R_{90,u} = 16.3 \cdot 10^{-6}\,\mathrm{cm}^{-1}$ and, at $\lambda_0 = 4358$ Å, $R_{90,u} = 48.4 \cdot 10^{-6}\,\mathrm{cm}^{-1}$ (see also OUTER, CARR and ZIMM, 1950). Numerous other values for the reduced intensities of many organic liquids are given by CABANNES (1929) and BHAGAVANTAM (1942). These are in general probably less accurate than those of CARR for benzene, but the relative values reported for different liquids are probably more reliable than the absolute values. For comparison, the reduced intensity $R_{90,u}$ of an isoionic solution of serum albumin (molecular weight 69,000) in water, at a concentration of 10 mg/ml and $\lambda_0 = 4358$ Å, is of the order of $4.5 \cdot 10^{-4}$, or a little less than ten times as great as the value for pure benzene.

If the total radiation of scattered intensity is integrated over all angles of scattering, the result gives the total rate of decrease of intensity of the incident beam as it progresses through the scattering medium. If dl denotes an infinitesimal element of length along the path of the incident beam, then the corresponding decrement in its intensity is:

$$dI = -I\tau\,dl\,. \tag{4}$$

The factor of decrement, τ, commonly known as the turbidity of the medium, is given by the integration already indicated [1]:

$$\left.\begin{aligned} \tau &= \int_0^{\pi} 2\pi R_{\vartheta,u} \sin\vartheta\,d\vartheta = 2\pi R_{90,u} \int_0^{\pi} (1+\cos^2\vartheta)\sin\vartheta\,d\vartheta \\ &= \frac{16\pi}{3} R_{90,u} = \frac{8\pi}{3} R_{90,v}\,. \end{aligned}\right\} \tag{5}$$

[1] It should be noted that the use of the integrand $(1+\cos^2\vartheta)\sin\vartheta$ in equation (5) applies only to small isotropic scatterers. It does not apply to liquid benzene, for instance, for which there is a large horizontal component in the scattered intensity at 90°; nor to systems of particles not small compared to λ.

The integration of equation (4) gives also for τ:

$$\tau = \frac{1}{l} \ln \frac{I_0}{I} \quad . \tag{6}$$

It is apparent that the turbidity, like the reduced intensity, has the dimensions of reciprocal length and is conveniently expressed in cm^{-1}. Thus the turbidity, in measurements of scattering, is exactly equivalent to optical density in the measurement of light absorption, except that the equation defining it is expressed in terms of natural logarithms. We have assumed in writing equation (6) that all the decrease in intensity as light is propagated through the medium is due to scattering, and none to absorption. This assumption must, of course, always be independently verified before we are justified in directly interpreting turbidity measurements (as determined for instance in a spectrophotometer) as giving the intensity of light scattering in a given medium.

Scattering From a Dilute Gas.

For a gas containing ν molecules per cc. the turbidity due to scattering is found to be given by the formula (see for instance DEBYE, 1944)

$$\tau = \frac{8\pi}{3} \left(\frac{2\pi}{\lambda_0}\right)^4 \nu \alpha^2 \, . \tag{7}$$

Since it is clear that the scattered intensity must be proportional to the first power of ν, with dimensions cm^{-3}, and to the second power of α, with dimensions cm^3, it is immediately apparent that a factor inversely proportional to the fourth power of the wavelength must enter into the equation in order to obtain the turbidity with dimensions cm^{-1}.

The polarizability α is a molecular quantity, not directly given by experiment, and in order to correlate equation (7) with the results of experimental measurements, we make use of the relation between the refractive index (n) of the gaseous medium and the polarizability, α.

$$n - 1 = 2\pi\nu\alpha \tag{8}$$

We may now eliminate α between the two equations (7) and (8) and arrive at the relation

$$\tau = \frac{32\pi^3}{3} \frac{(n-1)^2}{\lambda_0^4} \frac{1}{\nu} \, . \tag{9}$$

All the quantities in equation (9) are susceptible of direct measurement except ν, the number of molecules per cc. This can, therefore, be deduced from measurements of refractive index and of turbidity, if the wavelength of the light employed is known.

In the case of a gas we have assumed that the intensity of scattering from ν molecules in a given volume is ν times as great as that from a single molecule enclosed in the same volume. This is justifiable for a

dilute gas, since the molecules are moving at random and entirely independently of one another. Therefore, the scattering from different molecules is additive, since there is no systematic phase relation between the scattering of one molecule and that of another.

Scattering from Liquids and Solids: Concepts Derived from Fluctuation Theory.

In liquids and in solids these conditions no longer hold. The extreme opposite of the case of a perfect gas is that of an ideal crystal in which all the atoms are arranged with perfect regularity and are assumed to be at rest with respect to one another. Such an ideal crystal should scatter no light at all, for the light scattered by any given atom within the crystal will be cancelled by destructive interference with the scattering from another atom with a phase difference of half a wavelength between them. Since all the atoms in the crystal can be paired off in this manner (except for a few atoms at or near the surface of the crystal which are negligible in comparison with the total volume), the total intensity of scattering should be zero.

No actual crystal is ideal in the sense just described, and some light scattering is always observed, increasing in intensity as the temperature rises, with consequent increase in the intensity of thermal vibration of the atoms.

However, in the following discussion we shall not be primarily concerned with solids, but with liquids. The same conceptions apply to both, and the intensity of scattering in a condensed system may be calculated according to the principles first clearly enunciated by EINSTEIN (1910). From the microscopic point of view, the liquid is not a uniform medium. In any small local region fluctuations of density and concentration are constantly occurring, which cause the composition of any such local region to deviate from the mean value of the liquid as a whole. On the average, of course, the positive and negative fluctuations are equally frequent and the value for any small region, averaged over a considerable period of time, is the same as the mean value of the liquid as a whole. The probability of such a fluctuation is to be correlated with the change in the Gibbs free energy (F) of a macroscopic volume of the same fluid when it undergoes a similar concentration change. This probability is given by the equation

$$W = Ce^{-\Delta F/KT}. \tag{10}$$

From the optical point of view, on the other hand, the fluctuation gives rise to a change $\Delta\alpha$ in the polarizability of the liquid in the local region under consideration; and the intensity of the scattered light is proportional to the mean square value of $\Delta\alpha$, averaged over the entire

volume of the liquid under consideration. The polarizability is an approximately linear function of the concentration over a small range. We may therefore write

$$\Delta\alpha = \frac{\partial\alpha}{\partial c}\Delta c. \tag{11}$$

The polarizability α of a volume v_0 of material exposed to an external radiation field is related to the refractive index n by the equations

$$\alpha_v = \frac{n^2 - 1}{4\pi} \tag{12 a}$$

$$\frac{\partial\alpha_v}{\partial c} = \frac{n}{2\pi}\left(\frac{\partial n}{\partial c}\right) \tag{12 b}$$

$$\overline{\Delta\alpha_v^2} = \frac{n^2}{4\pi^2}\left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \overline{\Delta c^2}\,. \tag{12 c}$$

This gives the equation correlating the mean square value of the fluctuation of polarizability with the corresponding fluctuation in the concentration. It is apparent that the proportionality factor relating these two quantities depends both on the square of the refractive index of the medium and on the square of the refractive increment of the solute. Details of the derivation may be found elsewhere (see for instance ZIMM, STEIN and DOTY, 1945). The final equation, as given by EINSTEIN, furnishes a direct correlation between the turbidity produced by the solute and the change of its osmotic pressure (P) with concentration.

$$\tau = \frac{32\pi^3 n^2}{3 N_0 \lambda_0^4} \frac{(c\,\partial n/\partial c)^2}{\frac{c}{RT}\frac{\partial P}{\partial c}}\,. \tag{13}$$

Generally $\partial n/\partial c$ may be taken as a constant characteristic of the solute and independent of c over a considerable range in dilute solutions, so we may write $\partial n/\partial c = (n - n_0)/c$, where n_0 is the refractive index of the solvent. (N_0 is Avogadro's number, and c is expressed as g. solute/cc. solution.)

Two corrections must be made in equation (13) if it is to be strictly accurate, even for dilute solutions. If the solute consists of large molecules, the scattering due to their concentration fluctuations is large compared to that arising from the solvent. The latter, though small, is always finite, due to local density fluctuations in the solvent itself, the magnitude of which depends upon its compressibility. The theory of this effect has also been given by EINSTEIN (9 0); the experimental evidence for EINSTEIN's equations is given by CABANNES (1929) and BHAGAVANTAM (1942); see also MARK (948). The turbidity (τ_0) which arises from this source should be subtracted from the total turbidity of the solution, in order to determine the contribution due to the solute molecules.

Depolarization and Anisotropy.

The other correction involves the anisotropy of the scattering molecules. Up to this point we have assumed that the molecules are isotropic and therefore that the induced electric moment produced by the light beam is always parallel to the electric vector of the light wave. For anisotropic particles, however, the polarizability is different in different directions with respect to the molecular axes, and the induced moment is in general not parallel to the electric field intensity. In the most general case the polarizability of a molecule may be described by a polarizability ellipsoid with components, α_1, α_2, α_3 along the three principal axes of the ellipsoid. Since, in general, the molecules are oriented at random the horizontally and vertically polarized components of the scattered light must be calculated for an arbitrary orientation of the polarizability ellipsoid and the result then integrated by averaging over all possible orientations of the molecule. This calculation was carried out by RAYLEIGH (1918). If the incident light is unpolarized, then the depolarization, ϱ_u, of the light scattered at 90° is given by

$$\varrho_u = \frac{H_{90,\,u}}{V_{90,\,n}} = \frac{2\,(\alpha_1^2 + \alpha_2^2 + \alpha_3^2 - \alpha_1\,\alpha_2 - \alpha_1\,\alpha_3 - \alpha_2\,\alpha_3)}{4\,(\alpha_1^2 + \alpha_2^2 + \alpha_3^2) + \alpha_1\,\alpha_2 + \alpha_1\,\alpha_3 + \alpha_2\,\alpha_3}. \qquad (14)$$

The reduced intensity at 90° may then be multiplied by the factor $(6 - 7\varrho)/(6 + 6\varrho)$ (see CABANNES, 1929) in order to obtain the "corrected" value of the reduced intensity, which is directly related to the molecular weight of the particles.

The depolarization of scattered light from pure gases and liquids consisting of small molecules has been extensively studied, as a means for obtaining information about molecular anisotropy [see for instance STUART (1934) and BHAGAVANTAM (1942)]. Some liquids, especially those composed of aromatic molecules, give very high values of ϱ_u; the value for benzene, for instance, is approximately 0.4, not far below the theoretical maximum value of 0.5 [1]. By contrast, the values of ϱ found for colloidal solutions of dielectric particles [2] are very low, even when the molecules are far from spherical in shape. Thus LOTMAR (1938 b) reported ϱ_u as 0.015 for solutions of myosin (actomyosin) and values below 0.01 for myogen, casein, hemoglobin, gelatin, and total serum proteins. His paper is to be particularly recommended for its careful

---

[1] This value is the upper limit possible for ϱ_u, as may be seen by substituting $\alpha_1 \neq 0$, $\alpha_2 = \alpha_3 = 0$ in equation (14); this represents the most extreme imaginable anisotropy.

[2] Much higher values may be found for conducting particles, such as metallic sols, especially if they are geometrically asymmetrical. For references concerning such systems, see LOTMAR (1938a). The discussion here will be restricted to dielectric particles.

and critical discussion of the sources of error in depolarization measurements. DOTY and KAUFMAN (1945) have reported depolarization ratios for the scattered light from solutions of several polymers.

PUTZEYS and BROSTEAUX (1941) in connection with their molecular weight studies which are discussed further below reported depolarization values for several proteins. The extrapolated values at zero concentration of the protein were generally very low: 0.0095 for amandin, 0.0065 for HOMARUS, SEPIA and HELIX hemocyanins, and approximately 0.02 for serum albumins of three different species, prepared by an ammonium sulfate fractionation. An almost identical value has recently been obtained by us (EDSALL, EDELHOCH, LONTIE and MORRISON, 1950) for bovine serum albumin prepared by alcohol fractionation.

A careful study of depolarization in a protein solution has been made by LONTIE (1944) who studied the hemocyanin of HELIX POMATIA. The measured values of ϱ_u increased rapidly with decreasing wavelength — approximately as λ_0^{-4} — when measurements were made at moderate concentrations and with a light beam of large cross section (1.2 cm). With decrease in the aperture of the light beam (to 0.29 cm), and with decreasing protein concentration, the values of ϱ_u progressively decreased. The extrapolated values at zero protein concentration were 0.00396 at $\lambda_0 = 4358$ Å, and 0.00407 at $\lambda_0 = 5460$ Å, thus being independent of wavelength practically within the experimental error. LONTIE concluded, in agreement with the views of LOTMAR (1938 a, b), that the much higher values of the measured depolarization at higher concentrations (for instance $\varrho_u = 0.0553$ at 4358 Å, concentration 3.06 mg/cc, and incident light beam diameter 1.21 cm) were due chiefly to secondary scattering. Diminution of the path length of the scattered light by reducing the aperture of the beam, or diminution of the turbidity of the medium by lowering the protein concentration, both served to decrease the secondary scattering. As was to be expected, the secondary like the primary scattering increased as λ_0^{-4}. This produced the increase in the measured value of ϱ_u with decreasing wavelength, described above, which was found at finite concentrations and disappeared on extrapolation to zero concentration.

These studies emphasize how misleading it would be to draw conclusions concerning molecular anisotropy from the results of depolarization measurements on protein solutions, unless the measurements had been made with great care, and with due allowance for all possible sources of error.

DOTY and STEIN (1948) have found the very low value $\varrho_u = 0.0077$ for tobacco mosaic virus in solutions containing 0.003—0.009 g. virus per 100 ml.

Light Scattering and Osmotic Pressure.

Subject to corrections for scattering by the solvent and for depolarization, therefore, a measurement of light scattering by a solution containing large molecules (see equation 13) is fundamentally equivalent to a measurement of osmotic pressure, and the type of information to be defined by the two methods is essentially identical. It is apparent from the fundamental equations that the osmotic pressure for a given weight concentration of the solute is inversely proportional to the molecular weight, while the turbidity is directly proportional to it. Hence, to compare the two types of measurements it is convenient to transform equation (13) so that we express our measurements in terms of the reciprocal of the turbidity instead of the turbidity itself. Thus we may write (using the subscript 2 to denote the protein component):

$$\frac{Hc_2}{\tau} = \frac{\partial}{\partial c_2}\left(\frac{P}{RT}\right) \tag{15}$$

where the quantity H is defined by the relation

$$H = \frac{32\pi^3}{3}\frac{n^2}{N_0\lambda_0^4}\left(\frac{n - n_0}{c_2}\right)^2 . \tag{16}$$

Most colloidal solutions, including proteins, show marked deviation from VAN'T HOFF's law of osmotic pressure even at very low concentrations. However, in many fairly dilute solutions it is possible to express the osmotic pressure adequately by means of the two term equation

$$\frac{P}{RTc_2} = \frac{1}{M} + Bc_2 . \tag{17}$$

For the turbidity the corresponding relation is obtained by differentiation of (15), making use of (17) for the value of P/RT:

$$\frac{Hc_2}{\tau} = \frac{1}{M} + 2Bc_2 . \tag{18}$$

Thus a plot of Hc_2/τ against the concentration should give at low concentrations a straight line with intercept equal to the reciprocal of the molecular weight, and with a slope twice as great as that of the curve obtained from osmotic pressure measurements when P/RTc_2 is plotted against c_2. Thus light scattering measurements provide a means of measuring the molecular weight M and also of obtaining important information about the interaction between the solute molecules, which is a function of the slope term B. A large amount of information has now been derived by such measurements on high polymer solutions (see for instance MARK, 1948).

Polydispersed Systems: Number Average and Weight Average Molecular Weights.

If the molecules of the macromolecular solute are not of uniform size, the molecular weights determined by osmotic pressure and by light scattering are no longer identical. The measured value of P/RT, in the region where VAN'T HOFF's law applies, gives the total number of moles (or molecules) of non-diffusible substance per unit volume. Chemical analysis, on the other hand, yields the total mass per unit volume of all the non-diffusible components. Thus, if there are p non-diffusible components, we may define the weight fraction of all the non-diffusible material which is represented by the i'th component, as g_i. The weight concentration of this component, c_i, in g/cc, is then $g_i \sum_{i=1}^{p} c_i$, and its molecular weight is M_i. The contribution which this component makes to the osmotic pressure is, therefore, c_i/M_i and the total contribution of all components is $\Sigma\,(c_i/M_i)$. Thus, if we write the ratio $P/RT\,\Sigma c_i$, that is the ratio of the observed osmotic pressure to RT times the total weight concentration of the solute, we obtain what is known as a number average molecular weight, $\overline{M}_n$, given by the formula

$$\overline{M}_n = \frac{\Sigma c_i}{\Sigma (c_i/M_i)} = \frac{\Sigma m_i M_i}{\Sigma m_i} \quad . \tag{19}$$

The chief contribution to the number average molecular weight is obviously made by the smallest molecules in the system to which the membrane is impermeable. One gram per liter of molecules of weight 40,000 contributes three times as much to the number average as one gram per liter of molecules of weight 120,000.

Light scattering measurements on polydispersed systems give another kind of average molecular weight, known as the weight average, $\overline{M}_w$. This is equal to the sum of the squares of the masses of the molecules divided by the total mass.

$$\overline{M}_w = \frac{\Sigma m_i M_i^2}{\Sigma m_i M_i} = \frac{\Sigma c_i M_i}{\Sigma c_i} \quad . \tag{20}$$

This may be readily seen by considering the limiting form assumed by equation (18) as the total concentration of solute, Σc_i, approaches zero. In such extremely dilute systems we may write

$$\frac{H\,\Sigma c_i}{\tau} = \frac{\Sigma c_i}{\Sigma c_i \overline{M}_i} \quad . \tag{21}$$

The quantities on the left-hand side of the equation are experimentally determined, and the right-hand side gives the reciprocal of the weight average molecular weight. For a brief but more detailed discussion, see

ZIMM and DOTY (1944), and also BRINKMAN and HERMANS (1949), who consider also the higher coefficients in the light scattering equation.

Strictly speaking, the weight average to be used in a calculation from light scattering involves not merely the molecular weight of each component, but its molecular weight multiplied by the square of its refractive index increment. This distinction is not important in most polymers, for which the refractive increment per gram is essentially independent of molecular weight in any one preparation. However, it may be of real importance for a mixture of proteins, since the refractive increment per gram may differ significantly from one protein to another (see for instance ARMSTRONG, BUDKA, MORRISON and HASSON, 1947).

Molecular Weights of Proteins Determined by Light Scattering.

Comparatively few data on molecular weights are yet available, and only a few of the most recent have been determined on an absolute basis. The extensive data of PUTZEYS and BROSTEAUX (1941) are summarized in Table I. Amandin was taken as a standard protein, its molecular weight being assumed as 330,000 from sedimentation, diffusion and viscosity measurements, and the molecular weights of the other proteins were standardized with reference to it. These authors found that the turbidity/concentration ratio was a function of the concentration. For all the proteins they studied it could be described by an equation which in our notation may be written:

$$\frac{\tau}{Hc} = \left(\frac{\tau}{Hc}\right)_0 (1 - b\sqrt{c}) = M\,(1 - b\sqrt{c}) \qquad (22)$$

where $(\tau/Hc)_0$ is the limiting value of the molecular weight calculated at zero concentration, and c is the concentration of protein in g/cc. The values of b ranged from 1.93 for amandin to approximately 2 for the albumins and 3.2 to 4 for hemocyanins. The range of c studied was from 0.008 to 0.080 for serum albumin, and somewhat lower for the proteins of higher molecular weight. The variation of turbidity with protein concentration, charge, and other factors is further discussed in the following section. The molecular weights given by PUTZEYS and BROSTEAUX in Table I are in very satisfactory agreement with other data obtained from sedimentation, diffusion, viscosity, osmotic pressure and other methods; for tabulation of these data see for instance SVEDBERG and PEDERSEN (1940) and COHN and EDSALL (1943).

BÜCHER (1947) studied a preparation of the crystalline mercury compound of the enzyme enolase, prepared in WARBURG's laboratory. He obtained a molecular weight of 66,000, using edestin as a standard protein and assuming its molecular weight to be 300,000. The value

Table 1. *Molecular Weights of Proteins Determined by Light Scattering.*

Protein	Molecular Weight in thousands from Scattering at λ_0 5780 Å	5461 Å	Calibration Method	Observers
Ovalbumin	38.2	37.6	A	1
Horse Serum Albumin	76.5	72.2	A	1
Bovine Serum Albumin	77.7	76.6	A	1
Pig Serum Albumin	72.1	71.9	A	1
Hemocyanins:				
Palinurus vulgaris	461	464	A	1
Homarus vulgaris (*A*)	630	617	A	1
,, ,, (*B*)	733	689	A	1
Sepia officinalis	3210	3150	A	1
Helix pomatia	6340	—	A	1
Excelsin	281	276	A	2
(Amandin)	(330)	(330)	A	2
Edestin*	335	—	A	1
Prunus seed globulins:				
*P. avium**	286—316	—	A	3
*P. cerasus**	295	—	A	3
*P. domestica**	290	—	A	3
Yeast Enolase	—	66	B	4
Rabbit Serum antibody (anti-p-azophenylarsonic)	—	158	C	5
Ovalbumin	—	45.7	D	6
β-Lactoglobulin	—	35.7	D	6
Lysozyme	—	14.8	D	6
Bovine Serum Albumin*	—	73.	D	6
Bovine Serum Albumin†	—	77.	E	7
Tobacco Mosaic Virus	—	40.000	F	8
Bushy Stunt Virus	—	9.000	F	9
Influenza Virus	—	322.000	F	9

* Denotes preparations which were somewhat unstable and showed a perceptible tendency to aggregate on standing.

† Value determined for wavelength $\lambda_0 = 4358$ Å.

Calibration Methods:

A. Molecular weights given relative to amandin as a standard protein which is taken as having a molecular weight of 330,000.

B. Calibration with reference to edestin as a standard protein; assumed molecular weight of edestin 300,000.

C. Calibration with reference to pure carbon disulfide as a standard.

D. Calibration made on an absolute scale; for details of calibration, see Brice, Halwer and Speiser (1950). Molecular weights reported in this reference were determined also at 4358 Å wiht results in close agreement with those at 5461 Å.

E. Calibration with reference to pure benzene as a standard scatterer; reduced intensity of benzene assumed as 48.4×10^{-6} at 4358 Å.

F. Reduced intensity measurements at 90° calibrated by direct turbidity measurements and corrected for angular dissymmetry of scattering.

Table 1, continued:

Observers:

1. PUTZEYS and BROSTEAUX (1941).
2. BEECKMANS and LONTIE (1946).
3. PUTZEYS and BEECKMANS (1946).
4. BÜCHER (1947).
5. CAMPBELL, BLAKER and PARDEE (1948).
6. HALWER, NUTTING and BRICE (1950).
7. EDSALL, EDELHOCH, LONTIE and MORRISON (1950).
8. OSTER, DOTY and ZIMM (1947).
9. OSTER (1948).

obtained by light scattering for enolase agreed well with the molecular weight calculated from the mercury content (one gram atom Hg per mol enolase).

CAMPBELL, BLAKER and PARDEE (1948) studied preparations of a rabbit antibody against para-azo-phenylarsonic acid. They obtained a molecular weight of 140,000 by osmotic pressure and 158,000 by light scattering. They calibrated their measurements against carbon disulfide, which was taken as a standard material, its reduced intensity being taken as $4.4 \cdot 10^{-5}$ for light of wavelength 5460 Å.

The most careful determinations of molecular weight by light scattering on an absolute basis are probably those of HALWER, NUTTING and BRICE (1950). Their experimental methods are discussed later in this review. They give values of 35,000 for β-lactoglobulin, 15,000 for lysozyme, and 72,500 for bovine serum albumin, from measurements at 4358 Å, and essentially identical values from measurements at 5460 Å. The full report of their data on these proteins is now in preparation and is not yet available. Their data are in very good agreement with those determined from other methods. Investigations from our laboratory (EDSALL, EDELHOCH, LONTIE and MORRISON, 1950) on bovine serum albumin are discussed more fully in the following section. The molecular weight obtained for the particular preparation studied by us, measured with reference to standard liquids which had been calibrated on an absolute scale, was approximately 77,000. This is appreciably higher than the value of 69,000 given by the very careful osmotic pressure measurements of SCATCHARD, BATCHELDER and BROWN (946), which were made on a different preparation. The material studied by us, however, showed a small shoulder in the ultracentrifuge sedimentation diagram, superimposed on the advancing side of the main sedimentation peak corresponding to 4.6 SVEDBERG units. This preparation, therefore, was not entirely homogeneous, and the fact that the value from light scattering was higher than that from osmotic pressure was to be expected.

Multicomponent Systems of Small Molecules: Effects of Net Charge and of Ionic Strength on Turbidity in Protein Solutions.

The previous discussion applies strictly only to two component systems, or to systems containing polydispersed solutes for which the interaction coefficient (B) is essentially independent of molecular weight. When three or more components are present, and when strong interactions between them occur, new phenomena arise. Such effects were strikingly revealed by the studies of EWART, ROE, DEBYE and MCCARTNEY (1946). They studied, among other materials, a polystyrene preparation, which in pure benzene gave a limiting value of $Hc/\tau = 3 \cdot 10^{-6}$ at $c = 0$, but in a benzene-methanol mixture containing 15% methanol by volume gave a limiting value of Hc/τ near $1.4 \cdot 10^{-6}$. Moreover, the slope factor, B, was numerically much smaller in the latter medium than in the former. Benzene is of course a good solvent for polystyrene, whereas methanol acts as a precipitant at sufficiently high concentration. These authors explained their results in terms of selective adsorption of benzene by the polystyrene molecules, so that the solvent composition in the neighborhood of a large solute molecule is different from that in the bulk of the solution. They showed that this would lead to a change in the value of τ/c at infinite dilution, if the two components of the solvent had different refractive indices. If the refractive index of the two component solvent medium was essentially independent of composition — as was true for example for a butanone-isopropanol mixture — then the limiting value of Hc/τ was found to be independent of the composition of the solvent, even though one component of the solvent (in this case isopropanol) tended to act as a precipitant. By contrast it should be noted that the limiting value of the osmotic pressure/concentration ratio is independent of the composition of the solvent in any of these cases. The general correctness of the picture given by EWART, ROE, DEBYE and MCCARTNEY is clear. However, a more general thermodynamic theory of light scattering in multicomponent systems, originally outlined by ZERNIKE many years ago, has recently been formulated by several authors. It is of particular importance in its application to protein solutions, because proteins are multivalent acids and bases which can acquire high net charge by the addition of hydrogen or hydroxyl ions to the solution, and can also bind other anions, cations and neutral molecules very strongly. Effects of net charge and of ionic strength in multicomponent systems containing proteins are therefore very marked. The definition of the components in a system containing charged proteins involves certain complexities which must be carefully considered. The discussion which follows is taken largely from the paper of EDSALL, EDELHOCH, LONTIE and MORRISON (1950).

Definition of Components.

We shall follow SCATCHARD (1946) in the definition of components, denoting the solvent as component 1, the protein — if only one is present — as component 2, the salt with diffusible ions — if only one is present — as component 3. Other protein components, if present, may be denoted by higher even numbers, and other diffusible components by higher odd numbers [1]. All components are taken as electrically neutral; hence we distinguish between the protein *ion* and the protein *component*. The valence (Z_2) of the protein ion is defined as the mean net proton charge per protein ion, Z_2 being zero for the isoionic protein. It is thus equal to the mols of "bound acid" (Z_2 positive) or "bound base" (Z_2 negative) per mol of protein, determined by a titration with the hydrogen or glass electrode, with suitable corrections (see for instance COHN and EDSALL, 1943, Chapter 20; TANFORD, 1950). An albumin, soluble in water in the absence of salt, may be taken as approximately isoionic ($Z_2 = 0$) after thorough electrodialysis has removed all diffusible ions except H^+ and OH^- from the solution [2]. If a neutral salt is added to such a solution, it remains isoionic by definition, although the salt addition may cause the electrophoretic mobility to become positive or negative, due to selective binding of cations or anions by the protein. The value of Z_2 is adjusted to positive or negative values by addition of strong acids or bases[3]. We shall consider later the effects of binding of other ions by

[1] The term "diffusible" in this connection, denotes ability to pass through a membrane impermeable to molecules as large as typical proteins.

[2] If the only ions present in this solution are H^+, OH^- and protein ions, it is clear that the mean net charge on the protein cannot be *exactly* zero unless the isoionic point happens to coincide with the p_H of neutrality. Thus, if the p_H of the electrodialyzed solution is 5, we have $[H^+] = 10^{-5}\,M$, $[OH^-]$ negligible, and the protein must carry a small negative charge to balance the excess of H^+ over OH^- ions. For a serum albumin solution, concentration 7 g./l. ($10^{-4}\,M$) this requires that Z_2, for the electrodialyzed solution, be -0.1 ($= -10^{-5}/10^{-4}$), instead of zero. The difference is well within the usual experimental error, but it can be corrected for if necessary. The correction obviously becomes more important, the more acid the isoionic point of the protein and the more dilute the protein solution.

SCATCHARD and BLACK (1949) define an isoionic material as one which gives no non-colloidal ions other than hydrogen and hydroxyl. Thus, by their definition, electrodialyzed albumin is isoionic when $Z_2 m_2 = (OH^-) - (H^+)$, m_2 being the molar concentration of protein ion; while we have defined it as isoionic when $Z_2 = 0$. In practice, the difference between the two definitions is generally negligible.

[3] The use of strong alkali may be avoided by addition of sodium bicarbonate to the protein solution, which is then frozen and dried from the frozen state *in vacuo*. Under these circumstances, CO_2 is evolved according to the reaction: $HCO_3^- \rightarrow CO_2(g) + OH^-$; and on redissolving the dried protein the p_H of the solution, and the value of Z_2, should be the same as if an equivalent amount of Na^+OH^-, instead of $Na^+HCO_3^-$, had been added in the first place.

the protein, which may make the effective net charge of the protein ion considerably different from Z_2.

The specification of molecular weight of the protein, in the definition of the protein component, is largely a matter of convenience. What is essential is that the mass and chemical nature of the protein component (or components) added to the system should be definitely specified. The value of Z_2 must, of course, always be expressed so that it is stoichiometrically correct; the mean number of protons bound to, or removed from, the isoionic protein, *per gram protein*, must obviously depend only on the stoichiometric composition of the system, not on the assumed molecular weight. For instance, EDSALL, EDELHOCH, LONTIE and MORRISON (1950) assumed the value of 69,000 for the molecular weight of their serum albumin preparations. The value of Z_2 which they employed, therefore, represented the mols of H^+ ion bound or removed, per gram protein, multiplied by the factor 69,000.

The protein component, like all the other components, is so defined as to be electrically neutral. If the protein is being added to the system as an ion of valence Z_2, we must add at the same time some diffusible ions of charge opposite in sign to Z_2, or remove some ions of the same sign of charge as Z_2, or do both of these things, in such a way that the total increment of net charge is zero. Certain amounts of the diffusible ions in the system are thus assigned to the protein component, the amounts being positive if the ion in question is added, negative if it is removed, when the protein ion is added to the system.

The protein component might be defined so as to contain one mole of protein ion and Z_2/Z_i moles of the diffusible ion of opposite charge to Z_2, where Z_i is the valence of this diffusible ion. This is perhaps the most obvious definition, but it has the serious disadvantage that the addition of one mole of protein component involves adding $1 + (Z_2/Z_i)$ moles of ions to the system; the resulting effect on the chemical potential of the solvent would be chiefly due to the diffusible ions added, not to the protein ion which primarily concerns us. Therefore, following SCATCHARD (1946), we choose another definition, which involves the net addition of only one mole of ions to the system per mole of protein component. If only two diffusible ions are present, and both are univalent, this requires adding $Z_2/2$ moles of the diffusible ion with sign of charge opposite to that of the protein, and *removing* $Z_2/2$ moles of the diffusible ion with the same sign of charge as Z_2, when we add one mole of protein ion to the system. Thus the net addition of moles of diffusible ions is zero, and the solution remains electrically neutral after the protein component is added.

Consider the specific case of serum albumin at a concentration of 10^{-4} molar (approximately 7 g./l.), in a solution to which $20 \cdot 10^{-4}$ moles/l

of hydrochloric acid has been added, so that $Z_2 = +20$; 0.010 mol/l of sodium chloride has also been added to the solution. Thus the total concentration of diffusible ions in mol/l is $(Na^+) = 0.10$; $(Cl^-) = .012$. (The concentration of free hydrogen and hydroxyl ions is assumed to be negligible in comparison.) The first definition discussed in the preceding paragraph would include in component 2, per liter solution, 0.0001 mols protein ion (valence +20) and 0.0020 mols chloride ion. Component 3 (sodium chloride) would then contain .010 mols of both Na^+ and Cl^- ion. By the second definition, which we shall employ in the following discussion, component 2 includes 0.0001 mols protein ion, 0.001 mols Cl^- ion, and *minus* 0.001 mols Na^+ ion. Hence, by this definition, component 3 consists of 0.011 mols of both Na^+ and Cl^- ion. Obviously, when we add all the constituents of all the components together, the resulting sum must give correctly the actual composition of the system. It is clearly meaningless to ask whether (for example) any individual chloride ion, chosen at random, belongs to component 2 or component 3; but it is essential that the sum of the number of chloride ions assigned to these components, by any definition, should equal the number of chloride ions actually present.

Consider first the simple case in which there is only one protein component, and the mean valence of the protein ion is Z_2. Assume the solution to contain in addition to H^+ and OH^- ions (at negligible concentrations), only one other salt, containing only one kind of cation and one kind of anion (although one mol of salt may contain two or more mols of either cation or anion or both). Let m_2 be the molar concentration of protein; then $Z_2 m_2$ is its equivalent concentration as cation or anion, with the appropriate sign. Then the algebraic sum of the total molar concentrations in the solution of other cations and anions, multiplied by their valences, must be equal numerically, and opposite in sign, to $Z_2 m_2$. Some of these ions must be assigned to the protein component in order to satisfy the conditions for this component stated above. Let Z_c be the valence of the cations of the added salt, Z_a that of the anions. Let ν_{2c} be the number of diffusible cations per mol of protein component, and ν_{2a} the number of diffusible anions. These numbers may be calculated as follows. To fulfill the requirement that there shall be one mol of ions added to the system per mol of protein component, we must have:

$$\nu_{2c} = -\nu_{2a} \tag{23}$$

and to fulfill the requirement that the protein component is electrically neutral, the relation must hold that:

$$Z_c \nu_{2c} + Z_a \nu_{2a} = -Z_2 \tag{24}$$

combining with (23) above, we have:

$$\nu_{2c}(Z_c - Z_a) = -Z_2 \tag{25 a}$$

$$\nu_{2c} = \frac{-Z_2}{Z_c - Z_a} = \frac{-Z_2}{Z_c + |Z_a|} = -\nu_{2a}. \qquad (25\,b)$$

Thus, if the total molar concentration of diffusible cation in the solution is m_c, and the total molar concentration of anion is m_a, and if one mol of the salt (component 3) contains ν_{3c} mols of cation and ν_{3a} mols of anion, then the molar concentration of component 3 is:

$$m_3 = \frac{1}{\nu_{3c}}(m_c - \nu_{2c} m_2) = \frac{1}{\nu_{3a}}(m_a - \nu_{2a} m_2) = \frac{1}{\nu_{3a}}(m_a + \nu_{2c} m_2). \qquad (26)$$

These equations imply nothing concerning the nature of the forces between the protein ion and the other ions in solution; they serve simply to define the components stoichiometrically. Other definitions of the components could of course be employed. From the definition given here, it is apparent (equation 25 a) that either ν_{2c} or ν_{2a} must be negative, except when both are zero. This system of definition is useful only when m_3 is fairly large compared to $\nu_{2c} m_2$ (or $\nu_{2a} m_2$); some of the possible alternative definitions are discussed by SCATCHARD (1946).

If another salt, containing a cation X^+ and an anion Y^-, is added to the system, then the ions X^+ and Y^- are taken as forming a new component (component 5 according to our conventions). If they are present in equivalent concentrations in the solution, these ions are not considered as forming part of the protein component.

Thermodynamic Fluctuation Theory for Multicomponent Systems.

In a multicomponent system the mean square value of the fluctuation in refractive index $\overline{(\Delta n)^2}$, which determines the total turbidity, is a function of the concentrations, and refractive index increments, of each of the components of the system. It also involves cross terms, involving the correlation between the fluctuations of the concentrations of different components. For a given pair of components, i and j, the cross term is zero if the chemical potential of i is unaffected by a variation of the mass of j in the system; but if the chemical potentials are not independent in this manner the cross terms do not vanish.

The fundamental conceptions involved in the application of fluctuation theory to such systems were first advanced by ZERNIKE (1915, 1918). Recently they have been further developed independently by workers in three different laboratories: namely, BRINKMAN and HERMANS (1949), KIRKWOOD and GOLDBERG (1950), and STOCKMAYER (1950). The fundamental equations of all these authors lead to the same results.

The general equation, for the turbidity, τ, of systems at constant pressure and temperature, may be written

$$\tau = H'' \frac{\sum_{i,j} \Psi_i \Psi_j A_{ij}}{|a_{ij}|} \tag{27}$$

where

$$H'' = \frac{32000\pi^3 n^2}{3 N_0 \lambda_0^4} . \tag{28}$$

The summation is taken over *all but one* of the components. Generally it is most convenient to omit the solvent from the summation; to compensate for this omission the complete equation should include a term for the turbidity of the pure solvent, arising from density fluctuations in it. This term is generally small, in systems containing large molecules, and for brevity it is omitted from (27). However, in practice, we have generally determined the turbidity of the pure solvent and subtracted it from that of the solution. Ψ_i denotes the *molar* refractive increment of component i; that is Δn per mol of solute per liter of solution (or per kg. solvent). The terms a_{ij}, in the determinant $|a_{ij}|$ denote the coefficients $a_{ij} = \frac{\partial \ln a_i}{\partial m_j} = \frac{\partial \ln a_j}{\partial m_i} = a_{ji}$; here the a's denote activities, and the m's denote concentrations in mol/l. The term A_{ij}, in the summation in the numerator, denotes the cofactor of the term a_{ij} in the determinant $|a_{ij}|$; that is the determinant derived from $|a_{ij}|$ by striking out the row and column in which the term a_{ij} occurs, and multiplying the resulting determinant of lower order by $+1$ if $i + j$ is even, and by -1 if $i + j$ is odd.

Our equation (27) differs from STOCKMAYER'S (1950) in that he defined the terms a_{ij} as $\partial \mu_i / \partial m_j$, where μ denotes chemical potential; whereas we have employed activities. Thus, his expression differs from ours by a factor RT in the denominator. This difference has been taken care of in the formulation given here, so that our working equations are essentially identical with those of STOCKMAYER. Also the volume factor V, appearing in STOCKMAYER's equations, does not appear explicitly in equation (27), since the concentrations are here expressed in volume units.

Application to a Two Component System.

For a two component system, the summation in (27) involves only component 2. Hence $|a_{ij}| = a_{22} = \frac{\partial \ln a_2}{\partial m_2}$, and $A_{ij} = 1$. By definition of the activity (a_2) and the activity coefficient (γ_2):

$$\ln a_2 = \ln m_2 + \ln \gamma_2 = \ln m_2 + \beta_2 \tag{29 a}$$

$$a_{22} = \frac{\partial \ln a_2}{\partial m_2} = \frac{1}{m_2} + \frac{\partial \ln \gamma_2}{\partial m_2} = \frac{1}{m_2} + \beta_{22} . \tag{29 b}$$

Hence,

$$\tau = \frac{H'' \Psi_2^2}{a_{22}} = \frac{H'' \Psi_2^2}{\frac{\partial \ln a_2}{\partial m_2}} = \frac{H'' \Psi_2^2 m_2}{1 + \beta_{22} m_2} = \frac{H'' \Phi_2^2 M_2 c_2}{1000 (1 + \beta_{22} m_2)} . \tag{30}$$

Here $\Psi_2 = \partial n/\partial m_2; \Phi_2$, the refractive increment per g. component 2 per cc. solution, is $1000\,\Psi_2/M_2$.

Rearranging (30) we may then write:

$$\frac{H''\Phi_2^2 c_2}{1000\,\tau} = \frac{Hc_2}{\tau} = \frac{1}{M_2}(1 + \beta_{22}\, m_2). \tag{31}$$

Since $c_2 = \frac{m_2 M_2}{1000}$, this gives the slope factor B in equation (18) as:

$$B = \frac{1000\,\beta_{22}^{\circ}}{2\,M_2^2}. \tag{32}$$

where β_{22}° is the limiting value of β_{22} at low values of m_2.

Systems of Three and More Components.

For multicomponent systems in general, we shall follow SCATCHARD's (1946) formulation of the expressions for the activities of the components and their derivatives with respect to the masses of the components — that is, the coefficients which enter into equation (27). We shall use the subscript K to denote any component made up of small molecules or ions [1], and i to denote a small ion which is a constituent of one or more components, but is not itself a component. Again denoting the protein as component 2, we have, following SCATCHARD:

$$\left.\begin{aligned} \ln a_2 &= \ln m_2 + \Sigma_i \nu_{2i} \ln m_i + \beta_2 \\ &= \ln m_2 + \Sigma_i \nu_{2i} \ln (\Sigma_J \nu_{Ji}\, m_J + \nu_{2i}\, m_2) + \beta_2 \end{aligned}\right\} \tag{33}$$

$$\left.\begin{aligned} \ln a_K &= \Sigma_i \nu_{Ki} \ln m_i + \beta_K \\ &= \Sigma_i \nu_{Ki} \ln (\Sigma_J \nu_{Ji}\, m_J + \nu_{2i}\, m_2) + \beta_K \end{aligned}\right\} \tag{34}$$

Here, by definition:

$$\beta_2 = \ln \gamma_2 \tag{35}$$

$$\beta_K = \Sigma_i \nu_{Ki} \ln \gamma_K. \tag{36}$$

In the special case of a three component system, in which component 3 is a salt composed of one anion and one cation, we have $\beta_3 = 2 \ln \gamma_3$.

From these relations, we derive the coefficients employed in equation (27), denoting $\frac{\partial \beta_2}{\partial m_2}$ as β_{22}, $\frac{\partial \beta_K}{\partial m_2} = \frac{\partial \beta_2}{\partial m_K}$ as β_{2K}, and so forth.

$$a_{22} \equiv \frac{\partial \ln a_2}{\partial m_2} = \frac{1}{m_2} + \Sigma_i \frac{\nu_{2i}^2}{m_i} + \beta_{22}, \tag{37}$$

$$a_{2K} \equiv \frac{\partial \ln a_2}{\partial m_K} = \frac{\partial \ln a_K}{\partial m_2} = \Sigma_i \frac{\nu_{2i}\nu_{Ki}}{m_i} + \beta_{2K}, \tag{38}$$

$$a_{KJ} \equiv \frac{\partial \ln a_K}{\partial m_J} = \frac{\partial \ln a_J}{\partial m_K} = \Sigma_i \frac{\nu_{Ji}\nu_{Ki}}{m_i} + \beta_{JK}. \tag{39}$$

[1] A "small" component may be defined here as one which passes readily through membranes impermeable to proteins of molecular weight of the order of 30,000 or above.

Here J denotes any diffusible component other than K [1]. For the three component system containing one salt (component 3) with two ions, the summation denoted by Σ_i includes only one cation and one anion, and $\nu_{3c} = \nu_{3a} = 1$. From (25a) and (25b) we have $\nu_{2c} = -\nu_{2a} = -Z_2/(Z_c - Z_a)$, which becomes $-Z_2/2$ if the ions denoted by c and a are both univalent.

Then, using equation (26), we have:

$$m_c = m_3 - \frac{Z_2}{2} m_2 . \tag{40}$$

$$m_a = m_3 + \frac{Z_2}{2} m_2 . \tag{41}$$

From (37) we obtain:

$$a_{22} = \frac{1}{m_2} + \frac{Z_2^2}{4}\left(\frac{1}{m_3 - \frac{Z_2 m_2}{2}} + \frac{1}{m_3 + \frac{Z_2 m_2}{2}}\right) + \beta_{22} = \frac{1}{m_2} + \frac{Z_2^2}{2 m_3 \varepsilon} + \beta_{22} . \tag{42}$$

Here the factor ε is defined as:

$$\varepsilon = 1 - \left(\frac{Z_2 m_2}{2 m_3}\right)^2 . \tag{43}$$

The value of ε lies always between zero and unity, and it may be taken as unity when $Z_2 m_2 << 2 m_3$ [2].

From (38), (40) and (41) we obtain:

$$a_{23} = \frac{\nu_{2c}}{m_c} + \frac{\nu_{2a}}{m_a} + \beta_{23} = -\frac{Z_2^2 m_2}{2 m_3^2 \varepsilon} + \beta_{23} . \tag{44}$$

Finally for the effect of variation in the log of the activity of component 3 with variations in its own molarity we have, from (34), (40) and (41):

$$a_{33} = \frac{2}{m_3 \varepsilon} + \beta_{33} . \tag{45}$$

The value of β_{33} is determined independently, from measurements of electromotive force, freezing point, or vapor pressure, in solutions of the pure salt.

Applied to the three component system just discussed, equation (27) becomes:

$$\tau = \frac{H''(\Psi_2^2 a_{33} - 2\Psi_2 \Psi_3 a_{23} + \Psi_3^2 a_{22})}{a_{22} a_{33} - a_{23}^2} . \tag{46}$$

For protein systems, the first term in the numerator of (46) is generally much the largest, and the second and third may often be neglected.

---

[1] For example, J may be sodium chloride and K magnesium sulfate.

[2] In the extreme case when the only diffusible ions present are those required to balance the net charge on the protein, ε becomes equal to zero. Under these circumstances, the application of our equations would become meaningless and a different definition of components should be adopted. The general treatment adopted in this paper implicitly assumes that ε is not very far from unity.

This point will be considered in terms of the system water-serum albumin-sodium chloride. The molar refractive increment, Ψ_2, of serum albumin, per liter solution, is, from the data of PERLMANN and LONGSWORTH (1948) and of ARMSTRONG, BUDKA, MORRISON and HASSON (1947), equal to 12.9 for the sodium D line, assuming a molecular weight of 69,000 [1]. The data for sodium chloride solutions, at the same wavelength (see for instance, GEFFCKEN (1929)) when extrapolated to infinite dilution, give $\Psi_3 = 9.5 \cdot 10^{-3}$. Thus Ψ_2^2 is greater than $2\Psi_2\Psi_3$ by a factor of 680, and exceeds Ψ^2 by a factor of nearly 2×10^6. On the other hand, we must consider the relative magnitude of the coefficients a_{22}, a_{23} and a_{33}.

A critical evaluation of these terms for the case of serum albumin solutions in sodium chloride and sodium thiocyanate solutions [EDSALL, EDELHOCH, LONTIE and MORRISON, (1950)] shows that the second and third terms in the numerator of equation (46) are ordinarily less than 1% of the first term. Hence it is justifiable as a good approximation, to neglect the two latter terms and the equation then becomes

$$\frac{\Psi_2^2 H''}{\tau} = a_{22} - (a_{23}^2/a_{33}) . \tag{47}$$

We shall consider here only the limiting condition in which $|Z_2 m_2| << 2m_3$; hence $\varepsilon = 1$ to a close approximation, and $a_{23} \cong \beta_{23}$. Then (for notation compare equation (30):

$$\frac{\Psi_2^2 H''}{\tau} = \frac{\Phi_2^2 M_2^2 H''}{10^6 \tau} = \frac{1}{m_2} + \frac{Z_2^2}{2 m_3} + \beta_{22} - \frac{(\beta_{23})^2 m_3}{2 + \beta_{33} m_3} \tag{48}$$

$$\frac{H c_2}{\tau} = \frac{\Phi_2^2 H'' c_2}{1000 \tau} = \frac{1}{M_2} + \frac{1000}{M_2^2}\left(\frac{Z_2^2}{2 m_3} + \beta_{22} - \frac{\beta_{23}^2 m_3}{2 + \beta_{33} m_3}\right) c_2 . \tag{49}$$

Thus, *under these limiting conditions*, the slope $2B$ of the curve for Hc_2/τ as a function of c_2 becomes identical with the slope of the curve for osmotic pressure divided by concentration of protein as a function of c_2, given by SCATCHARD, BATCHELDER and BROWN (1946): see their equation (9).

Experimental Data for Serum Albumin.

These (EDSALL, EDELHOCH, LONTIE and MORRISON, 1950) show that to a close approximation the intercept of the curves obtained when Hc_2/τ is plotted against c_2 is equal to $1/M_2$, where M_2 has a slightly higher value than the figure of 69,000 which was obtained by SCATCHARD and his associates from osmotic pressure measurements. This was to be expected, since most preparations of bovine or human serum albumin contain

[1] From the equation given by PERLMANN and LONGSWORTH, the corresponding value for light of wavelength 4358 Å, at which most of our measurements were made, is 13.5. However, the calculations given here in the text are for the *D line*, since data for sodium chloride at $\lambda = 4358$ Å are not yet available.

small amounts of a heavier component which is shown in the ultracentrifuge as a small shoulder on the advancing side of the peak which defines the main component. The experimental technique for determination of τ (or of R_{90}) is discussed in a later section of these notes. The light used was the mercury blue line ($\lambda_0 = 4358$ Å). The refractive index increment for albumin at this wavelength is given by PERLMANN and LONGSWORTH (1948) as 0.195 at 25° and the refractive index of pure water is 1.3403 under the same conditions. This gives DEBYE's factor $H = 1.040 \cdot 10^{-5}$.

Experimentally, good agreement was found between the slope factors obtained from osmotic pressure and from light scattering (see Fig. 2), at sodium chloride concentrations of 0.15 to 0.18 M, and Z_2 values from +20 to −20.

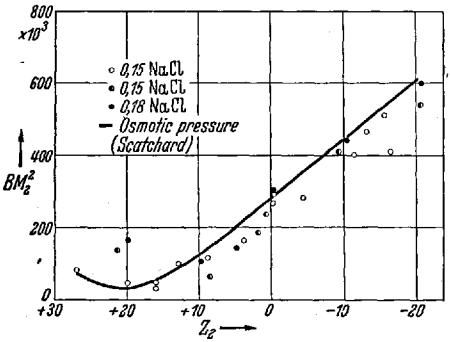


Fig. 2. Comparison of the Slope Factor B (equations 7 and 18) for Bovine Serum Albumin, from Osmotic Pressure and from Light Scattering Measurements. Slopes are expressed as $BM_2^2/1000$ where M_2 is the molecular weight of the protein. The abscissa gives Z_2, the net proton charge per molecule of albumin. Solid line from osmotic pressure data of SCATCHARD, BATCHELDER and BROWN. Points from light scattering measurements [EDSALL, EDELHOCH, LONTIE and MORRISON (1950)].

As predicted by equation (49) the slope of the curves for Hc_2/τ as a function of c_2 varies greatly with the ionic strength and the charge on the protein. As would be expected from the presence of the "Donnan term" [1] $Z_2^2/2m_3$ in equation (49) the slopes of the curves are small or zero when the valence Z_2 is near zero and become large and positive at ionic strength and high Z_2. Some typical curves are illustrated in Fig. 3 for various ionic strengths of sodium chloride from $< 10^{-4}$ to 0.15 and for $Z_2 = +25$. The limiting slope ($2\ BM_2^2/1000$) in the absence of added salt is of the order of 10^5 at the lowest ionic strength ($< 10^{-4}$); it falls rapidly as salt is added, [2] and becomes practically zero at 0.15 M sodium chloride; however in all cases the extrapolated value of the molecular weight at $c_2 = 0$ is the same within the limits of error. At such high

[1] We shall refer to this as the "Donnan term" since it is formally identical with the term arising from the Donnan effect in the equations for osmotic pressure in these systems. If all activity coefficients were unity, it is the only term that would affect the slope factor, B.

[2] The increase of turbidity which occurs on adding salt, corresponding to a transition from a point on the top curve to one on the bottom curve of Fig. 3, occurs with extreme rapidity. The final steady state is attained certainly in less than a minute, the time taken for mixing albumin with salt solution and taking a reading in the light scattering apparatus.

values of Z_2, and at ionic strength below 0.001, measurements of scattering as a function of angle should reveal the "negative dissymmetry of scattering", studied by DOTY and STEINER (1949), and briefly discussed in a later section of this review. Under such conditions, the assumptions of fluctuation theory used in deriving equation (18) break down. EDSALL, EDELHOCH, LONTIE and MORRISON therefore confined their more intensive studies to solutions of ionic strength 0.003 and above, where the fluctuation theory is valid. They studied solutions of serum albumin at Z_2 values from +10 to −20, and at ionic strengths from 0.003 to 0.183 in sodium chloride, calcium chloride and sodium thiocyanate. The slope factors for sodium chloride, at four ionic strengths, are plotted as a function of Z_2 in the lower half of Fig. 4.

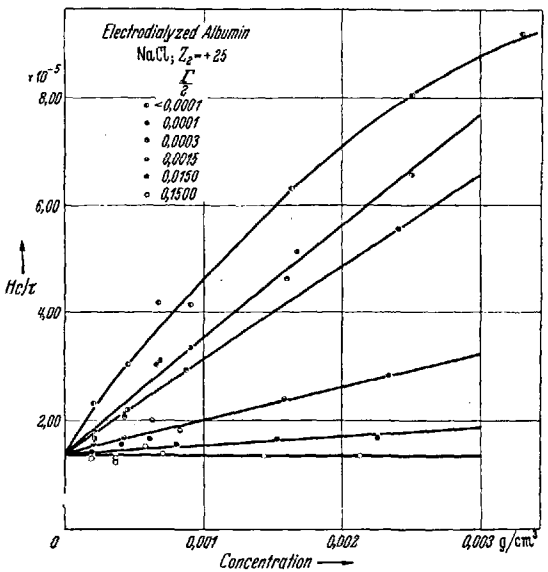


Fig. 3. Values of Hc_2/τ as a Function of c_2, for Bovine Serum Albumin with a net Proton charge of +25, at Several Different Concentrations of Sodium Chloride.

These curves are roughly of the parabolic form that would be expected from the Donnan term alone, but it is clear that other terms are important The absolute magnitudes of the slopes are less, often much less, than would be predicted from the Donnan term, so that other effects of opposite sign must enter in. The minimum of the curve is found to lie not at $Z_2 = 0$, but always at positive values of Z_2. Moreover, as the ionic strength of the sodium chloride increases, the minimum shifts progressively over to the left in Fig. 4. It must be noted that Z_2 is calculated only in terms of the protons bound to or removed from the isoionic albumin molecule, and takes no account of the binding of other ions. If it is assumed that chloride ions are also bound, the progressive shift of the minimum with increasing ionic strength is readily interpretable. There is now a large mass of evidence from quite independent measurements that chloride ions are bound by serum albumin; other ions such as thiocyanate are even more strongly bound. The best quantitative evidence for such binding is probably that given by SCAT-

CHARD, SCHEINBERG and ARMSTRONG (1950). They have described their data in terms of the assumption that an albumin molecule contains 40 sites capable of binding Cl^- or CNS^- ions; 10 of these are assumed to be all alike, each with an intrinsic association constant (K) of 44 for Cl^-, or 1000 for CNS^-; the other 30 bind much more weakly, with K values of 1.1 for Cl^-, and 25 for CNS^-. These intrinsic binding constants must be corrected for electrostatic effects arising from the variable net charge on the protein; SCATCHARD, SCHEINBERG and ARMSTRONG found that they could be described by a simple spherical model for the albumin ion, using the DEBYE-HÜCKEL theory. Taking their values for chloride binding at different ionic strengths, we may calculate a new quantity, the total net charge on the albumin, denoted as Z_2^*, which is equal to $Z_2 - \bar{\nu}$, where $\bar{\nu}$ is the number of chloride ions bound per mole of albumin When the slopes are plotted against Z_2^* as in the upper section of Fig. 4, the minima in the different curves are all brought nearly into coincidence and they lie very nearly at $Z_2^* = 0$. Conversely we could have used the displacements of the minima in the curves of the lower section of Fig. 4 as a measure of the number of chloride ions bound. Much greater shifts are found in thiocyanate than in chloride solutions, and here again the light scattering data give results in accord with the calculated number of ions bound by the protein, as deduced from the entirely independent measurements of SCATCHARD, SCHEINBERG and ARMSTRONG. Thus, light

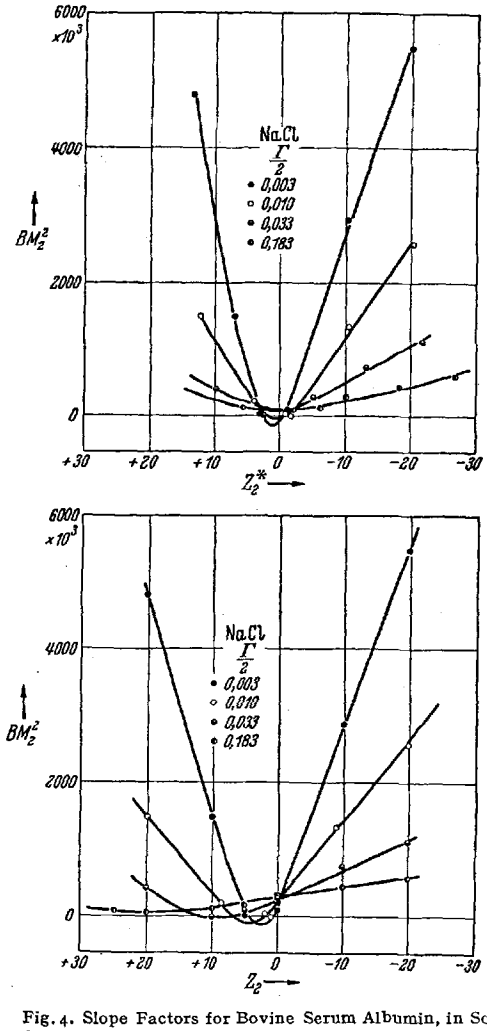


Fig. 4. Slope Factors for Bovine Serum Albumin, in Sodium Chloride Solutions at four different Ionic Strengths, as a Function of the Proton Net Charge (Z_2, lower diagram) and of the total net charge (Z_2^*, upper diagram).

scattering measurements are a useful tool for the study of specific ion binding by proteins. Studies on calcium chloride solutions indicated considerable binding of calcium by serum albumin, especially at negative Z_2 values, such as are found in the physiological p_H range [1].

Kinetics of Dimer Formation in Reaction of Serum Albumin with Mercurials.

It was shown by HUGHES (1947) that human serum albumin is largely composed of a fraction which he has termed mercaptalbumin (HUGHES, 1950). This was readily crystallized with mercuric chloride, the crystals containing one atom of mercury to two molecules of albumin. Ultracentrifuge studies on solutions of this mercury derivative showed the presence of large amounts of a fast component of sedimentation constant $s_{20} = 6.7$ S, in addition to the normal albumin (4.3 S). The work of HUGHES appears to have established clearly that the heavy component is a dimer, composed of two molecules of serum albumin linked by a mercury atom, and that the reactive group in the protein is a sulfhydryl group. The kinetics of the reaction have been studied in detail in our laboratory by light scattering measurements, although only preliminary reports have so far appeared (LONTIE, MORRISON, EDELHOCH and EDSALL, 1948; HUGHES, STRAESSLE, EDELHOCH and EDSALL, 1950). If we write the albumin with its sulfhydryl group as Alb-SH, then the sequence of reactions may be written as follows.

$$\text{Alb–SH} + \text{HgCl}_2 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{Alb–S–HgCl} + \text{H}^+ + \text{Cl}^- \qquad \text{I}$$

$$\text{Alb–S–HgCl} + \text{Alb–SH} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} \text{Alb–S–Hg–SAlb} + \text{H}^+ + \text{Cl}^- \qquad \text{II}$$

$$\text{Alb–S–Hg–SAlb} + \text{HgCl}_2 \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} 2\ \text{AlbS–HgCl} \qquad \text{III}$$

The results obtained hitherto on these reactions have been briefly summarized by HUGHES, STRAESSLE, EDELHOCH and EDSALL (1950).

From measurements of light scattering under various conditions it is inferred that:

$$k_1 >> k_{-1} \text{ and } k_1 >> k_2$$

k_2 and k_{-2} are of the same order of magnitude. Reaction II is thus the rate-controlling step. Reaction III is too rapid to measure, being essentially complete in less than a minute at room temperature.

Measurements at three different temperatures indicated that the rate of reaction II is somewhat more than doubled by a 10° rise of

[1] An interesting theoretical treatment of light scattering in solutions of charged macromolecules has recently been given by J. J. HERMANS (1950).

temperature; thus there is no indication of an unusually high energy of activation.

Viscosity measurements show that Alb-S-Hg-S-Alb is more asymmetric than Alb-SH, but shorter than 2 moles of Alb-SH joined end to end. This suggests that the two albumin molecules must be approximately in juxtaposition over a considerable area, involving a face of each monomer molecule of which the sulfhydryl group forms a part. Since reaction III is rapid, the mercury linkage must be readily accessible to small ions and molecules in the solvent, rather than being completely shielded by other portions of the protein. Added halide ions, or SH compounds, displace reaction II to the left, the effect being in the order $RSH > I^- > Br^- > Cl^-$. Silver ion appears to compete with mercury for the SH group; all other metallic ions tested were without effect. Other mercury derivatives are now being studied in this reaction.

It seems plain that many association and dissociation reactions in protein solutions can be studied by light scattering more conveniently than by any other available method. Measurements can be made rapidly and at frequent intervals so that a hundred or more measurements may be made if desired in the time that would be required for a single sedimentation run in the ultracentrifuge. OSTER (1947) has given an interesting discussion of the uses of light scattering measurements in certain types of aggregating or dissociating systems of colloidal particles.

Scattering from Particles not Small Compared to the Wave Length.

Up to this point it has been assumed that the scattering from a particle can be adequately represented by that from a single dipole. If the molecule is small enough, relative to the wave length of the incident light, there is no difficulty in this assumption. However, when the largest dimension of the particle becomes greater than about one-tenth to one-fifteenth the wave length, the phase and amplitude of the incident wave will be appreciably different in different parts of the particle at any one instant of time. These phase differences give rise to interference between the scattered waves originating in different parts of the particle and lead to an overall decrease in scattered intensity. The magnitude of the interference varies with ϑ, being greater for backward scattering than for forward scattering. Thus, for a large particle, we may expect the scattered intensity to be greatest at $\vartheta = 0$ and to decrease at larger angles in a manner determined by the particle size, shape and refractive index and by the wave length of the incident light. The diagram in Fig. 5 aids in visualizing the fundamental features of the situation and shows how the phase difference for light scattered from two points within the molecule varies with angle.

Scattering from Isotropic Spheres of Arbitrary Size and Refractive Index.

The general problem, for scattering from isotropic spheres of any radius and refractive index has been solved by MIE (1908); important contributions were also made by DEBYE (1909) and by RAYLEIGH (1910). BLUMER (1925, 1926) obtained numerical solutions for many particular cases, using MIE's general equations. LAMER and SINCLAIR (1943) have given an extended tabulation of scattered intensities for spheres having various values of m and α[1]. The computations themselves were carried out by Dr. ARNOLD LOWAN of the National Bureau of Standards. The parameter m is the relative refractive index and $\alpha = 2\pi r/\lambda$ where r is the radius of the sphere and λ is the wave length of the light in the medium surrounding the particle.

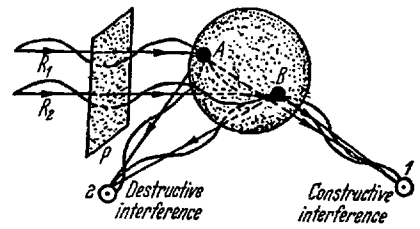


Fig. 5. Scattering from a large particle. [FROM ZIMM, STEIN and DOTY (1945).]

The scattering diagram for a sphere with $\alpha = 2.5$ and $m = 1.33$ is shown in Fig. 6. Such a system corresponds, for instance, to spherical drops of water in air, the drops having a radius of 217 mμ if the wave length of the light *in vacuo* is 546 mμ. The function $P(\vartheta)$ represents *in general* the intensity distribution for an isolated particle of arbitrary size and shape. It gives (on a relative scale normalized to unity at $\vartheta = 0$) the scattered intensity of the vertical component in unpolarized incident light ($V_{\vartheta,u}$) or equally well the sum of both components in the scattered light with vertically polarized incident light ($R_{\vartheta,v}$) since $R_{\vartheta,v} = 2\,V_{\vartheta,u}$. The type of plot used here has proved to be advantageous for many cases. Of course,

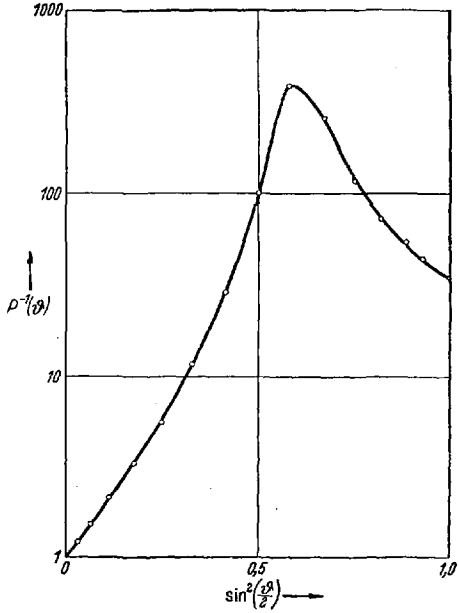


Fig. 6. Scattering diagram for a sphere (Mie theory) $m = 1.33$, $\alpha = 2.5$.

[1] The use of the symbol α to denote $2\pi r/\lambda$ should not be confused with the symbols $\alpha_0, \alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ employed earlier to denote molecular polarizabilities.

in instances where the range of intensities is sufficiently small, the reciprocal relative intensities can be plotted on a linear instead of a logarithmic scale. A polar plot of intensities has been used extensively in the literature on MIE theory and may be helpful occasionally.

The scattering diagram for a spherical particle considerably smaller than the one represented in Fig. 6, would be given by a continuously rising curve with no intensity minimum or for a much larger sphere by one with a series of maxima and minima. It may be noted qualitatively that an increase in either m or α shifts the first minimum to lower values of ϑ and increases the total number of intensity minima.

The calculations based on MIE theory have been verified experimentally by LAMER and his collaborators (1946, 1947, 1949) [1] using monodisperse sulfur hydrosols and also monodisperse aerosols as experimental objects. Sulfur sols made by the acidification of sodium thiosulfate solutions have been known to colloid chemists for a long while. As ordinarily prepared the sols are polydisperse and show only bluish or white scattering. By a careful control of conditions, however, LAMER has been able to make very nearly monodisperse sols over a wide range of sizes. Apparently RAY (1921) first noted the presence of colored bands in the angular scattering of white light from such sols. These colored bands (termed "orders" by LAMER) result from the interference effects already discussed. Obviously for a sphere of given size the intensity minima for different wave lengths must occur at different values of ϑ; where, for examp'e, the ratio of red scattered light to green scattered light is a maximum, there a red band or order will appear. For sulfur sols of the proper particle size as many as nine distinct orders have been observed.

In applying the MIE theory to an experimental problem several approaches may be followed.

The most satisfactory procedure would be to fit a theoretical intensity curve to the experimental data. This unfortunately usually entails a prohibitive amount of labor in performing calculations unless the proper curve can be found in the existing tabulations. Usually some method of interpolation between the values already calculated is sufficiently accurate and involves relatively little labor.

VAN DE HULST (1946) and SINCLAIR and LAMER (1949) have given curves which permit interpolation between different values of α to obtain, E, the ratio of the *scattering cross section* to the *geometric cross section*, i. e., the ratio of the energy lost by the incident wave to the energy of the beam that is geometrically obstructed. (This ratio is denoted as K_S by SINCLAIR and LAMER. See also LAMER and BARNES, 1947). The

[1] See LAMER and BARNES (1946), JOHNSON and LAMER 1947, and SINCLAIR and LAMER (1949).

geometric obstruction presented by a sphere is, of course, πr^2. The ratio, E, (supposing that the refractive index of the particle is known) allows determination of both size and concentration from transmission data. One could apply the method as follows. The turbidity τ, can be written

$$\tau = E \pi r^2 N \tag{50}$$

as N, the number of particles per cc. approaches zero. By measuring τ as a function of wave length and plotting τ versus $1/\lambda$ one can compare the experimental curve with a plot of E as a function of α. Since the maxima in both curves occur at the same value of α, the value of r is readily determined. Once r is known, an absolute turbidity measurement suffices to find N from equation (50). Fig. 7 shows E as a function of α for several values of m. The values for $m = 1.33$ and $\alpha = 8$ and 12 were taken from STRATTON and HOUGHTON (1931). The remaining values are from LAMER and SINCLAIR, (1943).

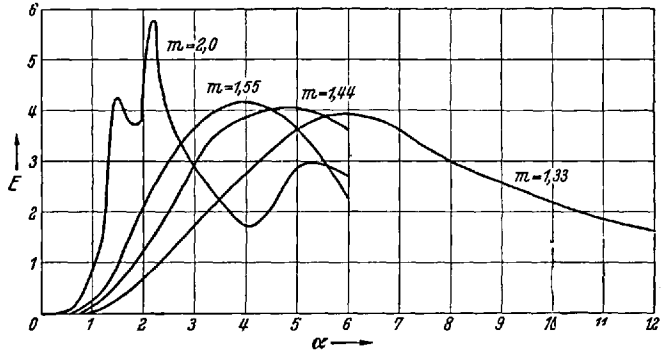


Fig. 7. Scattering from spheres having various values of m and α. The value of E approaches 2 for large α.

It is sometimes convenient to make use of the angular intensity distribution. We have already mentioned the occurrence of "orders" in the scattered light with white incident light. The location of these orders has been employed extensively by LAMER to find particle size. The position of "orders" can be calculated from MIE theory for various values of m and α. The sharpness of the "orders" may be used as a measure of polydispersity for systems which are nearly monodisperse (KERKER and LAMER, 1950). KENYON and LAMER (1949) have modified this appoach by measuring the angular distribution of intensity at two wave lengths (monochromatic light) and from these data calculating the positions of the "orders". By comparison with order positions calculated from MIE theory for the same two wave lengths one may then find the particle size.

Interpretation of the $P(\vartheta)$ curve itself is very convenient and has been applied by DANDLIKER (1950) to a latex of polystyrene which

consists of uniform spheres about 2600 Å. in diameter (electron microscopy by WILLIAMS and BACKUS, 1949). The measurement consists in locating the angular position of minimum intensity in monochromatic light and is discussed more extensively in a succeeding section.

The particle size of spheres may be easily related also to absolute intensities. Methods of interpolation have been used between different values of either m or α, by DANDLIKER (ibid.). Fig. 8 shows how the intensity function i_1 at $\vartheta = 0$ changes with m and α. The function i_1 is proportional to the vertical component in the scattered light with unpolarized incident light and is to be found in the tables of BLUMER and of LAMER and SINCLAIR. It is related to the scattered intensity by the equation

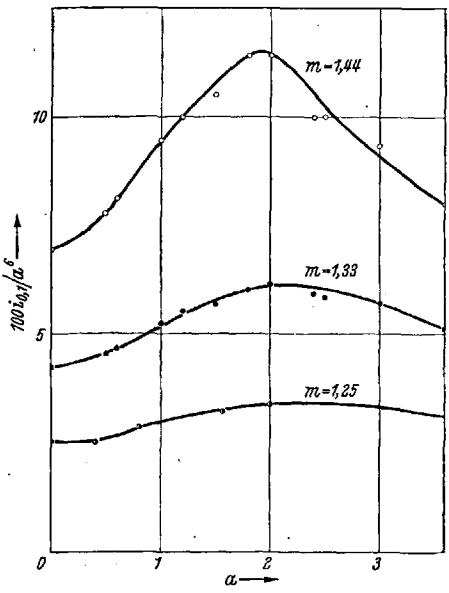


Fig. 8. The relation between forward scattering and size for different refractive indices.

$$V_{\vartheta,u} = \frac{N\lambda^2}{8\pi^2}(i_1) \,. \qquad (51)$$

The value of i_1 at $\vartheta = 0$ has been written as $i_{0,1}$. It may be noted that the function i_2 which is proportional to the horizontal component in the scattered light (unpolarized incident light) could be discussed in a similar fashion.

In the limiting case for small spheres the ratio of $i_{0,1}/\alpha^6$ approaches $[(m^2-1)/(m^2+2)]^2$. If we define φ as

$$\varphi = \frac{i_{0,1}}{\alpha^6} \Big/ \left(\frac{m^2-1}{m^2+2}\right)^2 \qquad (52)$$

we have a quantity which tells us how a large sphere of arbitrary m differs from a small particle in its scattered intensity at $\vartheta = 0$. Particle size can be calculated from the equation

$$\frac{2}{\varphi}\left[\frac{V_{0,u}}{c}\right]_{c\to 0} = \frac{9\pi^2 M}{\lambda^4 N_0 d^2}\left(\frac{m^2-1}{m^2+2}\right)^2 \qquad (53)$$

where c is the concentration, λ the wave length in the medium, d the density of the particles and N_0 Avogadro's number.

For values of α not greater than about 2.5 the depolarization at 90° ($H_{90,u}/V_{90,u}$) is a single-valued function of α and may be used to determine the particle size (SINCLAIR and LAMER, 1949). Since i_2 is related to $H_{\vartheta,u}$ by the same factor that relates i_1 to $V_{\vartheta,1}$, the depolarization

ratio is found from the tables by taking i_2/i_1, at a given value of ϑ. Graphical interpolations are readily made between the calculated values KERKER and LAMER (1950) have studied the effects of polydispersity on the depolarization.

Scattering from Particles of Various Shapes, When the Relative Refractive Index is Near Unity.

Calculations similar to those of MIE have not been made for non-spherical particles because of mathematical difficulties. However, the mathematical problem for large particles of spherical or other shape is greatly simplified if the refractive index of the particle is nearly equal to that of the medium ($m \approx 1$). In this case, the incident wave undergoes no appreciable change in either phase or amplitude as it traverses a particle so that the phase and amplitude of the induced dipoles and higher multipoles are readily determined. It is of particular importance that for exactly forward scattering, i. e., $\vartheta = 0$, there is no phase difference between the scattered fields coming from different parts of the particle and, therefore, of course, no interference. This leads to the important conclusion that equation (1) remains valid at $\vartheta = 0$ even for large particles. It may be rewritten in the more nearly general forms

$$\left[\frac{R_{\vartheta,v}}{c}\right]_{c\to 0} = \left[\frac{2\,V_{\vartheta,u}}{c}\right]_{c\to 0} = KMP(\vartheta)\,. \tag{54}$$

The factor $K = \dfrac{4\pi^2 n^2 (\partial n/\partial c)^2}{\lambda_0^4 N_0}$ where n is the refractive index of the solvent, $(\partial n/\partial c)$ the refractive index increment and λ_0 the wave length *in vacuo*[1].

Applied to the turbidity, τ, equation (54) becomes

$$\left[\frac{\tau}{c}\right]_{c\to 0} = \pi K M \int_0^{\pi} (1 + \cos^2\vartheta)\,\sin\vartheta\, P(\vartheta)\, d\vartheta\,. \tag{55}$$

The integral may be evaluated graphically from experimental data. If $P(\vartheta) = 1$ then the integral is $8/3$ and equation (55) is reduced to equation (18). The general condition for validity of this simplified theory is, for spheres, that $2\alpha(m-1) \ll 1$ (VAN DE HULST, 1946). Analogous

[1] The use of the last equality sign in equation 54 implies a special form of relation between the specific refractive index increment of the solute, on the one hand, and the refractive indices of the pure solvent and pure solute, on the other. HELLER (1945) has derived the relation involved, and has shown that in general it is not exactly valid for systems in which a direct test can be aplied. In protein systems the direct test has not been applied; the refractive index of a pure anhydrous protein has never, to our knowledge, been measured, although in the blue-green region of the spectrum it must be fairly close to 1.60. For further discussion see DOTY and EDSALL (1950).

conditions defining a negligibly small phase shift in the incident wave may be expected to apply to other geometric shapes. For proteins in water ($m \approx 1.15$ to 1.20) a theory based on the above assumptions will be a reasonable approximation for many cases.

By a slight modification of the treatment given in SCHUSTER and NICHOLSON (1928) one can obtain the following expression for the intensity of forward scattering applicable at zero concentration to particles of arbitrary size and refractive index whenever $H_{0,v}/V_{0,v} = 0$

$$R_{0,v} = \frac{n^2 c M}{\lambda_0^4 N_0} \left[4\pi^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 + \frac{\lambda_0^2}{4} \left(\frac{\tau}{c}\right)^2 \right]. \qquad (55a)$$

For all ordinary cases (e. g. a protein with a molecular weight of a few million or less) the second term in the bracket is negligible compared to the first and the equation reduces to equation (54). In general, however, for large refracting particles the second term cannot be neglected. Physically, the first term gives the intensity scattered in phase with the incident wave, while the second term gives the component scattered with a phase difference of 90° to the incident wave. Thus a negligible phase shift means that the second term can be ignored. We are indebted to Professor BRUNO H. ZIMM for pointing these relations out to us.

Equations (54) and (55) neglect the effects of depolarization which if appreciable must be allowed for. If the depolarization is due to anisotropy alone then the corrections discussed in a previous section can be applied. However, additional contributions to the depolarization arise from the effects of size alone, so that the use of the CABANNES factor for a large refracting particle would result in an overcorrection. For a discussion of these complications, see ZIMM, STEIN and DOTY (1945) and LOTMAR (1938 a, b). DOTY (1948) has given a helpful general discussion.

Since internal interference is important only when the ratio of particle size to wave length becomes appreciable, it is evident that the interference effects will be negligible at sufficiently long wave lengths. As we have seen, both the scattered intensity and the turbidity are proportional to $1/\lambda^4$ for small particles. If measurements can be made over a range of wave lengths into a region where the inverse fourth power law is obeyed, then equation (18) becomes applicable, and the problem can be treated as one of small particle scattering. It is important to note that in general both n and $\partial n/\partial c$ are functions of λ and that corrections must be applied to these factors in interpreting wave length dependence. PERLMANN and LONGSWORTH (1948) have reported data on the dispersion of several protein preparations.

This approach has been applied by OSTER (1946) in measuring the size of *PR* 8 influenza virus and also bushy stunt virus. Transmission measurements were made at a series of wave lengths and τ plotted as

a function of $1/\lambda^4$. From the limiting slope (extrapolated to infinite λ) M was found to be $322 \cdot 10^6$ for influenza virus and $9.0 \cdot 10^6$ for bushy stunt. These values agree well with estimates by electron microscopy and by sedimentation and diffusion.

It should be possible to interpret wave length dependence data also in regions where $P(\vartheta)$ is different from unity by using equations (54) or (55). This has been done by comparison of experimental data with theoretical curves constructed on the basis of an assumed model, by DOTY and STEINER (1950).

Interference Functions for Specific Geometric Shapes: Sphere, Ellipsoid, Random Coil and Thin Rod.

The problem of finding the intensities scattered from a large rigid particle at angles other than zero is formally similar to that dealing with scattering of X-rays by atoms since, in this case, m is very near unity for all substances. The general solution obtained by DEBYE (1915) and by THOMSON (1916) for this problem may be given in the form

$$P(\vartheta) = \sum_i \sum_j \frac{\sin \varkappa s \varrho_{i,j}}{\varkappa s \varrho_{i,j}} \tag{56}$$

which gives the intensity distribution from an assembly of point scatterers held at fixed distances $\varrho_{i,j}$ from one another. $\varkappa$ stands for $2\pi/\lambda$ and s for $2 \sin \vartheta/2$. Now to evaluate $P(\vartheta)$ for a specific geometric shape reduces to the problem of determining the distribution function which will give the $\varrho_{i,j}$'s and then carrying out the summation.

Applied to spheres equation (56) gives (RAYLEIGH, 1914, DEBYE, 1947),

$$P(\vartheta) = \frac{9}{y^6} (\sin y - y \cos y)^2 , \tag{57}$$

$$y = s\alpha = \frac{2\pi D}{\lambda} \sin \frac{\vartheta}{2} \tag{58}$$

where D is the diameter of the sphere. This function has a series of minima at $y = \tan y$ and these can be located easily by plotting y versus $\tan y$. Numerical values are given by VAN DE HULST (1946). Since the first minimum occurs at $y = 4.4934$, we see that very roughly the minima will be separated by intervals of π on the y scale. Let us consider now the angular positions of minimum intensity $\vartheta_{\min}$ for different values of α. Since $\vartheta_{\min}$ is dependent on y alone we may write

$$\sin \frac{\vartheta_{\min}}{2} = k/\alpha \tag{59}$$

where k is a constant for a given order of interference. This equation holds fairly well for values of m even as high as 1.33, but in these cases

k will be a function of m also but, of course, can be evaluated from the tables for MIE theory. Equation (57) may be expanded for small values of y to give

$$P_{(\vartheta)}^{-1} = 1 + y^2/5 + 4y^4/175 + 47y^6/23625 + \cdots. \tag{60}$$

The corresponding problem for an assembly of randomly oriented ellipsoids is somewhat more difficult and no simple closed expression has been found for $P(\vartheta)$. For discussions see GUINIER (1939) and ROESS and SHULL (1947). The first three terms of the solution have been derived by DEBYE (personal communication) as

$$\left.\begin{aligned} P(\vartheta) = 1 - \frac{\varkappa^2 s^2}{5}\left(\frac{a^2+b^2+c^2}{3}\right) + \frac{3\varkappa^4 s^4}{175}\left\{\left(\frac{a^2+b^2+c^2}{3}\right)^2\right. \\ \left. + \frac{2}{5}\left[\left(\frac{a^2-b^2}{3}\right)^2 + \left(\frac{b^2-c^2}{3}\right)^2 + \left(\frac{c^2-a^2}{3}\right)^2\right]\right\} \cdots \end{aligned}\right\} \tag{61}$$

where a, b and c are the semi-axes of the ellipsoid.

Since this manuscript was written DEBYE (personal communication) has derived a formula for $P(\vartheta)$ which applies to a system of ellipsoids of revolution, with the ellipsoid axes distributed at random. Mathematically it is equivalent to a formula given by ROESS and SHULL (1947) which involves the use of hypergeometric functions. Debye's formula appears more readily adaptable to numerical computation. If the ellipsoid semi-axes are a, a, and c, and if p is defined by the relation, $p = (c^2 - a^2)/a^2$, then the formula is

$$\left.\begin{aligned} P(\vartheta) = \sum_{n=o}^{\infty} (-1)^n \, 3 \cdot 4! \, \frac{(2n+2)(2n+5)}{(2n+6)!} \, 2^{2n} (\varkappa s a)^{2n} \\ \sum_{r=o}^{n} \frac{n!}{r!(n-r)!} \frac{p^r}{(2r+1)} = 1 - \frac{(\varkappa s a)^2}{5}\left(1 + \frac{p}{3}\right) + 3\frac{(\varkappa s a)^4}{175} \\ \left(1 + \frac{2p}{3} + \frac{p^2}{5}\right) - \frac{4(\varkappa s a)^6}{4725}\left(1 + \frac{3p}{3} + \frac{3p^3}{5} + \frac{p^3}{7}\right) + \cdots \end{aligned}\right\} \tag{61a}$$

This equation holds for all values of p from rods ($p = \infty$) to discs ($p = -1$).

Numerical data derived from (61a) are conveniently represented by the procedure of ZIMM (1948b) in which the reciprocal relative intensity, $P^{-1}(\vartheta)$ is plotted against $(\varkappa s a)^2$ — or, for a specific wavelength and a paticular molecule, against $\sin^2(\vartheta/2)$. For prolate ellipsoids of axial ratio 5.1 ($p = 25$), the limiting slope, $dP^{-1}(\vartheta)/d(\varkappa s a)^2$ is 1.87. If the axial ratio is 10, the limiting slope is 6.86; if the axial ratio is 20, the slope is 26.86. Detailed computations show that the curves so plotted remain nearly linear up to fairly high values of $(\varkappa s a)^2$ — the higher terms in the summation rapidly become large as $\varkappa s a$ increases, especially for p values of 100 or more, but the net result of summing positive and negative terms deviates surprisingly little from the simpler linear relation.

Recently formula for $P(\vartheta)$ for structures of various shapes have been tabulated by FOURNET and GUINIER (1950).

The P function for a randomly coiled molecule, of great importance to the chemistry of synthetic high polymers, has been derived by DEBYE (1947) and by ZIMM, STEIN and DOTY (1945).

$$P(\vartheta) = \frac{2}{u^2}[e^{-u} - (1-u)] \qquad u = \frac{8\pi^2 R^2}{3\lambda^2}\sin^2\frac{\vartheta}{2} \tag{62}$$

where R^2 is the mean square length between the terminal segments of the coil. The literature concerning the use of this equation is very extensive.

For a thin rod, equation (56) becomes (NEUGEBAUER, 1943; ZIMM, STEIN and DOTY, 1945)

$$P(\vartheta) = \frac{1}{x}Si\,2x - \left(\frac{\sin x}{x}\right)^2$$

$$x = \frac{2\pi L}{\lambda}\sin\frac{\vartheta}{2} \tag{63}$$

where L is the length of the rod and Si is the integral sine function (JAHNKE and EMDE, 1945). An expansion of this equation (ZIMM, 1948 b) for small values of x results in

$$P_{(\vartheta)}^{-1} = 1 + x^2/9 + 7x^4/2025 + \cdots. \tag{64}$$

For large values of x the function approaches

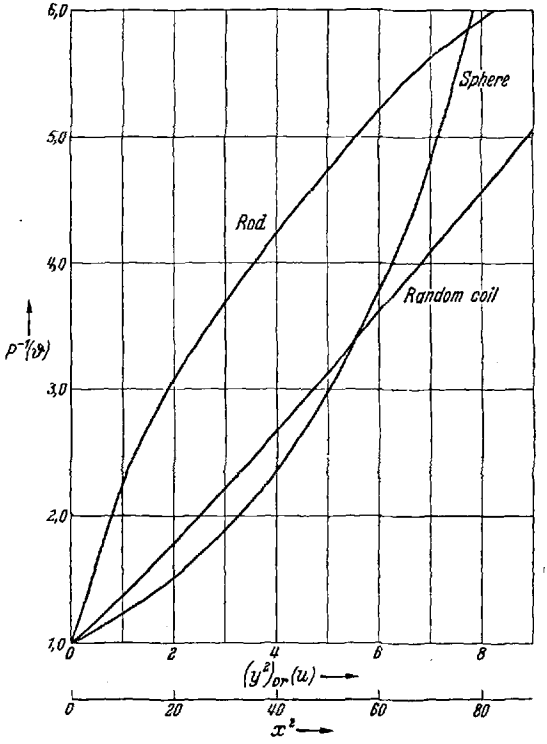


Fig. 9. Interference functions for particles with the relative refractive index near unity. (See Equations 57, 62 and 63.)
$y = (2\pi D/\lambda)\sin\vartheta/2$ (sphere);
$u = (8\pi^2 R^2/3\lambda^2)\sin^2\vartheta/2$ (Random Coil);
$x = (2\pi L/\lambda)\sin\vartheta/2$ (Thin Rod).

$$\frac{2}{\pi^2} + \frac{2x}{\pi} + \frac{1+\pi\sin 2x}{\pi^3 x} \tag{65}$$

as a limit. In Fig. 9, $P^{-1}(\vartheta)$ is plotted as a function of the appropriate variable for spheres, rods, and random coils

Studies on Large Protein Molecules.

The rod equation has been applied to protein solutions in several instances. Studies on tobacco mosaic virus have been reported by OSTER,

DOTY and ZIMM (1947). These workers measured the turbidity by transmission and characterized the angular dependence by dissymmetry measurements. The dissymmetry is the ratio of the intensities scattered at two angles equidistant from 90°, the intensity at the smaller value of ϑ being made the numerator. By applying equations (63) and (55) to the dissymmetry and turbidity, both L and M can be found. The light scattering results ($M = 40 \cdot 10^6$; $L = 2700$ Å.) were compared with those from electron microscopy and viscosity on the same sample; all were in excellent agreement.

Dissymmetry measurements have been made on an actomyosin preparation by JORDAN and OSTER (1948). The results were interpreted as indicating that the actomyosin particle becomes more highly coiled in the presence of adenosine triphosphate.

Light scattering investigations have been made also on a rod-like particle from human red cells (DANDLIKER, MOSKOWITZ, ZIMM and CALVIN, 1950), and on a pathological human serum globulin [1] (EDSALL and DANDLIKER, 1950). In both of these cases complete angular dependence curves between about 20° and 144° were determined. Values of the sedimentation constant calculated from light scattering agreed fairly well with those obtained in the ultracentrifuge. Neither of these protein preparations was monodisperse, and thus the results do not constitute a good test of equation (63).

In the case of the pathological globulin the angular dependence data could be accounted for equally well by thin rods 563 Å. long or by spheres 414 Å. in diameter. A sphere of this size would have a molecular weight of about $30 \cdot 10^6$ whereas the actual molecular weight (equation (54) is $1.16 \cdot 10^6$. These considerations, of course, exclude the spherical model.

Recently MOMMAERTS has studied the light scattering of purified myosin solutions. These were prepared by MOMMAERTS and PARRISH (1950), and were homogeneous in the ultracentrifuge. The molecular weight from light scattering was about 850, 000, in very close agreement with the measurements of PORTZEHL (1950) in H. H. WEBER's laboratory at Tübingen, which gave 858,000 from sedimentation and diffusion, and 840,000 by osmotic pressure. The length of the molecule obtained from angular dissymmetry measurements by MOMMAERTS (1950) was about 1500 Å, while PORTZEHL obtained a greater length, 2000—2400 Å. The explanation of this discrepancy is not yet clear.

---

[1] This protein was obtained by Dr. A. S. MCFARLANE from a patient whose normal globulin production was directed to the production of a pathological globulin which raised the blood viscosity to three times the normal value. The serum concentration of this globulin was about four times the albumin concentration.

PORTZEHL, SCHRAMM and WEBER (1950) have studied the turbidity of actomyosin, and found it to be greater than that of myosin (*L*-Myosin in their terminology) by a factor of nearly 10. The turbidity of actomyosin solutions at a given concentration was also found by MOMMAERTS to be much higher than for myosin; and the actomyosin solutions showed much greater angular dissymmetry of scattering. The effect of ATP on dissymmetry was found by MOMMAERTS to be variable, but it always reduced the total turbidity in agreement with the concept that ATP dissociates the actomyosin into actin and myosin.

Polydispersity.

We shall now consider the effects of polydispersity on the interpretation of light scattering measurements on solutions of large molecules. If a solution contains particles having differing weights and shapes, but all scattering independently, then the observed intensity is simply the sum of all the individual intensities:

$$R_{\vartheta,v} = K \sum_i c_i M_i P_i(\vartheta) \; . \tag{66}$$

Usually the only easily measurable quantities are $R_{\vartheta,v}$ and the total concentration $c = \Sigma c_i$ so that as actually applied the relation becomes

$$R_{\vartheta,v} = K c M P(\vartheta) \tag{67}$$

where $P(\vartheta)$ is just the experimental curve. These two equations define the weight average value of M (equation 20).

Similarly, if we apply equations (60), (6) or (64) to the limiting slope of $P^{-1}(\vartheta)$ plotted against $\sin^2 \vartheta/2$ we will obtain an average value of some characteristic molecular dimension. The nature of this average is discussed by ZIMM (1948 b) for the case of randomly coiled molecules. For the case of rods, which is thoroughly similar to that of random coils, it is easily shown that the average length, $\overline{L}$, obtained is

$$\overline{L}^2 = \frac{\sum_i c_i M_i L_i^2}{\sum_i c_i M_i} \; . \tag{68}$$

Since the weighting factor, $c_i M_i$, is the same as that in the expression for the Z-average molecular weight, we see that $\overline{L}^2$ is the Z-average of the square of the rod length [1]. If we assume that all the particles have

[1] The Z-average molecular weight for a polydispersed system is defined by the relation

$$\overline{M}_z = \frac{\Sigma m_i M_i^3}{\Sigma m_i M_i^2} = \frac{\Sigma c_i M^2}{\Sigma c_i M_i}$$

Compare the definitions of $\overline{M}_n$ and $\overline{M}_w$ in equations 19 and 20 respectively.

a uniform cross section then the molecular weight is proportional to the rod length and we can write equation (68) as

$$\overline{M}^2 = \frac{\sum_i c_i M_i^3}{\sum_i c_i M_i} \tag{69}$$

where $\overline{M}$ is the average molecular weight obtained from the average lenght, $\overline{L}$, and the molecular cross section. By introducing a molecular size distribution function we can find how this $\overline{M}$ compares with the more usual average values of M. A convenient function for this purpose used by ZIMM (1948 b) is

$$f(M)\,dM = \frac{Y^{Z+1}}{Z!} M^Z e^{-YM}\,dM\,; \qquad \int_0^\infty f(M)\,dM = 1 \tag{70}$$

where $f(M)dM$ is the weight fraction of material of molecular weight M in the range dM. Y and Z are adjustable parameters. The curve has a single maximum at $M = Z/Y = M_n$, the number average molecular weight. For large Z the system approaches monodispersity. The points of inflection occur at $M = (Z \pm \sqrt{Z})/Y$. Combining equations (69) and (70) we obtain

$$\overline{M}^2 = \frac{(Z+3)(Z+2)}{Y^2}\,. \tag{71}$$

The weight average(equations 20) for this same distribution is$(Z+1)/Y$ so that

$$\frac{\overline{M}^2}{M_w^2} = \frac{(Z+3)(Z+2)}{(Z+1)^2}\,, \tag{72}$$

showing that $\overline{M} \geq M_w$. The effect of polydispersity on the sharpness of orders in the Tyndall spectra has been discussed by JOHNSON and LAMER (1947) and by KERKER and LAMER (1950). Analytical treatments of the problem for spheres have been given by ROESS and SHULL (1947) and by DANDLIKER (1950).

Effects of Intermolecular Interaction in Systems of Particles of Large Effective Volume.

We have previously considered the effects of net charge and of ionic strength on the slopes of the Hc_2/τ curves for proteins when plotted as a function of c_2. However, the discussion was limited to cases where the fluctuation theory, as developed by EINSTEIN, might be expected to apply; that is to solutions of ionic strength 0.003 or greater, when the net proton charge (Z_2) on the protein molecule is between +25 and −25 (for serum albumin). Under such conditions EINSTEIN's assumption that the fluctuations in neighboring volume elements are independent

should still be approximately fulfilled. However, if the charge on the protein molecule is still further increased, and the ionic strength reduced to extremely low values, the repulsive forces between the protein ions become so great that the fluctuations are probably no longer independent. Studies of certain proteins and polyelectrolytes under such conditions have been undertaken by DOTY and STEINER (1949). In dilute solutions of serum albumin at Z_2 values near +50 (p_H 3.1 to 3.3) and with only enough other ions present to balance the charge on the protein, they observed a previously unrecognized phenomenon of "negative dissymmetry" of scattering; that is, the intensity of backward scattering was greater than that in the forward direction. Thus under these circumstances a solution containing 0.00172 g. albumin per cc. gave $R_{45°,v}/R_{135°,v} = 0.835$. When the protein concentration was twice as great as this, however, the ratio of the two R values rose to 0.935, and at $c_2 = 0.007$ g./cc. it was unity. DOTY and STEINER interpreted their findings on the assumption that the effective distance of closest approach between the albumin molecules was much greater than the diameter of the actual molecules, because of the electrostatic repulsions. As an approach to a theoretical analysis of the data, they used a treatment analogous to that of DEBYE (1927) for intensity of X-ray scattering from gases, giving the equation

$$R_{\vartheta,v}/c_2 = KMP\left\{1 - (\Psi/V)\,\Phi\left(\frac{4\pi d}{\lambda}\sin\frac{\vartheta}{2}\right)\right\} \qquad (73)$$

Here Ψ is the excluded volume — the effective volume of the albumin molecules determined by their distance of closest approach; V is the total volume of the solution (Ψ/V must lie between zero and unity), and d is the distance of closest approach. The function $\Phi(X)$ is given by $\Phi(X) = 3X^{-3}(\sin X - X\cos X)$. In serum albumin — with dimensions approximately 150 by 38 Å (ONCLEY, SCATCHARD and BROWN, 1947) — $P(\vartheta)$ in equation (73) may be set equal to unity. Since Ψ increases with c, the equation predicts a rapid fall of $R_{\vartheta,v}/c_2$ with increase of c_2 in very dilute solutions, and also a greater value for $R_{135,v}$ than for $R_{45,v}$. Both these effects were actually observed. The values of d, the distance of closest approach, which had to be assumed to account for the magnitude of the observed effects, were of the order of 450—500 Å for c_2 — .0005 and of 230 Å for c_2 = .002 g./cc. Thus the "distance of closest approach" is not a rigidly defined quantity, but is very sensitive to the protein concentration and to the concentration of counter-ions needed to balance the charge on the protein. The negative dissymmetry of scattering vanished on addition of salt (approximately 0.002 M) or on diminishing the net charge on the protein.

In a series of later experiments the concentration of counter-ions was kept constant by diluting the protein with a sodium chloride solution

of the same chloride ion concentration as that in the protein solution; the p_H of the sodium chloride solution being first adjusted to the same value as that of the protein solution, so that the charge on the protein ion remains constant on mixing (DOTY and STEINER, unpublished studies; see also the review by DOTY and EDSALL, 1950). Under these circumstances, the form of the curve for Hc_2/τ (or Kc_2/R_{90}) as a function of c_2 was essentially that which would be calculated on the assumption that the protein molecules are like hard spheres, with effective diameters determined by the electrostatic repulsions between them. At constant counter-ion concentrations, these diameters were practically independent of protein concentration.

Thus in this case intermolecular interference, like the intramolecular interference considered in the preceding section, diminished total intensity of scattered light; but unlike the latter it gave rise to a greater intensity of backward than of forward scattering. In systems of large molecules both intramolecular and intermolecular effects must be considered. OSTER, DOTY and ZIMM (1947) found the dissymmetry ratio $R_{42,5°}/R_{137,5°}$ for tobacco mosaic virus, which was 1.94 at infinite dilution ($\lambda_0 = 5460$ Å), to diminish rapidly with increasing virus concentration, especially if the ionic strength was very low. OSTER (1948) studied the variation of dissymmetry with concentration of the spherical influenza virus (strain *PR* 8) in water. He inferred (OSTER, 1950 a, b) an effective diameter of 4520 Å, although the actual diameter, from the dissymmetry at infinite dilution, was 1280 Å. Further considerations regarding molecular distributions in liquids, and their effect on scattering, are given by OSTER (1950 a, b).

ZIMM (1948 a) has carried out a theoretical investigation of the form of the concentration dependence of scattering to be expected from a dilute solution. The most important assumption made in the derivation is that when neighboring particles interact they do so at only one point at a time. Also the theory is not rigorous when either M or the second virial coefficient is too large.

The outstanding results of ZIMM's analysis are two-fold. First, the theory predicts that the initial slope (as $c \to 0$) of the $c/R_{\vartheta,v}$ versus c curve is independent of ϑ. Second, the ratio of $c/R_{\vartheta,v}$ should be a linear function of c at low concentrations. Moreover these quantities are also linear functions of $\sin^2(\vartheta/2)$ at small values of ϑ as one may see from equations (60), (61) and (64). On this basis ZIMM has proposed a bilinear method of plotting the experimental data. The ordinates are made $c/R_{\vartheta,v}$ and the abscissas $\sin^2 \vartheta/2 + k'c$ where k' is an arbitrary constant (e. g. $k' = 100, 2, 1/2$ etc.) chosen for convenience. Lines are then drawn through points of the same value of $\sin^2 \vartheta/2$ to extrapolate to infinite dilution. In the resulting plot the limiting slope of $P^{-1}(\vartheta)$ at $\vartheta = 0$

determines some characteristic dimension of the particle. For example, inspection of equation (64) shows that the limiting slope equals $4\pi^2 L^2/9\lambda^2$ so that the rod length can be found. This method of extrapolation has been used for a rod shaped protein particle by DANDLIKER, MOSKOWITZ, ZIMM and CALVIN (1950).

Experimental Methods.

We shall not attempt here to describe all details of experimental procedure, but only to indicate some of the major points, and to refer to a few of the most recent and most important papers.

Clarification of Liquids.

It is a prime condition for any satisfactory light scattering measurement that the liquid studied should be clear and free from dust particles Pure volatile liquids can be repeatedly distilled without boiling, in a sealed all-glass apparatus consisting of a reservoir bulb and an observation cell connected by a glass neck. Air can first be removed by pumping it off with a vacuum pump before the apparatus is sealed off. The observation cell is then cooled and the reservoir gently warmed; the liquid thus distills over into the former. The cell is then tilted, so that the liquid flows back into the reservoir, carrying most of the dust with it. The process is repeated several times until the liquid in the observation cell is clear when observed from the side in a strong beam of light. Involatile liquids, such as protein solutions, are clarified by filtration through carefully washed fine grain filter pads, or "fine" or "ultrafine" sintered glass filters; or by high speed centrifuging at 20,000 g or above; or by a combination of both procedures. Carefully distilled, dust-free water should be used in making up such solutions. Many proteins are easily denatured at surfaces, and the denatured molecules readily aggregate; hence precautions must be taken to minimize denaturation. When successive dilutions of a protein solution are made from one container into another, it may be desirable to moisten both the pipette used for transfer and the receiving vessel with dust-free water to minimize surface denaturation. However, with serum albumin, which is not as readily denatured at surfaces as some proteins, this precaution was not found necessary in our work. The presence of dust particles in the liquid is most readily detected by visual examination of the forward scattered light, fairly close to the incident beam.

Turbidity by Transmission Measurements.

The most direct method of measuring turbidity is by determination of incident and transmitted intensity, using a standard cell of known length containing the solution under study, in such an instrument as

the BECKMAN spectrophotometer. It must be shown, however, that all the loss in transmitted intensity is due to scattering and none to true absorption. This is often difficult to prove; measurements at different wavelengths, as indicated in the preceding section, are almost essential in this connection; if the values vary as the inverse fourth power of the wavelength, the evidence is good that scattering is involved, rather than absorption. The angular divergence of the transmitted beam must be as small as possible, so that scattered light does not contribute significantly to the measured intensity. This direct method for turbidity is only applicable when the turbidity is fairly high, so that the ratio I_0/I_T differs from unity by a factor which is large enough to be determined accurately. OSTER (1950 c) has made extensive use of direct turbidity measurements in the study of interactions in the solutions of tobacco mosaic virus. The advantages and limitations of such measurements have been very thoroughly treated by DOTY and STEINER (1950).

Measurements of Reduced Intensity of Scattering.

The earlier investigators in the field all employed visual or photographic methods of measuring the scattered intensity; these are well discussed by CABANNES (1929) and BHAGAVANTAM (1942); some of the more recent techniques of this class are also discussed by MARK (1948). The "visual turbidimeter", and visual apparatus for determination of angular dissymmetry,described by STEIN and DOTY (1946) may be cited as excellent examples of effective and relatively simple designs of such instruments. Nearly all recent instruments employ photoelectric cells as light detectors. PUTZEYS and BROSTEAUX (1935) were among the first to employ photocells in such studies. The recent development of the extremely sensitive photomultiplier tubes has marked a major advance in light scattering technique; it is now possible to work even with very dilute protein solutions and still obtain results of satisfactory accuracy. Also a very narrow beam of incident light may be used; this permits reduction in the size of the cell which contains the scattering liquid — an important consideration in the study of proteins, which often are available only in extremely small amounts.

One of the most satisfactory types of apparatus yet developed is that of ZIMM (1948 b). In his arrangement, the cell containing the liquid under study is a small thin-walled glass bulb, immersed in an outer cell containing a liquid of approximately the same refractive index as that in the inner cell. The scattered light is received on a photomultiplier tube, while a portion of the incident beam falls on a phototube of much lower sensitivity. The currents produced in the two tubes are balanced in a precision potentiometer; at balance, the setting of the potentiometer shows the ratio of the currents. Details of the electronic circuit are given

by ZIMM. A similar circuit is now in use in this laboratory; in our apparatus the scattering cell is rectangular, 1 cm^2 in cross section, and is adapted specifically for measurements at 90° to the incident beam. The scattering at 90° from pure benzene ($R_{90,u} = 48.4 \cdot 10^{-6}$ at 4358 Å) is readily measured to within 2 or 3% with this apparatus. BRICE, HALWER and SPEISER (1950) have recently described in great detail the design and calibration of an apparatus adapted for measurements of scattering at 45°, 90° and 135°. The scattering cell is so designed that the cell contents can be viewed normally at any of these angles, or at 0°. Experimental precautions, and the necessary corrections that must be made to the experimental measurements, are treated with great thoroughness in this paper.

Another type of apparatus, for angular intensity distribution measurements, has been described by P. P. DEBYE (1946); with a number of modifications introduced by one of us (W. B. D.), it is now in use in our laboratory. The scattered light is received on a mirror inclined at 45° to the vertical, and is thus reflected down on to a photomultiplier tube situated beneath it. The mirror is attached to a head which moves in an arc around the cell which contains the scattering liquid; by turning a graduated dial, it may be set to receive scattered light at any angle to the incident beam, between about 20° and 144°. The conical scattering cell, with a capacity of 12 cc. of liquid, is similar to that used by ZIMM. It is immersed in a large rectangular cell, which contains a liquid — usually dust-free water — of nearly the same refractive index as the liquid inside the cell. The mirror is also immersed in this outer liquid; thus bending of the path of the scattered light is minimized. The cell is calibrated by taking readings as a function of angle, using a very dilute fluorescein solution; the intensity of the fluorescent radiation from this solution is independent of angle. The light source, as with almost all types of apparatus now in use, is a high pressure mercury arc (General Electric H 3); with suitable filters to isolate the blue (436 mμ), green (546 mμ) or yellow (579 mμ) lines.

Corrections Required to Obtain Absolute Values of Reduced Intensity from Experimental Readings.

Determination of the absolute values of reduced intensity requires precise determination of the effective volume of illuminated liquid which supplies light to the detecting system. In most experimental arrangements, the scattered light emerges from the liquid under study into air on its way to the photocell. If the walls of the scattering cell are flat, a beam of light diverging from a point in the center of the cell diverges still more widely on emerging into a medium of lower refractive index.

There is also, owing to the refractive index change, a small alteration in the effective volume of liquid which serves as a source of light to the photocell. These problems were well known to CABANNES (1929) and other earlier authors; but their study has very recently been taken up again by several authors, because of the importance of placing light scattering measurements on an absolute basis. CARR (1949) has termed the two major corrections mentioned above the "refractive index" and the "volume" correction factors, respectively. The former is given by the factor Q_n (or by Q_n^2: see below):

$$Q_n = n\left[1 - \frac{\Delta r}{X}\left(\frac{n-1}{n}\right)\right] \tag{74}$$

where n is the refractive index of the scattering liquid, Δr is the distance from the center of the cell to the face at which the light emerges, and X is the distance from the center of the cell to the photocell detector. It is assumed, in deriving this equation, that the medium outside the cell is of refractive index unity (air). If $X >> \Delta r$, as is true with many types of apparatus, including our own, then $Q_n \cong n$; if the photocell is directly in contact with the scattering cell, or immersed in the scattering medium $Q_n = 1$. For a cylindrical scattering cell (circular cross section) Q_n is the factor by which the observed intensity reading is multiplied to give the true intensity which would have been determined in the absence of refraction. For a cell with a plane surface, the corresponding factor is Q_n^2; for a spherical cell, with the center of observed scattering at the center of the cell, the refractive index correction need not be made, since the rays all emerge normal to the surface of the sphere. CARR deduced these relations and verified them experimentally. BRICE, HALWER and SPEISER (950) independently treated these relations; they discussed also other minor but significant corrections that must be made to obtain precise results.

The "volume correction factor" of CARR is in general very small compared to the refractive index correction; we shall not discuss it here.

Both CARR and BRICE, HALWER and SPEISER have studied carefully the calibration of absolute intensity of scattering by comparison with the reflected intensity from diffusely reflecting surfaces, such as magnesium oxide or casein paint. Apparently none of these surfaces acts as an ideal diffuse reflector; there is always at least a small fraction of the light which undergoes specular reflection, and this must be allowed for in the calibration of light scattering measurements.

In DEBYE's laboratory at Cornell University, absolute turbidities have been determined by comparing the intensity of the scattered light with that of a small portion of the incident beam, the latter having been weakened in intensity by a known factor by means of several successive reflections (P. DEBYE, 1944, 1947; P. P. DEBYE, 1946).

The Use of Working Standards.

In making a series of light scattering measurements, it is important that the scattered intensity from the solutions under study be directly compared with that from a working standard material which has itself been calibrated in absolute terms. The ideal working standard should be stable and easy to handle; and it should give a reduced intensity comparable to that of the liquids with which it is to be used. It is more convenient to use a standard which gives a depolarization factor (ϱ_u) close to zero, and gives no angular dissymmetry of scattering, so that the relation between its turbidity (τ) and its reduced intensity ($R_{90,u}$) may be accurately given by equation (5). Preferably several such standards should be available, to cover the wide range of turbidities that may be encountered in practice. Many working standards have been employed, and none as yet appears completely satisfactory. We have employed pure dust-free benzene, in a sealed all-glass container connected to a reservoir bulb for distillation to remove dust. However the reduced intensity of benzene ($R_{90,u} = 48 \cdot 4 \cdot 10^{-6}$ at $\lambda_0 = 4358$ Å) is lower than that of most dilute protein solutions in water. We have also used toluene and *p*-xylene, with reduced intensities slightly greater than that of benzene. Carbon disulfide has been used by BLAKER, BADGER and GILMANN (1949); they report for it a value of $R_{90,u} = 151 \cdot 10^{-6}$ at 4358 Å and $47.8 \cdot 10^{-6}$ at 5461 Å. This is a very convenient value for a working standard; but the samples of carbon disulfide employed by us became noticeably yellow in a relatively short time after exposure to 4358 Å radiation. Possibly this is due to impurities in our material, since BLAKER, BADGER and GILMANN report one of their samples to have been stable for three years when used chiefly with light of 5461 Å. Benzene, toluene, xylene and carbon disulfide all have refractive indices much higher than that of water; the readings obtained from them must therefore be adjusted by the refractive index correction factor, discussed above, so as to make them comparable with those obtained from aqueous solutions. All these standard liquids have large values of ϱ_u; hence it is not legitimate to use equation (5) in calculating their turbidities from the reduced intensities given above.

A standard preparation of polystyrene, prepared by the Dow Chemical Company, has been distributed by P. DEBYE and A. M. BUECHE of Cornell University to many workers in the United States. The solid polystyrene is dissolved in toluene (5 g./l.); the solution is not very stable, and must be made up afresh at frequent intervals. Values for the turbidity (or reduced intensity) of this standard solution have been determined in several laboratories: for results, see BRICE, HALWER and SPEISER (1950), Table VI; also EDSALL, EDELHOCH, LONTIE and MORRISON (1950).

Solid blocks of plastics, of moderate turbidity, have been used as working standards, but their properties may change slowly with time. ZIMM (1948 b) used a rectangular block made of polystyrene to which five percent of methyl acrylate had been added when the polymerization was half completed. This gave a convenient degree of turbidity, but the absolute value obtained was rather sensitive to temperature; ZIMM stated that it was desirable to keep this standard thermostated.

BRICE, HALWER and SPEISER (1950) used working standards of opal glass, which was studied both as a transmitting and as a reflecting diffusor. This proved useful in practice but, particularly when used as a transmitting diffusor, gave values which had to be carefully corrected in terms of an absolute standard.

Determination of the scattered intensity from the pure solvent, which must be subtracted from the reading for the solution, involves experimental difficulties. For proteins the solvent is generally pure water or an aqueous salt solution. The readings obtained from pure dust free water are generally considerably higher than what would be expected from the reduced intensity of the water itself; they include some stray light also. This stray light contribution should, of course, also be subtracted from the reading for the protein solution, but its exact magnitude is difficult to determine. Every effort must be made to reduce stray light to a minimum, so that the correction becomes negligible.

Depolarization Measurements.

Visual methods of determining depolarization factors (Cornu method) are well described, with references, by LOTMAR (1938 a, b) and LONTIE (1944). Square Polaroid discs, cut so that one side of the square is parallel to the direction of the electric vector in the light transmitted by the polaroid, are convenient for insertion in front of a photocell which views the scattered light; the factor ϱ is then given from the readings with the square disc inserted to transmit horizontal and vertical vibrations respectively. Since the latter component is usually much the more intense, it may be desirable in reading it to introduce a neutral filter of known transmittance with the polaroid, so that the readings on the photocell are comparable for horizontal and vertical components. Many photomultiplier tubes show markedly different relative responses for polarized light of a given intensity, depending on the plane of the electric vector; the differences may be as great as 20 percent or more in some cases. This possibility must always be tested for, and the appropriate corrections applied to the measured readings, if necessary.

Refractive Index Increments.

In evaluating DEBYE's factor H (equation 16), the refractive index increment of the solute must be accurately known. This determination is conveniently carried out with the differential refractometer of P. P. DEBYE (1946), in which the solution is contained in a hollow glass prism of triangular cross section, immersed in a cell containing the pure solvent. The deflection of a light beam passing through the system is a nearly linear function of the refractive index difference $n - n_0$, which may thus be measured to about 0.000,003.

Bibliography

ARMSTRONG, S. H., jr., M. J. E. BUDKA, K. C. MORRISON and M. M. HASSON: Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XII. The Refractive Properties of the Proteins of Human Plasma and Certain Purified Fractions. J. Amer. chem. Soc. **69**, 1747—1753 (1947).

BEECKMANS, M. L. and R. LONTIE: Poids moléculaires et zones de stabilité des globulines végétales. II. L'edestine. Bull. Soc. Chim. Biol. **28**, 509—513 (1946).

BHAGAVANTAM, S.: Scattering of Light and the Raman Effect. Chemical Publishing Co., Inc., Brooklyn, N. Y. (1942).

BLAKER, R. H., R. M. BADGER and T. S. GILMANN: The Investigation of the Properties of Nitrocellulose Molecules in Solution by Light Scattering Methods. I. J. Phys.Colloid Chem. **53**, 794—803 (1949).

BLUMER, H.: Strahlungsdiagramme kleiner dielektrischer Kugeln. Z. Physik **32**, 119—134 (1925).

— Strahlungsdiagramme kleiner dielektrischer Kugeln. II. Z. Physik **38**, 304— 328 (1926).

— Die Zerstreuung des Lichtes an kleinen Kugeln. Z. Physik **38**, 920—947 (1926).

— Die Farbenzerstreuung an kleinen Kugeln. Z. Physik **39**, 195—214 (1926).

BRICE, B. A., M. HALWER and R. SPEISER: Photoelectric Light-Scattering Photometer for Determining High Molecular Weights. J. Opt. Soc. America, in press (1950).

BRINKMAN, H. C. and J. J. HERMANS: The Effect of Non-Homogeneity of Molecular Weight on the Scattering of Light by High Polymer Solutions. J. chem. Physics **17**, 574—576 (1949).

BÜCHER, T.: Über das Molekulargewicht der Enolase. Biochim. Biophys. Acta **1**, 467—476 (1947).

CABANNES, J.: La Diffusion Moléculaire de la Lumière. Presses Universitaires de France, Paris (1929).

CAMPBELL, D. H., R. H. BLAKER and A. B. PARDEE: The Purification and Properties of Antibody Against para-Azophenylarsenic Acid and Molecular Weight Studies from Light Scattering Data. J. Amer. chem. Soc. **70**, 2496—2499 (1948).

CARR, C. I.: Dissertation. University of California, Berkeley, California (1949). J. Chem. Physics (in press).

COHN, E. J. and J. T. EDSALL: Proteins, Amino Acids and Peptides. Reinhold Publishing Corp., New York (1943).

DANDLIKER, W. B.: Light Scattering Studies of a Polystyrene Latex. J. Amer. chem. Soc., **72**, 5110—5116 (1950).

DANDLIKER M. MOSKOWITZ, B. H. ZIMM and M. CALVIN: The Physical Properties of Elinin, A Lipoprotein from Human Erythrocytes. J. Amer. chem. Soc., in press. (1950).

DEBYE, P.: Der Lichtdruck auf Kugeln von beliebigem Material. Ann. Physik **30**, 57—136 (1909).

— Zerstreuung von Röntgenstrahlen. Ann. Physik **46**, 809—823 (1915).

— Über die Zerstreuung von Röntgenstrahlen an amorphen Körpern. Physik. Z. **28**, 135—141 (1927).

— Light Scattering in Solutions. J. appl. Physics **15**, 338—342 (1944).

— Molecular-Weight Determination by Light Scattering. J. Phys. Colloid Chem. **51**, 18—32 (1947).

DEBYE, P. P.: A Photoelectric Instrument for Light Scattering Measurements and a Differential Refractometer. J. appl. Physics **17**, 392—398 (1946).

DOTY, P. Depolarization of Light Scattered from Dilute Macromolecular Solutions. I. Theoretical Discussion. J. Polymer Sci. **3**, 750—762 (1948).

— and EDSALL, J. T.: Light Scattering in Protein Solutions. Advances in Protein Chemistry. G. in press. (1950).

— and H. S. KAUFMAN: The Depolarization of Light Scattered from Polymer Solutions. J. Phys. Chem. **49**, 583—595 (1945).

— and STEIN, S. J.: Depolarization of Light Scattered From Dilute Macromolecular Solutions. II. Experimental Results. J. Polymer Sci. **3**, 763—771 (1948).

— and R. F. STEINER: Light Scattering from Solutions of Charged Macromolecules. J. Chem. Physics **17**, 743—744 (1949).

— — Light Scattering and Spectrophotometry of Colloidal Solutions. J. Chem. Physics, **18**, 1211—1220 (1950).

EDSALL, J. T., and W. B. DANDLIKER: Light Scattering Studies on a Pathological Serum Globulin. (Unpublished.) (1950.)

— H. EDELHOCH, R. LONTIE and P. R. MORRISON: Light Scattering in Solutions of Serum Albumin: Effects of Charge and Ionic Strength. J. Amer. chem. Soc., **72**, 4641—4656 (1950).

EINSTEIN, A.: Theorie der Opaleszenz von homogenen Flüssigkeiten und Flüssigkeitsgemischen in der Nähe des kritischen Zustandes. Ann. Physik **33**, 1275 bis 1298 (1910).

EWART, R. H., C. P. ROE, P. DEBYE and J. R. MCCARTNEY: The Determination of Polymeric Molecular Weights by Light Scattering in Solvent-Precipitant Systems. J. Chem. Physics **14**, 687—695 (1946).

FOURNET, G., and A. GUINIER: L'Etat Actuel de la Theorie de la Diffusion des Rayons X aux Petits Angles. J. Physique Radium, **11**, 516—520 (1950).

GEFFCKEN, W.: The Dependence of Equivalent Refractivit y on the Concentration of Strong Electrolytes in Solution. Z. physik. Chem. (B) 5, 81—123 (1929).

GUINIER, A.: La Diffraction Des Rayons X Aux Très Petits Angles; Application a L'Etude De Phénomènes Ultramicroscopiques. Ann. Physique **12**, 161 bis 237 (1939).

HALWER, NUTTING and BRUCE: Molecular Weight of Lactoglobulin, Ovalbumin, Lysozyme and Serum Albumin by Light Scattering in press. (1950).

HELLER, W.: The Determination of Refractive Indices of Colloidal Particles by Means of a New Mixture Rule or From Measurements of Light Scattering. Physical Rev. **68**, 5—10 (1945).

HERMANS, J. J.: Light Scattering by Charged Particles in Electrolyte Solutions. Proc. Internatl. Colloquium on Macromolecules, Amsterdam, 1949. D. B. Centen's Vitgivers-Maatschappij N. V., 238—249 (1950), Amsterdam. (Also published in Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. **68**, 1137—1148 (1949).

HUGHES, W. L., jr.: Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XIV. An Albumin Fraction Isolated from Human Plasma as a Crystalline Mercuric Salt. J. Amer. chem. Soc. **69**, 1836 (1947).

— Protein Mercaptides. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **14**, 79—84 (1950).

— R. STRAESSLE, H. EDELHOCH and J. T. EDSALL: Equilibrium, Kinetics, and Formation of Intermediates in the Reaction of Human Mercaptalbumin with Mercury Compounds. Abstracts of Papers, 117th Meeting, American Chemical Society, pp. 51c—52c (1950).

JAHNKE, E., and F. EMDE: Tables of Functions, Dover (1945).

JOHNSON, I., and V. K. LAMER: The Determination of the Particle Size of Monodispersed Systems by the Scattering of Light. J. Amer. chem. Soc. **69**, 1184—1192 (1947).

JORDAN, W. K., and G. OSTER: On the Nature of the Interaction Between Actomyosin and ATP. Science **108**, 188—190 (1948).

KENYON, A. S., and V. K. LAMER: Light Scattering Properties of Monodispersed Sulfur Sols. I. Monochromatic Ultraviolet Angular Scattering. II. Effect of the Complex Index of Refraction Upon Transmittance. J. Colloid Sci. **4**, 163—184 (1949).

KERKER, M., and V. K. LAMER: Particle Size Distribution in Sulfur Hydrosols by Polarimetric Analysis of Scattered Light. J. Amer. chem. Soc., **72**, 3516—3525 (1950).

KIRKWOOD, J. G., and R. J. GOLDBERG: Light Scattering Arising from Composition Fluctuations in Multi-Component Systems. J. chem. Physics **18**, 54—57 (1950).

KRISHNAN, R. S.: Über die Dispersion der Depolarisation bei der Lichtstreuung in kolloiden Systemen. Eine Methode zum Nachweis molekularer Aggregation durch Lichtstreuung. Kolloid-Z. **84**, 2—15 (1938).

LAMER, V. K., and M. D. BARNES: Monodispersed Hydrophobic Colloidal Dispersions and Light Scattering Properties. I. Preparation and Light Scattering Properties of Monodispersed Colloidal Sulfur. J. Colloid Sci. **1**, 71—77 (1946).

— — A Note on the Symbols and Definitions Involved in Light Scattering Equations. J. Colloid Sci. **2**, 361—363 (1947).

— and D. SINCLAIR: Verification of Mie Theory. OSRD Report No. 1857 and Report No. 944, Office of Publications Board, U. S. Department of Commerce (1943).

LONTIE, R.: De depolarisatie van het licht vertstrooid door oplossingen van proteinen. — I. De invloed van de golflengte op de depolarisatie van Haemocyanine. Meded. van de Konink. Vlaamsche Acad. voor Wetenschappen (Belgie) **6**, 5—24 (1944).

— P. R. MORRISON, H. EDELHOCH and J. T. EDSALL: Light Scattering in Solutions of Serum Albumin and γ-Globulin. Abstracts of Papers, 114th Meeting, American Chemical Society, pp. 25c—26c (1948).

LOTMAR, W.: Über den Zusammenhang zwischen Depolarisationsgrad und Teilcheneigenschaften bei der Lichtstreuung in Kolloiden. Helv. Chim. Acta **21**, 792—812 (1938a).

— Über die Lichtstreuung in Lösungen von Hochmolekularen. Helv. Chim. Acta **21**, 953—984 (1938b).

MARK, H.: Light Scattering in Polymer Solutions. Frontiers in Chemistry. V. Chemical Architecture. Interscience Publishers, New York, p. 121 (1948).

MIE, G.: Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen, Ann. Physik **25**, 377—445 (1908).

MOMMAERTS, W. F. H. M.: A Study of the Scattering of Light in Myosin Solutions. Federation Proceedings **9**, 207 (1950).
— — R. G. PARRISH: J. biol. Chem. (in press) (1950).
NEUGEBAUER, T.: Berechnung durch Lichtzerstreuung von Fadenketten-Lösungen. Ann. Physik **42**, 509—533 (1943).
ONCLEY, J. L., G. SCATCHARD and A. BROWN: Physical-Chemical Characteristics of Certain of the Proteins of Normal Human Plasma. J. Phys. Colloid Chem. **51**, 184—198 (1947).
OSTER, G.: Molecular Weights and Other Properties of Viruses as Determined by Light Absorption. Science **103**, 306—308 (1946).
— Light Scattering from Polymerizing and Coagulating Systems. J. Colloid Sci. **2**, 291—299 (1947).
— The Scattering of Light and its Applications to Chemistry. Chem. Reviews **43**, 319—365 (1948).
— Scattering of Visible Light and X-Rays by Solutions of Proteins. Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry **1**, 73—84 (1950a). (Butterworth's Scientific Publications, London; Academic Press, New York.)
— Visible Light and X-Ray Scattering by Concentrated Solutions of Macromolecules. Proc. Internatl. Colloquium on Macromolecules, Amsterdam, 1949, D. B. Centen's Vitgivers-Maatschappij N. V., 224—237 Amsterdam. (1950b), Also in Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **68**, 1123—1136 (1949).
— Two-phase Formation in Solutions of Tobacco Mosaic Virus and the Problem of Long-range Forces. J. Gen. Physiol **33**, 445—474 (1950c).
— P. M. DOTY and B. H. ZIMM: Light Scattering Studies of Tobacco Mosaic Virus. J. Amer. chem. Soc. **69**, 1193—1197 (1947).
OUTER, P., C. I. CARR and B. H. ZIMM: Light Scattering Investigation of the Structure of Polystrene. J. Chem. Physics **18**, 830—839 (1950).
PERLMANN, G. E., and L. G. LONGSWORTH: The Specific Refractive Increment of Some Purified Proteins. J. Amer. chem. Soc. **70**, 2719—2724 (1948).
PERRIN, F.: Polarization of Light Scattered by Isotropic Opalescent Media. J. chem. Physics **10**, 415—427 (1942).
PORTZEHL, H.: Masse und Maße des L-Myosins. Z. Naturforsch. **5b**, 75—78 (1950)
— G. SCHRAMM and H. H. WEBER: Aktomyosin und seine Komponenten, I. Mitt. Z. Naturforsch. 5b, 61—74 (1950).
PUTZEYS, P., and M. L. BEECKMANS: Poids moléculaires et zones de stabilité des globulines végétales. I. Les globulines de réserve du genre Prunus. Bull. Soc. Chim. Biol. **28**, 503—509 (1946).
— and J. BROSTEAUX: The Scattering of Light in Protein Solutions. Trans. Faraday Soc. **31**, 1314—1325 (1935).
— — Light Scattering and the Molecular Weight of the Proteins. Mededeel Koninkl. Vlaam. Acad. Wetenschap. Belg. Klasse Wetenschap **3**, 3—23 (1941).
RAY, B.: On the Colour and Polarization of the Light Scattered by Sulphur Suspensions. Proc. Indian Assoc. Cultivation Sci. **7**, 1—12 (1921).
RAYLEIGH, LORD: On the Light from the Sky, its Polarization and Colour. Phil. Mag. **41**, 107—120, 274—279 (1871); On the Scattering of Light by Small Particles. Phil. Mag. **41**, 447—454 (1871): also in Scientific Papers, Vol. I, 87—110 (Cambridge University Press, 1899).
— The Incidence of Light upon a Transparent Sphere of Dimensions Comparable with the Wave Length. Proc. Roy. Soc. **84A**, 25—46 (1910).
— On the Diffraction of Light by Spheres of Small Refractive Index. Proc. Roy. Soc. (London) **90A**, 219—225 (1914).

RAYLEIGH On the Scattering of Light by a Cloud of Similar Small Particles ofany Shape and Oriented at Random. Phil. Mag. J. Sci. **35**, 373—381 (1918).

ROESS, L. C., and C. G. SHULL: X-Ray Scattering at Small Angles by Finely-Divided Solids. II. Exact Theory for Random Distributions of Spheroidal Particles. J. Appl. Physics **18**, 308—313 (1947).

SCATCHARD, G.: Physical Chemistry of Protein Solutions. I. Derivation of the Equations for the Osmotic Pressure. J. Amer. chem. Soc. **68**, 2315—2319 (1946).

— A. C. BATCHELDER and A. BROWN: Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. VI. Osmotic Equilibria in Solutions of Serum Albumin and Sodium Chloride. J. Amer. chem. Soc. **68**, 2320—2329 (1946).

— and E. S. BLACK: The Effect of Salts on the Isoionic and Isoelectric Points of Proteins. J. Phys. Colloid Chem. **53**, 88—99 (1949).

— I. H. SCHEINBERG and S. H. ARMSTRONG, jr.: Physical Chemistry of Protein Solutions. IV. The Combination of Human Serum Albumin with Chloride. Ion. V. The Combination of Human Serum Albumin with Thiocyanate Ion J. Amer. chem. Soc. *72*, 535—546 (1950).

SCHULZ, G. V.: Absolute Molekülgrößenbestimmungen an makromolekularen Stoffen durch Messung der Intensität des Streulichtes. Z. physik. Chem. **194**, 1—27 (1944).

— and G. HARBORTH: Die Bestimmung des Molekulargewichts und der räumlichen Ausdehnung von Fadenmolekülen nach der Streulichtmethode. Die macromol. Chem., B II, 187—200 (1948).

SCHUSTER, A., and J. W. NICHOLSON: Theory of Optics 3rd. edition, p. 320. Edward Arnold and Co., London (1928).

SINCLAIR, D.: Light Scattering by Spherical Particles. J. Opt. Soc. Amer. **37**, 475—480 (1947).

— and V. K. LAMER: Light Scattering as a Measure of Particle Size in Aerosols. Chem. Rev. **44**, 245—267 (1949).

STAUDINGER, H. J., and I. HAENEL-IMMENDÖRFER: Molekulargewichtsbestimmung an Glykogenen durch Anwendung des RAYLEIGHschen Gesetzes. Die macromol. Chem. **1**, 185—196 (1943).

STEIN, R. S., and P. DOTY: A Light Scattering Investigation of Cellulose Acetate. J. Amer. chem. Soc. **68**, 159—167 (1946).

STOCKMAYER, W. H.: Light Scattering in Multicomponent Systems. J. chem. Physics **18**, 58—61 (1950).

STRATTON, J. A., and H. G. HOUGHTON: A Theoretical Investigation of the Transmission of Light Through Fog. Physic. Rev. **38**, 159—165 (1931).

STUART, H. A.: Molekülstruktur. Springer: Berlin 1934.

SVEDBERG, T., and K. O. PEDERSEN: Die Ultracentrifuge. Steinkopff-Leipzig. (1940).

TANFORD, C.: Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XXIII. Hydrogen Ion Equilibria in Native and Modified Human Serum Albumin. J. Amer. chem. Soc. **72**, 441—451 (1950).

THOMSON, J. J., CITED by COMPTON, A. N. and S. K. ALLISON: X-Rays in Theory and Experiment. D. van Nostrand Co., New York 1935. p. 134 (1916).

VAN DE HULST, H. C.: Optics of Spherical Particles. Astronomiques de L'Observatoire D'Utrecht, **XI**, Part 1, 1—87 (1946).

WILLIAMS, R. C., and R. C. BACKUS: Macromolecular Weights Determined by Direct Particle Counting. I. The Weight of the Bushy Stunt Virus Particle. J. Amer. chem. Soc. **71**, 4052—4057 (1949).

ZERNIKE, F.: L'Opalescence Critique, Dissertation, Amsterdam 1915.

ZERNIKE, F.: "Etude Theorique et Experimentale de l'Opalescence Critique." Arch. Neerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, Series **3A**, Vol. IV, 74—149 (1918).

ZIMM, B. H.: The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions. J. chem. Physics **16**, 1093—1099 (1948a).

— Apparatus and Methods for Measurement and Interpretation of the Angular Variation of Light Scattering; Preliminary Results on Polystyrene Solutions J. chem. Physics **16**, 1099—1116 (1948b).

— and P. M. DOTY: The Effect of Non-Homogeneity of Molecular Weight on the Scattering of Light by High Polymer Solutions. J. Chem. Physics **12**, 203—204 (1944).

— R. S. STEIN and P. DOTY: Classical Theory of Light Scattering from Solutions. — A Review. Polymer Bulletin **1**, 90—119 (1945).

(Completed in July, 1950.)

Prof. Dr. JOHN T. EDSALL, University Laboratory of Physical Chemistry, Related to Medicine and Public Health, Harvard University, Boston 15 (Mass. USA.).

Fortschr. chem. Forsch., Bd. 2, S. 57—91 (1951).

Anwendung des Elektronenmikroskops in der anorganischen Chemie.

Von

KURT BEYERSDORFER

Mit 20 Textabbildungen.

Inhaltsübersicht.

Seite

I. Einführung 57

II. Das Elektronenmikroskop 58

1. Aufbau 58
2. Wechselwirkung zwischen Objekt und Elektronenstrahl 59
3. Zusatzeinrichtungen 60

III. Herstellung der Präparate 61

1. Objektträger 61
2. Präparation feindisperser Stoffe 62
3. Oberflächenabbildung 63
   a) Oxydabdruck 63
   b) Lackabdruck 63
   c) Bedampfter Lackabdruck 64
   d) Aufdampfabdruck 65
   e) Matrizenabdrucke 65

IV. Beispiele untersuchter Stoffsysteme 66

1. Vorbemerkung 66
2. Kohlenstoff 66
3. Metalle und Legierungen 69
   a) Ätzstrukturen 69
   b) Aufdampfschichten 71
   c) Photographische Schichten 72
   d) Kolloide Metalle (Ag, Au, Pt, Pd) 72
4. Hydroxyde und Oxyde zweiwertiger Metalle 74
5. Hydroxyd und Oxyd des Aluminiums 79
6. Zinkoxyd 82
7. Oxydische Rauche 83
8. Tonmineralien 85

V. Ausblick 87

Literatur 88

I. Einführung

Das Elektronenmikroskop hat uns in die Lage versetzt, etwa 100mal kleinere Bereiche sichtbar zu machen als dies mit dem Lichtmikroskop möglich ist und uns damit einen Einblick in Dimensionen gewährt, die dem menschlichen Auge bisher verschlossen waren. Wir können heute

Teilchen sehen, die nur aus wenigen Hundert Atomen aufgebaut sind. Ob es einmal gelingen wird, einzelne Atome abzubilden, ist noch ungewiß, jedoch schließen theoretische Überlegungen (*79*) die Möglichkeit einer Abbildung zumindest schwerer Atome keineswegs aus, wenn es gelingt, eine Auflösung von 1 bis 2 ÅE zu erreichen. Mit dem Feldelektronenmikroskop hat MÜLLER (*67a*) bereits einzelne Atome und Moleküle sichtbar gemacht.

Wir verstehen unter dem Auflösungsvermögen eines Mikroskops den Abstand, den zwei Punkte im Objekt haben müssen, damit sie in der Abbildung eben noch getrennt wiedergegeben werden. Nach der ABBEschen Theorie ist die Auflösung durch die Wellenlänge der verwendeten Strahlung begrenzt. Sie liegt für das Lichtmikroskop bei 0,2 μ. Das entspricht der halben Wellenlänge des blauen Lichts. Das Ultraviolett-Mikroskop hat lediglich eine Steigerung auf 0,1 μ gebracht. Ein entscheidender Fortschritt kann nur mit einer wesentlich kürzerwelligen Strahlung erzielt werden, die uns in den schnellen Elektronen zur Verfügung steht. Ihre Wellenlänge ist um eine Größenordnung kleiner als der Durchmesser der Atome.

II. Das Elektronenmikroskop.

1. Aufbau.

Der gesamte Weg der Elektronen befindet sich im Hochvakuum von 10^{-4} Torr. Der Strahlengang eines Elektronenmikroskops ist dem eines Projektions-Lichtmikroskops vergleichbar. An die Stelle der Glaslinsen im Lichtmikroskop treten im Elektronenmikroskop rotationssymmetrische elektrische oder magnetische Felder, die die Aufgabe der Linsen übernehmen und daher auch als solche bezeichnet werden. Die Elektronen werden an einer Glühkathode oder in einem Gasentladungsraum in Freiheit gesetzt, im elektrischen Feld von 30 bis 100 KV beschleunigt und durchsetzen das Objekt, das in zwei oder drei Stufen, dem Objektiv und den Projektiven, vergrößert und auf einen Leuchtschirm oder eine Photoplatte projiziert wird. Durch die auftreffenden Elektronen wird der Leuchtschirm zu sichtbarem Leuchten angeregt. Die photographische Platte wird durch die Elektronen unmittelbar „belichtet".

Zur Auswertung aller Einzelheiten, die eine hochaufgelöste elektronenmikroskopische Abbildung enthält, ist eine 100 000 bis 150 000fache Gesamtvergrößerung nötig. Dies sei an einem Beispiel kurz erläutert:

Auf einer unter optimalen Bedingungen hergestellten Aufnahme eines sehr feinstruktuierten Objektes lassen sich noch Teilchen mit einem Abstand von 2.10^{-6} mm trennen. Das menschliche Auge trennt aber nur Bildpunkte mit einem Abstand von etwa 2.10^{-1} mm. Der Ab-

stand der Teilchen muß also mindestens auf das 10^5fache vergrößert werden, damit sie mit dem Auge noch als getrennt angesehen werden. Die „förderliche Vergrößerung" ist in diesem Falle 100 000fach.

Eine derart hohe elektronenoptische Vergrößerung erfordert jedoch eine sehr große Intensität des Elektronenstrahls im Objekt, damit das Leuchtschirmbild zur Beobachtung und zum Einstellen des Mikroskops genügend hell erscheint, denn die Intensität der Objektbeleuchtung muß mit dem Quadrat des Vergrößerungsmaßstabes gesteigert werden, wenn die Helligkeit des Bildes gleich bleiben soll. Bei sehr intensiver Bestrahlung besteht die Gefahr, daß das Objekt durch übermäßige Erhitzung zerstört wird. Man begnügt sich deshalb im allgemeinen mit einer niedrigeren elektronenoptischen Vergrößerung und erzielt die förderliche Gesamtvergrößerung durch Betrachtung des Leuchtschirmbildes mit einem lichtstarken Beobachtungsmikroskop von 5 bis 20facher Vergrößerung. Auch die photographischen Aufnahmen können ohne wesentlichen Verlust an Bildgüte 5 bis 10fach nachvergrößert werden, wenn man feinkörnige Platten verwendet. Die geringere elektronenmikroskopische Vergrößerung bietet den weiteren Vorteil des größeren Gesichtsfeldes.

2. Wechselwirkung zwischen Objekt und Elektronenstrahl.

Die Elektronen werden beim Durchgang durch Materie gestreut und erleiden zum Teil diskrete Geschwindigkeitsverluste. Sie geben Energie an das Objekt ab, das sich hierbei erwärmt. Die Temperaturerhöhung ist um so größer, je intensiver der Elektronenstrahl und je dicker das Präparat ist. RUESS (*75*) hat die thermische Zersetzung von Graphitoxyd im Elektronenmikroskop beobachtet, die bei 270° C einsetzt, und KÖNIG (*53*) ist es — allerdings unter extremen Bedingungen — sogar gelungen, Kohlenstoff zu schmelzen.

Die elektronenmikroskopische Abbildung kommt durch die unterschiedliche Streuung der Elektronen an verschiedenen Objektpunkten zustande. Der gestreute Anteil ist um so größer, je dicker die Schicht und je größer das mittlere Atomgewicht und die Dichte der bestrahlten Substanz ist. Schweratomige Stoffe ergeben daher bei geringen Dickeunterschieden im Präparat größere Kontraste in der Abbildung als solche niedrigen Atomgewichts. Die größte noch durchstrahlbare Objektdicke hängt demnach in starkem Maße vom Atomgewicht der im Präparat enthaltenen Elemente ab. Sie liegt für Stoffe niedriger Ordnungszahl in der Größenordnung einiger Tausend ÅE und ist für die schwersten Elemente etwa 10mal kleiner. Die Werte gelten für 50 kV-Elektronen. Die Durchdringungsfähigkeit der Elektronen wächst mit ihrer Geschwindigkeit. Die Durchstrahlung eines gegebenen Objektes kann also durch Erhöhung der Geschwindigkeit der Elektronen

erhöht werden. Es ist jedoch in jedem Fall zweckmäßig, die Objekte so dünn wie möglich zu präparieren, damit sich feine Strukturen nicht überlagern und damit unsichtbar werden. Der grundsätzliche Vorzug des Elektronenmikroskops besteht in seinem Auflösungsvermögen bei der Abbildung dünner Schichten. Andererseits kann man den Kontrast der Abbildung dünner Objekte, die aus leichten Elementen bestehen, durch die Wahl einer niedrigen Beschleunigungsspannung erhöhen.

3. Zusatzeinrichtungen.

Da das Elektronenmikroskop mit sehr kleiner Beleuchtungs- und Objektivapertur arbeitet — sie beträgt nur etwa 1/1000 derjenigen des Lichtmikroskops — ist die Abbildung sehr *tiefenscharf*. Objekte von einem μ Tiefenausdehnung erscheinen auch bei hoher Vergrößerung in allen Ebenen scharf. *Raumbildpaare*, die durch Aufnahme des Objektes unter verschiedenen Neigungswinkeln zum Strahl hergestellt werden, vermitteln auch von tief gestaffelten Objekten einen räumlichen Eindruck, da die Abbildung über den ganzen Objektbereich scharf ist. Man erhält die Raumbilder, indem man das Objekt für die erste Aufnahme bis zu 6 Grad nach der einen Seite, für die zweite Aufnahme um denselben Betrag nach der entgegengesetzten Seite neigt.

Die elektronenmikroskopische Abbildung allein sagt nicht immer Endgültiges über die stoffliche Zusammensetzung des Objektes aus, die für den Chemiker in erster Linie von Interesse ist. In derartigen Fällen kann das *Elektronenbeugungsdiagramm* eine wertvolle Ergänzung des Elektronenbildes sein. Es gibt Auskunft über die Krystallstruktur der Substanz, die Größe der Krystallite und ihre Orientierung, wodurch eine Analyse äußerst geringer Stoffmengen ermöglicht wird. Mit modernen Elektronenmikroskopen können Beugungsdiagramme von Objektbereichen mit wenigen μ Durchmesser aufgenommen werden, die der elektronenmikroskopischen Abbildung eindeutig zugeordnet werden können. Ein Beugungsdiagramm erhält man, wenn man die abbildenden Linsen ausschaltet. Die unter dem Objekt befindlichen Linsen müssen genügend weite Öffnungen besitzen, um die gebeugten Elektronen hindurchzulassen.

Zum Studium von *Schmelz-* und *Krystallisationsvorgängen*, sowie von Krystallumwandlungen bei erhöhter Temperatur hat v. ARDENNE (*1*) einen heizbaren Objektträger entwickelt. Er besteht aus einem elektrisch geheizten Platinband mit einer Bohrung, über die eine temperaturbeständige Trägerfolie gespannt wird.

Zur Beobachtung von *chemischen Umsetzungen* im Elektronenmikroskop haben RUSKA (*77*) und v. ARDENNE (*2*) Reaktionskammern gebaut, die es ermöglichen, Gase von einem Druck bis etwa 30 Torr auf das Objekt einwirken zu lassen. In der Strahlrichtung ist die Ausdehnung der Kam-

mern sehr gering, so daß das Gas die Abbildungsgüte nur wenig beeinflußt. Die Kammer ist nach der einen Seite durch den Objektträger abgeschlossen, nach der anderen steht sie durch eine feine Blende mit dem hochevakuierten Mikroskopraum in Verbindung, die den Elektronenstrahl hindurchtreten läßt, aber das Eindringen zu großer Gasmengen verhindert.

III. Herstellung der Präparate.

1. Objektträger.

Da es für Elektronen völlig „durchsichtige" Stoffe nicht gibt, verwendet man als Objektträger im Elektronenmikroskop dünne, strukturlose Folien, die die Elektronen *möglichst wenig* streuen und bremsen. Filme von 100 bis 200 ÅE Dicke sind bereits genügend fest, da sie nur sehr kleine Flächen freitragend zu überspannen brauchen. Sie werden durch feinmaschige Drahtnetze oder Metallplättchen mit Bohrungen von 0,03 bis 0,1 mm gehalten.

Im allgemeinen werden Häutchen aus *Kollodium* verwandt, die nach dem Verfahren von TRENKTROG (*78*), (*84*) durch Spreiten einer Lösung von Kollodium in Amylacetat auf einer Wasseroberfläche einfach hergestellt werden können. Das Kollodium zersetzt sich zwar unter dem ionisierenden Einfluß des Elektronenstrahls, es bleibt jedoch ein Kohlenstoffilm zurück, der im Vakuum des Elektronenmikroskops sehr temperaturbeständig ist (*54*).

Neuerdings hat HAST (*36*) Trägerfolien von weniger als 100 ÅE Dicke durch Aufdampfen von *Beryllium auf Glycerin* im Hochvakuum hergestellt. Diese Filme sind im Elektronenmikroskop kaum mehr sichtbar, stören also die Abbildung noch weniger als Kollodiumfolien.

Strukturlose Folien aus *Aluminiumoxyd*, die an Luft temperaturbeständig sind, haben HASS und KEHLER (*34*) durch anodische Oxydation von aufgedampften Aluminiumschichten sehr glatter Oberfläche erhalten. Die Oxydation erfolgt in ca. 3%iger wäßriger Lösung von Ammoniumtartrat oder Ammoniumborat bei einer Spannung von 15 bis 25 V. Es entsteht dabei ein strukturloser, 100 bis 300 ÅE dicker Film. Innerhalb dieser Grenzen hängt die Dicke nur von der angelegten Spannung ab. Der Oxydfilm sperrt den Stromdurchgang, sobald er die Grenzdicke erreicht hat. Damit kommt die Oxydation von selbst zum Stillstand. Die Oxydschicht wird in gesättigter $HgCl_2$-Lösung vom Aluminium abgelöst, in 5%iger Salzsäure und schließlich in destilliertem Wasser gewaschen, aus dem sie mit einem Objektträger aufgefischt wird. Sie ist bis 600° C verwendbar.

Trägerfilme aus *Siliciumdioxyd* sind sogar bis 900° C strukturlos und beständig. Nach HASS und KEHLER (*35*) wird das sich aus einem Gemisch von Si und SiO_2 bei 1100 bis 1200° C bildende, dampfförmige

Siliciummonoxyd im Vakuum auf einer Steinsalzspaltfläche niedergeschlagen, von der der zusammenhängende SiO-Film in Wasser abgelöst werden kann. GRUBE und SPEIDEL (*29*) haben auf röntgenographischem Wege und KÖNIG (*55*) durch Elektronenbeugung an Aufdampfschichten festgestellt, daß SiO auch in festem Zustand zunächst beständig ist. Es wird jedoch in dünner Schicht an Luft vollständig zu SiO_2 oxydiert, wie HASS durch optische Messungen zeigen konnte. Der strukturlose SiO_2-Film rekrystallisiert erst bei 900° C.

2. *Präparation feindisperser Stoffe.*

Feindisperse Stoffe können auf den Objektträgerfilm aufgestäubt, Rauche können unmittelbar darauf aufgefangen werden. Suspensionen bringt man als Tröpfchen auf den Trägerfilm. Die Flüssigkeit läßt man eintrocknen (*78*). Schon eine sehr geringe Löslichkeit der suspendierten Stoffe kann dabei stören. Wenn sich der in Lösung gegangene Anteil beim Eintrocknen ausscheidet, entstehen Teilchen, die in der Ursubstanz nicht vorhanden waren. Welch geringe Stoffmengen im Elektronenmikroskop noch sichtbar gemacht werden können, möge das folgende Beispiel zeigen:

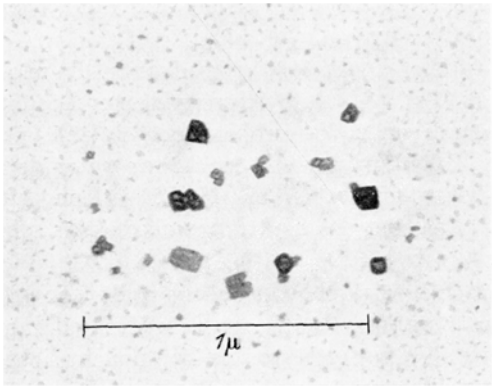


Abb. 1. Bariumsulfat-Krystalle, Eintrocknungsrückstand von gesättigter $BaSO_4$-Lösung auf dem Objektträger.

Ein Tröpfchen von 0,2 mm^3 einer gesättigten Lösung von Bariumsulfat, das etwa 5.10^{-10} g $BaSO_4$ enthält, hinterläßt beim Eintrocknen auf dem Objektträger größere oder kleinere Kryställchen. Abb. 1 zeigt ein Nest solcher Krystalle. Das Gesamtgewicht der abgebildeten Teilchen liegt in der Größenordnung von 10^{-14} g. Auch ein Tröpfchen einfach destillierten Wassers hinterläßt auf dem Objektträger schon sichtbare Rückstände.

Ebenso wie das Lichtmikroskop zum Nachweis kleiner Stoffmengen dient, kann das Elektronenmikroskop zu mikroanalytischen Zwecken benutzt werden. Systematische Untersuchungen über elektronenmikroskopische Analyse sind zwar noch nicht bekannt geworden, aber es besteht durchaus die Möglichkeit, 1000 mal kleinere Stoffmengen als mit dem Lichtmikroskop zu identifizieren.

Kolloide, die in wässriger Suspension negativ geladen sind, ballen sich infolge der elektrostatischen Abstoßung von der gleich geladenen

Kollodiumfolie beim Auftrocknen zusammen. Durch die Aggregation wird eine Abbildung der ursprünglichen Aufteilung sehr erschwert. ZBINDEN und HUBER (*90*) haben daher die Kollodiumfolie durch Eintauchen in Lösungen von Cinchoninchlorhydrat, Chininchlorhydrat und Methylenblau umgeladen, worauf sich Vanadinpentoxyd fein verteilt auftrocknen ließ.

Sehr feine Pulver, die zum Klumpen neigen, lassen sich gleichmäßig verteilen, wenn man sie in Kollodiumlösung dispergiert und einen Tropfen der Suspension auf einer Wasseroberfläche spreitet (*56*). Die Kollodiumfolie, in der die Teilchen eingebettet sind, wird mit einem Objektträger aufgefangen.

3. Oberflächenabbildung.

Oberflächen dicker Objekte lassen sich zwar unter sehr kleinen Winkeln streifend beobachten, die Abbildungen sind jedoch stark in einer Richtung verzeichnet und von geringer Auflösung (*13*). MAHL hat daher zur elektronenmikroskopischen Oberflächenabbildung den Weg über Abdruckfilme eingeführt, die im *Durchstrahlungsbild* die Oberflächenstruktur des Objektes wiedergeben. Im Abdruckfilm erscheinen Bereiche verschiedener Höhe und Neigung auf der abzubildenden Oberfläche als Bereiche verschiedener Dicke in der Durchstrahlungsrichtung. Hierdurch kommt ein plastisch wirkendes Bild zustande.

a) Oxydabdruck. MAHL (*57*) hat eine Methode zur Abbildung von Aluminium und dessen Legierungen entwickelt. Die abzubildende Oberfläche wird unter denselben Bedingungen oxydiert, die bereits für die Herstellung der Objektträgerfilme aus Aluminiumoxyd angegeben worden sind. Je dünner der Oxydfilm ist, desto mehr Feinheiten in der Struktur der Metalloberfläche gibt er wieder. Schichten, die dünner als 100 ÅE sind, lassen sich jedoch nur schwer zusammenhängend vom Metall lösen.

Der Oxydfilm ist an allen Stellen gleich dick und hat die Form der Metallschicht, auf der er entstanden ist (Abb. 2, I). In der Durchstrahlung kommt ein Reliefbild zustande, da die einzelnen Flächenelemente je nach ihrer Neigung zum Elektronenstrahl heller oder dunkler erscheinen. Je länger der Weg der Elektronen durch die Schicht ist, desto mehr Elektronen werden abgebeugt, um so dunkler wird also das Bild an dieser Stelle.

b) Lackabdruck. Der ebenfalls von MAHL in die Elektronenmikroskopie eingeführte Lackabdruck (*57*) ist allgemeiner anwendbar. Die Oberfläche, von der der Abdruck genommen werden soll, wird mit einer etwa 0,1%igen Lösung von Kollodium in Amylacetat übergossen. Überschüssiges Kollodium läßt man durch Neigen der Probe ablaufen. Der Rest trocknet zu einem 200 bis 300 ÅE dicken Film, der auf me-

chanischem oder chemischem Wege von der Unterlage abgelöst wird. Der Lackfilm trägt auf der einen Seite die Prägung der Oberfläche, auf der anderen Seite ist er weitgehend eingeebnet (Abb. 2, IIa). Vertiefungen im Objekt zeichnen sich daher als Verdickung im Film ab, Erhöhungen dagegen als dünne Stellen. In Amerika wird heute vielfach Formvar an Stelle von Kollodium verwendet, da es größere Festigkeit besitzen soll.

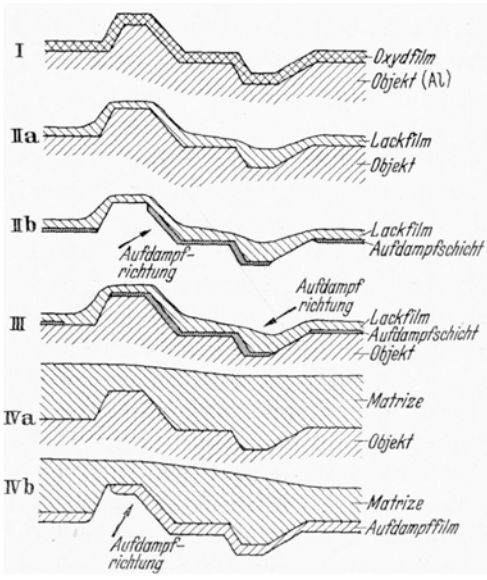


Abb. 2. Schematische Darstellung der Abdruckverfahren. *I* = Oxydabdruck, *IIa* = Lackabdruck, *IIb* = Bedampfter Lackabdruck, *III* = Aufdampfabdruck, *IV* = Matrizenabdruck, *a* = Lackmatrize auf dem Objekt, *b* = Matrize mit selbsttragendem Aufdampffilm.

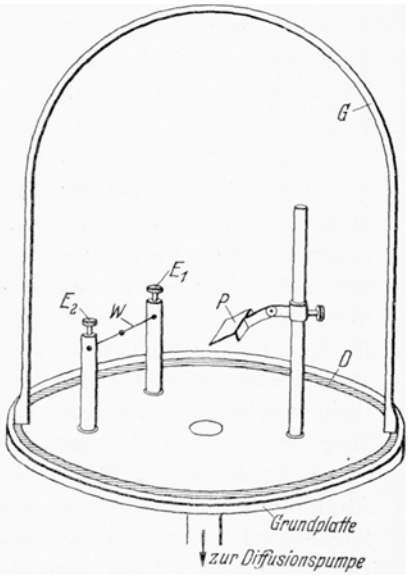


Abb. 3. Aufdampfapparatur. *G* = Glasglocke, *D* = Dichtungsring (Gummi), E_1, E_2 = Elektroden zum Anschluß des Heizdrahtes oder Schiffchens, E_1 isoliert und hochvakuumdicht nach außen geführt, *W* = Wolframdraht mit zu verdampfendem Metall *P* = Verstellbarer Präparateträger.

c) **Bedampfter Lackabdruck.** Einfache Lackabdrucke vermögen Oberflächenstrukturen nur mit einer Auflösung von der Größenordnung der Dicke des Abdruckfilms wiederzugeben. Man kann die Kontraste jedoch steigern, wenn man die Lackfolie auf der Seite, der das Oberflächenrelief aufgeprägt ist, unter einem Winkel von 20 bis 30° im Vakuum mit einem Schwermetall bedampft (*58*) (Abb. 3). Die einzelnen Flächenelemente werden dabei je nach ihrer Neigung zur Dampfquelle, einem durch elektrischen Stromfluß geheizten Wolframdraht, auf dem sich die zu verdampfende Substanz befindet, verschieden dick belegt (Abb. 2, IIb).

Geeignet zur Schrägbedampfung sind Pt, Au, Pd, Cr sowie WO_3. Letzteres läßt sich leicht aus Schiffchen von dünnem Wolframblech

verdampfen. Von Pt und Au genügt eine Auflage von 10 bis 20 ÅE, die wegen des hohen Atomgewichts und der großen Dichte dieser Metalle hinreichenden Kontrast liefert. Das Elektronenbild wirkt plastisch wie ein unter dem Aufdampfwinkel beleuchtetes Relief, zumal dann, wenn man das photographische Negativ betrachtet. Aus der Länge der Schatten können die Höhenunterschiede im Oberflächenrelief bestimmt werden (*67*).

d) Aufdampfabdruck. Bei der Abbildung sehr feiner Strukturen stört es manchmal, daß sich scharfe Kanten in dem nicht ganz starren Lackfilm durch die Oberflächenkräfte etwas abrunden, sobald der Film vom Objekt abgelöst ist. Auch ein bedampfter Lackfilm zeigt daher die scharfen Konturen des Objektes nicht mehr. Bedampft man dagegen die abzubildende Oberfläche selbst mit dem das Bild bestimmenden Schwermetallfilm (11), etwa Platin, in einer Dicke von 20 bis 30 ÅE und verstärkt diese Schicht nachträglich durch einen Kollodiumfilm (Abb. 2, III), so wirkt sich ein Verziehen der Lackfolie nicht mehr aus, da scharfe Kanten im Objekt durch scharf abgesetzte Dickenunterschiede in der Aufdampfschicht bereits festgelegt sind. Das Verfahren ist anwendbar, wenn sich die Doppelschicht auf chemischem Wege von der Unterlage ablösen läßt.

e) Matrizenabdrucke. Es gelingt nicht immer, die dünnen, durchstrahlbaren Abdruckfilme vom Objekt abzuheben. Dagegen lassen sich *stärkere* Lackmatrizen fast immer ohne Zerstörung abziehen oder durch Ätzmittel vom Objekt trennen. HEIDENREICH und PECK (*38*) verwenden für den Zwischenfilm *Polystyrol*, das gegen anorganische Reagenzien sehr widerstandsfähig ist. Auf die Matrize wird ein zusammenhängender Film aus *Siliciumdioxyd* oder *Siliciummonoxyd* schräg aufgedampft, der nach Auflösung des Polystyrols in Benzol freitragend abgebildet wird (Abb. 2, IV).

Von harten Objekten kann eine *Prägematrize* aus Aluminium hergestellt werden, von der ein Oxydabdruck genommen wird (*81*). Das Verfahren eignet sich besonders für metallographische Untersuchungen.

Die bisher veröffentlichten Präparationsmethoden sind zum größten Teil von Elektronenmikroskopikern entwickelt worden, die zunächst von sich aus nach Anwendungsgebieten für das Elektronenmikroskop gesucht und schließlich gemeinsam mit den jeweiligen Fachleuten Probleme aus deren Gebieten in Angriff genommen haben. Der Chemiker, der künftig das Elektronenmikroskop in seinen Dienst stellt, wird sich deshalb geeignete Präpariermethoden zum Teil selbst schaffen oder die bekannten Methoden seinen speziellen Bedürfnissen anpassen müssen.

IV. Beispiele untersuchter Stoffsysteme.

1. Vorbemerkung.

Die ersten für die praktische Anwendung reifen Übermikroskope wurden vor etwa einem Jahrzehnt in Deutschland gebaut. In der Zwischenzeit sind durch die Anwendung von Elektronenmikroskopen auf fast allen Gebieten der Naturwissenschaften viele neue Erscheinungen bekannt geworden. Es kann nicht mehr die Aufgabe eines einzelnen Berichtes sein, die chemischen Ergebnisse lückenlos aufzuzählen. Dagegen erscheint es zweckmäßig, solche Beispiele hervorzuheben, die wesentliche morphologische Erfahrungen enthalten und gegebenenfalls als Grundlage für systematische Untersuchungen dienen können. Dabei müssen die beobachteten *Stoffe* in den Vordergrund gestellt werden, und daraus wiederum ergibt sich eine natürliche Trennung der Untersuchungen auf den Gebieten der anorganischen und der organischen Chemie.

Abgrenzbare Körperformen, wie sie das Elektronenmikroskop abbildet, können für chemische Fragestellungen eine doppelte Bedeutung haben:

1. Sie können in Beziehung stehen zum inneren Aufbau, das heißt zur *Struktur* der Stoffe.

2. Sie können in Beziehung stehen zum *Reaktionsweg*, auf dem sich die Stoffe bildeten.

Beide Beziehungen sind Gegenstand einer Forschungsrichtung, die allgemein als chemische Morphologie bezeichnet wird (*49*).

In der anorganischen Chemie werden systematische Versuche zur Aufklärung der Zusammenhänge zwischen dem Ablauf chemischer Reaktionen einerseits und den sichtbaren Formen der Ausgangsprodukte oder der Zwischenprodukte oder der Endprodukte andererseits seit etwa 40 Jahren ausgeführt (*51*). Dafür stand zunächst nur das Lichtmikroskop zur Verfügung. Viele der mit seiner Hilfe gewonnenen Erfahrungen behalten ihre Gültigkeit auch in dem Bereich, den das Elektronenmikroskop neu erschließt. Einige dieser Erfahrungen müssen durch die Anwendung des Elektronenmikroskops verfeinert werden (*25*). Durch das höhere Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops wird die Spanne verringert, die zwischen den Bausteinen der Moleküle oder der Krystalle (den eigentlichen Zentren chemischer Vorgänge) und den sichtbaren Formen der Aggregationen besteht. Dadurch werden Rückschlüsse von den sichtbaren Formen auf Elementarvorgänge sicherer.

2. Kohlenstoff.

Feindisperser Kohlenstoff, der als Ruß wie auch als Aktivkohle in der Technik für viele Zwecke verwendet wird, wurde vor allem von

HOFMANN und Mitarbeitern eingehend untersucht. Bei diesen Arbeiten ergänzen röntgenographische Strukturbestimmung und elektronenmikroskopische Abbildung einander. Ruß ist nahezu reiner Kohlenstoff, der aus mehr oder weniger runden Teilchen von etwa 100 ÅE bis 5000 ÅE besteht. Die Teilchengröße hängt von den Entstehungsbedingungen ab. Rußeaus Gasflammen weisen in der Regel kleine Teilchen auf (Abb. 4), Ruße aus brennenden Flüssigkeiten (Flammruße) sind im allgemeinen grobteiliger und unterschiedlicher in der Korngröße. Ausgesprochen runde Teilchen verschiedener Größe erhält man bei der thermischen Zersetzung von Kohlenwasserstoffen (Abb. 5), während die in der Flamme bei höherer Temperatur entstandenen Ruße teilweise die Andeutung einer Sechseckstruktur zeigen, die auf eine angenäherte Orientierung der Graphitkrystalle hinweist (*20*). Charakteristisch für viele Ruße ist die Bildung langer, sehr stabiler Ketten.

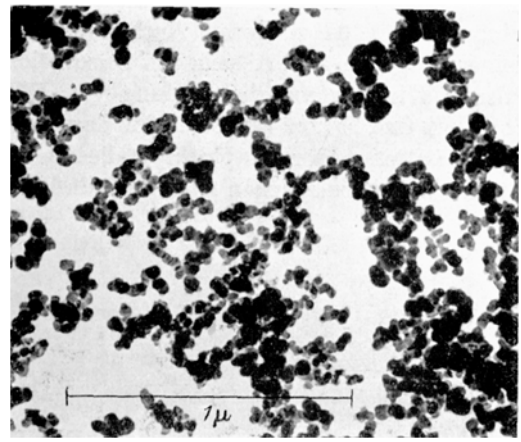


Abb. 4. Gasruß.

Röntgenographisch wurde nachgewiesen (*39*), (*42*), (*43*), daß die Teilchen von Gas- und Flammrußen aus Graphitkrystallen von etwa 20 ÅE bestehen. Lediglich bei sehr hoher Temperatur durch Explosion von Acetylen entstandener Ruß enthält größere Krystallite (*6*). Wie RAGOSS, HOFMANN und HOLST (*70*) durch Erhitzen von „Thermax", einem durch thermische Zersetzung von Erdgas erzeugten Ruß, zeigen konnten, setzt die Rekrystallisation in den 4000 ÅE großen, runden Teilchen bei 1300° C ein. Bei 3000° C bestehen die Partikel aus nur mehr wenigen

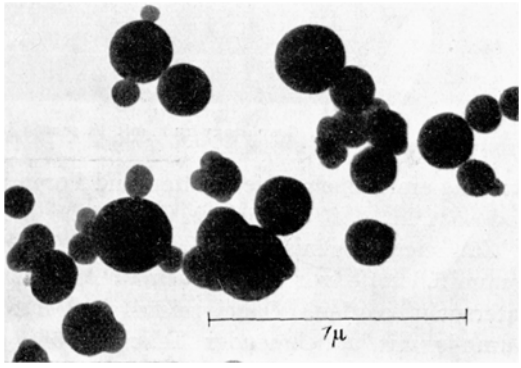


Abb. 5. Durch thermische Zersetzung von Kohlenwasserstoffen erzeugter Ruß.

Graphitkrystallen. Die fortschreitende Rekrystallisation gibt sich im Elektronenbild durch das Auftreten von kleinen Zacken am Rand der Teilchen zu erkennen, die mit steigender Temperatur in gerade, um 120 Grad gegeneinander geneigte Kanten übergehen. Das Teilchenvolumen wird dabei durch Ausheilung feinster Poren und Spalten kleiner, dagegen ändert sich das Adsorptionsvermögen und die katalytische Wirkung auf die Bildung von HBr aus H_2 und Br_2 nicht. HOFMANN und HÖPER (*40*) schließen daraus, daß für diese Eigenschaften die *Basis*flächen der Graphitkrystalle an der Oberfläche der Teilchen verantwortlich zu machen sind, und daß die *Kanten* keine bevorzugte

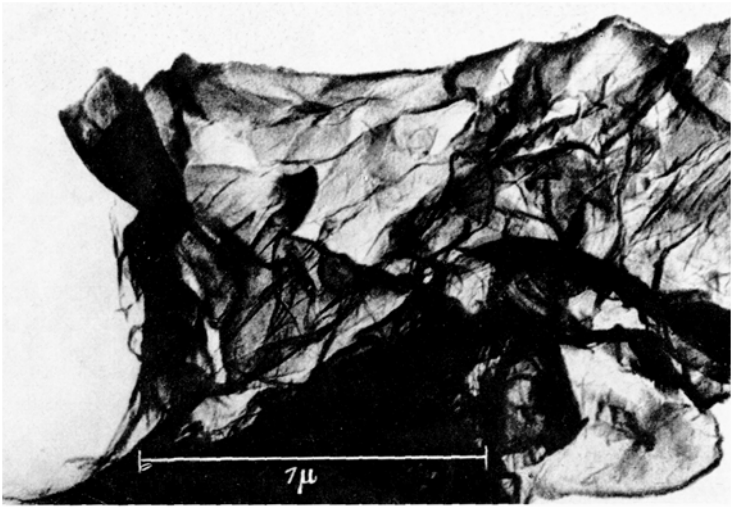


Abb. 6. Graphitoxydruß mit Pt schräg bedampft.

Stellung einnehmen. Die Spalten und Poren in nicht getempertem Ruß sind so fein, daß die innere Oberfläche nicht zur Wirkung kommt.

Zahlreiche technische Ruße sind im Hinblick auf ihre Eignung als Gummifüllstoffe vor allem auch in Amerika elektronenmikroskopisch untersucht worden. Dabei zeigte sich, daß die Zerreißfestigkeit des Gummis mit abnehmender Teilchengröße des beigemischten Rußes steigt (*37*). Auch die Rußketten, die im Gummi erhalten bleiben, haben einen Einfluß auf die Eigenschaften der fertigen Gummis.

Aktivkohlen zeigen im Elektronenmikroskop eine äußerst poröse Struktur. Sie sind aus Körnchen von 30 bis 50 ÅE aufgebaut, die untereinander zu einem lockeren räumlichen Netzwerk verbunden sind. Aus der elektronenmikroskopisch ermittelten Teilchengröße ergibt sich eine Oberfläche von 1000 m^2/g, was mit Adsorptionsmessungen in Einklang steht. Die Lücken zwischen den Teilchen haben eine Weite von

30 bis 100 ÅE. Die Übereinstimmung der Oberflächenmessung aus der Teilchengröße und durch Ermittlung des Adsorptionsvermögens beweist, daß die gesamte innere Oberfläche zugänglich ist. Beim Erhitzen auf 2000° C rekrystallisieren zunächst die einzelnen Körnchen, die dann bei 3000° C zu größeren Krystallen zusammenwachsen (*42*), (*80*).

Graphitoxydruß, der durch spontane thermische Zersetzung von Graphitoxyd bei 250 bis 300° C im Vakuum gebildet wird, besteht im Gegensatz zu allen übrigen Rußen aus zerknitterten Folien mit einer Flächenausdehnung von 1 μ und darüber, wie RUESS (*75*), (*76*) zeigen konnte (Abb. 6). Die Folien werden aus Graphitschichtenpaketen gebildet, die nach röntgenographischen Messungen eine Dicke von einigen μ und eine Längsausdehnung der krystallinen Bereiche von zum Teil mehr als 500 ÅE besitzen. Im Elektronenmikroskop wird an bedampften Präparaten (*12*) die bevorzugte Anlagerung von Gold- oder Platinkörnern entlang von Stufen sichtbar, die gelegentlich über 1000 bis 2000 ÅE geradlinig verlaufen und miteinander Winkel von 60 oder 120° bilden. Nach dem Elektroneninterferenzbild eines Schüppchens von etwa 4 μ Durchmesser sind die krystallinen Bereiche nicht streng, jedoch nach einer Vorzugsrichtung orientiert. Die Dicke der Folien wurde aus der Länge der Bedampfungsschatten zu etwa 20 ÅE ermittelt, was etwa 6 C-Schichten im Graphitgitter entspricht.

3. Metalle und Legierungen.

Das elektronenmikroskopische Oberflächenbild vermag Feinheiten in der Gefügestruktur wiederzugeben, die mit dem Lichtmikroskop nicht mehr zu erfassen sind. Es gibt Aufschluß über feinste Ausscheidungen, wie sie Eutektika und zerfallene Mischkrystalle darstellen. Es ist deshalb auch zur Bestimmung von Phasengrenzen in Mehrstoffsystemen geeignet, wenn andere Methoden wegen der Kleinheit der auftretenden Effekte versagen.

a) Ätzstrukturen. Am eingehendsten sind die Ätzstrukturen von Aluminium und seinen Legierungen mit Hilfe des Oxydabdruck-Verfahrens untersucht worden. MAHL hat durch Ätzen von Reinstaluminium mit Salzsäure würfelförmige Oberflächenstrukturen erhalten (*59*). Auf Grund einer Abschätzung der energetischen Verhältnisse beim Abbau des kubisch-flächenzentrierten Al-Gitters wäre nach der Theorie von KOSSEL und STRANSKI für konkave Ätzfiguren eine Freilegung der Würfel- und Oktaederflächen, für konvexe Ätzfiguren eine abgerundete Form zu erwarten (*64*), (*82*). Solche Strukturen entstehen tatsächlich durch Ätzen mit trockenem HCl-Gas bei 300° C. Der Abbau längs der Würfelflächen kann dagegen durch die primäre Bildung einer monomolekularen Aluminiumoxydschicht in der wässrigen HCl-Lösung erklärt werden. Dabei muß die Oxydation des Aluminiums schneller ver-

laufen als die Auflösung des Oxyds, so daß die Oxydation und nicht der Angriff der Säure für die Abtragung des Aluminiums maßgebend ist.

Die Ätzfiguren zeigen häufig eine Feinzeichnung, die offenbar von geringen Verunreinigungen beeinflußt wird und auf eine Mosaikstruktur hinweist. Auf Abb. 7, die mit Salzsäure und Flußsäure geätztes Reinstaluminium darstellt, ist sie an einigen Blöcken zu erkennen, während die übrigen eine glattere Oberfläche zeigen. Daraus ergibt sich die Empfindlichkeit des elektronenmikroskopischen Nachweises von Verunreinigungen. Eine besonders regelmäßige Mosaikstruktur von 99,6%igen Aluminium, das mit siedender konzentrierter Salzsäure geätzt worden ist, zeigt Abb. 8. Die Blöckchen haben eine Kantenlänge von 700 bis 1000 ÅE.

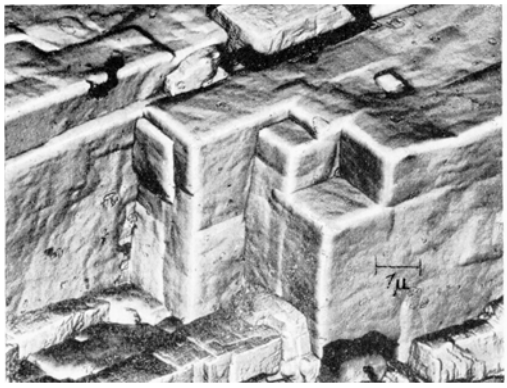


Abb. 7. Reinst-Aluminium mit Salzsäure und Flußsäure geätzt, Oxydabdruck. Mosaikstruktur an einigen Blöckchen erkennbar.

Abb. 8. Al (99,6%) mit siedender konzentrierter Salzsäure geätzt, Oxydabdruck. Mosaikstruktur.

MAHL und PAWLEK (*62*) konnten nachweisen, daß sich in einer Legierung von Al mit 5,7% Mg (Hydronalium) bei Anlaßtemperaturen von 200 bis 300° C Al_3Mg_2 zunächst in fein verteilter Form an den Korngrenzen ausscheidet. Nach längerem Erhitzen werden die Ausscheidungen größer und treten auch in den Körnern selbst in regelloser Verteilung auf.

Bei Duraluminium (*62*) der Zusammensetzung 95,7% Al, 4% Cu, 0,3% Mg konnte die Ausscheidung von $CuAl_2$ sichtbar gemacht werden. Beim Anlassen der abgeschreckten Legierungen scheidet sich die Verbindung in Form von Stäbchen längs der Würfelebenen des Aluminiums aus, die bei längerem Tempern wachsen und eine Länge von mehr als 1 μ erreichen.

Wegen ihrer technischen Wichtigkeit sind die Kohlenstoffstähle mehrfach untersucht worden (*38*), (*63*), (*66*), (*85*), (*89*). Das Elektronenmikroskop läßt vor allem die feinstrukturierten Zerfallsgefüge erkennen, die beim Abkühlen und Anlassen der Stähle entstehen und mit dem

Lichtmikroskop nicht mehr aufgelöst werden können. Perlit, ein eutektoides Gemenge von α-Fe und Fe_3C, das beim Zerfall von Austenit entsteht, zeigt lamellare Struktur. Die Breite der Lamellen hängt von den Abkühlungsbedingungen und der Zusammensetzung des Stahls ab. Sehr feine Streifenstrukturen werden in abgeschreckten Stählen beim Zerfall des metastabilen Martensit beobachtet.

Zur Klärung der noch unbekannten Ausscheidungsvorgänge in Legierungen wird noch eine große Zahl von Untersuchungen notwendig sein. Oftmals ändert sich das elektronenmikroskopische Gefügebild innerhalb einer Probe von Korn zu Korn, während im Lichtmikroskop keine Unterschiede zu erkennen sind. Beim Vordringen in die kleineren Dimensionen treten zum Teil völlig neuartige Erscheinungen auf. Sicher werden auch neue Ätzmethoden herangezogen werden müssen, um die feineren Strukturen sichtbar zu machen, die das Elektronenmikroskop abzubilden vermag.

b) Aufdampfschichten. Dünne Metallschichten, wie sie durch Aufdampfen im Vakuum erhalten werden, sind der unmittelbaren Abbildung im Elektronenmikroskop und der Untersuchung durch Elektronenbeugung des abgebildeten Bereiches zugänglich. Ihre Struktur und die Größe der Krystallite hängt von den Aufdampfbedingungen sowie von der Beweglichkeit der Metallatome auf der Unterlage ab, auf der sie niedergeschlagen werden. Es bilden sich zunächst Inseln, die durch weitere Kondensation von Dampf zu einer zusammenhängenden Schicht verwachsen. Cadmium, das schon unterhalb 500° C einen hinreichenden Dampfdruck entwickelt, bildet auf Kollodium vorwiegend sechseckige Krystalle, die selbst dann noch weit auseinanderliegen, wenn sie eine Größe von mehreren 1000 ÅE erreicht haben (*88*).

Silber (*32*) kondensiert sich auf Kollodium- oder Aluminiumoxyd-Folien bis zu einer mittleren Dicke von 150 ÅE in Form von rundlichen, voneinander getrennten polykrystallinen Tröpfchen, die sich noch stärker zusammenziehen, wenn die Unterlage während der Bedampfung erwärmt wird. Schichten von 350 ÅE Dicke enthalten Krystalle von über 1000 ÅE linearer Ausdehnung. Auf Steinsalz-Spaltflächen aufgedampftes Silber bildet Krystalle, die zur Unterlage orientiert sind.

Aluminium (*32*) ergibt schon bei einer Dicke von etwa 200 bis 250 ÅE zusammenhängende Schichten. Die Krystalle sind von der Größenordnung der Schichtdicke. Sie sind nicht nach einer Vorzugsrichtung orientiert, wie Hass durch Elektronenbeugung nachweisen konnte.

Antimon (*32*) schlägt sich auf Kollodium zunächst in Form von hexagonalen Säulen nieder, die mit der (0001)-Fläche auf der Trägerfolie aufliegen, wie das Elektronenbeugungsdiagramm zeigt. Mit wachsender Schichtdicke geht diese Orientierung verloren.

Strukturlos erscheinende metallische Aufdampfschichten sind im Elektronenmikroskop bisher nicht beobachtet worden. Auch die bei hohen Temperaturen verdampfenden Metalle wie Cr, Pt oder W bilden zunächst Körner, die bei weiterer Stoffzufuhr miteinander verwachsen.

c) **Photographische Schichten.** Aus photographischen Emulsionen isolierte AgBr-Krystalle wurden von v. ARDENNE sowie von HALL und SCHOEN elektronenoptisch untersucht. Bei der sehr starken Einwirkung der Elektronen, die etwa 10^8 mal so groß ist wie die normale Belichtung, bilden sich an den Silberbromid-Krystallen jeweils mehrere Silberkörner, die schließlich als Hörner aus dem Krystall herauswachsen, bis das Silberbromid ganz aufgezehrt ist (*3*). Belichtetes und entwickeltes

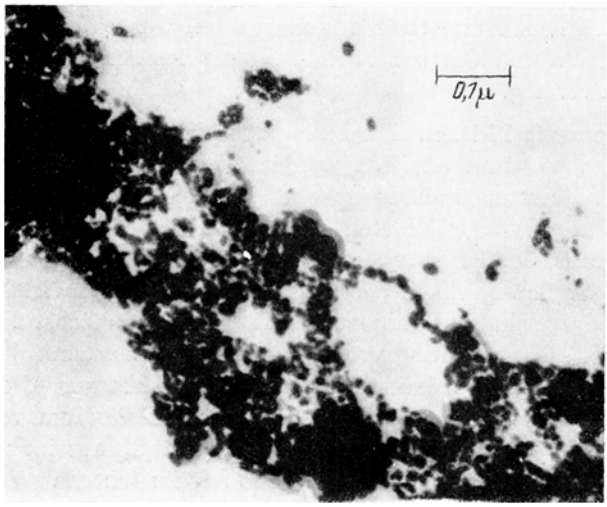


Abb. 9. Kolloidales Silber, Sol auf Kollodiumfolie eingetrocknet.

Silberbromid hinterläßt nach dem Fixieren Knäuel von dünnen Silberfäden. Die etwa 300 ÅE großen AgBr-Krystalle der sehr feinkörnigen Lippmann-Emulsionen bilden einzelne Silberfäden, die etwa 5mal so lang sind wie das Korn, aus dem sie entstanden sind (*31*). Silberbromid, das durch Umsetzung einer aufgedampften Silberschicht mit Bromdampf erzeugt worden ist, zeigt dasselbe Verhalten bei der Bestrahlung mit Elektronen wie AgBr-Krystalle aus photographischen Emulsionen (*30*).

d) **Kolloide Metalle** (Ag, Au, Pt, Pd). Sole von Ag und Au (*14*), (*48*) sind häufig untersucht worden, da sich die feindispersen Metalle wegen ihres hohen Atomgewichts und damit ihres großen Streuvermögens für Elektronen gut zur Bestimmung der Auflösung von Elektronenmikroskopen eignen. Silber wie Gold scheiden sich bei der Reduktion ihrer Salzlösungen in Teilchen aus, deren Größe zwischen 10 bis 30 ÅE und

etwa 2000 ÅE schwankt (Abb. 9). Wahrscheinlich existieren noch kleinere Teilchen, die jedoch noch nicht mit Sicherheit beobachtet werden konnten. Bei Silber zeigen auch die großen Teilchen kugelige Gestalt, was mit der Struktur von Aufdampfschichten dieses Metalls in Einklang steht. Gold bildet in wäßriger Lösung auch Oktaeder, während es sich aus dem Glasfluß des Goldrubins in Würfeln ausscheidet, wie durch die Beobachtung isolierter Krystalle (*9*) und durch Oberflächenabbildung von Bruchflächen (*11*) gezeigt werden konnte (Abb. 10).

Die Untersuchung von auf Asbest niedergeschlagenem Platin und Palladium hat ergeben, daß die Metalle in feinkörniger Form vorliegen und nicht gleichmäßige Überzüge auf Asbest bilden (*4*). Den auf einem

Abb. 10. Kolloidales Gold, würfelförmige Krystalle in einer Bruchfläche von Goldrubinglas. Aufdampfabdruck, Negativkopie.

Träger abgeschiedenen Platin- und Palladium-Kolloiden kommt wegen ihrer Verwendung als Katalysatoren eine besondere Bedeutung zu.

Die Form der Teilchen wird immer abgerundet erscheinen, solange ihre Größe mit der Auflösung der Abbildung vergleichbar ist. Soll die wahre Gestalt eines Polygons erkannt werden, muß es um so größer sein, je höher seine Eckenzahl ist (*14*). Die großen, rund erscheinenden Kolloide dürften demnach polykrystalline Körper sein, die von vielen kleinen, stumpf aneinanderstoßenden Krystallflächen begrenzt werden.

Zur Bestimmung des Au-Gehalts von Goldsolen haben RIEDEL und RUSKA (*73*) die Sole mit NaCl und LiCl versetzt, die Lösung vernebelt und die Tröpfchen auf dem Objektträger niedergeschlagen. Beim Eintrocknen hinterlassen die Tröpfchen Trocknungshöfe, aus deren Durchmesser das Tröpfchenvolumen abgeschätzt werden kann. Durch Aus-

zählen und Ausmessen der Au-Teilchen innerhalb eines Trocknungshofes läßt sich die Konzentration des Sols ermitteln.

4. Hydroxyde und Oxyde 2-wertiger Metalle.

Die schwerlöslichen Hydroxyde scheiden sich bei der Fällung aus wäßriger Lösung in sehr feiner Verteilung ab. Das Studium ihrer Morphologie erfordert daher ganz besonders die Anwendung des Elektronenmikroskops. Die durch Entwässerung der Hydroxyde gebildeten Oxyde unterscheiden sich deutlich von den Oxydrauchen und -schichten, die durch thermische oder elektrolytische Oxydation der Metalle entstehen.

FEITKNECHT und STUDER (*25*) haben Hydroxyde 2-wertiger Metalle einer vergleichenden Betrachtung unterzogen. Ihre Präparate waren teils durch Bewässerung der Oxyde nach

$$MeO + H_2O \rightarrow Me(OH)_2$$

(Beispiele: $Ca(OH)_2$, $Mg(OH)_2$)

teils durch Fällung mit Laugen aus Salzlösungen nach

$$Me^{++} + 2\,OH^- \rightarrow Me(OH)_2$$

(Beispiele: $Mg(OH)_2$, $Ni(OH)_2$, $Co(OH)_2$, $Mn(OH)_2$, $Cd(OH)_2$, $Cu(OH)_2$)

hergestellt.

$Ca(OH)_2$: Ältere kolloidchemische Untersuchungen von KOHLSCHÜTTER und FEITKNECHT (*52*) hatten ergeben, daß im Kalkbrei und in der Kalkmilch kleinste „Primärteilchen" von Calciumhydroxyd zu „Sekundärteilchen" vereinigt sind und daß diese wiederum lockere Haufwerke bilden, die als lichtmikroskopisch abgrenzbare „Körner" erscheinen. Die für die Verwendbarkeit des Kalks als Mörtel wichtige Quellfähigkeit ist in den Eigenschaften der Sekundärteilchen verankert. Der Aufbau dieser Sekundärteilchen konnte jedoch mit dem Lichtmikroskop noch nicht sichtbar gemacht werden. FEITKNECHT und STUDER haben nun das Wasser im Kalkbrei und in der Kalkmilch durch Alkohol verdrängt und damit eine Entquellung und Dispergierung der Calciumhydroxyd-Aggregate erreicht. Die Sekundärteilchen wurden weitgehend abgebaut. Als Primärteilchen erschienen vorzugsweise längliche, 500 bis 1000 ÅE große Krystallplättchen, die teils sechseckige Formen zeigten, teils zu länglichen Aggregaten verwachsen waren. Die röntgenographisch ermittelte Teilchengröße stimmte angenähert mit der elektronenmikroskopisch gemessenen Teilchengröße überein. Dies deutet darauf hin, daß die Abbauprodukte der Sekundärteilchen wirklich schon Primärteilchen (Einkrystalle) waren. Die Versuche verdienen auch insofern allgemeineres Interesse, als sie zeigen, daß die Löslichkeit des präparierten festen Stoffes die Deutung des elektronen-

mikroskopischen Bildes erschweren kann. Verdünnte Kalkmilch hinterläßt beim Auftrocknen auf dem Objektträger Kugeln mit einem Durchmesser von 0,1 bis 1 μ, die möglicherweise durch Umlösung oder Quellung der Sekundärteilchen entstanden sein könnten (Abb. 11) (vgl. dazu das Beispiel Bariumsulfat, S. 62). Solche Formen haben RADCZEWSKI, MÜLLER und EITEL (*68*), (*69*) bei der Hydratation von Calciumoxyd in einer gesättigten wäßrigen Lösung von Butylalkohol und auch bei der Hydrolyse von Tricalciumsilikat beobachtet, die etwa nach $3\,CaO \cdot SiO_2 \xrightarrow{H_2O} 2\,CaO \cdot SiO_2 \cdot aqu. + Ca(OH)_2$ verläuft.

$Mg(OH)_2$: Durch Umsetzung von Magnesiumoxyd mit Wasser wurden schön ausgebildete $Mg(OH)_2$-Krystalle erhalten. Die sechsseitigen Plättchen hatten einen Durchmesser von rund 1500 ÅE, waren also größer als die oben beschriebenen $Ca(OH)_2$-Krystalle. Die Hydratation des Magnesiumsoxyd-Präparates, das durch Erhitzen von basischem Carbonat auf 700° C hergestellt war, verlief offenbar so langsam, daß sich infolge geringer Übersättigung der Lösung an $Mg(OH)_2$ große Krystalle bildeten. Wenn $Mg(OH)_2$ aus Lösungen gefällt wurde, entstanden Krystallplättchen, die wesentlich kleiner waren.

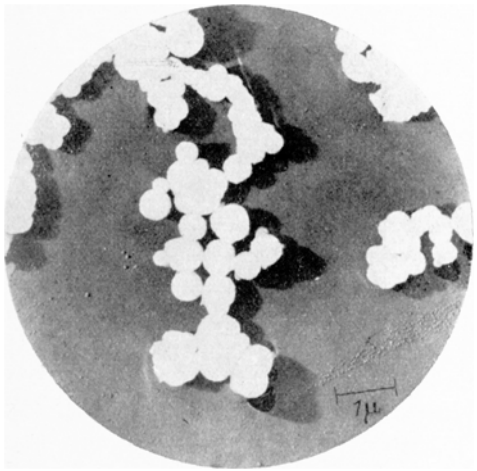


Abb. 11. Gelöschter Kalk, Kalkmilch stark verdünnt auf Folie eingetrocknet, schräg bedampft. Negativkopie. (Aufnahme H. STUDER).

Die Hydroxyde $Mg(OH)_2$, $Ni(OH)_2$, $Co(OH)_2$, $Mn(OH)_2$, $Cd(OH)_2$ bilden Krystallgitter vom Cadmiumjodid-Typus, d. h. Schichtengitter hexagonaler Symmetrie (C 6-Typ). Diese strukturelle Eigenschaft hat zur Folge, daß sie alle bei der Fällung mit Lauge aus Salzlösungen laminar ausgebildete Teilchen enthalten. Wenn die Teilchen auch nicht in allen Fällen sofort nach der Herstellung der Niederschläge elektronenmikroskopisch auflösbar sind und nicht sofort die hexagonale Symmetrie erkennen lassen, so tritt diese doch beim Altern der Niederschläge unter der Lösung deutlich hervor: Es entstehen sechseckig begrenzte Plättchen, die flach auf dem Objektträger aufliegen. Trotz der Ähnlichkeit der Krystallstrukturen hat jedes dieser Hydroxyde seine eigenen morphologischen Merkmale: bei vergleichbaren Fällungsbedingungen eine charakteristische Teilchengröße, eine charakteristische Größenverteilung der Teilchen und eine charakteristische Tendenz zur Abweichung von

ideal ausgebildeten sechseckigen Plättchen. Diese Unterschiede lassen sich nicht auf zahlenmäßig faßbare Unterschiede etwa des Ionenradius der Kationen oder etwa des Löslichkeitsproduktes der Hydroxyde zurückführen. Sie sind die Folgen komplexer Vorgänge bei der Fällung und bei der anschließenden Alterung. Ihre Ursachen müssen durch ein sorgfältiges Einzelstudium ermittelt werden. Man wird deshalb auch den wirklichen Verhältnissen nicht völlig gerecht, wenn man die elektronenmikroskopischen Befunde nur durch Angaben von Teilchengrößenund Teilchenformen beschreibt. Die folgenden Angaben sind als Hinweise auf die ausführliche Beschreibung in den Originalmitteilungen aufzufassen.

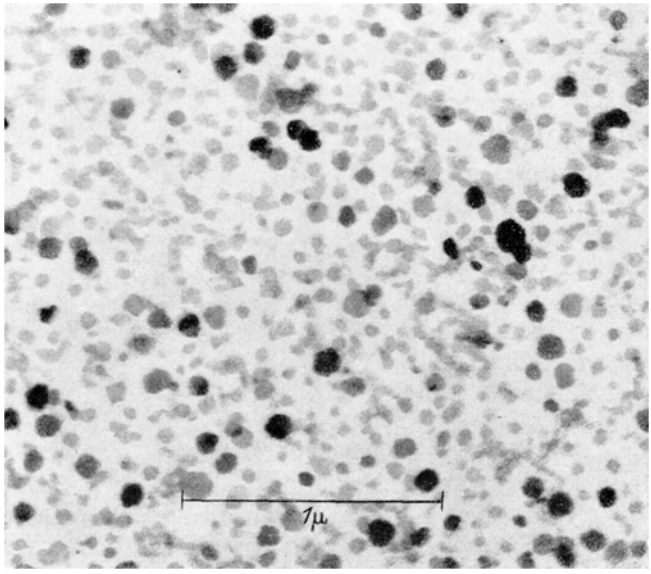


Abb. 12. Nickelhydroxyd, 5 Jahre altes Sol. (Aufnahme H. STUDER.)

$Ni(OH)_2$-Sole enthalten in frischem Zustand sehr dünne, elektronenmikroskopisch nur schwer abzubildende Plättchen. Nach sechsstündigem Erwärmen des Sols auf 100° C bilden sich schöne, sechsseitige Plättchen (22), die auch in einem 5 Jahre alten Sol in weniger regelmäßiger Form beobachtet wurden (Abb. 12). Die Teilchengrößen von 280 bis 560 ÅE sind darin am häufigsten.

$Co(OH)_2$ wurde aus einer Lösung von $CoCl_2$ gefällt und nach der Umwandlung der instabilen blauen Modifikation in die stabile rosa Modifikation (C 6-Typ) untersucht. Im Sol und in dem mit Ultraschall aufgelockerten Bodenkörper wurden gleichgroße, sechseckige Plättchen beobachtet, die offenbar aus der instabilen Modifikation *über die Lösung* als stabile Modifikation entstanden waren. Ihr Durchmesser war rund

4mal größer als der Durchmesser der $Ni(OH)_2$-Plättchen. Daneben lag unregelmäßiges, feinlaminares Material vor, das wahrscheinlich durch topochemische Umsetzung des instabilen Hydroxyds entstanden war.

Die beiden in Frage kommenden Reaktionswege für die sekundäre Umwandlung des Co-Hydroxyds können formuliert werden:

1. Umwandlung über die Lösung

Co-Hydroxyd blau (fest) → Co-Hydroxyd (gelöst) → Co-Hydroxyd rosa (fest)

2. Topochemische (= ortsgebundene) Umwandlung

Co-Hydroxyd blau (fest) → Co-Hydroxyd rosa (fest)

$Mn(OH)_2$ (*72*) zeigt in frisch gefälltem Zustand rundliche bis ovale Scheiben. Auch das Röntgendiagramm entspricht diesem Habitus. Mit Laugenüberschuß gefälltes, gealtertes Hydroxyd weist sechsseitige, mehr oder weniger regelmäßige Plättchen auf. Beim Altern in $MnCl_2$-Lösung besteht die Tendenz zu Verwachsungen der Teilchen.

$Cd(OH)_2$-Fällungen (*21*), (*71*) lassen die verschiedenen Reaktionswege erkennen, auf denen sich das Hydroxyd bilden kann. Die Fällung aus $CdCl_2$-Lösung führt über basische Chloride; ihre Reaktionsprodukte sind deshalb morphologisch schwerer zu übersehen. Einfacher ist die Fällung aus $Cd(NO_3)_2$-Lösung. Dabei entsteht zuerst sehr instabiles α-Hydroxyd. Dieses wandelt sich schon während der Fällung in stabiles Hydroxyd um. Infolgedessen wirkt das instabile Hydroxyd als Störsubstanz bei der Krystallisation des stabilen Hydroxyds: Reaktionsprodukte dieser gestörten Krystallisation sind miteinander verwachsene Plättchen; die Form der kleinen Aggregate weicht von der Form ideal ausgebildeter sechseckiger Pättchen ab. Die Umwandlung des instabilen Hydroxyds in das stabile Hydroxyd kann durch sehr schnelle Fällung überrannt werden. Dann besteht der Niederschlag zuerst nur aus dem instabilen Hydroxyd, und dieses wandelt sich nachträglich (wahrscheinlich über die Lösung) in das stabile Hydroxyd um: Reaktionsprodukt dieser nun ungestörten Krystallisation sind größere und regelmäßiger ausgebildete Plättchen (vgl. $Ni(OH)_2$, oben). Der Versuch enthält ein Beispiel für die chemische Deutung des Einflusses der Fällungsgeschwindigkeit auf die Form des Reaktionsproduktes.

Schematisch lassen sich die Unterschiede der schnellen und langsamen Fällung $Cd^{++} + 2\,OH^- \longrightarrow Cd(OH)_2$ beschreiben:

1. Schnelle Fällung

primär		sekundär
Cd-Hydroxyd, instabil (fest)	über die Lösung (?) ⟶	Cd-Hydroxyd, stabil (fest) „ungestörte" Krystallisation

2. Langsame Fällung

Cu(OH)$_2$-Fällungen erfordern die Berücksichtigung von zwei Reaktionsstufen:

1. die Bildung des Hydroxyds über schwerlösliche basische Salze:

$$Cu^{++} \xrightarrow{OH^-} \underset{\text{fest}}{\text{bas. Salz}} \xrightarrow{OH^-} \underset{\text{fest}}{\text{Hydroxyd}}$$

2. Die spontane Entwässerung des Hydroxyds unter der Lösung:

$$\underset{\text{fest}}{Cu(OH)_2} \dashrightarrow \underset{\text{fest}}{CuO} + H_2O$$

Die primäre Bildung basischer Salze führt unter sonst vergleichbaren Bedingungen zu krystallisierten Teilchen verschiedener Struktur, Form und Größe, je nachdem von Cu-Chlorid, -Bromid, oder -Nitrat ausgegangen wird. Dementsprechend sind auch die Teilchen des Hydroxyds, die sekundär aus den basischen Salzen entstehen, verschieden. Basisches Cu-*Chlorid* erscheint auf Grund der 3-dimensionalen Struktur seines Krystallgitters in isodiametrischen Kryställchen (*23*), es wandelt sich bei weiterem Laugenzusatz über die Lösung zu feinen isolierten Hydroxyd-Nadeln um. Basisches *Cu-Bromid* (oder -Nitrat) erscheint auf Grund seiner Schichtgitterstruktur in 0,1 bis 1 μ breiten Plättchen; es wandelt sich bei weiterem Laugenzusatz auch in Hydroxyd um, und zwar bei den kleineren Teilchen im wesentlichen über die Lösung unter Bildung von isolierten Hydroxyd-Nadeln (Abb. 13), bei den größeren Teilchen dagegen im Raum des basischen Salzes (topochemisch) unter Bildung von Aggregaten, die durch die ursprünglichen Kryställchen des basischen Bromids orientiert werden.

Die spontane Entwässerung des Hydroxyds unter der Lösung geht umso schneller vor sich, je feiner es krystallisiert ist. Größere Hydroxydkrystalle können sehr beständig sein. Da die Teilchengröße des Hydroxyds durch die Zwischenprodukte, die basischen Salze, bestimmt wird, wird also auch der Einfluß der Fällungsbedingungen für das Hydroxyd auf die Beständigkeit des Hydroxyds verständlich. Das entstandene Oxyd erscheint in spindel- oder kreuzförmigen Teilchen von der Größenordnung 1 μ, unter Umständen auch in faserigen Teilchen. Alle diese Formen deuten auf gestörte Krystallisation durch geringe Fremdstoffmengen hin. Aggregationen, die ihre Formen einem solchen chemischen Reaktionsmechanismus verdanken, werden als Somatoide bezeichnet. Nach FRICKE, GWINNER und FEICHTNER (*27*) ergibt sich aus der Verbreiterung der Röntgeninterferenzen für die krystallinen Bereiche des

„aktiven" Oxyds ein Durchmesser von etwa 80 ÅE. Daneben liegt amorphes Material vor.

In den Fällungsprodukten aus Mischlösungen von $CuCl_2$ und $NiCl_2$ wurden vier verschiedene Krystallformen beobachtet (*24*): Nickelhydroxyd in sehr feindisperser Form, Nadeln oder lange Fasern von Kupferhydroxyd, Kupferoxyd als spindelförmige oder aus quadratischen Teilchen zusammengesetzte Somatoide und ein feindisperses Doppelhydroxyd der Zusammensetzung $NiCu(OH)_4$. Das Doppelhydroxyd

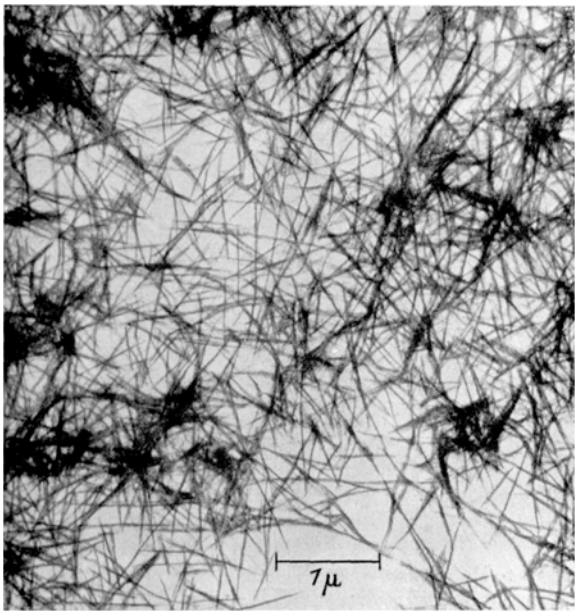


Abb. 13. Kupferhydroxyd, Fällung einer 0,2-m-$CuBr_2$-Lösung mit überschüssiger 0,4-n NaOH. (Aufnahme H. TOBLER.)

konnte neben Kupferhydroxyd wegen der großen Ähnlichkeit der Röntgendiagramme nur elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

Bei den vergleichenden Untersuchungen der Hydroxyde von 2-wertigen Metallen hat die elektronenmikroskopische Abbildung zur Aufklärung der Bildungsreaktionen der Hydroxyde beigetragen.

5. *Hydroxyd und Oxyd des Aluminiums.*

Frisches, in wäßriger Lösung gebildetes Aluminiumhydroxyd ist äußerst feindispers. Die Präparate sind röntgenamorph und zeigen im Elektronenmikroskop keinerlei Formen, die auf eine bestimmte Struktur schließen lassen. FEITKNECHT und Mitarbeiter (*25*) haben $4^1/_2$ Jahre lang gealtertes Hydroxyd untersucht, das durch anodische Auflösung von Aluminium in NaCl-Lösung erzeugt war. Dabei zeigte sich, daß

Gele, die in schwach saurem oder schwach alkalischem Medium aufbewahrt waren, Bayerit gebildet hatten. Die Röntgendiagramme und die im Elektronenmikroskop erkennbaren Formen der unter verschiedenen Alterungsbedingungen hergestellten Bayerit-Präparate wiesen Unterschiede auf. Neben kegelförmigen Somatoiden (vgl. Seite 78, Beispiel Kupferoxyd) wurden sechsseitige Plättchen in größerer oder geringerer Anzahl beobachtet. Im Gegensatz zu den Gelen, die sich in AlO(OH) umgewandelt hatten, schied sich aus den Solen in neutralem und schwach saurem Milieu $Al(OH)_3$ als Hydrargillit aus, der sechsseitige Plättchen verschiedener Dicke bildete.

Aluminiumhydroxyd wie auch feindisperses Aluminiumoxyd gehören zu den wirksamsten Adsorbentien. SCHOON und KLETTE (*80*)

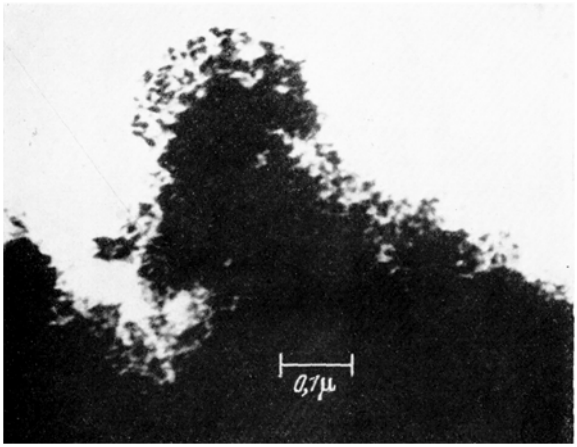


Abb. 14. Al_2O_3 aus gefälltem Böhmit durch Entwässern bei 800° C entstanden. (Präparat R. FRICKE.)

haben im Elektronenmikroskop Aluminiumoxydhydrat mit Silicagel gleicher Adsorptionseigenschaften verglichen und an beiden Präparaten denselben porösen Aufbau aus netz- und wabenförmig angeordneten Platten festgestellt. Von WEITBRECHT und FRICKE (*86*) wurde γ-Al_2O_3, das durch Erhitzen von BÖHMIT [(AlO(OH)] hergestellt war, eingehend untersucht. Die äußere Krystallform eines im Autoklaven hergestellten Böhmits ändert sich durch die Entwässerung nicht, wohl aber werden die röntgenographisch bestimmten Kohärenzbereiche innerhalb der schön ausgebildeten, bis 8000 ÅE langen Prismen verkleinert. Gefällter Böhmit zeigt im Elektronenmikroskop lockere Anhäufungen von etwa 50 ÅE großen Teilchen. Beim Erhitzen wird die Struktur weiter aufgelockert und es entsteht ein schwammiges Netzwerk von Al_2O_3-Teilchen, die untereinander durch sehr feine, elektronenmikroskopisch kaum mehr erkennbare Brücken verbunden sind (Abb. 14). Die Teil-

chen rekrystallisieren bei Temperaturen bis 900° C kaum. Erst bei 1000° C setzt eine merkliche Teilchenvergrößerung unter gleichzeitiger Umwandlung in α-Al_2O_3 ein. Die übermikroskopisch bestimmte Weite der Poren ist von derselben Größenordnung wie die Teilchen selbst. Die sehr große aktive Oberfläche, die sich aus der schwammigen, äußerst feinteiligen Struktur ergibt, läßt die Eignung dieses Aluminiumoxyds als Katalysator und Katalysatorträger erkennen.

Als dünner, jedoch gleichmäßiger und sehr dichter Film bildet sich Aluminiumoxyd auf jeder metallischen Aluminiumoberfläche. Die Oxydschicht passiviert die Oberfläche des unedlen Metalls und macht es beständig gegen Luft und Wasser. Der Oxydfilm erreicht auf glatten, im Hochvakuum aufgedampften Aluminiumschichten an Luft bei Zimmertemperatur nach einem Monat seine Grenzdicke von weniger als 100 ÅE, wie HASS durch polarisationsoptische Messungen (*33*) nachweisen konnte. Oberhalb 400° C nimmt die Dicke der Oxydschicht stärker zu, oberhalb 450° C beginnt die Krystallisation des amorphen Films auf der Aluminiumunterlage, während sie an isolierten Oxydschichten erst oberhalb 680° C einsetzt, wie an Hand von Elektronenbeugungsdiagrammen nachgewiesen wurde. MAHL (*60*) hat den Aufbau von Oxydschichten, die durch Glühen von geätztem Reinstaluminium bei 550° C erzeugt waren, elektronenmikroskopisch und mittels Elektroneninterferenzen untersucht. Die von der Unterlage abgelöste Oxydhaut ist ein Abdruck der geätzten Aluminiumoberfläche. Das Oxyd kann daher den krystallographischen Flächen des Aluminiums zugeordnet werden, auf denen es gewachsen ist. Im Elektronenbild erscheinen auf den (100)-Ebenen Plättchen von wenigen 100 bis 3000 ÅE in regelloser Anordnung. Das Elektronenbeugungsdiagramm der Schicht zeigt eine teilweise Orientierung zur Unterlage an. An Ätzstrukturen mit abgerundeten Ecken und Kanten ist das zur (111)-Fläche des Aluminiums orientierte Wachstum größerer Al_2O_3-Krystalle zu beobachten. Offenbar findet die Oxydation an den Oktaederflächen des Aluminiums bevorzugt statt.

Elektrolytisch erzeugte Oxydschichten auf Aluminium sind wegen ihrer technischen Bedeutung mehrfach elektronenmikroskopisch untersucht worden. Sie sind alle mehr oder weniger wasserhaltig. Man muß dabei grundsätzlich zwei Arten unterscheiden: Die dichten, verhältnismäßig dünnen Ventilschichten und die dicken Schichten, wie sie nach dem Eloxalverfahren erzeugt werden.

Die *Ventilschichten* entstehen bei der anodischen Oxydation in Elektrolyten, die das Aluminiumoxyd nur wenig angreifen. Sie erscheinen in einer Dicke von 100 bis 300 ÅE im Elektronenmikroskop strukturlos und werden daher nach dem Vorschlag von HASS und KEHLER (*34*) als Trägerfolien in der Elektronenmikroskopie verwandt (s. Abschn. III, 1). Das Elektronenbeugungsdiagramm dieser Schichten

läßt einige diffuse Ringe erkennen, die dahingehend gedeutet werden, daß hier äußert feinkrystallines γ-Al_2O_3 mit regellos verteilten Fehlstellen vorliegt. Bei Temperaturen über 650° C krystallisieren die Schichten, das Beugungsdiagramm zeigt die scharfen Interferenzen von γ-Al_2O_3, und im elektronenmikroskopischen Bild werden die Oxydkrystalle sichtbar, die mit zunehmender Temperatur wachsen. Dickere Schichten entstehen durch Anlegen einer höheren Spannung und durch längere Dauer der Elektrolyse. Sie sind porös und erscheinen körnig (*61*).

Die Ventilschichten sperren den Stromdurchgang, sobald sie eine von der Spannung abhängige Dicke erreicht haben. Elektrische Durchschläge erzeugen die Poren, die durch weitere Oxydation des Metalls an der Grenzfläche Metall-Oxyd geschlossen werden.

In Schwefelsäure- und Oxalsäure-Elektrolyten werden die Schichten wesentlich dicker und lockerer. Die Poren sind weiter und haben nach FISCHER und KURZ (*26*) einen Durchmesser von 150 bis 400 ÅE. Ihr Volumen macht nach elektronenmikroskopischen Messungen etwa 13% der gesamten Schicht aus. Durch Schrägbedampfung mit Wolframoxyd konnte WILSDORF (*87*) die Oberflächenstruktur dieser Oxydschichten im Elektronenmikroskop sichtbar machen. Die den Elektrolyten zugekehrte Seite ist weitgehend eben, die an das Metall grenzende Seite zeigt um die Poren herum kalottenförmige Erhebungen. WILSDORF deutet diesen Befund durch die Annahme, daß während der Elektrolyse in den Poren eine Gasentladung brennt, durch die Sauerstoff und Wasserstoff in Freiheit gesetzt wird. Die Gase stehen infolge von Kapillarkräften unter hohem Druck, und der Sauerstoff diffundiert von den Poren aus ins Metall. Die Oxydhaut auf dem Grund der Poren wird durch die Gasentladung immer wieder zerstört, so daß die Oxydation weiterlaufen kann. HUBER (*44*) hat den Querschnitt eines extrem dicken *Eloxalfilms* von 0,8 mm mit Hilfe eines Oberflächenabdrucks abgebildet. Danach verlaufen die Poren geradlinig in Richtung der Normalen zur Oberfläche, was sich mit den Anschauungen über ihre Entstehung deckt. Die übermikroskopischen Befunde bestätigen und ergänzen demnach die Vorstellungen über Bildung und Aufbau der elektrolytisch erzeugten Aluminiumoxydschichten, die mit Hilfe anderer Methoden gewonnen wurden.

6. *Zinkoxyd.*

Durch anodische Oxydation in Natronlauge entstehen auf Zink ähnliche Oxydfilme wie auf Aluminium. HUBER und BIERI (*45*) haben das Wachstum derartiger Schichten auf Zinkeinkrystallen mit dem Elektronenmikroskop und mit Elektroneninterferenzen untersucht. In einer Dicke von 100 bis 150 ÅE zeigt die Oxydhaut eine schuppige Struktur. Die Krystalle sind auf dem Metall mit ihrer hexagonalen Basisfläche

orientiert aufgewachsen. In Schichten von 2000 bis 4000 ÅE geht die Orientierung mit zunehmendem Abstand vom Metall allmählich verloren. Die Filme zeigen Poren, die von elektrischen Durchschlägen herrühren. Die Röntgendiagramme von anodisch erzeugtem Zinkoxyd und von ZnO-Rauch entsprechen einander.

Pyrogen entstandenes ZnO, das als Pigment eine Rolle spielt, kommt in verschiedenen Krystallformen vor. Sie lassen sich im wesentlichen auf sechsseitige Tafeln und lange Nadeln zurückführen, die zu vierstrahligen Sternen verwachsen sind (*7*), (*8*). Die Gestalt der Krystalle hängt von den Entstehungsbedingungen ab. Die Zinkdampf- und Sauerstoffkonzentration dürfte dabei eine Rolle spielen. Die in Abb. 15 dargestellten ZnO-Nadeln sind durch Verbrennen von Zink an Luft bei etwa 800° C entstanden. Sie haben beim Aufsteigen in der Wärmeströmung verschiedene Wachstumsbedingungen durchlaufen. Auf diese Weise können die Absätze in den Nadeln erklärt werden.

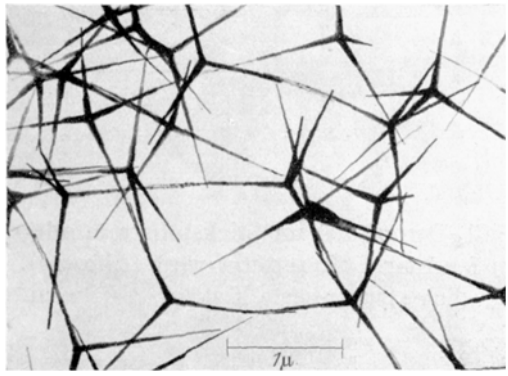


Abb. 15. ZnO-Rauch aus Verbrennung von Zn bei 800° C. Die dunklen Punkte in den Nadeln sind durch Beugung der Elektronen im Krystallgitter hervorgerufen.

Pyrogen entstandenes ZnO nimmt bei Anwesenheit von Feuchtigkeit reichlich Kohlensäure auf. Die ursprünglichen Krystalle werden dabei weitgehend zerstört. Das gebildete basische Karbonat ist feinkörniger und wird beim Glühen unter Abspaltung von CO_2 und H_2O in noch kleinere Teilchen von etwa 0,1 μ Durchmesser aufgespalten. Nach beendeter Kalzinierung liegt ZnO in Form sehr dünner, unregelmäßiger Plättchen vor (*7*). Dieser Vorgang ist ein typisches Beispiel für die Darstellung oberflächenaktiver Stoffe, die in ihren einzelnen Phasen elektronenmikroskopisch verfolgt werden kann.

7. Oxydische Rauche.

Ebenso wie Zink liefert auch Magnesium bei der Verbrennung an Luft einen Oxydrauch, der in gut ausgeprägten Würfeln krystallisiert (Abb. 16). Die Würfel sind zu Ketten aneinander gelagert, teilweise sind sie durch sehr dünne Brücken miteinander verbunden. Oxyde, die weniger zur Krystallisation neigen, liegen im Rauch als kugelige Gebilde vor, die sich zu Ketten zusammenlagern, wie z. B. Al_2O_3, das durch Verbrennung von Aluminium im elektrischen Lichtbogen erhalten wird (*10*).

Rundliche Gebilde entstehen auch durch Hydrolyse flüchtiger Siliciumverbindungen bei erhöhter Temperatur in der Gasphase. Diese Gebilde sind lockere Aggregate von 50 bis 70 ÅE großen Teilchen, wenn

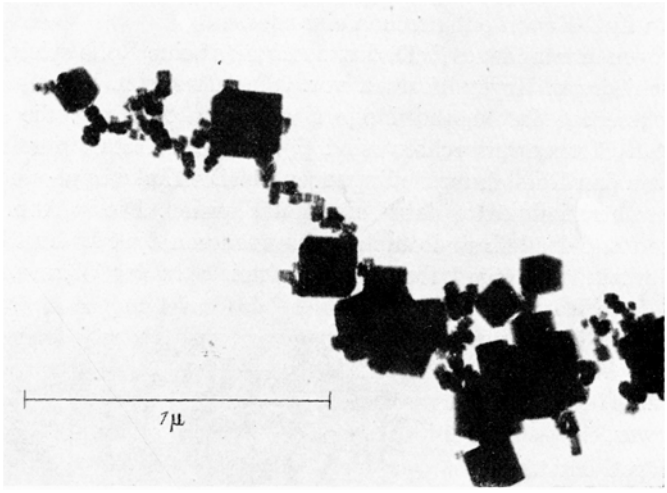


Abb. 16. MgO-Rauch aus Verbrennung von Magnesiumdraht.

$SiCl_4$-Dampf, der im Stickstoffstrom mitgeführt worden ist, bei 800° C in feuchter Luft zersetzt wird (Abb. 17). Dagegen weist SiO_2-Rauch deutlich strukturierte Teilchen auf, wenn er in der Flamme eines mit $SiCl_4$ beladenen Wasserstoffstroms gebildet wird (Abb. 18). Die Teilchen scheinen in diesem Falle von einer glatten glasigen Schicht umhüllt zu sein. Das Elektronenbeugungsdiagramm dieser Rauche zeigt den diffusen Ring der amorphen Kieselsäure.

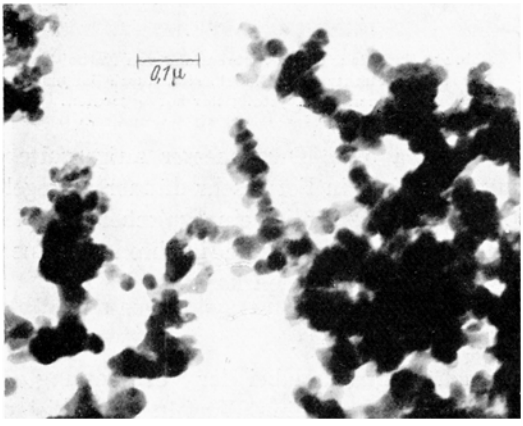


Abb. 17. SiO_2-Rauch aus Hydrolyse von $SiCl_4$-Dampf bei 800° C, lockere, rundliche Teilchen.

TiO_2-Rauch, der durch Hydrolyse von $TiCl_4$ bei 800° C gewonnen ist (*28*), besitzt ein ähnliches Aussehen.

Siliciumdioxydrauch wird in technischem Maßstab als Aerosol hergestellt; das aus der Gasphase niedergeschlagene Siliciumdioxyd liefert lockere, sehr voluminöse SiO_2-Präparate. Siliciumdioxydrauch entsteht auch bei der Elemen-

taranalyse silico-organischer Verbindungen durch Verbrennung (*74*). Eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines solchen Verbrennungsproduktes ist in Band 1, S. 50 dieser Zeitschrift abgebildet.

Anwendung der Hydrolyse von Siliciumtetrachlorid:

KOHLSCHÜTTER und MATTNER (*50*) haben $SiCl_4$ in Baumwollfasern eingeführt und nachträglich im Inneren der Fasern mit Wasserdampf zu Kieselsäure umgesetzt. Nach dem Verbrennen der mit Kieselsäure beladenen Fasern erhielten sie als anorganischen Rückstand dünne SiO_2-Schichten, die elektronenmikroskopisch auflösbare Abdrucke der Lamellen in der ursprünglichen Faser ergaben (Abb. 19). Das Verfahren ist auch in anderen Stoffsystemen zur Abbildung *innerer* Oberflächen geeignet.

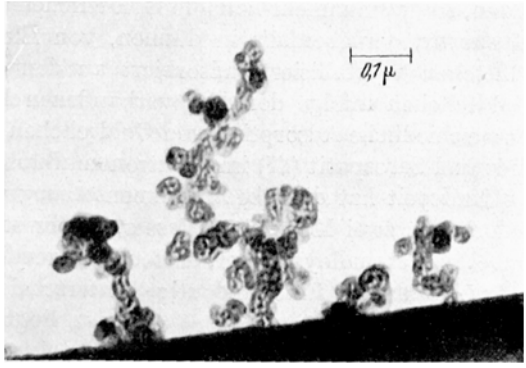


Abb. 18. SiO_2-Rauch aus Hydrolyse von $SiCl_4$-Dampf in Wasserstoff-Flamme, Teilchen mit Innenstruktur und gesinterter Außenhaut.

8. Tonmineralien.

Die Eigenschaften der Tone, ihre Plastizität und Quellfähigkeit sind bedingt durch die *Plättchen*struktur der meisten Tonmineralien. Die Krystalle sind submikroskopisch klein. Das Elektronenmikroskop wurde zu ihrer Analyse mit Erfolg heran. gezogen.

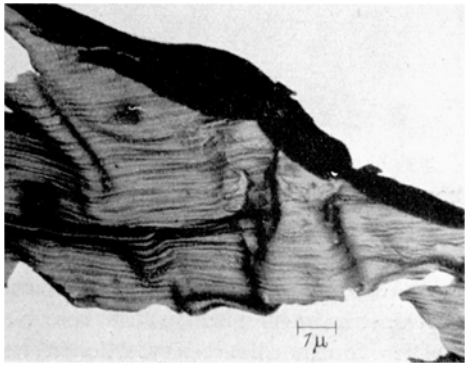


Abb. 19. SiO_2-Abdruck von Lamellen innerhalb einer Baumwollfaser, gewonnen durch Hydrolyse von $SiCl_4$ in der Faser. (Präparat H. W. KOHLSCHÜTTER.)

Kaolinit, dem die Formel $Al_2(OH)_4 \cdot Si_2O_5$ zukommt, krystallisiert vornehmlich in sechsseitigen Plättchen (Abb. 20) von 200 bis 1000 ÅE Dicke, die EITEL und GOTTHARDT (*15*) an Schnaittenbacher Kaolin mittels elektronenmikroskopischer Stereoaufnahmen gemessen haben. Die Basisflächen der Krystalle sind negativ geladen. Sie adsorbieren nach THIESSEN (*83*) positive Silberjodidteilchen. Dagegen werden negativ geladene kolloide Goldpartikel nur an den Ecken und Kanten angelagert,

wo durch Adsorption von Kationen eine Umladung der Oberfläche stattfindet (*18*). In $BaCl_2$-Lösung werden auch an den Basisflächen durch Kationenaustausch Ba^{2+}-Ionen adsorbiert (*16*), die die Flächen umladen, so daß nunmehr kolloide Goldteilchen angelagert werden können. Muskowit, der ebenfalls in dünnen, von Elektronen durchstrahlbaren Plättchen krystallisiert, adsorbiert an den Basisflächen und Kanten Goldteilchen infolge der dort vorhandenen Kationen (*83*). Durch die unterschiedliche Adsorption von Goldteilchen kann Muskowit von Kaolinit und Sarospatit (*41*) im Elektronenmikroskop unterschieden werden.

Halloysit hat dieselbe Zusammensetzung wie Kaolinit, krystallisiert jedoch mit zwei Molekülen Wasser, das er sehr leicht abgibt. Er geht dabei in Metahalloysit über, dessen Röntgendiagramm dem des Kaolinit sehr ähnlich ist. Eine eindeutige Unterscheidung beider Mineralien gelingt mit dem Elektronenmikroskop, da Halloysit und der daraus entstehende Metahalloysit im Gegensatz zum plättchenförmigen Kaolinit in leistenförmigen Krystallen (*17*), (*47*) vorkommt.

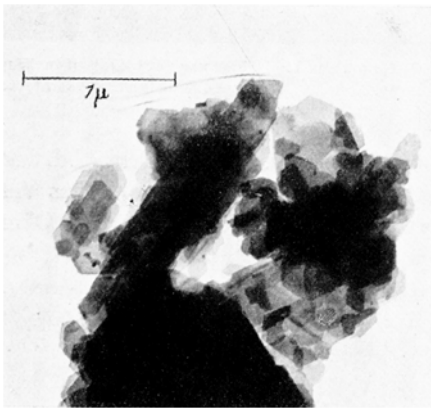


Abb. 20. Kaolinit.

Die hohe Plastizität der Bentonite wird durch die Struktur ihres Hauptbestandteiles, des Montmorillonits ($4\ SiO_2 \cdot Al_2O_3 \cdot H_2O$) verursacht, der aus äußerst dünnen Krystallplättchen besteht. Im Elektronenmikroskop wurden noch Plättchen von 10 ÅE Dicke beobachtet (*5*), die aus einer einzigen Silicatschicht bestehen. Durch Kationenaustausch lassen sich die schweren Cs^+-, Ba^{2+}- und La^{3+}-Ionen anlagern (*16*). Die dünnen Plättchen heben sich dann wegen des großen Elektronenstreuvermögens der schweren Ionen im elektronenmikroskopischen Bild besser ab.

Die Montmorillonit-Kryställchen werden durch Kochen mit Salzsäure weitgehend zerstört. Al_2O_3 geht zum Teil in Lösung, und es hinterbleibt ein schwammiges Gerüst mit Poren von etwa 200 ÅE Durchmesser (*18*). Mit Salzsäure aufgeschlossener Montmorillonit wird in der Technik unter dem Namen Bleicherde als Adsorbens verwendet.

Im Gegensatz zu den meisten Tonmineralien krystallisiert Attapulgit, ein Al-Mg-Silicat. in feinen *Nadeln* von 50 bis 250 ÅE Durchmesser (*19*). Er ist der Hauptbestandteil der amerikanischen Fullererde, die als technisches Bleichmittel dient. Die auf Grund von röntgenographischen Untersuchungen ausgesprochene Vermutung, daß Attapulgit eine

kettenartige Krystallstruktur besitzt, konnte durch Abbildung der sehr dünnen Nadeln bestätigt werden.

V. Ausblick.

Das Elektronenmikroskop hat im Laufe weniger Jahre zur Beantwortung zahlreicher chemischer Fragen beigetragen. Mit seiner Hilfe wurde unsere Kenntnis der hochdispersen Stoffe wesentlich erweitert. In vielen Stoffsystemen, in denen Vorstellungen über Teilchengrößen und -formen bisher nur auf indirekten Wegen und mit kombinierten Untersuchungsmethoden erworben werden konnten, ist die Verbindung zu den Erfahrungen im Auflösungsbereich des Lichtmikroskops unmittelbar hergestellt worden.

Für die Beantwortung spezifisch chemischer Fragestellungen ist die bloße Feststellung von Teilchengrößen und -formen im allgemeinen nicht ausreichend. Jede natürliche Form eines Stoffes steht in Beziehungen zu seiner Struktur und zu den Bedingungen, unter denen er sich bildete. Es ist zu erwarten, daß diesen Beziehungen im Auflösungsbereich des Elektronenmikroskops in zunehmendem Maße *systematische* Untersuchungen gewidmet werden. Die für den Abschnitt IV dieses Berichtes ausgewählten Beispiele enthalten Erfahrungen, die vervollständigt werden müssen oder verallgemeinerungsfähig sind, auf die deshalb bei weiteren Untersuchungen auf dem Gebiet der anorganischen Chemie Bezug genommen werden kann.

Die Abbildung anorganischer Einzelmoleküle ist noch nicht gelungen. Wohl aber konnte die Anordnung der Benzolringe im Kupferphthalocyanin-Molekül mit dem Feldelektronenmikroskop dargestellt werden (*67a*). Organische Riesenmoleküle [Jodbenzoylglycogen (*46*), Haemocyanin (1)] wurden im Elektronenmikroskop abgebildet. Auch die kleineren Virusteilchen können als einzelne Riesenmoleküle aufgefaßt werden. Die bekannte Aufnahme des krystallisierten Tabaknecrose-Virus (*65*) gehört bisher zu den eindrucksvollsten Ergebnissen der Elektronenmikroskopie. Sie zeigt die regelmäßige Anordnung der Virusteilchen im Krystallgitter, das hier zum erstenmal abgebildet worden ist. Damit ist der Anschluß an die Strukturbestimmung durch Interferenz von Röntgen- und Elektronenstrahlen an Krystallgittern hergestellt, und die Abbildung anorganischer Molekülgitter rückt durchaus in den Bereich der Möglichkeit, falls es gelingt, das Auflösungsvermögen der Elektronenmikroskope weiter zu steigern.

Die Aufnahmen 11, 12 und 13 wurden mit dem Trüb-Täuber-Elektronenmikroskop, alle übrigen Aufnahmen mit dem elektrostatischen AEG-Zeiss-Elektronenmikroskop der SDL aufgenommen.

Literatur.

1. v. ARDENNE, M.: Elektronen-Übermikroskopie. Berlin: Springer 1940.
2. — Die Reaktionskammer-Übermikroskopie mit dem Universal-Elektronenmikroskop. Z. Phyik. Chem. B. **52**, 61 (1942).
3. — Analyse des Feinbaues stark und sehr stark belichteter Bromsilberkörner mit dem Universal-Elektronenmikroskop. Z. angew. Phot. **2**, 14 (1940).
4. —, u. B. BEISCHER: Untersuchungen mit dem Universal-Elektronenmikroskop. Angew. Chem. **53**, 103 (1940).
5. —, K. ENDELL u. U. HOFMANN: Untersuchungen feinster Fraktionen von Bentoniten und Tonböden mit dem Universal-Elektronenmikroskop. Ber. dtsch. keram. Ges. **21**, 209 (1940).
6. —, u. U. HOFMANN: Elektronenmikroskopische und röntgenographische Untersuchungen üb. die Struktur von Rußen. Z. phys. Chem. B. **50**, 1 (1941).
7. ARNOLD, H.: Über das Eindicken von Zinkweißemaillen, Farben, Lacke, Anstrichstoffe 1949, 2.
8. —, u. E. GÖLZ: ZnO-Untersuchungen I. Kautschuk **18**, 2 (1942).
9. BACHMANN, G. S., R. B. FISCHER u. A. E. BADGER: Beobachtung von Goldteilchen in Glas mit dem Elektronenmikroskop. Glass Ind. **27**, 399, 416, 418, 420, 422 (1946).
10. BARNES, R. B., and C. I. BURTON: Metallic smokes as test objects in electron microscopy. Ind. Engng, Chem. News Edit. **19**, 965 (1941).
11. BEYERSDORFER, K.: Elektronenmikroskopische Oberflächenabbildung von Rubingläsern. Optik **5**, 557 (1949).
12. — Über die Struktur des Graphitoxydrußes. Optik (1950).
13. v. BORRIES, B.: Sublichtmikroskopische Auflösungen bei der Abbildung von Oberflächen im Übermikroskop. Z. Physik **116**, 370 (1940).

13a. v. BORRIES, B.: Die Übermikroskopie, Berlin 1948.

14. —, u. G. A. KAUSCHE: Übermikroskopische Bestimmung der Form und Größenverteilung von Goldkolloiden. Kolloid.-Z. **90**, 132 (1940).
15. EITEL, W., u. E. GOTTHARDT: Über die stereogrammetrische Dickenmessung kleinster Krystalle nach übermikroskopischen Aufnahmen. Naturwiss. **28**, 367 (1940).
16. —, u. O. E. RADCZEWSKI: Zur Kennzeichnung des Tonminerals Montmorillonit im übermikroskopischen Bilde. Naturwiss. **28**, 397 (1940).
17. — — Zur Kenntnis des Metahalloysits. Preuß. Akad. d. Wiss., Math.-nat. Kl. (1943) Nr. 5 S. 3.
18. ENDELL, J.: Tonmineralien, Gestaltung und Struktur. Tonind.-Ztg. (1949), 2.
19. — Nachweis der Faserstruktur von Fullererde im Elektronenmikroskop. Z. Naturforsch. **1**, 646 (1946).
20. ENDTER, F.: Zur Struktur der technischen Ruße. Z. anorg. allg. Chem. **263**, 191 (1950).
21. FEITKNECHT, W.: Laminardisperse Hydroxyde und basische Salze zweiwertiger Metalle. Kolloid-Z. **92**, 257 (1940).
22. — Laminardisperse Hydroxyde und basische Salze zweiwertiger Metalle. Kolloid-Z. **93**, 66 (1940).
23. —, u. K. MAGET: Die Hydroxychloride des Kupfers. Helv. Chim. Acta **32**, 1639 (1949).
24. — — Über Mischfällungen von Kupfer-Nickelhydroxyd. Z. anorg. allg. Chem. **258**, 250 (1949).
25. —, u. H. STUDER: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Größe und Form der Teilchen kolloider Metallhydroxyde. Kolloid-Z. **115**, 13 (1949).

26. Fischer, H., u. F. Kurz: Übermikroskopisches Bild anodischer Oxydfilme auf Aluminium und ihr Wachstum. Korros. u. Metallschutz **18**, 42 (1942).
27. Fricke, R., E. Gwinner u. Ch. Feichtner: Über Wärmeinhalt und Gitterzustand verschieden aktiver Formen von CuO und über die Bildungswärme von $Cu(OH)_2$. Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1744 (1938).
28. Friess, H., u. H. O. Müller: Staube und Rauche im Übermikroskop. Gasmaske **11**, 1 (1939).
29. Grube, G., u. U. Speidel: unveröff.
30. Haardick, H.: Über die Wechselwirkungen zwischen Aufdampfschichten und mikroskopischen Objekten. Optik **5**, 549 (1949).
31. Hall, C. E, and A. L. Schoen: Application of the electron microscope to the study of the photographic phenomena. J. opt. Soc. America **31**, 281 (1941).
32. Hass, G.: Untersuchungen über den Aufbau aufgedampfter Metallschichten mittels Übermikroskop und Elektroneninterferenzen. Kollcid-Z. **100**, 230 (1942).
33. — Über das Wachstum und die Struktur dünner Oxydschichten auf Aluminium. Z. anorg. allg. Chem. **254**, 96 (1947).
34. —, u. H. Kehler: Über eine temperaturbeständige und haltbare Trägerschicht für Elektroneninterferenzaufnahmen und übermikroskopische Untersuchungen. Kolloid-Z. **95**, 26 (1941).
35. — — Über ein Verfahren zur Untersuchung unzusammenhängender dünner Schichten im Übermikroskop und zur Herstellung von Abdruckfilmen und Trägerfolien mittels Aufdampfen von Silizium-Monoxyd. Optik **5**, 48 (1949).
36. Hast, N.: Production of Extremly Thin Metal Films by Evaporation on to Liquid Surfaces. Nature **162**, 892 (1948).
37. Heering, H., I. v. Gizycki u. A. Kirseck: Rußuntersuchungen mit dem Übermikroskop. Kautschuk **17**, 55 (1941).
38. Heidenreich, R. D., and V. G. Peck: Fine structure of metallic surfaces with the electron microscope. J. appl. Physics **14**, 23 (1943).
39. Hofmann, U.: Die Struktur und die technischen Eigenschaften des Kohlenstoffs. Wiener Chem. Z. **46**, 97 (1943).
40. —, u. W. Höper: Über die „aktiven Stellen" bei der Katalyse. Naturwiss. **32**, 225 (1944).
41. —, A. Jacob u. H. Loofmann: Untersuchung der Tonfraktion der Böden mit dem Elektronenmikroskop. Bodenkunde u. Pflanzenernähr. **25**, 257 (1941).
42. —, A. Ragoss, G. Rüdorff, R. Holst, W. Ruston, A. Russ u. G. Ruess: Die Struktur und die Graphitierung von Kohlenstoff. Z. anorg. allg. Chem. **255**, 195 (1947).
43. — — u. F. Sinkel: Die Struktur der Kolloide des feinkrystallinen Kohlenstoffs. Kolloid-Z. **96**, 231 (1941).
44. Huber, K.: J. Colloid Science **3**, 197 (1948).
45. —, u. B. Bieri: Orientierte Abscheidung von Oxyden bei der anodischen Oxydation. Helv. physica Acta **21**, 375 (1948).
46. Husemann, E., u. H. Ruska: Die Sichtbarmachung des p-Jodbenzoylglykogens. Naturwiss. **28**, 534 (1940).
47. Kempcke, E., F. Endter u. U. Hofmann: Der Halloysit von Bergnersreuth. Sprechsaal **82**, 1 (1949).
48. Koch, H. W.: Teilchengröße und Teilchengestalt in Goldsolen. Z. Elektrochem. **47**, 717 (1941).

49. KOHLSCHÜTTER, H. W.: Mitteilung an K. BEYERSDORFER.
50. —, u. H. MATTNER: Abscheidungen von Kieselsäure an Baumwollfasern Z. anorg. Chem. **262**, 122 (1950).
51. —, u. L. SPRENGER: Die Entwicklung der Topochemie. Z. angew. Chem. **52**, 197 (1939).
52. —V., u. W. FEITKNECHT: Helv. Chim. Acta **6**, 377 (1923).
53. KÖNIG, H.: Über das Schmelzen des Kohlenstoffs. Naturwiss. **34**, 108 (1947).
54. — Veränderung organischer Präparate im Elektronenmikroskop. Gött. Nachr. Math. Phys. Kl. 1946, 24.
55. — unveröff.
56. KRAUSE, F.: Das magnetische Übermikroskop und seine Anwendung in der Biologie. Naturwiss. **25**. 817 (1937).
57. MAHL, H.: Ein plastisches Abdruckverfahren zur übermikroskopischen Untersuchung von Metalloberflächen. Metallwirtsch. **19**, 488 (1940).
58. — Über die Erzeugung und Ablösung dünner Oberflächenfilme im Hinblick auf das Abdruckverfahren. Korros. u. Metallschutz **20**, 225 (1944).
59. — Übermikroskopische Beobachtungen an Aluminium-Ätzstrukturen. Zbl. Mineral., Geol., Paläont., Abt. A 182 (1941).
60 — Über thermisch erzeugte Oxydfilme bei Aluminium. Kolloid-Z. **100**, 219 (1942).
61. — Übermikroskopische Untersuchungen an oxydischen Oberflächenfilmen. Korros. u. Metallschutz **17**, 1 (1941).
62. —, u. F. PAWLEK: Übermikroskopische Untersuchungen an Aluminiumlegierungen. Z. Metallkunde **34**, 232 (1942).
63. — — Übermikroskopische Gefügeuntersuchungen an unlegierten Stählen. Arch. Eisenhüttenwes. **16**, 223 (1942).
64. —, u. I. N. STRANSKI: Über Ätzfiguren an Al-Krystalloberflächen I. Z. physik. Chem. B **51**, 319 (1942).
65. MARTHAM, R., K. M. SMITH, and R. W. G. WYCKOFF: Electron microscopy of tabacco necrosis virus crystals. Nature **161**, 760 (1948).
66. MEHL, R. F.: The structure and rate of formation of pearlite. Trans. Amer. Soc. Metals **29**, 813 (1941).
67. MÜLLER, H. O.: Die Ausmessung der Tiefe übermikroskopischer Objekte Kolloid-Z. **99**, 6 (1942).
67a. MÜLLER, E. W.: Sichtbarmachung der Phthalocyaninmolekel mit dem Feldelektronenmikroskop, Naturwiss. **37**, 333 (1950),
68. RADCZEWSKI, O. E., H. O. MÜLLER u. W. EITEL: Zur Hydratation des Tricalciumsilicats. Naturwiss. **27**, 807 (1939).
69. — — — Übermikroskopische Untersuchung der Hydratation des Kalkes. Zement **28**, 693 (1939).
70. RAGOSS, A., U. HOFMANN u. R. HOLST: Die Graphitierung von Thermax-Ruß. Kolloid-Z. **105**, 118 (1943).
71. REINMANN, R.: Zur Chemie, Thermodynamik und Morphologie der basischen Cadmiumchloride und von Cadmiumhydroxyd. Diss. Bern 1948.
72. RIBI, E.: Über Hydroxyverbindungen des Mangans. Diss. Bern 1948.
73. RIEDEL, G., u. H. RUSKA: Übermikroskopische Bestimmung der Teilchenzahl eines Sols über dessen aerodispersen Zustand. Kolloid-Z. **96**, 86 (1941).
74. ROCHOW, E. G.: An introduction to the chemistry of the silicones. New York: Wiley & Sons 1946.
75. RUESS, G.: Zur Objekterwärmung im Siemens-Elektronenmikroskop. Kolloid-Z. **109**, 149 (1944).

76. —, u. F. Vogt: Höchstlamellarer Kohlenstoff aus Graphitoxyhydroxyd. Mh. Chem. **78**, 222 (1948).
77. Ruska, E.: Beitrag zur übermikroskopischen Abbildung bei höheren Drucken. Kolloid-Z. **100**, 212 (1942).
78. Ruska, H.: Übermikroskopische Untersuchungstechnik. Naturwiss. **27**, 287 (1939).
79. Scherzer, O.: Können Atome im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden? Physik. Bl. **5**, 460 (1949).
80. Schoon, T. H. u. H. Klette: Der Aufbau typischer Adsorbentien. Naturwiss. **29**, 652 (1942).
81. Seeliger, R. u. J. Hunger: Das Prägeabdruckverfahren zur übermikroskopischen Oberflächenabbildung. Physik. Bl. **2**, 15 (1946).
82. Semmler, E.: Übermikroskopische Beobachtungen an tiefgeätztem Aluminium und Hydronalium. Aluminium **9**, 302 (1942).
83. Thiessen, P. A.: Wechselseitige Adsorption von Kolloiden. Z. Elektrochem. **48**, 675 (1942).
84. Trenktrog, W.: Diss. Kiel 1923.
85. Trotter, I., D. Mc. Lean, and C. I. B. Clews: The Microstructure of a Water-Quenched Carburized Iron, Symposium on metallurgical Applications of the Electron Microscope, London Nov. 1949, Nr. 1199, S. 75.
86. Weitbrecht, G. u. R. Fricke: Die Teilchengröße, Störstruktur und Sekundärstruktur des γ-Al_2O_3 und seiner Ausgangsstoffe. Z. anorg. allg. Chem. **253**, 9 (1945).
87. Wilsdorf, H.: Über das Wachstum elektrolytisch erzeugter poriger Aluminiumoxydschichten. Z. angew. Physik **2**, 17 (1950).
88. Zworykin, Marton, Ramberg, Hillier, Vance: Electron Optics and the Electron Microscope. New York 1945, S. 392.
89. — V. K., and E. G. Ramberg: Surface studies with the electron microscope. J. appl. Physics **12**, 692 (1941).
90. Zbinden, H. u. K. Huber: Experientia Vol. III/11, 1 (1947).

(Abgeschlossen im Mai 1950)

Dr. Kurt Beyersdorfer, (17a) Mosbach/Baden,
Süddeutsche Laboratorien.

Fortschr. chem. Forsch., Bd. 2, 92—145 (1951).

Organische Einschluß-Verbindungen.

Von

WILHELM SCHLENK jr.

Mit 32 Textabbildungen.

Inhaltsübersicht.

Seite

I. Definition der „Einschlußverbindungen" 92
II. Kanal-Einschlußverbindungen 94
1. Harnstoff-addukte 94
a) Die Struktur der Harnstoff-addukte 95
b) Das Molverhältnis 97
c) Gitterenergie 98
d) Dissoziation 100
e) Harnstoffadditionsverbindungen von anderem Gittertyp . . . 101
2. Thioharnstoff-addukte 102
3. Choleinsäuren 107
4. 4,4'-Dinitrodiphenyl-addukte 114
5. Schardinger-Dextrin-addukte 119
6. Zeolith-sorbate 120
III. Käfig-Einschlußverbindungen 122
1. Hydrochinon-clathrate-compounds 122
2. Dicyano-ammin-benzol-nickel 126
3. H_2O-Käfigverbindungen („Feste Gas- und Flüssigkeitshydrate") 127
IV. Schicht-Einschlußverbindungen 134
1. Tonmineral-sorbate 134
2. Basische Zinksalze organischer Säuren 139
3. Pferde-methämoglobin-hydrat 140
V. Schlußbemerkung 142
Literatur 143

I. Definition der „Einschlußverbindungen".

Während auf dem Gebiet der *anorganischen* Molekülverbindungen die Vorstellungen der von A. WERNER entwickelten Koordinationslehre für die Forschung eminent fruchtbar geworden sind und für die Systematik ein umfassendes Ordnungsprinzip geliefert haben, konnten für die *organischen* Verbindungen höherer Ordnung räumlicher Bau wie auch wirkende Bindungskräfte *nicht* unter gleich einfache und gleich einheitlich geltende Grundprinzipien eingeordnet werden. Der Fundamentalbegriff symmetrischer Lagerung um ein Koordinationszentrum existiert für die rein organischen Molekülverbindungen nicht; die Bindungskräfte lassen sich wohl manchmal, aber durchaus nicht immer auf die klassischen Vorstellungen der Elektronenvalenz zurückführen.

Ein Gesichtspunkt, der sich für die Erforschung der rein organischen Molekülverbindungen als fruchtbar erwiesen hat, ist die von PAUL PFEIFFER entwickelte „Lokalisationstheorie der Restaffinitätskräfte" (*38*). Nach dieser Auffassung kommt bestimmten funktionellen Gruppen oder Bezirken der zusammengelagerten Moleküle die entscheidende Bedeutung für den Zusammenhalt der Kombinationsprodukte zu. Implicite liegt diese Annahme auch der heute gebräuchlichen Systematik der rein organischen Molekülverbindungen zugrunde, welche die Additionsprodukte nach chemischer Ähnlichkeit in Gruppen zusammenfaßt und diese Gruppen dann nebeneinander aufreiht: die Gruppe der Chinhydrone, die Gruppe der Molekülverbindungen der Ketone, die Gruppe der Molekülverbindungen der Nitrokörper u. s. f.

Es gibt nun einige Molekülverbindungen — zum Teil sind sie seit langem bekannt, zum größeren Teil erst in jüngster Zeit entdeckt und bearbeitet worden —, die sich diesem System *nicht* einordnen lassen, da bei ihnen lokalisierte Bindungskräfte der PFEIFFERschen Art entweder überhaupt nicht angenommen werden können oder wenigstens nicht die ausschlaggebende Rolle spielen: Das erste gilt z. B. für die seit langem bekannten Hydrate der Paraffine und für die Desoxycholsäure-, Harnstoff- und Thioharnstoffaddukte der Paraffine; das zweite für die Desoxycholsäure-, Harnstoff-, Thioharnstoff- und Dinitrodiphenyladdukte anderer Körperklassen. Für die eingehende Erforschung derartiger Kombinationsprodukte haben nicht Erwägungen über die wirkenden Kräfte, sondern Studien über die räumliche Lage der Komponenten im Krystall den Ausgangspunkt gebildet; und es ist für all diese Produkte eine Art von krystallchemischer Verwandtschaft zutage getreten, die eine ungezwungene Zusammenfassung zu einer besonderen Gruppe erlaubt.

Das Gemeinsame der hier zu besprechenden Molekülverbindungen ist die gleichartige räumliche Lagerung der Komponenten im Molekülverbindungskrystall: Die eine der jeweiligen Verbindungskomponenten bildet ein invariables Grundgitter, welches Hohlräume birgt. In diesen Hohlräumen sind die Moleküle der anderen Komponenten eingelagert, manchmal mehr oder weniger beweglich, manchmal in definierten Punktlagen. Das betreffende Grundgitter bildet sich im allgemeinen nur in Berührung mit dem Verbindungspartner aus und ist nur in seiner Gegenwart stabil; in einigen Fällen ist partielle oder gänzliche Entfernung der eingelagerten Moleküle möglich, ohne daß das Hohlraumgitter kollabiert.

Einfache geometrische Überlegung ergibt, daß für die Gestalt der Gitterhohlräume grundsätzlich drei Möglichkeiten denkbar sind: Sie können erstens dreidimensional geschlossen, d. h. käfigartig sein; sie können zweitens nach einer Dimension offen, d. h. kanalförmig sein; und sie können drittens nach zwei Dimensionen offen, d. h. schichtförmig sein. Alle drei Möglichkeiten findet man verwirklicht; es wird also

im folgenden von „Käfigverbindungen", „Kanalverbindungen" und „Schichtverbindungen" die Rede sein. Als Oberbegriff ist die Bezeichnung „Einschlußverbindungen" gewählt; der naheliegende Ausdruck „Einlagerungsverbindung" wird vermieden, da diesem Wort bereits vor langem von A. WERNER ein anderer, spezieller Sinn unterlegt worden ist (*54*).

Wenn im vorliegenden Referat eine Zusammenfassung chemisch weit auseinanderliegender Verbindungsgruppen nach der Ähnlichkeit ihres Krystallbaues vorgenommen wird, so erhebt sich die Frage, ob ein solcher Gesichtspunkt nicht zu einer bloßen Anhäufung morphologischer Konvergenzerscheinungen führt. Im Verlauf der Einzelbesprechung der Verbindungsklassen wird sich ergeben, daß der architektonischen Gleichartigkeit weitgehende Ähnlichkeit der wirkenden Kräfte zugeordnet ist, d. h. zugrunde liegen dürfte, so daß sich auch vom dynamischen Gesichtspunkt aus die vorgenommene Zusammenfassung rechtfertigt.

II. Kanal-Einschlußverbindungen.

1. Harnstoffaddukte.

An die Spitze der Besprechung seien die 1940 von F. BENGEN (*5*) entdeckten Harnstoffaddukte gestellt, weil diese Gruppe eine ganz besonders große Zahl von Verbindungen umfaßt, weil ferner in dieser Klasse die Dominanz der geometrischen Verhältnisse über valenzchemische Einflüsse besonders klar zum Ausdruck kommt, und weil hier die interessante und den herkömmlichen Anschauungen ungewohnte Tatsache nicht ganzzahliger Molverhältnisse bei gleichzeitiger strenger Gültigkeit des Gesetzes der konstanten Verbindungsgewichte aufgefunden wurde und sich als einfache Folge der geometrischen Verhältnisse deuten ließ (*47*).

Harnstoff bildet unter denkbar einfachen Versuchsbedingungen — meist genügt bloßes Mischen von gelöstem oder pulverisiertem Harnstoff mit dem betreffenden organischen Partner — mit einer erstaunlich großen Anzahl verschiedenartiger organischer Verbindungen krystallisierte, zum Teil recht beständige, Additionsverbindungen. Als befähigt zur Harnstoffaddition wurden bisher erkannt: Paraffin- und Olefinkohlenwasserstoffe, Alkohole, Äther, Ketone, Mono- und Dicarbonsäuren, Ester, Halogenide, Amine, Nitrile, Thioverbindungen. Die Addukte sind echte Verbindungen, wie durch Tensionsanalysen und durch Feststellung der Gültigkeit des Gesetzes der konstanten Verbindungsgewichte bewiesen wurde. Das Molverhältnis zwischen Harnstoff und Partner ist in der Regel nichtganzzahlig.

Es ergab sich, daß zur Harnstoffaddition vorzugsweise *geradkettige* aliphatische Verbindungen geeignet sind, daß sich verzweigte Aliphaten

nur dann an Harnstoff anlagern, wenn die Moleküle verhältnismäßig lang und die Verzweigungsstellen nicht eng benachbart sind, und daß Aromaten nur dann Harnstoffaddukte bilden, wenn sie eine längere aliphatische Seitenkette tragen.

Sowohl die Nichtganzzahligkeit des Molverhältnisses trotz Gültigkeit des Gesetzes der konstanten Proportionen, wie auch die anderen aufgezählten Sonderbarkeiten erklärten sich in einfacher Weise aus der im folgenden zu beschreibenden Krystallstruktur.

a) Die Struktur der Harnstoffaddukte.

Bei Berührung mit additionsfähigen organischen Substanzen der besprochenen Art, z. B. Hexadecan, gruppieren sich die Moleküle des normalen, tetragonal krystallisierten Harnstoffs ($a = 5{,}73$; $c = 4{,}77$; Raumgruppe V_d^3; $Z = 2$ Moleküle) zu einem hexagonalen Gitter um ($a = 8{,}20$; $c = 11{,}1$; Raumgruppe D_6^2; $Z = 6$ Moleküle). Die Harnstoffmoleküle haben nunmehr ihren Platz im Krystall in den Längskanten regulärer sechsseitiger Prismen. Hierdurch entsteht ein wabenartiges Gefüge mit durchgehenden prismatischen Hohlräumen. In diese Kanäle des Grundgitters, das bei allen Addukten dieser Art dasselbe ist, lagern sich, in gestreckter Gestalt, die Partnermoleküle ein. Sie besetzen dabei, relativ zu den Harnstoffmolekülen, keine definierten, periodisch wiederkehrenden Punkte. Eine strenge Ordnung wird nur insoweit eingehalten, als die gestreckten Partnermoleküle sich linear aneinanderreihen und dabei einen bei allen Addukten sehr annähernd gleich großen statistischen Mittelabstand von etwa 2,4 Å „head to tale" einhalten.

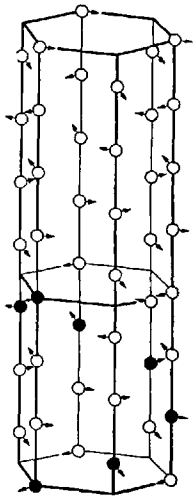


Abb. 1. Das Grundgitter der hexagonalen Harnstoff-addukte [nach C. HERMANN, cf. SCHLENK (47)].

Abb. 1 zeigt, schematisiert, das hexagonale Grundgitter. Der abgegrenzte untere Teil stellt die Elementarzelle, die Kreise stellen die in den Prismenkanten liegenden Sauerstoffatome der Harnstoffmoleküle dar, die Pfeile zeigen die Richtung der Ebenen $O{-}C\langle^{N}_{N}$ dieser Harnstoffmoleküle an. 6 schwarze Moleküle (das oberste und das unterste in der Abbildung ist nur halb zu zählen) sind als der Elementarzelle zugeordnet zu denken, die übrigen rechnen zu den umgebenden 6 Nachbarprismen. In der Abb. 2 sind die Harnstoffmoleküle maßstabtreu mit ihrer ungefähren Wirkungssphäre abgebildet; im Inneren des Prismas befinden sich zwei Moleküle n-Octan, im Abstand von 2,4 Å aneinanderstoßend.

Dieses Strukturbild erklärt zunächst die seltsame Tatsache, daß bevorzugt geradkettige, weniger leicht oder gar nicht dagegen verzweigte oder cyclische organische Moleküle zur Bildung von Harnstoffadduktен dieser Art neigen. Abb. 3 zeigt den Querschnitt des hexagonalen Gitters mit eingelagertem

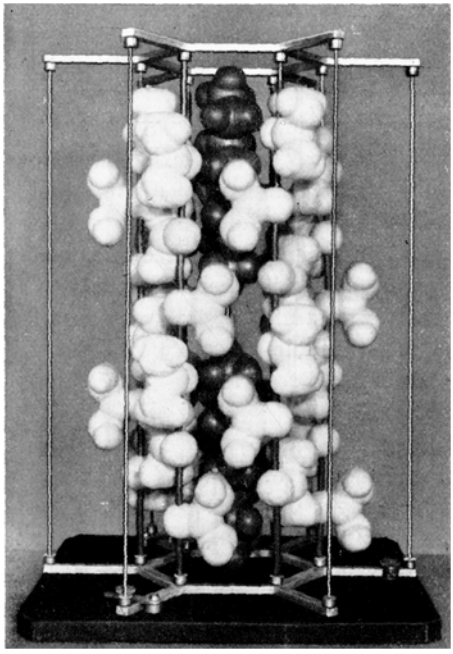


Abb. 2. n-Octan-harnstoff, in seitlicher Ansicht [nach SCHLENK (*47*)].

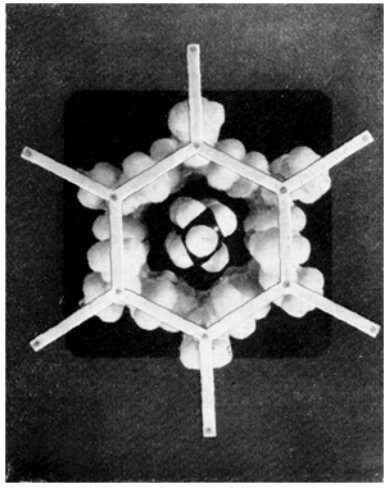


Abb. 3. n-Octan-harnstoff, in Richtung der *c*-Achse gesehen [nach SCHLENK (*47*)].

n-Octan In Abb. 4 ist nebeneinander der Querschnitt des Gitterhohlraumes und der Moleküle n-Octan (links), 3-Methylheptan (rechts), Benzol (oben) und 2,2,4-Trimethylpentan (unten) gezeichnet. Man sieht, daß das n-Octanmolekül leicht, das 3-Methylheptan- und das Benzolmolekül knapp, das 2,2,4-Trimethylpentanmolekül jedoch nicht mehr im Hohlraum unterzubringen ist, ohne daß es zu einer Überschneidung der Wirkungssphären kommt. Diesem Bild entsprechen genau die experimentellen Ergebnisse: n-Octan wirkt spontan adduktbildend, Verbindungen mit einfacher Methylverzweigung oder mit einem Benzolring lassen sich unter gewissen Bedingungen ebenfalls einlagern, bei stark verzweigten Verbindungen wie 2,2,4-Trimethylpentan gelingt dies dagegen *nicht*.

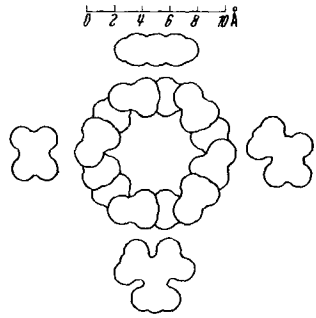


Abb. 4. Querschnitt des Gitterhohlraums und der Moleküle n-Octan, Benzol, 3-Methylheptan und 2,2,4-Trimethylpentan [nach SCHLENK (*47*)].

b) Das Molverhältnis.

Auch die beobachteten Molverhältnisse erklären sich aus der Krystallstruktur. Die pro Partnermolekül gebundene Harnstoffmenge erwies sich in allen untersuchten (mehr als 40 verschiedenen) Addukten dieser Art

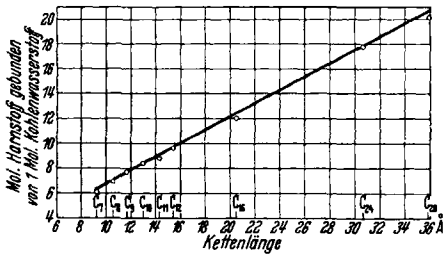


Abb. 5. Paraffin-harnstoff-addukte, Abhängigkeit der Zusammensetzung von der Kettenlänge [nach SCHLENK (47)].

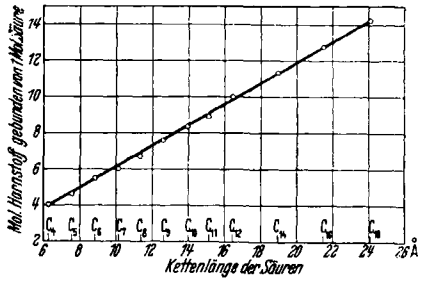


Abb. 6. Carbonsäure-harnstoff-addukte, Abhängigkeit der Zusammensetzung von der Kettenlänge [nach SCHLENK (47)].

als proportional zur Kettenlänge des Moleküls. Für zwei Verbindungsklassen, Paraffine und Paraffinmonocarbonsäuren, ist dieser Zusammenhang in Abb. 5 und Abb. 6 wiedergegeben. Angesichts der gestreckten Lage der Moleküle im Krystall ist der Sachverhalt unmittelbar plausibel. Gleichzeitig verliert die in den meisten Fällen beobachtete Nichtganzzahligkeit des Molverhältnisses ihre besondere Seltsamkeit. Die bereits erwähnte Tatsache, daß die eingelagerten Moleküle, unabhängig von ihrer eigenen Länge und Art, einen konstanten Abstand von 2,4 Å zwischeneinander einhalten, ergibt sich, wenn man die Länge der organischen Moleküle in Beziehung setzt zu derjenigen Kanalstrecke, welche durch die laut Analyse pro Partnermolekül gebundene Anzahl von Harnstoffmolekülen repräsentiert wird. Abb. 7 gibt diese Verhältnisse für die untersuchten Kohlenwasserstoffaddukte wieder. Man sieht, daß zwischen jeweils verfügbarer und effektiv belegter Kanalstrecke für alle Addukte die gleiche Differenz (nämlich 2,4 Å) besteht. Für die Harnstoffaddukte der übrigen Verbindungsklassen gilt, mit geringfügigen Abweichungen, das nämliche.

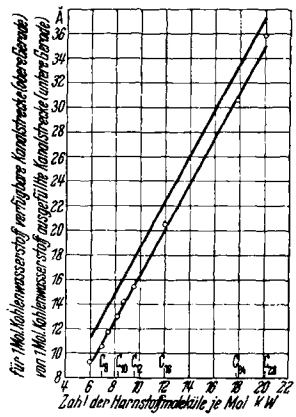


Abb. 7. Verfügbarer und ausgefüllter Hohlraum im hexagonalen Gitter der Harnstoff-addukte von Kohlenwasserstoffen [nach SCHLENK (47)].

Die Nichtganzzahligkeit der Molverhältnisse ist nun nichts als die einfache Konsequenz des Packungsprinzips der Aneinanderreihung der

eingelagerten Moleküle unter konstanter Einhaltung des Abstandes 2,4 Å head to tale. Betrachtet man die Addukte der Glieder einer homologen Reihe, z. B. der Paraffine, so würde, wie eine einfache geometrische Überlegung ergibt, sprunghaft steigende *Ganz*zahligkeit des Molverhältnisses für jeden Einzelfall nur dann resultieren können, wenn der Packungsabstand der Paraffinmoleküle von Addukt zu Addukt wechselnd bald größer, bald kleiner wäre, da der Längenzuwachs der Paraffinkette pro CH_2-Gruppe (1,27 Å) nicht etwa gleich ist dem in Richtung der *c*-Achse gemessenen Abstand aufeinander folgender Harnstoffmoleküle (1,85 Å) der hexagonalen Elementarzelle. Eine Durchbrechung des Prinzips optimaler Raumausnützung, d. h. Abweichungen von dem konstanten Molekülabstand 2,4 Å, hätte zur Voraussetzung, daß bei der Bindung der eingelagerten Moleküle lokalisierte Kräfte wirksam wären, die diese *gegen* die Wirkung der VAN DER WAALSschen Kräfte in „unökonomischer" Stellung zu halten vermöchten.

Daß dem offensichtlich *nicht* so ist, nimmt bei den Paraffinaddukten nicht Wunder. Daß auch bei den Carbonsäure- und sonstigen Addukten, bei denen auf Grund der relativ hohen Inkremente der Anlagerungswärme ihrer funktionellen Gruppen (s. S. 100) zweifellos das Mitwirken lokalisierter, spezifischer Bindungskräfte angenommen werden muß, *gleichfalls* der konstante Molekülabstand von 2,4 Å eingehalten wird und mithin nicht ganzzahlige Molverhältnisse resultieren, zwingt zu dem Schluß, daß die lokalisierten Kräfte in diesen Fällen nicht groß genug sind, um sich gegen die vom Gesamtmolekül ausgehenden VAN DER WAALSschen Kräfte durchzusetzen.

Tabelle 1. *Die Dichte von Harnstoffaddukten des Cetanharnstofftyps.*

Organische Komponente	d_4^{20} ber.	d_4^{20} gef.
n-Dodecan	1,205	1,203
Cetan	1,205	1,200
Cetylalkohol	1,235	1,229
Laurinsäure	1,245	1,242
Laurinsäuremethylester	1,240	1,237
n-Dipropylketon	1,225	1,219
1-Chloroctan	1,235	1,241
4,4'-Dichlordibutyläther	1,310	1,307

Die Richtigkeit der aus der Strukturuntersuchung entwickelten Vorstellungen über den räumlichen Bau der Addukte und gleichzeitig die Richtigkeit der analytisch ermittelten Molverhältnisse wird durch die gute Übereinstimmung bestätigt, die sich bei der Gegenüberstellung der errechneten und gemessenen Dichtewerte der Addukte ergibt (Tabelle 1).

c) Die Gitterenergie

Die Bildung der Addukte ist ein exothermer Vorgang (Tabelle 2).

Man kann die Wärmetönung Q', die gemessen wird, wenn krystalliner, tetragonaler Harnstoff und eine flüssige organische Verbindung ein hexa-

gonales Addukt miteinander bilden, als das Ergebnis von 3 Teilvorgängen auffassen:

1. Die im flüssigen Zustand miteinander im Verband stehenden Octanmoleküle werden unter Überwindung der Molkohäsion in Einzelmoleküle isoliert.

2. Die Harnstoffmoleküle und Octanmoleküle lagern sich aneinander.

3. Die Harnstoffmoleküle werden aus der Lage im tetragonalen Gitter in die des hexagonalen Gitters überführt.

Tabelle 2. *Wärmetönung der Bildung von Harnstoffaddukten.*

Organische Komponente	cal/Mol Harnstoff	cal/Mol organische Substanz
n-Octan	1010	7160
n-Decan	1100	9120
n-Hexadecan	1240	14900
Methyläthylketon	1071	4285
Diäthylketon	1172	5500
Dipropylketon	1229	7370
n-Octanol	809	5420
n-Buttersäure	1365	5440
n-Buttersäuremethylester	1034	5580

Die bei Vorgang 1 zu leistende Arbeit kann angenähert gleich gesetzt werden der inneren Verdampfungswärme L der organischen Verbindung. Der Energiebedarf Q_3 des Vorganges 3, der Gitterumwandlung des Harnstoffs, ist bei der Bildung aller Addukte gleich groß. Vorgang 2, die Aneinanderlagerung der Partnermoleküle, ist die energieliefernde Teilreaktion. Die Wärmetönung dieses Vorganges sei Q_2 genannt. Dann gilt für die Energiebilanz

$$Q_2 - Q_3 - L = Q'.$$

Es sei nun die Energiebilanz für die Harnstoffaddition eines kürzeren und eines längeren Kohlenwasserstoffs, z. B. des n-Octans und des n-Hexadecans, verglichen. Die Anlagerungswärme Q_2, auf die gleiche Menge Harnstoff, das heißt auf die gleiche Kanallänge bezogen, muß im Falle des Cetans größer sein als im Fall des Octans, da die zur Lieferung der Anlagerungswärme nichts beitragenden Leerstellen zwischen den Kohlenwasserstoffmolekülen im Addukt des kurzen Kohlenwasserstoffs zahlreicher sind als in dem des langen. Die Gitterumwandlungsenergie Q_3 hat dagegen in beiden Fällen den gleichen Wert. Da für beide Fälle der besetzte und der leere Kanalraum zahlenmäßig bekannt ist (10,4 Å besetzt und 2,4 Å leer pro Mol Octan; 20,5 Å besetzt und 2,4 Å leer pro Mol Hexadecan) lassen sich zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten aufstellen:

$$10{,}4\,Q_2 - (10{,}4 + 2{,}4)\,Q_3 - L_{\text{Octan}} = Q'_{\text{Octan}}$$
$$20{,}5\,Q_2 - (20{,}5 + 2{,}4)\,Q_3 - L_{\text{Hexadecan}} = Q'_{\text{Hexadecan}}$$

Durch Einsetzung der bekannten Werte L für Octan und Hexadecan und der experimentell ermittelten Wärmetönungen Q' ergab sich, daß die Gitterumwandlungsenergie etwa 1000 cal pro Mol Harnstoff und die Anlagerungswärme für das g-Äquivalent der Methylengruppe etwa 2700 cal beträgt. Entsprechende Rechnungen für die Adduktbildung anderer Paraffinkohlenwasserstoffe bestätigten diese Zahlen. Die Inkremente der Anlagerungswärme anderer Gruppen (OH, CO, COOH, COO–) wurden aus entsprechenden Gleichungen errechnet, wobei die ermittelten

Werte des CH_2-Inkrementes und der Gitterumwandlungsenergie eingesetzt wurden. In der Tabelle 3 sind die erhaltenen Werte zusammengestellt.

Man sieht, daß die Gruppen, bei denen eine spezifische Bindung, z. B. die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Harnstoff in Betracht zu ziehen ist, deutlich höhere Werte für die Anlagerungswärme aufweisen als die Methylengruppe. Dennoch überwiegt bei Verbindungen mit einigermaßen großem paraffinischem Bereich des Moleküls, z. B. Dipropylketon oder Stearinsäure, der Gesamtanteil der Methylengruppen an der Anlagerungsenergie bei weitem den spezifischen Anteil der polaren Gruppen. Bei kurzen Molekülen und besonders bei Gegenwart *zweier* polarer Gruppen ist es umgekehrt. Es ist möglich, daß mit dem höheren prozentuellen Anteil polarer Bindungskräfte das abweichende Verhalten kurzkettiger sowie mancher bifunktioneller Verbindungen zusammenhängt: Die Tatsache zum Beispiel, daß das Addukt des ersten Homologen der Ketonreihe, des Acetons, ein von der Norm abweichendes Gitter aufweist; daß in der Reihe der Carbonsäuren erst von der Buttersäure an und in der Reihe der Dicarbonsäuren erst von der Sebacinsäure an Addukte vom hexagonalen Normaltyps gebildet werden. Im übrigen ist die geringere Tendenz kurzer Moleküle zur Bildung von Kanaleinschlußverbindungen dadurch bedingt, daß in solchen Fällen die zur Energielieferung nicht beitragenden Leerstellen prozentuell höher ins Gewicht fallen.

Tabelle 3. *Die Inkremente der Anlagerungswärme bei der Harnstoff-Adduktbildung.*

Gruppe	Anlagerungswärme in cal	
	pro g-Äquival. der Gruppe	pro 1 Å Länge
CH_2	2 700	2150
C=O	7 900	6300
—OH . . .	4 300	3000
—COOH . .	13 600	5500
—COO— . .	8 200	3400

d) Dissoziation.

Im allgemeinen lassen sich definierte Schmelzpunkte für die organischen Harnstoffadditionsverbindungen nicht feststellen, da vor Erreichung der Schmelztemperatur Dissoziation eintritt. Bei gewöhnlicher Temperatur sind die Additionsverbindungen an der Luft praktisch unbegrenzt haltbar, sofern die organische Komponente so geringen Dampfdruck besitzt, wie z. B. Cetan oder Stearinsäure. Die Addukte flüchtiger Verbindungen, z. B. Heptan, Diäthylketon oder Buttersäure, haben dagegen auch bei Raumtemperatur schon merklichen Dampfdruck.

Zwischen Addukt und Gasphase stellt sich ein von beiden Seiten her erreichbares Gleichgewicht ein; es lassen sich also auch durch Einwirkung gasförmiger Verbindungen auf krystallisierten Harnstoff Addukte darstellen.

Für einige Addukte, z. B. Heptanharnstoff, wurde durch Tensionsanalysen der Charakter als „echte Verbindungen" bewiesen: nach par-

tiellem Abpumpen der flüchtigen Komponente stellt sich, bis zum völligen Entzug, immer wieder der nämliche, charakteristische Dampfdruck ein. So entstehen also nicht etwa Addukte mit allmählich sinkendem Heptangehalt, sondern bis zum Schluß bleibt ursprüngliches 6,1 : 1 Addukt erhalten, während sich ein dem Heptanentzug äquivalenter Betrag in „leeren", tetragonalen Harnstoff verwandelt.

Auch in Berührung mit Lösungsmitteln dissozieren die Addukte unter Ausbildung eines Gleichgewichtszustandes in die Komponenten.

Dieser Umstand ist der Grund dafür, daß aus Gemischen die an sich zur Adduktbildung befähigten Komponenten im allgemeinen nicht restlos mittels Harnstoff abgetrennt werden können.

Da Temperaturerhöhung im Sinne steigender Dissoziation wirkt, ist ceteris paribus der erzielbare Trenneffekt bei tiefer Temperatur besser als bei höherer.

Nach den vorausgehenden energetischen Betrachtungen ist verständlich, daß die Dissoziationskonstante stark von der Molekülgröße der gebundenen organischen Komponente abhängt. Wie groß der Einfluß der Kettenlänge ist, zeigt folgendes Beispiel: 1 Mol Heptanaddukt dissoziiert in 100 Mol Benzol praktisch restlos in die Komponenten, 1 Mol Cetanaddukt in der gleichen Menge Benzol dagegen nur zu etwa 3%. Auf Grund der unterschiedlichen Bindungsfestigkeit lassen sich aus *Gemischen* von Adduktbildnern unter geeigneten Versuchsbedingungen die einzelnen Komponenten, gestuft nach ihrer Affinität zum Harnstoff, mehr oder weniger rein einzeln abtrennen; andererseits können aus Adduktgemischen — oder Mischaddukten — die einzelnen organischen Komponenten in entsprechender Weise fraktioniert extrahiert werden.

e) Harnstoffadditionsverbindungen von anderem Gittertyp.

Seit langem bekannt sind Additionsverbindungen des Harnstoffs mit einigen niedrigmolekularen Carbonsäuren. Ameisensäure bildet unter Wasserabspaltung Monoformylharnstoff; Essigsäure bildet eine Verbindung der Zusammensetzung $CO(NH_2)_2 \cdot 1\ CH_3COOH$; Bernsteinsäure und Adipinsäure bilden Verbindungen von der molekularen Zusammensetzung 1 Säure : 2 Harnstoff. In all diesen Fällen handelt es sich um molekular-stöchiometrische Verbindungen von salzartiger Natur. Es gibt aber auch eine Reihe von organischen Harnstoffaddukten, in denen mehr Harnstoff von der organischen Komponente gebunden wird, als valenzmäßig zu deuten ist, die in dieser Hinsicht also den Addukten vom Cetanharnstofftyp an die Seite zu stellen sind, die aber dennoch, wie die Röntgenogramme zeigten, abweichende Strukturen besitzen. Einige dieser Produkte sind in der folgenden Tabelle 4 aufgeführt:

Tabelle 4. *Harnstoff-Addukte von besonderer Struktur.*

Organische Komponente	Molverhältnis Harnstoff: org. Komponente	Gitter-struktur
1,4-Dichlorbutan	4,5	a
1,6-Dichlorhexan	6,0	a
1,6-Dibromhexan	5,2	b
1,6-Diaminopropan . . .	5,6	c
Korksäuredinitril	5,7	d
Aceton	2,8	e

Von keinem dieser Addukte ist bisher die Krystallstruktur näher untersucht worden [1], doch spricht einiges dafür, daß die Strukturen im Prinzip der des Cetanharnstoffs ähnlich sein könnten. Das Molverhältnis hat, unabhängig von den Bedingungen der Herstellung, jeweils einen konstanten Wert. Der Quotient ist in der Regel nichtganzzahlig; daß das Addukt des 1,6-Dichlorhexans hiervon eine prinzipielle Ausnahme macht, ist unwahrscheinlich, vielmehr weist der Umstand der Gitteridentität mit dem 1,4-Dichlorbutanaddukt darauf hin, daß die Ganzzahligkeit hier, wie bei den „ganzzahligen" Addukten des Cetanharnstofftyps, ein „Zufall" ist. Für die höheren Homologen des Acetons und des Korksäuredinitrils ist erwiesen, daß sie zum „Cetanharnstofftyp" gehören; daß das nämliche für die Addukte der Homologen der übrigen in der Tabelle 4 aufgeführten Verbindungen gilt, sofern der „paraffinische" Anteil der Moleküle nur einen genügend hohen Anteil ausmacht, kann als sehr wahrscheinlich gelten. Als besonders merkwürdig sei vermerkt, daß das Addukt des 1,5-Dibrompentans im Gegensatz zum 1,6-Dibromhexanaddukt die hexagonale Struktur des Cetanharnstoffs besitzt (das Molverhältnis ist 6,6 : 1). Zweifellos wird nicht nur das Ergebnis der Strukturuntersuchung der aufgeführten Addukte, sondern insbesondere das Studium derjenigen Homologen zu aufschlußreichen Erwägungen Anlaß geben können, die in dem Bereich liegen, in dem jeweils die Morphotropie in der homologen Reihe zu konstatieren ist.

Zum Schluß sei eine tabellarische Übersicht über einige der bisher untersuchten (*47*) Harnstoffaddukte vom hexagonalen Gittertyp gegeben (Tabelle *5*)

2. *Thioharnstoffaddukte.*

Ebenso wie Harnstoff bildet auch Thioharnstoff mit zahlreichen organischen Verbindungen Additionsprodukte, die zum Typ der Einschlußverbindungen gehören. Die ersten Addukte dieser Art sind 1947 von B. ANGLA beschrieben worden (1), doch war damals das Bauprinzip (*48, 49*) noch unbekannt.

[1] *C.* HERMANN und Mitarbeiter (Marburg/Lahn) sind mit einschlägigen Stukturuntersuchungen beschäftigt (Privatmitteilung).

Tabelle 5. *Harnstoff-Einschlußverbindungen vom hexagonalen Typ.*

Organische Komponente	Mol Harnstoff: 1 Mol org. Komponente	Organische Komponente	Mol Harnstoff: 1 Mol org. Komponente
Hexan	5,5	Octanol-1	6,9
Heptan	6,1	Decanol-1	8,1
Octan	7,0	Dodecanol-1	9,3
Nonan	7,7	Tetradecanol-1	10,6
Decan	8,3	Hexadecanol-1	12,3
Undecan	8,7	Decanol-5	7,9
Dodecan	9,7	Tridecanol-6	10,1
Hexadecan	12,2	Tetradecanol-7	10,7
Tetraeicosan	18,0	1-Chloroctan	7,7
Octaeicosan	21,4	1-Chlordodecan	10,0
Octen-1	7,2	1-Chlortetradecan	11,6
Decen-1	8,1	1-Bromoctan	7,2
Octadecylbenzol	16,0	1-Bromdecan	8,9
n-Buttersäure	4,0	Buttersäure-methylester	5,4
Valeriansäure	4,6	Caprylsäure-methylester	8,3
Capronsäure	5,4	Laurinsäure-methylester	10,5
Oenanthsäure	6,0	Myristinsäure-methylester	12,3
Caprylsäure	6,7	Palmitinsäure-methylester	13,3
Pelargonsäure	7,6	Stearinsäure-methylester	14,9
Caprinsäure	8,2	Adipinsäure-dimethylester	7,3
Undecansäure	8,9	Sebacinsäure-dimethylester	10,1
Laurinsäure	10,0	Sebacinsäure-diäthylester	11,6
Myristinsäure	11,6	1,6-Difluorhexan	5,6
Palmitinsäure	12,8	4,4'-Dichlordibutyläther	7,8
Stearinsäure	14,2	1,5-Dibrompentan	6,6
Methyläthylketon	4,0	Sebacinsäure	10,9
Diäthylketon	4,8		
Dipropylketon	6,0		

Wie bei der Harnstoffaddition, spielt auch bei der Thioharnstoffaddition die chemische Natur der Partner eine untergeordnete Rolle. Ausschlaggebend dafür, ob eine Verbindung von Thioharnstoff addiert wird, ist in erster Linie die Gestalt und Größe ihrer Moleküle. Interessanterweise sind nun aber die Maße, die die Moleküle aufweisen müssen, um von Thioharnstoff addiert werden zu können, verschieden von denen, die zur Harnstoffaddition befähigen. Der Thioharnstoff könnte in dieser Hinsicht geradezu als Antipode des Harnstoffs bezeichnet werden: Von Harnstoff werden die unverzweigten Aliphaten, nicht dagegen die verzweigten und nicht die cyclischen Verbindungen addiert. Beim Thioharnstoff ist es umgekehrt: Addiert werden vorzugsweise stark verzweigte Aliphaten sowie cyclische Verbindungen, nicht dagegen unverzweigte Aliphaten. Pulverdiagramme von Thioharnstoffaddukten mit Komponenten der verschiedensten Art erwiesen sich als identisch oder zeigten höchstens geringfügige Abweichungen voneinander. Daraus war

der Schluß zu ziehen, daß analog wie bei den Harnstoffaddukten ein invariables, von den Molekülen des Thioharnstoffs gebildetes Grundgitter vorliegt, das Hohlräume aufweisen muß, die den Partnermolekülen Platz bieten. Die präparativen und analytischen Erfahrungen ließen hinsichtlich der Gestalt der Hohlräume keinen Zweifel daran, daß sie *kanal*förmig sein muß. Denn nur die Annahme in einer Dimension offener Hohlräume ist mit der Tatsache vereinbar, daß ohne Änderung des Grundgitters auch langgestreckte Moleküle eingelagert werden können. So werden z. B. 1,9-Dicyclohexylnonan, p-Dicyclohexylbenzol, Isododecyclohexan addiert. Nichts spricht dafür, daß nicht auch Verbindungen mit noch längeren Molekülen addiert werden können. Die Strukturanalyse [C. HERMANN und M. RENNINGER, cf. (*49*)] bestätigte aufs beste das auf Grund der präparativen und analytischen Erfahrungen entworfene Bild.

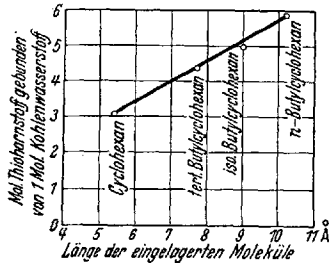


Abb. 8. Thioharnstoff-addukte von Cyclohexanhomologen, Abhängigkeit der Zusammensetzung von der Kettenlänge.

Wie bei den Harnstoffaddukten gilt das Gesetz der konstanten Verbindungsgewichte; die Thioharnstoffaddukte sind also nach herkömmlichem Brauch als echte Verbindungen zu bezeichnen. Die pro Mol des Partners gebundene Menge Thioharnstoff ist angenähert proportional zur Länge der Moleküle. Die auftretenden Molverhältnisse sind, wie bei den Harnstoffaddukten, häufig nichtganzzahlig. In Abb. 8 sind die Molverhältnisse für die Addukte des Cyclohexans und einiger Homologen gegen die Länge der betreffenden Moleküle aufgetragen. Abb. 9 gibt das Molverhältnis in Abhängigkeit von der Länge der Partnermoleküle für 11 weitere, verschiedenartige Addukte wieder. Man sieht, daß der funktionelle Zusammenhang der nämliche ist, wie für die Addukte der Cyclohexanhomologen.

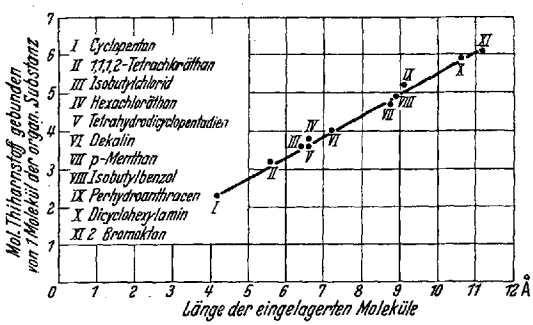


Abb. 9. Thioharnstoff-addukte von aliphatischen und cyclischen Verbindungen, Abhängigkeit der Zusammensetzung von der Kettenlänge.

Die Tatsache, daß es gerade von Harnstoff nicht addierbare „dicke" Moleküle, wie Tetramethylbutan, Trimethylpentan, Dicyclohexyl, Cyclooctan, Dekahydronaphthalin sind, die von Thioharnstoff addiert wer-

den, führte zu dem Schluß, daß das Lumen der Hohlräume im Thioharnstoffgitter größer sein muß als das der Kanäle im Harnstoffadduktgitter.

Nun hätten, geometrisch betrachtet, in geräumigeren Kanälen dieser Art natürlich auch *unverzweigte* Aliphaten Platz. Warum bilden diese dennoch keine Thioharnstoffaddukte? Den Schlüssel zum Verständnis dieser Tatsache liefert eine einfache thermodynamische Überlegung. Energetisch wird sich bei der Thioharnstoffaddition zweifellos Analoges abspielen wie bei der Harnstoffaddition: Der Energiegewinn der Aneinanderlagerung der Thioharnstoff- und der Partnermoleküle muß die Umwandlung des Thioharnstoffgitters bestreiten. Betrachten wir den Vorgang der Einlagerung des Moleküls eines hochverzweigten Paraffins wie Tetramethylbutan mit dem, was bei der Einlagerung eines Moleküls n-Octan geschehen würde. Zur Wirkung kommen bei Einlagerungen dieser Art zweifellos nur VAN DER WAALSsche Kräfte. Es steht außer Zweifel, daß im ersten Fall, bei annähernd praller, allseitig gleichmäßiger Lumenausfüllung (Abb. 10 links) ein wesentlich größerer Energiebetrag frei wird, als im Fall der Einlagerung des schlanken Moleküls, das sich nur mit einer „Flanke" zur Kanalwand in den Abstand des Potentialminimums begeben kann (Abb. 10 rechts). Die frei werdende Energie ist hier also kleiner — offenbar zu klein, um die Gittertranslation des Thioharnstoffs bestreiten zu können. Auch rein statisch betrachtet ist plausibel, daß ein Gitter mit Hohlräumen, das in „ungefülltem Zustand" notorisch nicht beständig ist, sondern bei Entzug der eingelagerten Partnermoleküle kollabiert, einer einigermaßen „prallen" Füllung (Abb. 10 links) bedarf, um nicht zusammenzubrechen, dagegen durch eine „magere" Füllung (Abb. 10 rechts) *nicht* ausreichend stabilisiert ist.

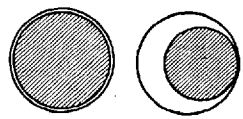


Abb. 10. Ausfüllung eines Lumens durch 2,2,4-Trimethylpentan (links) und n-Octan (rechts).

Ebenso wie ein n-Paraffin ist auch Benzol zur spontanen Thioharnstoffaddition nicht befähigt. Möglicherweise ist der Grund der gleiche wie für das Versagen der unverzweigten Aliphaten: Ein ebenes Molekül gibt keine gute Ausfüllung eines prismatischen Lumens. Begierig werden dagegen Cyclohexan, Cyclohexen und Cyclohexadien-1,4 addiert; ebenso Cyclooctan und Cyclooctatetraen. Alle diese Verbindungen haben nichtebene Ringmoleküle. Gleichfalls addiert werden Cyclopentan und Cyclopenten; beide haben zwar ebene Ringe, aber die Wasserstoffatome liegen außerhalb der Ringebenen und machen so die Moleküle zu dreidimensionalen Gebilden. Cyclopentadien dagegen wird nicht addiert: Hier ragen nur die beiden Wasserstoffatome der Methylengruppe aus der Ringebene heraus, was offenbar nicht mehr genügt, um das Molekül hinreichend „füllig" zu machen.

Viele der Verbindungen, die zu spontaner Addition an Thioharnstoff unfähig sind, wie unverzweigte Paraffine und Benzol, können dennoch in das Hohlgitter eingelagert werden, wenn die Ausbildung und Stabilisierung von gleichzeitig anwesenden „echten" Adduktbildnern besorgt wird. Dieser Fall tritt ein, wenn man die indifferenten Verbindungen mit einem geeigneten additionswilligen Stoff, wie z. B. 2,2,4-Trimethyl-pentan, mischt, und auf das Gemisch Thioharnstoff einwirken läßt. Auf diese Weise können bis zu 30% und mehr n-Paraffin oder Benzol miteingeschleppt werden.

Verständlicherweise eignen sich als „Mitnehmer" solche Verbindungen relativ gut, deren Eigenadditionsbestreben nicht allzustark ist. Sehr additionsbegierige Verbindungen, wie z. B. Dicyclohexyl lassen den indifferenten Begleitern beim „Kampf um die Plätze" keine Chance.

In der Tabelle 6 ist eine Auswahl von bisher untersuchten Thioharnstoffeinschlußverbindungen zusammengestellt (*49*).

Tabelle 6. *Thioharnstoffaddukte vom Einschlußtyp.*

Organische Komponente	Organische Komponente
2,2,3-Trimethylbutan	Dicyclohexylmethan
2,2,3,3-Tetramethylbutan	Dicyclohexyläthan
2,2,4-Trimethylpentan	Dicyclohexylpropan
2,5-Dimethylhexan	Dicyclohexylpentan
2,2,4,6,6-Pentamethylheptan	p-Dimethylcyclohexan
2,7-Dimethyloctan	n-Butylcyclohexan
2,3,7-Trimethyloctan	Isobutylcyclohexan
Pinakolin	tert.-Butylcyclohexan
Pivalinsäureisobutylester	Isododecylcyclohexan
Isobutylchlorid	p-Dicyclohexylcyclohexan
tert. Butylchlorid	Cyclohexylcyclohexen
Isobutylbromid	Cyclohexanol
Isoamylbromid	α-Cyclohexylcyclohexanol
2-Bromoctan	Cyclohexylchlorid
Chloroform	1,2-Dibromcyclohexan
Tetrachlorkohlenstoff	Cyclohexanon
Bromoform	Cyclohexylidencyclohexanon
Tetrabromkohlenstoff	Isobutylbenzol
1,1,2-Trichloräthan	Cyclohexylbenzol
1,1,2,2-Tetrachloräthan	p-Dicyclohexylbenzol
1,1,1,2-Tetrachloräthan	Dicyclopentadien
Tetrachloräthen	Tetrahydrodicyclopentadien
Pentachloräthan	Camphen
Cyclopentan	Hydrocamphen
Cyclopenten	cis-Decahydronaphthalin
Cyclohexan	trans-Decahydronaphthalin
Cyclohexen	Methyldecalin
Cyclohexadien-1,4	Äthyldecalin
Cyclooctan	Dicyclohexylamin
Cyclooctatetraen	Benzylcyclohexylamin
Dicyclohexyl	Campher

3 *Choleinsäuren.*

Die grundlegenden Arbeiten über Choleinsäuren, in denen die Mannigfaltigkeit dieser Verbindungsklasse und ihre allgemeinen Eigenschaften beschrieben worden sind, liegen zum großen Teil weit zurück. Doch sei der Besprechung der neueren, vorwiegend der Strukturaufklärung gewidmeten Arbeiten eine kurze Zusammenfassung der älteren Erkenntnisse vorausgeschickt.

H. WIELAND und H. SORGE (*55*) erkannten im Jahr 1916, daß die lange vorher erstmals von LATSCHINOFF aus Galle isolierte Verbindung, die den Namen „Choleinsäure" führte, ein Kombinationsprodukt aus Desoxycholsäure (8 Mol) und Fettsäure (1 Mol) ist. Sie fanden weiterhin, daß sich Desoxycholsäure nicht nur mit der in der natürlichen Choleinsäure aus Galle aufgefundenen Palmitinsäure und Stearinsäure, sondern ebenso mit vielen anderen Fettsäuren zusammenlagern kann, und daß das Molverhältnis der Addukte von der Kettenlänge der Paraffincarbonsäuren abhängig ist. Auch mit Xylol, Naphthalin, Benzoesäure, Benzaldehyd, Campher, Phenol, Carvon, Salol, Cholesterin und anderen organischen Verbindungen stellten WIELAND und SORGE Desoxycholsäure-Additionsverbindungen dar. Seither wird der Name „Choleinsäure", der ursprünglich einen bestimmten Stoff aus Galle bezeichnete, für die ganze Klasse derartiger Additionsverbindungen verwendet; man spricht von Stearinsäure-, Xylol-, Campher-choleinsäure usw.

Unter den sonstigen, auf ihr Additionsvermögen untersuchten Gallensäuren erwies sich nur noch die Apocholsäure (3 α, 12 α-Dioxycholen-8, 14-säure) als befähigt, den Desoxycholsäure-addukten analoge Verbindungen zu liefern (*7*). Die Apocholsäure-addukte weisen jeweils die gleichen Molverhältniszahlen der Komponenten auf, wie die der Desoxycholsäure.

In systematischer Arbeit wurden in der Folge von zahlreichen Forschern die verschiedensten Choleinsäuren dargestellt und auf das Mengenverhältnis der Komponenten untersucht; so in lückenloser Reihe die Addukte der Fettsäuren von der Essigsäure bis zur Cerotinsäure, zahlreiche Addukte von Olefincarbonsäuren, Dicarbonsäuren, Alkoholen, Estern, Ketonen und anderen Verbindungen. Vom valenzchemischen Standpunkt aus besonders interessant ist der Befund von RHEINBOLDT (*43*), daß selbst *Paraffine* von Desoxycholsäure und Apocholsäure addiert werden. Im Hinblick auf die später zu erörternde räumliche Anordnung der Komponenten im Krystall sei hervorgehoben, daß auch Cholesterin und andere großräumige Moleküle wie Anthracen, Phenanthren und Benzanthren Choleinsäuren bilden.

Für die mengenmäßige Zusammensetzung der untersuchten Produkte gilt das Gesetz der konstanten Proportionen. Das Molverhältnis scheint immer ganzzahlig zu sein; als Verhältniszahlen wurden die Quotienten 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1, 10 : 1 und 12 : 1 festgestellt. Einige Verbindungen können in zwei verschiedenen Mengenverhältnissen addiert werden, so Campher im Molverhältnis 1 : 1 und 2 : 1; Buttersäure und Buttersäureäthylester im Molverhältnis 2 : 1 und 4 : 1. HUNTRESS und PHILLIPS (*22*) geben für die ganze Schar der von ihnen dargestellten Kohlenwasserstoffcholeinsäuren je zwei Verhältniszahlen an, eine für die bei gewöhnlicher Temperatur isolierten Verbindungen, die andere für Addukte, die einer Temperatur von 110° ausgesetzt waren. Es ist jedoch nicht möglich, auf Grund der mitgeteilten experimentellen Daten mit Sicherheit zu beurteilen, ob es sich bei den Werten der 110°-Reihe — der Kohlenwasserstoffgehalt ist bei

diesen Produkten verringert gegenüber dem der Ausgangsaddukte — um echte Haltepunkte handelt.

In einigen Fällen wurde beobachtet, daß unter den Addukten von Stereoisomeren die der l-Formen etwas schwerer löslich sind als die der d-Formen (*51*).

Zur Keto-Enoldesmotropie befähigte Verbindungen, wie Acetessigsäure und Acetylaceton sind in Form der Desoxycholsäureaddukte total enolisiert, wie die sofort nach Auflösung der betreffenden Krystalle vorgenommene Untersuchung der Lösungen ergab (*52*).

Die Bindung zwischen den Komponenten ist in den Choleinsäuren fester als in den Harnstoff- und Thioharnstoffaddukten, was daran zu erkennen ist, daß die Addukte, wenigstens soweit sie einigermaßen langkettige Komponenten enthalten, charakteristische Schmelzpunkte zeigen, die höher sind als die der Komponenten, und daß sie stets geruchlos sind, also nur niedrige Dampfdrucke aufweisen. In Gegenwart von Lösungsmitteln stellen sich Dissoziationsgleichgewichte ein, wobei entweder Zerfall in die Komponenten erfolgt, oder, falls das betreffende Lösungsmittel seinerseits eine Choleinsäure zu bilden vermag, wie z. B. Xylol, Substitution der ursprünglichen Komponente, z. B. der Fettsäuren, stattfinden kann.

Während bei den Harnstoffaddukten bisher erst in zwei Fällen, nämlich beim Buttersäureharnstoff und beim Valeriansäureharnstoff, wahrscheinlich gemacht werden konnte, daß nicht nur im Krystall, sondern auch im gelösten Zustand eine gegenseitige Bindung der Komponentenmoleküle statt hat, bekundet sich bei den Choleinsäuren die Existenz starker Wechselwirkung zwischen den Verbindungspartnern auch in Lösung sehr deutlich. Schwerlösliche Natronseifen, ja Stoffe, die in Wasser gänzlich unlöslich sind, wie Naphthalin, Xylol, Cholesterin, können durch eine wässerige Lösung von Natriumdesoxycholat glatt in Lösung gebracht werden. Über die Art der gegenseitigen Bindung der Lösungsgenossen ist allerdings noch nichts sicheres bekannt. KRATKY (*25*) äußerte die Vermutung, daß die Komplexe in Lösung analog gebaut sind, wie die Choleinsäuren im Krystall. Indessen wies WIELAND schon 1916 darauf hin, daß die Lösungswirkung nicht dem in den krystallisierten Choleinsäuren gültigen Komponentenverhältnis adäquat ist. Es bedarf z. B. zur Auflösung von 1 Molekül Natriumpalmitat nur zweier Moleküle Natriumdesoxycholat, während das Molverhältnis im Krystall 1 : 8 beträgt. Wie KUTHY (*26*) fand, ist der Effekt der „Löslichmachung" wasserunlöslicher Stoffe nicht auf die beiden „Choleinsäurebildner", Desoxycholsäure und Apocholsäure, beschränkt, sondern in ungefähr der gleichen Stärke auch bei den Natriumsalzen der Cholsäure, Dehydrocholsäure, Glycocholsäure und Taurocholsäure anzutreffen: „es gibt keinen Zusammenhang zwischen Bildung von Choleinsäuren und Lösungsvermögen".

Gelöste Stearin-choleinsäure scheint nur teilweise in die Komponenten dissoziiert zu sein, da der Drehwert der Lösung kleiner ist als der vorhandenen Desoxycholsäure entspricht (*55*). Für Methanollösungen von Sebacincholeinsäure und Acetessigester-choleinsäure schloß dagegen SOBOTKA aus Molekulargewichtsbestimmungen bzw. Enoltitration auf weitgehende Dissoziation.

Die Krystallstruktur der Fettsäure-choleinsäuren.

Die Tatsache, daß bei den Choleinsäuren die gleichen Molverhältniszahlen zu beobachten sind, die bei den anorganischen Koordinationsverbindungen auftreten, hatte RHEINBOLDT (*44*) zu der Vermutung veranlaßt, daß die Choleinsäuren nach dem WERNERschen Prinzip aufgebaut

seien, dergestalt, daß sich die Gallensäuremoleküle um die Partnermoleküle als Koordinationszentren gruppieren. Schon die ersten Röntgenuntersuchungen [Go und KRATKY (*19*)] führten aber zu einem Resultat, das mit der Annahme von Symmetriezentren, um die je nach der Koordinationszahl verschieden viele Moleküle gruppiert sind, unvereinbar war: Die Pulverdiagramme von Fettsäurecholeinsäuren mit den Koordinationszahlen 3, 4, 6 und 8 waren praktisch identisch. KRATKY und Mitarbeiter (*25, 19*) entwarfen auf Grund ihrer Röntgenbefunde für die Fettsäurecholeinsäuren ein Strukturbild, dessen Richtigkeit später von GIACOMELLO (*16*) und CAGLIOTI und GIACOMELLO (*9*) durch Patterson- und Fourieranalysen bestätigt wurde. Nach diesen Ergebnissen sind die Addukte zu den *Kanaleinschlußverbindungen* zu rechnen. Bisher sind nur Strukturuntersuchungen von Carbonsäure-choleinsäuren und einigen analogen Esteraddukten (*21*) ausgeführt worden. Immerhin macht die Ähnlichkeit der Eigenschaften, besonders der Zusammenhang zwischen Molekülgröße der Partner und Molverhältniszahl in den Addukten, für eine weitere Anzahl von Choleinsäuren, z. B. Paraffincholeinsäuren, die Gültigkeit des gleichen Bauprinzips sehr wahrscheinlich.

Die untersuchten Produkte haben rhombische Symmetrie; Raumgruppe ist V 3. Die Elementarzelle enthält 4 Moleküle Desoxycholsäure. Die Ergebnisse einiger Elementarkörperbestimmungen sind in der Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7. *Die Elementarzelle einiger Fettsäurecholeinsäuren.*

	Molverhältniszahl der Partner	a in Å	b in Å	c in Å	V in Å³	Dichte d
Propio-choleinsäure . . .	3	25,79	13,57	7,23	2530	1,123
Butyro-choleinsäure . . .	4	25,80	13,49	7,23	2516	1,124
Heptylo-choleinsäure . .	4	25,77	13,52	7,22	2516	1,133
Caprylo-choleinsäure . .	4	25,75	13,49	7,21	2505	1,137
Laurin-choleinsäure . . .	6	25,77	13,48	7,21	2505	1,126
Palmitin-choleinsäure . .	8	25,92	13,45	7,23	2521	1,122
Stearin-choleinsäure. . .	8	25,90	13,53	7,23	2534	1,126

Wie man sieht, zeigen die Wertetripel der Achsen nur so geringe Abweichungen, daß wahrscheinlich überhaupt keine reellen Unterschiede vorhanden sind.

Die Gleichheit der beobachteten Translationsperioden, Auslöschungen und Identitätsverhältnisse zwingt zu der Annahme, daß die in Rede stehenden Choleinsäuren ein identisches, aus den Desoxycholsäuremolekülen gebildetes Grundgitter besitzen, in dem die Moleküle der Komponenten eingelagert sind. Bezüglich der Gestalt der Hohlräume und der Lagerung der Fettsäuremoleküle schlossen KRATKY und Mitarbeiter,

daß die Hohlräume kanalförmig den Krystall in Richtung der c-Achse durchziehen und daß in ihnen die Fettsäuremoleküle geradlinig aneinander gereiht liegen müssen.

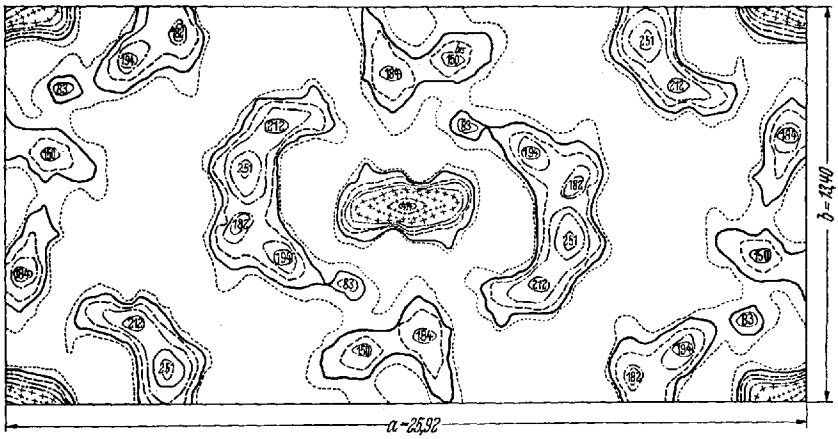


Abb. 11. Fourier-Analyse der Fettsäure-choleinsäuren, Projektion der Elementarzelle in Richtung der c-Achse [nach CAGLIOTI und GIACOMELLO (9)].

Die Abb. 11 gibt das Resultat der Fourieranalyse [CAGLIOTI und GIACOMELLO (9)] der Fettsäurecholeinsäuren in der Projektion längs der c-Achse wieder. Im Zentrum findet man den Querschnitt des senkrecht zur Papierebene zu denkenden Fettsäuremoleküls, in einigem Abstand umgeben von den annähernd sichelförmig gestalteten Querschnittsprojektionen zweier Desoxycholsäuremoleküle, deren Ringe ebenfalls senkrecht zur Papierebene zu denken sind. Die Maxima 212, 251, 182, 194, 83, 184, 150-bis gehören jeweils zu *einem* Molekül. Im Maximum 150 projeziert sich das Ende der Seitenkette eines zweiten Moleküls.

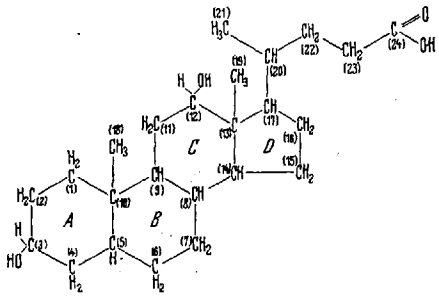


Abb 12. Desoxycholsäure.

Bezüglich der Gestalt des einzelnen Desoxycholsäuremoleküls (Abb. 12) ließen sich aus der Fourier-Analyse folgende Schlüsse ziehen: Die Ringe B und C sowie C und D sind in trans-Stellung miteinander verknüpft. Daraus folgt, daß die Ringatome von B, C und D um eine gemeinsame Mittelebene liegen. Die Ringe A und B sind in cis-Stellung verknüpft, ihre Mittelebenen bilden also einen Winkel. Das verursacht die in der Fourier-Abbildung zum Ausdruck kommende

ausgebuchtete Form des Desoxycholsäuremoleküls. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Resultaten früherer Untersucher, insbesondere mit den röntgenographischen Befunden von BERNAL. Die in Stellung 3 stehende *OH*-Gruppe ist dem Innern der Bucht, also dem Fettsäuremolekühl zugekehrt. Es liegt nahe, ihr eine maßgebliche Beteiligung an der Bindung des Fettsäuremoleküls zuzuschreiben. Die *OH*-Gruppe in Stellung 12 ist nach CAGLIOTI und GIACOMELLO der konkaven Seite des Moleküls abgewendet, ebenso die Methylgruppe in 10 und 13 und die Seitenkette in 17.

Wie sind nun mit diesen Befunden über den Krystallbau der Fettsäure-choleinsäuren die beobachteten Molverhältnisse vereinbar?

Wenn im Kanal eine die Fixierung des Fettsäuremoleküls veranlassende Zone maximaler Feldstärke existiert, so muß sich diese Zone im Abstand der Identitätsperiode von 7,22 Å in Richtung der *c*-Achse periodisch wiederholen. Es sei in einem Kanal eine Zone von einem Fettsäuremolekül besetzt. Nun können zwei Fälle eintreten: entweder ist die auf diese Zone folgende nächste attraktive Zone frei und kann durch ein neues Fettsäuremolekül besetzt werden, oder sie ist noch durch das erste Fettsäuremolekül blockiert; diesfalls wird das zweite Fettsäuremolekül erst von der übernächsten Zone gebunden. Es leuchtet ein, daß der eine oder der andere Fall verwirklicht sein wird je nach der Länge der gebundenen Fettsäuremoleküle. Unterstellt man, daß die Fettsäuremoleküle in gestreckter Form im Kanal liegen, so haben die Moleküle die in Spalte 2 der Tabelle 8 eingetragenen Längen in Å. Für den Platzbedarf in den Kanälen ist zur geometrischen Länge der Moleküle noch der Abstand head to tale zwischen 2 Nachbarmolekülen zu addieren. Seine Größe kann nur geschätzt werden, dürfte aber 2 bis 3 Å betragen. Wenn der Wert von 2,4 Å, der bei den Harnstoffaddukten gefunden wurde, angenommen wird, so ergeben sich für die Platzbeanspruchung pro Fettsäuremolekül die Werte der Spalte 3 in der Tabelle 8. Nun sind der Kanalstrecke $c = 7{,}22$ Å in der Elementarzelle 2 Moleküle Desoxycholsäure zugeordnet (die gesamte Elementarzelle enthält 4 Moleküle Desoxycholsäure und 2 Kanalstrecken von 7,22 Å). So gehören also zu einer Kanalstrecke von

7,22 Å	2	Moleküle	Desoxycholsäure
7,22—14,44 Å	4	„	„
14,44—21,6 Å	6	„	„
21,6 —29,9 Å	8	„	„
29,9 —36,1 Å	10	„	„
36,1 —43,3 Å	12	„	„
43,3 —50,5 Å	14	„	„ usf.

Die auf Grund dieser Überlegung von den Fettsäuremolekülen entsprechend ihrem Platzbedarf „geforderte" Anzahl Desoxycholsäure-

moleküle findet sich in Spalte 4. Spalte 5 endlich gibt die von RHEINBOLDT und anderen experimentell gefundenen Werte.

Tabelle 8. *Fettsäurecholeinsäuren, Molverhältnis und Raumbedarf der eingelagerten Komponenten.*

C-Atomzahl der Fettsäuren	Länge der Fettsäuremoleküle in Å	Beanspruchte Kanalstrecke pro Fettsäuremolekül in Å	Errechnete Anzahl Desoxycholsäuremoleküle pro Mol Fettsäure	Gefundene Anzahl Desoxycholsäuremoleküle pro Mol Fettsäure
3	5,07	7,47	4	3
4	6,32	8,72	4	4
5	7,57	9,97	4	4
6	8,87	11,27	4	4
7	10,17	12,57	4	4
8	11,43	13,83	4	4
9	12,67	15,07	6	6
10	13,97	16,37	6	6
11	15,32	17,72	6	6
12	16,47	18,87	6	6
13	17,82	20,22	6	6
14	19,00	21,40	6	6
15	20,25	22,65	8	8
16	21,5	23,90	8	8
17	22,75	25,15	8	8
18	24,07	26,47	8	8
19	25,32	27,72	8	8
20	26,57	28,97	8	8
21	27,82	30,22	10	8
22	29,07	31,47	10	8
23	30,32	32,72	10	8
24	31,57	33,97	10	8
25	32,82	35,22	10	8
26	34,07	36,47	12	8

Die Tabelle beginnt mit der Propionsäure. Es gibt zwar auch eine Essigsäurecholeinsäure, diese lieferte aber ein abweichendes Röntgenogramm und dürfte mithin eine andersartige Struktur besitzen. Das Addukt der Cerotinsäure (C_{26}) ist die höchste bisher röntgenographisch untersuchte Verbindung dieser Reihe.

Für den größten Teil der betrachteten Choleinsäuren stimmen die aus den räumlichen Vorstellungen abgeleiteten Molverhältnisse (Spalte 4) mit den gefundenen (Spalte 5) in eindrucksvoller Weise überein. Eine Abweichung zeigt sich für die Propionsäure und vor allem für die höheren Homologen von der Heneicosansäure an aufwärts: hier bleibt die Verhältniszahl trotz des Längerwerdens der Ketten konstant auf dem Wert 8 stehen, während Ansteigen auf den Wert 10 und 12 zu erwarten wäre. Die Fettsäuremoleküle müssen hier also dichter gepackt sein als bei maximaler Streckung der Moleküle und in linearer Aneinanderreihung möglich ist.

Auffälligerweise wurden bis vor kurzem überhaupt niemals Choleinsäuren mit höherer Molverhältniszahl als 8 beobachtet, obwohl sich unter den untersuchten Verbindungen auch solche befinden, die noch längere Moleküle als Cerotinsäure enthalten, z. B. Myristinsäurehexadecylester $C_{14}H_{27}O_2 \cdot C_{16}H_{33}$ [RHEINBOLDT (*45*)]. Die ersten und bisher einzigen Ausnahmen machen Arachinsäureäthylester, Stearinsäureoctylester und Cerotinsäureäthylester, für die nach GIACOMELLO (*17*) die Molverhältniszahlen 10 : 1 bzw. 12 : 1 gelten. Die Röntgenbefunde zeigten, daß diese Verbindungen nach dem gleichen Prinzip aufgebaut sein müssen, wie die Fettsäurecholeinsäuren. Für die Addukte des Arachinsäure- und Stearinsäureäthylesters stimmen, wie Tabelle 9 zeigt, die gefundenen Verhältniszahlen mit den aus dem Raumbedarf errechneten überein. Für Stearinsäureoctylester dagegen wäre nach der Länge des Moleküls die Verhältniszahl 12 statt 10 zu erwarten.

Tabelle 9. *Estercholeinsäuren, Molverhältnis und Raumbedarf der eingelagerten Komponenten.*

	Länge der Estermoleküle in Å	Beanspruchte Kanalstrecke pro Mol Ester in Å	Geforderte Anzahl Desoxycholsäuremoleküle pro Mol Ester	Gefundene Molverhältniszahl
$C_{20}H_{39}O_2 \cdot C_2H_5$	29,0	31,4	10	10
$C_{18}H_{35}O_2 \cdot C_8H_{17}$	34,0	36,4	12	10
$C_{26}H_{51}O_2 \cdot C_2H_5$	36,5	38,9	12	12

Während in diesen drei Fällen von den Estern *mehr* Desoxycholsäure gebunden wird als von den mit ihnen isomeren, hinsichtlich der Länge des Moleküls übereinstimmenden freien Carbonsäuren, ist bei zahlreichen anderen Estern nach den Befunden von RHEINBOLDT (*45*) das Gegenteil der Fall (Tabelle 10).

Tabelle 10. *Die Molverhältnisse der Choleinsäuren von Estern und isomeren Säuren.*

Desoxycholsäureaddukte von			Molverhältnis im Esteraddukt	Molverhältnis im Säureaddukt
Laurinsäure-n-propylester,	isomer	Pentadecylsäure . .	6	8
Laurinsäure-n-butylester,	,,	Palmitinsäure . . .	6	8
Laurinsäure-n-hexylester,	,,	Stearinsäure . . .	6	8
Laurinsäure-n-octylester,	,,	Arachinsäure . . .	6	8
Myristinsäure-n-methylester,	,,	Pentadecylsäure . .	6	8
Myristinsäure-n-äthylester,	,,	Palmitinsäure . . .	6	8
Myristinsäure-n-butylester,	,,	Stearinsäure . . .	6	8
Myristinsäure-n-hexylester,	,,	Arachinsäure . . .	6	8
Pelargonsäure-n-heptylester,	,,	Palmitinsäure . . .	6	8

Die Unterschiede in den Molverhältniszahlen der Choleinsäuren dieser isomeren Verbindungen konnten bisher ebensowenig erklärt werden wie die Tatsache, daß in der Reihe der Carbonsäureaddukte die Molverhältniszahl auch bei den hohen Homologen den Wert 8 nicht überschreitet. Zur Auflösung dieser Unklarheiten, deren Gewichtigkeit von KRATKY schon 1936 mit Nachdruck hervorgehoben wurde (*25*), bedarf es weiterer experimenteller Arbeit. Eine Frage, die nur durch weitere Krystallstrukturuntersuchungen gelöst werden kann, ist ferner, ob auch die Choleinsäuren anderer Körperklassen nach dem „Einschlußprinzip" aufgebaut sind, das für die Addukte der Carbonsäuren und Ester als gültig erkannt wurde.

Vergleicht man die bisher krystallchemisch untersuchten Choleinsäuren mit den Harnstoffaddukten, so ergeben sich, kurz zusammengefaßt, folgende Übereinstimmungen und Unterschiede.

Beiden Verbindungsklassen ist ein invariables Grundgitter eigen, hier gebildet von Desoxycholsäuremolekülen, dort von Harnstoffmolekülen.

Beide Grundgitter enthalten Kanäle, in denen annähernd gestreckt die Moleküle des Partners liegen.

Die Grundgitter bilden sich nur in Gegenwart der Addenden aus.

Für die Mengen der im Kanal eingelagerten Addenden sind zwei Faktoren maßgeblich; einerseits das Prinzip maximaler Raumausnützung, herrührend aus dem Bestreben maximaler gegenseitiger Absättigung aller wirkenden Anziehungskräfte zwischen Wirt- und Gastmolekülen; andererseits periodisch wiederkehrende Stellen maximaler Feldstärke im Kanal sowie in den Gastmolekülen.

Bei den Harnstoffaddukten überwiegt der erste Faktor so sehr den zweiten, daß unter Verzicht auf bevorzugte „spezifische" Lagerung der Gastmoleküle, auch wenn diese ausgezeichnete Stellen wie CO- oder COOH-Gruppen haben, der verfügbare Gitterhohlraum optimal ausgefüllt wird. Hiervon ist das *stetige* Ansteigen des Molverhältnisses sowie das Auftreten nichtganzzahliger Molverhältnisse die plausible Folge.

Bei den Fettsäure-choleinsäuren dagegen dominiert der zweite Faktor über den ersten. Hiervon ist die Folge das alleinige Auftreten ganzzahliger Molverhältnisse sowie der treppenförmige Anstieg der Molverhältniszahlen in der homologen Reihe der Addukte.

4. 4,4'-Dinitrodiphenyladdukte.

Aus der großen Anzahl bekannter Komplexverbindungen von Nitroaromaten hebt sich eine Reihe von Addukten des 4,4'-Dinitrodiphenyls [RAPSON, SAUNDER und STEWART (*42*)] durch die ungewöhnlichen Molverhältniszahlen 1 : 3, 2 : 7, 1 : 4 und 1 : 5 ab (Tabelle 11).

Tabelle 11. *Molekülverbindungen des 4,4'-Dinitrodiphenyls.*

Addend	Farbe	Schmelzpunkt	Molverhältnis der Komponenten	Abgekürzte Bezeichnung der röntgenographisch untersuchten Produkte
4,4'-Diacetoxydiphenyl . . .	creme	224—226°	5: 1	
4-Acetoxydiphenyl	creme	191—221°	4: 1	
N,N,N',N'-Tetramethylbenzidin	dunkelrot	233°	4: 1	B
Benzidin	rot	240°	4: 1	C
4,4'-Dimethoxydiphenyl . . .	kanariengelb	216—218°	7: 2	
4-Joddiphenyl	fahlgelb	192—220°	7: 2	E
4-Bromdiphenyl	creme	192—220°	7: 2	F
4,4'-Dihydroxydiphenyl . . .	orangegelb	249—250°	3: 1	D
4-Aminodiphenyl	orange	220°	3: 1	A
4-Hydroxydiphenyl	gelb	228—230°	3: 1	
Diphenyl.	creme	191—221°	3: 1	

Röntgenuntersuchung der sechs durch römische Buchstaben gekennzeichneten Addukte hat eine weitgehende Übereinstimmung des Krystallbaues dieser Verbindungen ergeben (*46*); die für Produkt *A* vorgenommene detaillierte Strukturuntersuchung mittels Fourier-Analyse führte zu folgendem Bild (Abb. 13):

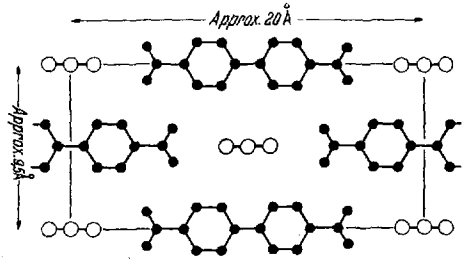


Abb. 13. Idealisiertes Strukturbild der 4,4'-Dinitrodiphenyl-addukte [nach RAPSON, SAUNDER und STEWART (*42*)].

Jedes Dinitrodiphenylmolekül in der Abbildung repräsentiert mehrere solche Moleküle, die in einem Abstand von 3,7 Å parallel übereinander liegen. Bei einer fortgesetzten Anordnung dieser Art entstehen kanalförmige Hohlräume (senkrecht zur Abbildungsebene). In diesen Kanälen haben die Partnermoleküle, hintereinander gereiht, ihren Platz. In der Abbildung sieht man den Querschnitt eines solchen Moleküls, wie er sich beim Durchblick durch den Kanal darstellt.

Die krystallographischen Daten der sechs untersuchten Produkte sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

Man sieht, daß die Winkel β der vier monoklinen 3 : 1 und 7 : 2 Produkte fast gleich sind. Die Brechungsexponenten sind für diese 4 Addukte ebenfalls sehr ähnlich.

Bei den beiden 7 : 2 Addukten zeigen die Aufnahmen in Richtung der *c*-Achse eine Anomalie: nur die 0., 7. und 14. Schichtlinie ist scharf, die

Tabelle 12. *Krystallographische Daten der 4,4'-Dinitrodiphenyladdukte.*

	Addukt A	Addukt B	Addukt C	Addukt D	Addukt E	Addukt F
Molverhältnis .	3 : 1	4 : 1	4 : 1	3 : 1	7 : 2	7 : 2
Krystallsystem .	monoklin (100) (110) (001)	triklin (100) (010) (001)	monoklin (100) (110) (001) (101)	monoklin (100) (110)	monoklin (100) (110)	monoklin (100) (110)
Winkel	$\beta = 99°\,39'$	$\alpha = 127°\,0'$ $\beta = 103°\,39'$ $\gamma = 95°\,45'$	$\beta = 120°28'$	$\beta = 95°$	$\beta = 100°$	$\beta = 100°$
Opt. Achsenwinkel, 2 V .	45°	—	—	29°	34°	37°
Brechungsindices . . α	1,59	—	—	1,62	1,62	1,60
β	1,64	—	—	1,63	1,65	1,64
γ	2,03	—	—	1,99	2,13	2,39
Dimensionen der Elementarzelle in Å . . . a	20,06	30,2	19,1	20,0	20,0	20,0
b	9,46	11,15	14,8	18,65	9,5	9,5
c	11,13	11,5	22,0	11,3	25,8	25,8
Dichte	1,43	1,43	1,44	1,45	1,56	1,52
Zahl der Komplexe pro Elementarzelle. .	2	2	4	4	2	2
Wahrscheinliche Raumgruppe .	C_m	P_1 od. $\bar{P}1$	C_c	$P_{2_1}/_a$	C_m	C_m

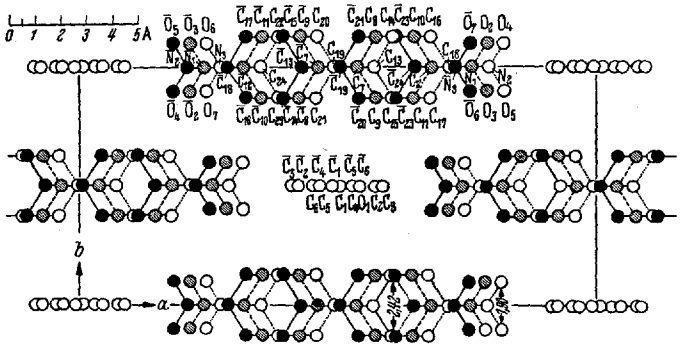


Abb. 14. Die Struktur des 4,4'-Dinitrodiphenyl-adduktes von 4-Oxydiphenyl, Projektion in Richtung c auf a b [nach SAUNDER (*46*)].

übrigen sind in der b-Richtung auseinandergezogen. Diese Erscheinung ist wahrscheinlich auf periodische Fehler in der Krystallstruktur zurückzuführen (*24*), soll hier aber nicht näher erörtert werden.

Abb. 14 gibt das exakte Strukturbild des Adduktes *A*. Das vereinfachte Bild 13 ist also dahingehend zu modifizieren, daß die Dinitro-

diphenylmoleküle in der Richtung c nicht ganz genau senkrecht übereinander, sondern zu je drei periodisch etwas gegeneinander verschoben liegen. Dadurch erhalten die Kanäle, bildlich gesprochen, Knicke. Die eingelagerten Oxydiphenylmoleküle schmiegen sich diesen Knicken an, daher fallen ihre Molekülläng sachsen nicht genau in die c-Richtung, und infolgedessen bietet sich in Abb. 14 das eingelagerte Molekül in einem Querschnitt dar, der breiter ist als der Breite des Benzolringes entspricht. Die Abb. 15 veranschaulicht dies durch die schematische Wiedergabe eines Kanalstückes in Längsschnitt a b senkrecht zur Richtung c. Die maßstabtreue Zeichnung läßt gleichzeitig die Molekülabstände, auf die es bei der Bindung zwischen den Partnern ankommt, ferner die Abstände der Oxydiphenylmoleküle voneinander und schließlich die Abstände der Dinitrodiphenylschichten erkennen.

In Abb. 16 sind Projektionen der Strukturen der Komplexe B, C, D, E und F zusammengestellt.

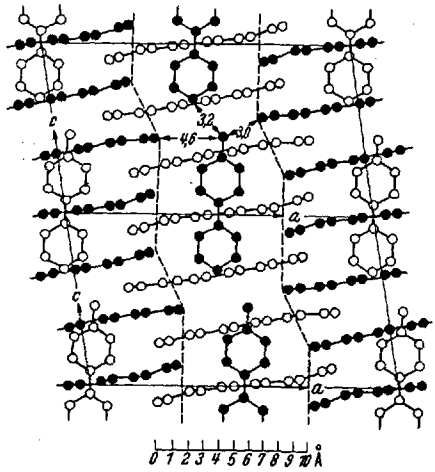


Abb. 15. Die Struktur des 4,4'-Dinitrodiphenyladduktes von 4-Oxydiphenyl, Projektion in Richtung b auf a c [nach SAUNDER (46)].

Komplex B: ähnlich, wie für die Oxydiphenylmoleküle des Komplexes A im vorausgehenden erläutert, liegen auch die Tetramethylbenzidinmoleküle etwas geneigt zur Längsachse der Kanäle und, entsprechend, die Dinitrodiphenylmoleküle nicht genau übereinander. Abstand der Dinitrodiphenylschichten $^1/_8\,a = 3{,}78$ Å.

Komplex C: die Benzidinmoleküle liegen längs b. Abstand der Dinitrodiphenylschichten $^1/_4\,b = 3{,}71$ Å.

Komplex D: Längsachse der Kanäle ist c, die Dioxydiphenylmoleküle liegen mit ihrer Längsachse etwas geneigt zu c. Abstand der Dinitrodiphenylschichten $^1/_3\,c = 3{,}76$ Å.

Komplex E und F: Die Struktur der beiden Komplexe stimmt innerhalb der Fehlergrenzen überein. Längsachse der Kanäle ist c; Abstand der Dinitrodiphenylschichten $^1/_7\,c = 3{,}69$ Å.

Das geschilderte Strukturbild läßt erwarten, daß die Anzahl Dinitrodiphenylmoleküle, die einem Partnermolekül zugeordnet ist, durch die Länge des Partnermoleküls bestimmt ist.

In der Tabelle 13 sind die Längen der eingelagerten Moleküle zuzüglich ihres mutmaßlichen zwischenmolecularen Abstandes (Spalte 2), ferner die Zahl der durch einen Abstand von 3,7 Å voneinander getrennten Dinitrodiphenylmoleküle, die rechnungsmäßig der Länge des jeweils eingelagerten Partners zuzuordnen wären (Spalte 3), und schließlich die tatsächlichen Molverhältniszahlen (Spalte 4) nebeneinander gestellt.

Die Übereinstimmung der für die Länge der eingelagerten Moleküle errechneten und der analytisch gefundenen Molverhältniszahlen ist, wie man sieht, im allgemeinen recht gut. Besonders hervorzuheben ist, daß in denjenigen Fällen, in denen aus der Raumbeanspruchung Molverhältnisse errechnet werden, die nennenswert von *ganzen* Zahlen abweichen, z. B. beim 4,4'-Dihydroxydiphenyl- und beim 4-Aminodiphenyladdukt dennoch *ganz*zahlige Molverhältnisse erzwungen werden. Somit ist also

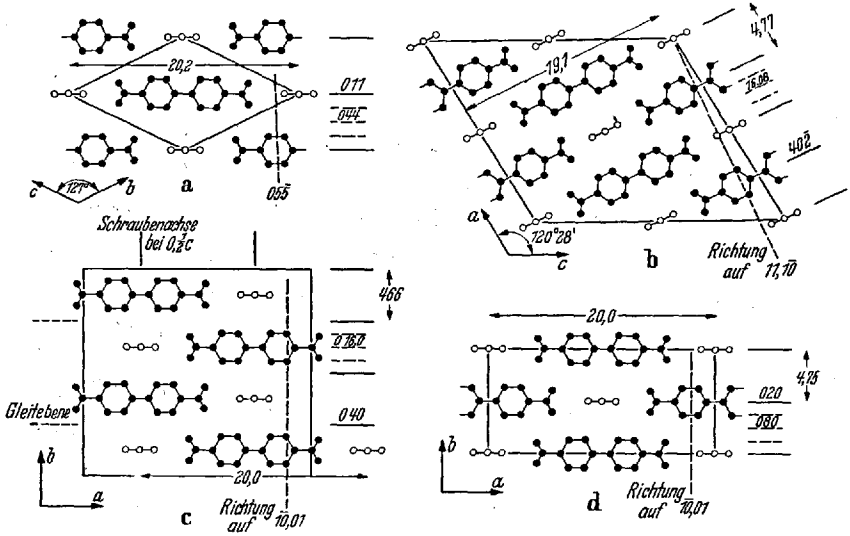


Abb. 16. Die Struktur der 4,4'-Dinitrodiphenyl-addukte von
a) Tetramethylbenzidin, Projektion längs *a* auf *b c*. b) Benzidin, Projektion längs *b* auf *a c*. c) 4,4'-Dioxydiphenyl, Projektion längs *c* auf *a* b. d) 4-Jod- und 4-Bromdiphenyl, Projektion längs *c* auf *a b*. [Nach SAUNDER (*46*)].

Tabelle 13. *Dinitrodiphenyladdukte, errechnetes und gefundenes Molverhältnis.*

Adduktkomponente	Länge des eingelagerten Moleküls in Å	Molverhältniszahl, rechnerisch der Länge des Partners entsprechend	Molverhältniszahl, analytisch ermittelt
4-Hydroxydiphenyl (A)	11,9	3,2: 1	3: 1
N,N,N',N'-Tetramethylbenzidin (B) .	15,3	4,1: 1	4: 1
Benzidin (C)	13,9	3,8: 1	4: 1
4,4'-Dihydroxydiphenyl (D)	12,5	3,4: 1	3: 1
4-Joddiphenyl (E)	13,1	7 : 2	7: 2
4-Bromdiphenyl (F)	12,8	7 : 2	7: 2
4,4'-Diacetoxydiphenyl	17—18	4,6—4,9: 1	5: 1
4-Acetoxydiphenyl	14—14,5	3,8—3,9: 1	4: 1
4,4'-Dimethoxydiphenyl	14,8—15,3	4,0—4,1: 1	4: 1
4-Aminodiphenyl.	12,2	3,3: 1	3: 1
Diphenyl	10,7	2,9: 1	3: 1

die Raumbeanspruchung für die Ausbildung des Molverhältnisses, wie bei den Choleinsäuren, zwar mitbestimmend, aber nicht, wie bei den Harnstoffaddukten, allein entscheidend; nichtganzzahlige Molverhältnisse werden offenbar vermieden. Die Verhältnisse 7 : 2 (Addukt E u. F) sind in diesem Sinn nicht als unganzzahlig — 3,5 : 1 — aufzufassen, da in der Elementarzelle jeweils eine *ganze* Molekülzahl, nämlich 2, des Addenden gebunden ist (s. Tabelle 12, zweite Zeile von unten).

Nach den Ergebnissen der Strukturuntersuchung betragen die kleinsten vorkommenden Abstände zwischen Wirt- und Gastmolekülen in den Addukten etwa 3,0 bis 3,6 Å; räumliche Anzeichen für das Vorliegen starker lokalisierter Bindungen fehlen also. So wird man der Wirkung VAN DER WAALSscher Kräfte einen wesentlichen Anteil an dem Zusammenhalt der Addukte zuzuschreiben haben. Andererseits liegt die Existenz schwacher Wasserstoffbrücken über einen Abstand von 3 Å im Bereich der Möglichkeit. Für die Vorstellung, daß beide Arten von Bindungskräften nebeneinander wirken dürften, spricht folgendes: Wenn Wasserstoffbrückenbindung *allein* maßgeblich wäre, so müßte man das Molverhältnis 1 : 1 erwarten, ein Zusammenhalt der Addukte im Molverhältnis 1 : 3, 2 : 7, 1 : 4 und 1 : 5 dagegen wäre unverständlich. Auf der anderen Seite bliebe bei der Annahme ausschließlicher Wirkung VAN DER WAALSscher Kräfte die Vermeidung *nicht*ganzzahliger Molverhältnisse — wie 3,4 : 1 und 3,3 : 1 beim Dihydroxydiphenyl- und Aminodiphenyladdukt, s. Tabelle 13 — unverständlich; und unerklärt bliebe ferner, daß bei der Adduktbildung Farbvertiefung eintritt und zwar intensitätsmäßig nach der Reihenfolge, die der Stärke der Elektronendonatorgruppe der eingelagerten Moleküle entspricht; und daß schließlich die Dinitrodiphenylverbindungen des Benzidins und Tetramethylbenzidins, welche die stärksten Donatorgruppen tragen, unter den untersuchten Verbindungen bei weitem die stabilsten sind.

5. *Schardinger-Dextrin-Einschlußverbindungen.*

Nach FREUDENBERG und CRAMER (*11, 15*) sind die in der älteren Literatur als s-Dextrin und r-Dextrin bezeichneten und früher für besondere Polysaccharide gehaltenen Abbauprodukte der Stärke Addukte von α- bzw. β-Dextrin mit einem höheren Alkohol, wahrscheinlich n-Hexanol. Dieser ist so fest gebunden, daß diese Additionsverbindungen als solche umkrystallisiert werden können. Durch Wasserdampfdestillation kann der Alkohol abgetrieben werden; unter diesen Versuchsbedingungen dissoziieren also die Addukte.

Die röntgenographische Untersuchung hat ergeben, daß das aus sechs in 1,4-Stellung miteinander verknüpften Glukanringen bestehende α-Dextrin und das aus sieben Glukanringen analog aufgebaute β-Dextrin eine Krystallstruktur der Art besitzen, daß die Makroringe — in der

Elementarzelle liegen deren zwei übereinander — ihrem Innenraum einen Kranz von Wasserstoffatomen zukehren. Innerhalb dieser Ringe sind die Alkoholmoleküle eingeschlossen.

6. Zeolithsorbate.

Bei gewissen wasserhaltigen Silikaten, den Zeolithen, fungieren als Gitterstrukturträger tetraedrische Alumokieselsäureanionen $(Al, Si)O_4$. Diese sind im Krystall so angeordnet, daß das Gitter von zusammenhängenden Kanälen durchzogen ist. In den Kanälen befinden sich Kationen (Na, Ca), welche die anionische Ladung absättigen, und außerdem Wassermoleküle.

Nach dem speziellen Aufbau des Gitters werden drei Typen von Zeolithen unterschieden:

1. Würfelzeolithe mit festen, dreidimensionalen Netzwerkstrukturen (Chabasit, Analcim);
2. Blätterzeolithe mit laminarer Netzwerkstruktur (Heulandit);
3. Faserzeolithe mit faseriger Netzwerkstruktur (Natrolit, Skolezit).

Die Struktur der laminaren und faserigen Zeolithe neigt dazu, bei der Entwässerung zu kollabieren. Die robuste Struktur des Analcims und des Chabasits dagegen gestattet, das eingelagerte Wasser reversibel zu entfernen oder auch durch andere neutrale Moleküle zu ersetzen.

Die Studien über die Sorption nichtpolarer Moleküle in den Kanälen führten zu höchst interessanten Ergebnissen. BARRER und IBBITSON (*4*) fanden, daß außer Edelgasen, Stickstoff, Sauerstoff und anderem auch Kohlenwasserstoffe eingelagert werden können, und zwar nur geradkettige, nicht dagegen verzweigte oder cyclische. Es ist also möglich, mittels Chabasit oder Analcim oder analoger, synthetisch gewonnener Produkte (*2*) durch selektive Sorption geradkettige Kohlenwasserstoffe von verzweigten und cyclischen zu trennen (*3*). Dieser verblüffend an die Selektivität der Harnstoffaddition erinnernde Befund ist nach BARRER und IBBITSON auf die einfache Tatsache zurückzuführen, daß die Querschnitte der nicht sorbierbaren Moleküle für das Lumen der Kanäle, das etwa 5 bis 6 Å betragen dürfte, zu groß sind.

Tabelle 14. *Die freie Energie der Zeolithsorption von Kohlenwasserstoffen als Funktion der Kettenlänge.*

Sorbend	A_0 für Chabasit (cal/Mol Gas)	A_0 für Analcim (cal/Mol Gas)
CH_4 . . .	4 700	3800
C_2H_6. . .	8 150	7400
C_3H_8. . .	9 750	—
n-C_4H_{10} .	11 150	9300

Es zeigte sich, daß die freie Energie der Sorption, auch wieder in Analogie zu den bei der Harnstoffaddition gemachten Befunden, mit der Kettenlänge der Sorbenden wächst (Tabelle 14).

Der Sättigungswert, ausgedrückt in ccm sorbiertem Gas (760 mm, 0°) pro g Sorbend, fällt mit steigender Molekülgröße (Tabelle 15). Auch

hinsichtlich des „Molverhältnisses" gilt hier also die gleiche Regel wie bei den Harnstoffaddukten: je größer die Moleküle sind, desto geringer ist die Anzahl, die in das Grundgitter eingelagert werden kann.

Obwohl mit steigender Molekülgröße die Affinität der Anlagerung wächst, ist die *Geschwindigkeit* der Sorption bei größeren Molekülen geringer als bei kleineren. Bei einem Durchmesser der Moleküle bis zu etwa 4 Å können die Gase die Kanäle in einem Prozeß freier Diffusion ohne meßbare Aktivierungsenergie verhältnismäßig rasch füllen. Die Moleküle der n-Paraffine vom Propan ab werden wesentlich langsamer aufgenommen. Die Einlagerung bedarf in diesem Fall einer erheblichen Aktivierungsenergie — Anwendung von Temperaturen von über 100° —, die nach BARRER und JBBITSON vermutlich dazu gebraucht wird, die großen Moleküle, die viel mehr dazu neigen, sich festzusetzen, längs der Kanäle von einer Stelle maximalen Sorptionspotentials zur nächsten weiter zu treiben.

Tabelle 15. *Sättigungswerte der Sorption in Chabasit und Analcim als Funktion der Molekülgröße der Sorbenden.*

Gas	Länge der sorbierten Moleküle in Å	Sättigungswert für Chabasit cc (760mm,0°)/g	Sättigungswert für Analcim cc (760mm,0°)/g
H_2O	2,76	266	97
NH_3	3,60	193	72
H_2	3,74	186	69
Ar	3,84	181	67
O_2	3,83	181	67
N_2	4,08	170	63
CH_4	4,00	173	64
C_2H_6	5,54	125	46,4
C_3H_8	6,52	106	39,5
n-C_4H_{10}	7,78	89	33,1
n-C_5H_{12}	9,04	77	28,5
n-C_6H_{14}	10,34	67	25,0
n-C_7H_{16}	11,56	59	22,2

Den zahlreichen frappanten Analogien der morphologischen und thermodynamischen Verhältnisse bei den Harnstoffeinschlußverbindungen und Zeolithsorbaten steht auch eine Reihe gewichtiger Unterschiede gegenüber.

Zunächst ist hervorzuheben, daß bei den Zeolithsorbaten und Harnstoffaddukten nur die Beziehungen zwischen Grundgitter und Einschlußkomponente vergleichbar sind, nicht dagegen der Aufbau der Grundgitter selbst: bei den Harnstoffaddukten — wie auch bei den übrigen, bisher besprochenen Einschlußkrystallverbindungen — besteht das Grundgerüst in einem Molekülgitter, bei den Zeolithen dagegen in einem Atomgitter.

Für die Harnstoffaddukte und sonstigen rein organischen Kanalverbindungen gilt das Gesetz der konstanten Verbindungsgewichte. Die Moleküladdukte der Zeolithe dagegen weisen zwar charakteristische Sättigungswerte auf, können im übrigen aber auch jede beliebige geringere Menge des Verbindungspartners enthalten, verhalten sich also wie Adsorbate.

Bei den Harnstoffaddukten sind die eingelagerten Komponenten wenn auch nicht Bausteine, so doch insofern integrierende Bestandteile des Gitters, als sich das Grundgitter nur in ihrer Anwesenheit ausbildet und bei Entfernung der Partnermoleküle durch Verdampfung oder Extraktion sofort collabiert. So gewiß diese Unterschiede hinsichtlich Zusammensetzung und Beständigkeit für die bisher bekannten Addukte beider Arten Geltung haben, so brauchen sie dennoch nicht eine unausfüllbare Kluft zu bezeichnen. Es wurde schon eingangs daran erinnert, daß es Zeolithe gibt, die die Entwässerung nicht vertragen, ohne zu kollabieren. Es macht keine Schwierigkeit, sich vorzustellen, daß man einen Zeolith finden oder synthetisieren könnte, der bei vollständiger Füllung der Kanäle mit Kohlenwasserstoffmolekülen beständig, dessen Gitter jedoch so empfindlich wäre, daß es bei partiellem Abpumpen des Kohlenwasserstoffs in adäquatem Maß zusammenbricht. In diesem Fall hätte man die Analogie zu den Harnstoffaddukten, es würde das Gesetz der konstanten Proportionen gelten. Auf der anderen Seite: es ist nicht unmöglich — entsprechende Versuche wurden bisher allerdings nicht durchgeführt —, daß bei extrem tiefen Temperaturen auch bei den Harnstoffaddukten eine Entfernung der kanalfüllenden Komponenten gelingt, *ohne* daß das hexagonale Grundgitter zusammenbricht. Für die betreffende Temperatur würde das Harnstoffaddukt dann den Charakter als stöchiometrische Verbindung verlieren und als organischer „Zeolith" gelten können.

III. Käfig-Einschlußverbindungen.

1. Clathrate-compounds des Hydrochinons.

Neben dem gewöhnlichen, trigonalen α-Hydrochinon ($F = 172{,}3°$, umkrystallisierbar aus Wasser, Äthanol oder Äther) und dem durch Sublimation erhältlichen monoklinen γ-Hydrochinon findet sich in der Literatur noch eine dritte, als β-Hydrochinon bezeichnete Form beschrieben, die man erhält, wenn man eine der beiden anderen Formen aus Methanol umkrystallisiert. D. Z. PALIN und H. M. POWELL fanden, daß es sich bei dem sogenannten β-Hydrochinon um eine Additionsverbindung $3\,C_6H_4(OH)_2 \cdot 1\,CH_3OH$ handelt und entdeckten, daß dieses Addukt, zusammen mit der seit 1859 bekannten Molekülverbindung von Hydrochinon und Schwefeldioxyd, der Molekülverbindung von Hydrochinon und Schwefelwasserstoff und einer Reihe weiterer Addukte dieser Art einen völlig neuen Typ von Molekülverbindungen repräsentiert (*31*), (*32*,) (*33*), (*34*), (*39*). Man findet hier die zweite der drei denkbaren Möglichkeiten der Einlagerung einer Molekülart in dem Grundgitter einer zweiten Molekülart verwirklicht: die allseitig geschlossene, käfigartige Umhüllung der Gastmoleküle. Der von PALIN und POWELL geprägte

Name clathrate-compounds ist abgeleitet aus κλῆθρα oder clathri, das Tierkäfiggitter.

Die Krystallstruktur der verschiedenen Hydrochinon-Käfigverbindungen ist im Prinzip identisch; die detaillierte Untersuchung wurde am Beispiel des SO_2-Adduktes vorgenommen.

Der rhombischen Elementarzelle des Adduktes $3\,C_6H_4(OH)_2 \cdot SO_2$ kommen die Achsen $a = 16{,}3$; $c = 5{,}81$ zu. Raumgruppe ist C_{3i}^4–R 3. Für die Anordnung der Hydrochinonmoleküle im Krystall ergab die Patterson- und Fourier-Analyse das in der Abb. 17 schematisiert wiedergegebene Bild. Die kleinen Kreise bedeuten die durch Wasserstoffbrücken (kurze Verbindungslinien) den Zusammenhalt von Molekül zu Molekül besorgenden Sauerstoffatome der Hydrochinonmoleküle. Die Benzolringe selber sind der Übersichtlichkeit halber nicht gezeichnet, sondern werden durch die *längeren* Verbindungslinien von O-Atom zu O-Atom wiedergegeben. Es liegt also ein unendliches dreidimensionales Netzwerk von Hydrochinonmolekülen vor. In dieses weitmaschige Netzwerk ist nun ein identisches zweites Netzwerk so hineingestellt, daß seine horizontalen Hexagone in halber Höhe zwischen den Hexagonen des ersten Netzwerkes liegen. Abb. 18 verdeutlicht die relative Lage der zwei Netzwerksysteme, von denen jedes identisch mit dem in Abb. 17 gezeigten ist. In dem Gefüge der beiden ineinander gestellten Netzwerke gibt es nun Hohlräume, groß genug, um kleine Moleküle in einer Distanz zu umschließen, die den normalen Abständen zwischen nichtverbundenen Atomen entspricht, und zugleich eng genug umgittert, um ein Entweichen der eingeschlossenen Moleküle zu verhindern. Die besetzbaren Hohlräume machen etwa $7^1/_2\%$ des Totalvolumens aus.

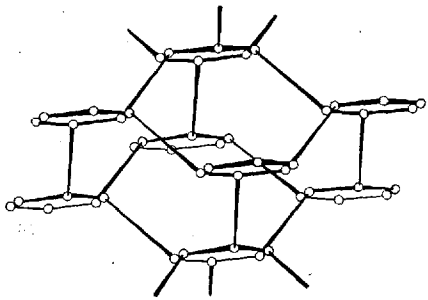


Abb. 17. Das Grundgitter der β-Hydrochinon-addukte. Teilbild von *einem* der beiden einander durchdringenden Netzwerksysteme [nach PALIN und POWELL (*32*)].

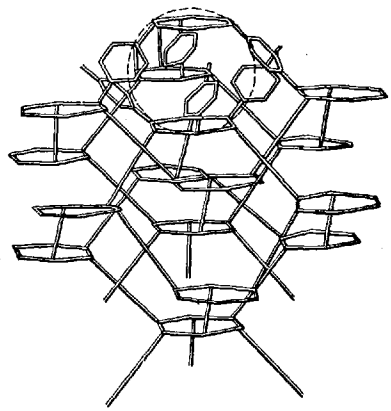


Abb. 18. Das Grundgitter der β-Hydrochinon-addukte. Gesamtbild von *beiden* einander durchdringenden Netzwerksystemen [nach PALIN und POWELL (*32*)].

Diese Hohlräume sind es, in denen die Schwefeldioxyd-, Methanol- oder anderen Partnermoleküle eingeschlossen sind. In der Abb. 18 oben

ist ein solcher Hohlraum andeutungsweise abgegrenzt, in der Abb. 19 schematisiert verdeutlicht.

Abb. 20 gibt eine Elektronendichtekarte in der (0001) Fläche. Im Zentrum befindet sich das SO_2-Molekül. Die Deutung der Elektronendichten durch Molekülbilder ist aus der Einzeichnung der Valenzstriche von 2 Hydrochinonmolekülen zu ersehen.

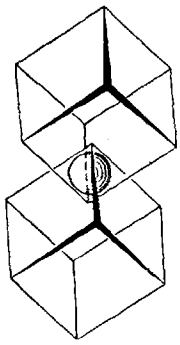


Abb. 19. Schema eines Hohlraums, gebildet durch zwei einander durchdringende Netzwerke [nach POWELL (*39*)].

Eine eigentümliche Verzerrung des Gitters ist festzustellen, wenn Moleküle eingelagert sind, die eine gestreckte Form haben und etwas zu lang sind, um in den Hohlräumen der geschilderten „Normalform" des Grundgitters Platz zu finden. Das Gitter ist diesfalls in der Richtung *c* gedehnt unter gleichzeitiger Schrumpfung in der Richtung *a*. Abb. 21 gibt diese Verzerrung anschaulich wieder.

Die röntgenographisch und analytisch ermittelten Daten für eine Reihe von Hydrochinoneinschlußverbindungen sind in der Tab. 16 zusammengestellt.

Die Werte der Spalte III und IV zeigen, daß die Elementarzellen für die Addukte der kleinen Moleküle HCl, HBr, H_2S und $HC{\equiv}CH$ praktisch identisch sind, daß dagegen bei den größeren, länglichen Molekülen die oben besprochene Dehnung in der *c*-Richtung und Schrumpfung in der *a*-Richtung auf-

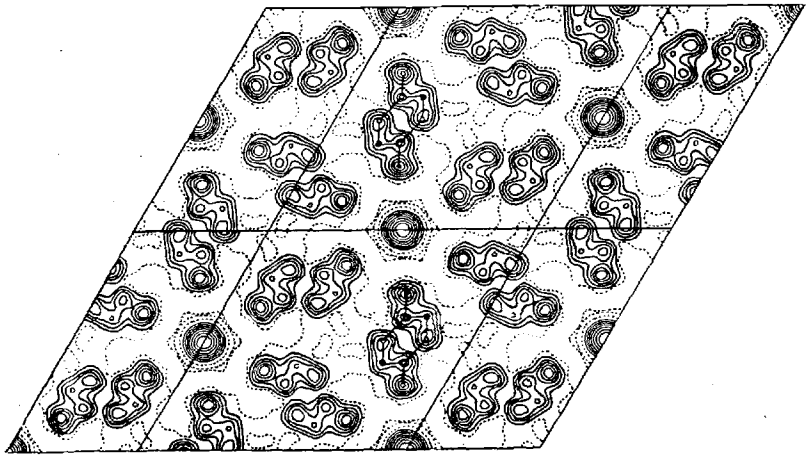


Abb. 20. Fourier-Analyse des SO_2-Hydrochinon-adduktes, Projektion auf (000¹) [nach PALIN und POWELL (*32*)].

tritt. Beim Acetonitril scheint übrigens die Grenze der zulässigen Dehnung erreicht zu sein; denn es gelang nicht, ein analoges Addukt mit dem nur um weniges größeren CS_2-Molekül darzustellen.

Tabelle 16. *Hydrochinon-Einschlußverbindungen.*

Addierte Verbindung		Elementarzelle		Dichte	Theoretische Werte für die Idealformel $3\,C_6H_4(OH)_2 \cdot M$		Werte aus der Röntgenuntersuchung			Werte aus chemischen Analysen	
Formel	Molgewicht	a Å	c Å		Molgewicht für $3 \cdot 3[C_6H_4(OH)_2] \cdot M$	M %	Molgewicht der Elementarzelle	M %	Molverhältnis $M : 3\,C_6H_4(OH)_2$	M %	Molverhältnis $M : 3\,C_6H_4(OH)_2$
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
HCl	36,5	16,55	5,46	1,38	1100	9,97	1083	8,6	0,85	8,58	0,85
HBr	81	16,57	5,48	1,36	1233	19,7	1075	7,9	0,35	8,1	0,36
H_2S	34	16,58	5,49	1,34	1194	9,35	1060	6,55	0,69	6,2	0,64
C_2H_2	26	16,63	5,46	1,31	1068	7,31	1038	4,6	0,62	—	—
CH_3OH	32	16,56	5,55	1,35	1086	8,85	1078	8,1	0,92	8,6	0,97
HCOOH	46	16,42	5,65	1,37	1128	12,23	1096	9,7	0,79	10,2	0,82
SO_2	64	16,29	5,81	1,44	1182	16,25	1165	14,8	0,91	14,5	0,88
CO_2	44	16,17	5,82	1,36	1122	11,77	1087	8,9	0,74	8,9	0,74
CH_3CN	41	15,95	6,24	1,33	1113	11,06	1108	10,7	0,96	11,0	0,99

Wie schon gesagt wurde, sind jedem Hohlraum und damit jedem addierten Molekül 3 Moleküle Hydrochinon zugeordnet. In der Spalte X und XII müßte daher im Idealfall überall der Wert 1 erscheinen. Daß die gefundenen Zahlen immer *unter* diesem Wert bleiben, ist darauf zurückzuführen, daß immer ein gewisser, manchmal sogar recht erheblicher Prozentsatz der Hohlräume *unbesetzt* bleibt. Eigentümlicherweise wird der Idealwert 1 am nächsten erreicht beim Acetonitril, dem längsten der einlagerungsfähigen Moleküle. Warum? PALIN und POWELL deuten dies folgendermaßen: Die Dehnung führt einen Zustand so starker Spannung herbei, daß das Gitter nur dann genügend stabilisiert ist, wenn annähernd alle Hohlräume gefüllt sind. Daß im übrigen beim unverzerrten

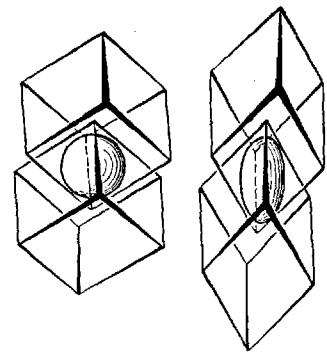


Abb. 21. Schema des normalen und des gedehnten Hohlraums von Hydrochinonaddukten [nach POWELL (*39*)].

Gitter beliebige Werte unter 1 auftreten (eine Überschreitung des Wertes 1 ist nie beobachtet worden) ist verständlich, da die „β-Struktur" auch für sich allein, d. h., gänzlich ohne Füllkörper, existenzfähig ist. Die *völlig* leere β-Struktur läßt sich allerdings nur schwierig herstellen; es ist offensichtlich, daß die eingeschlossenen Moleküle zur Stabilisierung des Grundgitters beitragen.

Vor kurzem gelang POWELL und GUTER auch die Herstellung einer Argon-Hydrochinon-Einschlußverbindung. Nach dem Ergebnis der Röntgenuntersuchung hat sie die nämliche Kristallstruktur wie die anderen, im vorausgehenden besprochenen Addukte (*40*).

2. Dicyano-ammin-benzolnickel.

Eine anorganisch-organische Käfigverbindung ist nach einer Mitteilung von POWELL und RAYNER (*41*) auch die vor langem erstmals von K. A. HOFMANN dargestellte Verbindung $Ni(CN)_2 \cdot NH_3 \cdot C_6H_6$, das Dicyano-ammin-benzol-nickel. Dieses Produkt hatte man bisher als Koordinationsverbindung

$$\begin{matrix} CN & & NH_3 \\ & Ni & \\ CN & & C_6H_6 \end{matrix}$$

mit gleichartig um das Nickelatom gruppierten Liganden gedeutet, ohne allerdings dieser Formulierung valenzchemisch einen Sinn unterlegen zu können.

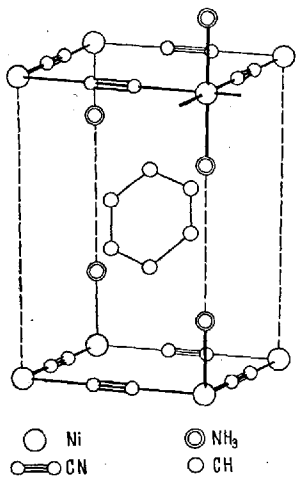


Abb. 22. Die Struktur des Dicyano-ammin-benzol-nickels [nach POWELL und RAYNER (*41*)].

Die Röntgenuntersuchung enthüllte ein völlig anderes Strukturbild (Abb. 22).

Die Elementarzelle ist tetragonal, hat die Parameter $a = 7{,}2$; $c = 8{,}3$ und enthält die doppelte Anzahl der in der obigen Formel bezeichneten Atome. Das Grundgitter besteht in einem zweidimensionalen Netz von —Ni—CN—Ni-gruppen. Jedem zweiten Nickelatom sind in senkrechter Lage über und unter dem bezeichneten Netzwerk 2 NH_3-Moleküle zugeordnet. Die hierdurch umgrenzten Hohlräume enthalten die Benzolmoleküle.

Wahrscheinlich gehören auch die analogen, gleichfalls von K. A. HOFMANN beschriebenen Verbindungen, die statt des Benzols Thiophen, Furan, Pyrrol, Anilin oder Phenol enthalten, zum gleichen Strukturtyp.

3. Wasser-Käfigverbindungen („Feste Gas- und Flüssigkeitshydrate").

Unter der Bezeichnung „Feste Gas- und Flüssigkeitshydrate" wird üblicherweise eine Reihe anorganischer und organischer Additionsverbindungen des Wassers zusammengefaßt, die folgende Merkmale gemeinsam haben. Nach der Bruttozusammensetzung treffen in der Regel sechs, manchmal mehr, aber niemals weniger Moleküle H_2O auf 1 Molekül des Verbindungspartners. Der Verbindungspartner besitzt stets hohe Flüchtigkeit, ist also entweder ein Gas oder eine niedrig siedende Flüssigkeit. Alle Addukte der Reihe krystallisieren im kubischen System. Sie sind nur bei verhältnismäßig tiefen Temperaturen beständig.

Eine Zeitlang sind die Hydrate dieser Art, deren erster Vertreter, das Chlorhydrat $Cl_2 \cdot 6\ H_2O$, schon vor 140 Jahren von DAVY dargestellt wurde, intensiv bearbeitet worden. In den letzten Jahrzehnten aber sind sie, von einigen wenigen Vertretern abgesehen, die ein gewisses Interesse für die Erdgasindustrie boten (*20*), (*27*), (*56*), so sehr in den Hintergrund getreten, daß es heute nicht mehr allgemein bekannt ist, wie außerordentlich mannigfaltig die Verbindungsgruppe, ihrer Zusammensetzung nach, ist. Sie umfaßt Edelgashydrate, Hydrate des Chlors, Chlordioxyds, Schwefeldioxyds, Kohlendioxyds, Stickstoffoxyduls, des Schwefelwasserstoffs, Selenwasserstoffs und anderer flüchtiger Hydride, ferner Hydrate von gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffen, wie Methan, Äthylen und Acetylen, von organischen Halogeniden, wie Methylchlorid, Äthylenchlorid, Chloroform, und viele andere. Hinzu kommt noch die Gruppe der Mischhydrate, in denen zwei verschiedene Partner mit dem Wasser verbunden sind. Von DE FORCRAND sind allein mehr als dreißig verschiedene Mischhydrate von Schwefelwasserstoff und halogenierten Kohlenwasserstoffen dargestellt worden.

Bis in die allerletzte Zeit ist die Konstitution dieser Hydrate ein vollkommenes Rätsel geblieben. Angesichts der offenkundigen Gleichartigkeit so heterogener Produkte, wie Edelgas-, Schwefeldioxyd- und Kohlenwasserstoffadditionsverbindungen, ist es klar, daß valenzchemische Überlegungen keinen Schritt weiter helfen konnten. Hier wie bei allen anderen in diesem Referat besprochenen Verbindungsgruppen ist es die Röntgenstrukturanalyse gewesen, die den wesentlichen Fortschritt der Erkenntnis gebracht hat. Etwa zur gleichen Zeit, als PALIN und POWELL die Natur des „β-Hydrochinons" aufklärten und den Begriff der „clathrate-compounds" schufen, hat v. STACKELBERG durch Röntgenanalyse die Struktur der bisher rätselhaften Gas- und Flüssigkeitshydrate als Käfigeinschlußverbindungen aufgeklärt und damit an einem anderen Objekt dasselbe neuartige Bauprinzip entdeckt (*53*).

Durch DEBYE-SCHERRER-Aufnahmen konnte zunächst die Gleichheit des Krystallbaues der verschiedenartigen Gas- und Flüssigkeitshydrate sichergestellt werden. Die Auswertung von Einkrystallauf-

nahmen des Hydrates $SO_2 \cdot 6\,H_2O$ und des Mischhydrates $CHCl_3 \cdot 6\,H_2O \cdot H_2S \cdot 6\,H_2O$ ergab folgendes Strukturbild:

Die kubische Elementarzelle (Gitterkonstante ~12 Å) enthält 48 Wassermoleküle und 8 Partnermoleküle. Die 8 Partnermoleküle brauchen nicht gleichartig zu sein. Das Präparat des untersuchten Mischhydrats von Chloroform und Schwefelwasserstoff wies z. B. die durchschnittliche Zusammensetzung von $2{,}5\ CHCl_3 \cdot 5{,}5\ H_2S \cdot 48\ H_2O$, bezogen auf den Bereich der Elementarzelle, auf. Die 48 Wassermoleküle sind derart angeordnet, daß ein H_2O-Gerüst mit 8 Hohlräumen entsteht, deren jeder von 24 Wassermolekülen umgeben ist. Zwei von diesen acht angenähert kugelförmigen Hohlräumen sind so gestaltet, daß alle 24 umgebenden Wassermoleküle einen identischen Abstand von 4,2 Å zum Zentrum haben. Zieht man von dieser Strecke als Radius des Wassermoleküls den Betrag von 1,2 Å ab, so bleiben für den Radius des freien Hohlraumes 2,9 Å, für den Durchmesser also 5,8 Å. Die eingelagerten Moleküle der Gashydrate haben in der Regel Durchmesser von 5 bis 6 Å.

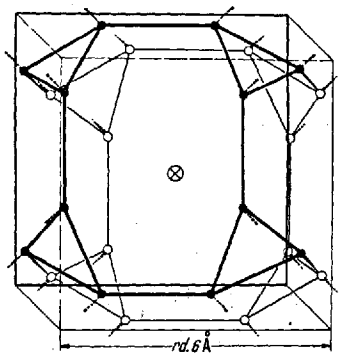


Abb. 23. Hohlraum 1. Art der Gashydrate. Die 24 H_2O-Moleküle liegen auf der Oberfläche eines Würfels (eingezeichnet) [nach v. STACKELBERG (53)].

Abb. 23 zeigt einen Hohlraum dieser Art.

Die übrigen 6 Hohlräume der Elementarzelle sind ebenfalls von 24 Wassermolekülen umgeben, jedoch so, daß von ihnen 8 einen Zentralabstand von 3,7 Å, 8 einen von 4,8 Å und 8 einen von 5,2 Å haben. Im Mittel beträgt der Radius der 6 freien Hohlräume dieser zweiten Art somit 3,3 Å.

Jedes Wassermolekül hat vier Nachbarn im Abstand von 2,6 Å; dieser Abstand ist der gleiche wie im Eisgitter. Es ist erwähnenswert, daß bei den Harnstoffaddukten Analoges gilt: auch dort stimmen die Abstände und Koordinationszahlen der Moleküle im Adduktgitter mit denen des normalen Harnstoffgitters überein.

Aus der Tatsache, daß keine Unterschiede in den Intensitäten der Röntgenreflexe bei den verschiedenen Gashydraten festzustellen sind, ist der Schluß zu ziehen, daß die Gasmoleküle keine definierten Punktlagen einnehmen, also in ihren Käfigen rotieren können.

In der folgenden Tabelle 17 sind die ermittelten Gitterkonstanten, sowie die röntgenographisch errechneten und die pyknometrisch ermittelten Dichten für einige Gashydrate zusammengestellt.

Man sieht, daß bei einem Teil der Präparate die unter Zugrundelegung der Idealformel $8\ M \cdot 48\ H_2O$ berechneten Dichten übereinstimmen, daß

Tabelle 17. *Gitterkonstanten und Dichten einiger Wasser-Käfigverbindungen.*

Nr.	Hydrat von	Gitterkonstante in Å	Röntgen. Dichte, berechnet mit (m) Gasmolekeln im Elementarbereich		Pyknometrische Dichte	Molverhältnis H_2O: M
1	SO_2	12,03 ± 0,05	1,31 ± 0,02 (8)		1,23 ± 0,03	6: 1
2	Cl_2	11,98 ± 0,05	1,37 ± 0,02 (8)		1,29 ± 0,02	6: 1
3	X	11,90 ± 0,03	1,88 ± 0,02 (8)			
4	CCl_4	12,21 ± 0,1	1,21 (3); 1,35 (4)	±0,04	1,10 (3)	~16:1
5	$CHCl_3$	12,23 ± 0,1	1,11 (3); 1,22 (4)			
6	CH_2Cl_2	12,20 ± 0,1	1,02 (3); 1,10 (4)			
7	C_2H_5Cl	12,21 ± 0,1	0,96 (3); 1,01 (4)			
8	CCl_4—H_2S	12,25 ± 0,1	1,30	±0,04 (2,5 + 5,5)	1,272 ± 0,01	6: 1
9	$CHCl_3$—H_2S		1,22		1,216 ± 0,01	6: 1
10	CH_2Cl_2—H_2S		1,14			6: 1
11	C_2H_5Cl—H_2S		1,10			6: 1
12	C_2H_5Br—H_2S	12,30 ± 0,1	1,18			6: 1

aber bei den Präparaten 4 bis 7 Übereinstimmung nur dann besteht, wenn ganz erheblich weniger Gasmoleküle im Elementarbereich angenommen werden, nämlich etwa 3 anstatt 8. Man stößt hier auf die gleiche Tatsache der nur teilweisen Hohlraumbesetzung, die von PALIN und POWELL für die Hydrochinon-Einschlußverbindungen gefunden wurde. Durch kleine Moleküle (H_2S) können die Leerstellen in den Wasser-Käfigverbindungen aufgefüllt werden (Bildung von Mischhydraten, Präparat 8 bis 12). Derartiger Auffüllung, z. B. durch He, Ne, A, O_2, N_2 kommt eine stabilisierende Wirkung zu; einige Hydrate können ohne Anwendung derartiger „Hilfsgase" überhaupt nicht dargestellt werden, z. B. das Jodhydrat. Die Annahme unbesetzter Hohlräume läßt als möglich erscheinen, daß partiell gefüllte Hydrate „zerdrückbar" sein könnten. Tatsächlich ist schon vor langem von TAMMANN und KRIGE festgestellt worden, daß beim Chloroformhydrat, bei dem nach dem Strukturbild v. STACKELBERGS mehr als die Hälfte der Hohlräume unbesetzt sein müssen, durch Druck die Zersetzungstemperatur herabgesetzt wird. Bei den „prall gefüllten" Hydraten der kleineren Moleküle SO_2 und N_2O wird dagegen die Dissoziation durch Druck *nicht begünstigt*, sondern, wie verständlich ist, zurückgedrängt.

Im allgemeinen ist die „ideale" Zusammensetzung $M \cdot 6\ H_6O$ bei denjenigen Hydraten anzutreffen, deren Einschlußkomponenten einen Moleküldurchmesser kleiner als 5,6 Å, ein Molvolumen (flüssig) kleiner als 55 ccm und ein Nullpunktsvolumen kleiner als 36 ccm haben. Molare Adduktzusammensetzung $M \cdot 15$ bis $16\ H_2O$ findet sich bei Molekülen mit einem Durchmesser größer als 5,8 Å. Dieses Molverhältnis trifft für die Flüssigkeitshydrate zu. Bei den Hydraten von Molekülen mit einem

Durchmesser von 5,6 bis 5,8 Å ist die Formel $M \cdot 8\,H_2O$. Moleküle mit einem Maximaldurchmesser von mehr als 6,8 Å sind nach den bisherigen Erfahrungen zur Bildung von Käfighydraten nicht befähigt. Es scheint, daß bei den Verbindungen $M \cdot 8\,H_2O$ nur die 6 Hohlräume zweiter Art (s. S. 128), bei den „Flüssigkeitshydraten" $M \cdot 15$ bis $16\,H_2O$ nur die Hälfte der Hohlräume zweiter Art besetzt sind.

In der Abb. 24 sind die geschilderten Verhältnisse übersichtlich zum Ausdruck gebracht. Die Hydratbildner sind auf der rechten Seite der Molekülläng enskala eingetragen, auf der linken Seite sind einige Stoffe vermerkt, von denen H_2O-Käfigverbindungen bisher *nicht* dargestellt werden konnten. Dem Diagramm ist zu entnehmen, daß nicht nur zu große, sondern auch zu kleine Moleküle für die Adduktbildung ungeeignet sind. Das trifft z. B. für He, Ne, H_2, N_2, O_2, NO, CO zu. Doch sind diese Moleküle imstande, mit großen Molekülen zusammen Mischhydrate zu bilden. Neben der Größe ist auch die Form der Moleküle für die Stabilität der Gashydrate von Bedeutung: gedrungene Form ist der Hydratbildung günstig, schlanke abträglich. Methan, Äthan, Propan bilden Hydrate; das gestreckte Molekül des n-Butans vermag sich nur im Gemisch mit anderen Molekülen an einer Hydratbildung zu beteiligen; das Hydrat des gedrungenen Isobutanmoleküls dagegen ist besonders stabil. Man wird an das Verhalten der unverzweigten aliphatischen Verbindungen gegen Thioharnstoff erinnert. Infolge ihrer Schlankheit vermögen sie das Adduktgitter allein nicht zu bilden und zu stabilisieren, wohl aber können sie durch gedrungenere Moleküle, die als Gitterstabilisatoren wirken, in das Addukt mitgenommen werden (s. S. 106). Eigentümlicherweise bildet der *Tetrachlorkohlenstoff* trotz idealer Form und geeigneten Moleküldurchmessers in ganz reiner Form anscheinend kein Hydrat. Aber die Gegenwart einer geringen Menge kleiner Moleküle, z. B. Luft, genügt, um die Hydratbildung zu initiieren. Es gilt die Regel, daß Gegenwart von polar gebundenem Wasserstoff die Bildung des Einschlußgitters verhindert. Z. B. sind Halogenwasserstoffe, Alkohole, Säuren, Amine, Amide, Ammoniak zur Hydratbildung ungeeignet. Das gleiche gilt für andere Verbindungen, die mit den Wassermolekülen Wasserstoffbrücken zu bilden vermögen, wie Aldehyde, Ketone, Nitrile.

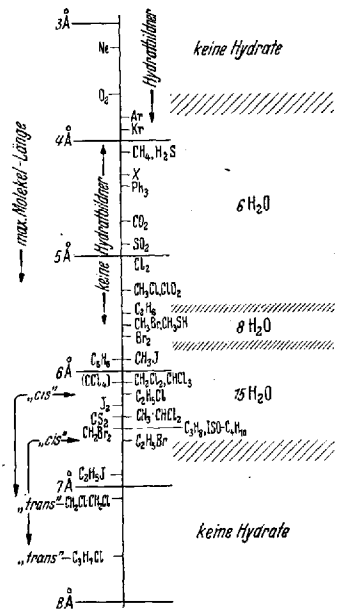


Abb. 24. Hydratbildung und Molekülgröße [nach v. STACKELBERG (53)].

Es sind also gerade hydrophile Stoffe, die zur Bildung der Wasser-Käfigverbindungen ungeeignet, und hydrophobe, die geeignet sind. Gegen die Wirkung spezifischer Bindungskräfte ist, wie man sieht, das Wasser-Käfiggitter viel empfindlicher als das β-Hydrochinongitter. Stark polare Verbindungen bilden nicht nur selbst keine Hydrate, sondern sie greifen, mit Hydraten in Berührung gebracht, deren Gitter an und lösen die Krystalle auf. Man kann von dieser Erfahrung Gebrauch machen, um die in Erdgasleitungen bisweilen sich ausscheidenden und Verstopfung verursachenden Kohlenwasserstoffhydrate aufzulösen: Zusatz von Ammoniak zerstört bzw. verhindert derartige Trombosen.

In der Tabelle 18, die v. STACKELBERG aus den Ergebnissen früherer und eigener Untersuchungen zusammengestellt hat, sind charakteristische Daten für einige Hydratbildner und ihre Addukte wiedergegeben. Die Hydratbildner sind nach steigendem Siedepunkt geordnet. In der gleichen Reihenfolge steigen, wie man sieht, die Werte für die Temperatur, bei der die Hydrate den Druck von 1 at entwickeln (Spalte III) und sinken die Drucke, die bei 0° C entwickelt werden (Spalte IV).

Tabelle 18. *Die Gashydrate.*

Hydrat-Bildner	Kp.	Hydrat		kritischer Zersetzungspunkt	H_2O-Molzahl
		Zersetzungstemperatur bei 1 at	Dissoziationsdruck bei 0°		
Ar	−190°	−42,8°	105 at		
CH_4	−161°	−29,0°	26,0	+21,5°	6
Kr	−152°	−27,8°	14,5	+13°	6
CF_4	−130°			+20,4°	
X	−107°	− 3,4°	1,5	+24°	6
C_2H_4	−102°	−13,4°	5,5	+18,7°	6
C_2H_6	− 93°	−15,8°	5,2	+14,5°	6
N_2O	− 89°	−19,3°	10,0	+12°	6
PH_3	− 87°	− 6,4°	1,6	+28°	
C_2H_2	− 84°	−15,4°	5,7	+16°	6
CO_2	− 79°	−24°	12,3	+10° (45 at)	6
CH_3F	− 78°		2,1	+18°	6
H_2S	− 60°	+ 0,35°	731 mm	+29,5° (23 at)	
AsH_3	− 55°	+ 1,8°	613	+28,3°	
C_3H_8	− 45°	0°	760	+ 8,5°	
H_2Se	− 42°	+ 8,0°	346	+30°	
CJ_3	− 34°	+ 9,6°	252	+28,7° (6 at)	6
C_2H_5F	− 32°	+ 3,7°	530	+22,8°	6
C_2F_4	− 32°				
CH_3Cl	− 24°	+ 7,5°	311	+21°	6
SbH_3	− 17°				
SO_2	− 10°	+ 7,0°	297	+12,1° (2,3 at),	6
CH_3Br.	+ 4°	+11,1°	187	+14,5° (1,5 at)	8
CH_3SH	+ 6°	+ 6°			
ClO_2	+ 10°	+15°	160	+18,2°	6

(Forts. Tab. 18) *Die Flüssigkeitshydrate.*

Hydratbildner	Kp.	Hydrat-Dissoziationsdruck bei °	kritischer Zersetzungspunkt	H_2O Molzahl
C_2H_5Cl	+13°	201 mm	+4,8° 590 mm	15
C_2H_5Br	+38°	(155)	+1,4° 166 ,,	15
CH_2Cl_2	+42°	116	+1,7° 160 ,,	15
CH_3J	+43°	74	+4,3° 175 ,,	15
CH_3CHCl_2	+57°	(56)	+1,5° (70) ,,	15
Br_2	+59°	45	+6,2° 93 ,,	8 (bis 10)
$HCCl_3$	+61°	(45)	+1,6°	15
SO_2Cl_2	+69°			

Spalte V bringt die Temperaturwerte für die kritischen Zersetzungspunkte und für einige Addukte die zugehörigen Druckwerte. Der „kritische Zersetzungspunkt" bezeichnet diejenige Temperatur, oberhalb derer das Addukt auch unter beliebigem Druck, und denjenigen Druck, unterhalb dessen das Addukt auch bei beliebig tiefer Temperatur nicht beständig ist. Der kritische Zersetzungspunkt ergibt sich aus dem Zustandsdiagramm der Gashydrate als Schnittpunkt der Dampfdruckkurven des Hydrats und des wassergesättigten Hydratbildners (Abb. 25). Die Werte der Spalte V zeigen keinen einfachen Gang; vom Äthylchloridhydrat ab ist die kritische Zersetzungstemperatur jedoch wesentlich niedriger als bei den vorausgehenden Addukten. Die Hydrate der höher siedenden Flüssigkeiten sind also nur in einem tieferen Temperaturbereich beständig als die der viel flüchtigeren Gase! Dieser zunächst überraschende Befund ist thermodynamisch so zu erklären, daß bei den in Rede stehenden Flüssigkeiten die Verdampfungswärmen wesentlich höher sind als bei den Gasen. Die Verdampfungswärme aber geht mit negativem Vorzeichen in die Berechnung der Affinität der Hydratbildung ein und ist somit, je größer sie ist, der Hydratbildung desto „abträglicher" (vgl. die Betrachtung für die Harnstoffaddition, S. 99). Nach einer Berechnung EUCKENS (s. bei *53*) ist zu erwarten, daß Stoffe, deren Verdampfungswärme größer als etwa 7500 cal/Mol ist, deren Siedepunkt also nach TROUTON über 60° liegt, überhaupt keine Hydrate des obigen Typus bilden können.

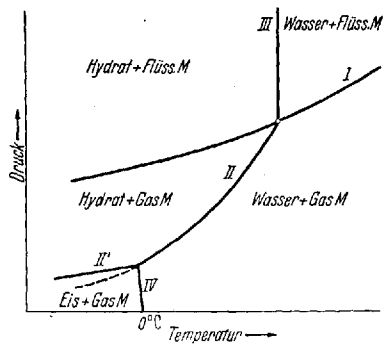


Abb. 25. Schema des Zustandsdiagramms der Gashydrate bei Überschuß an Hydratbildner *M* [nach v. STACKELBERG (*53*)].

Bildungswärmen von Gashydraten (Tabelle 19) sind teils kalorimetrisch bestimmt (Spalte II), teils aus der Temperaturabhängigkeit der Dissoziationsdrucke errechnet worden (Spalte III).

Tabelle 19. *Bildungswärmen von Gashydraten.*

I	II	III	IV	V
	W kalorimetrisch kcal	W berechnet kcal	Bildungswärme aus festen Komponenten kcal	Mol. H_2O pro Gastmolekül
CH_4		14,5		
C_2H_6		15,0		5,8 ± 0,5
CO_2	14,9	14,4	+2	
N_2O	15,0	14,7	+1	
C_2H_2	15,4	15	+3	
C_2H_4	15,4	15,2	+4	
Kr		13,9	+3	
X		16,7	+5,6	
SO_2		16,6 ± 0,6	+0,4	6,1 ± 0,6
Cl_2	16,9 ±0,5	15,5 ± 0,5	+0,5	5,9 ± 0,3
Br_2		19,6 ± 0,8	−2,9	7,9 ± 0,5
CH_3Cl		18,1 ± 1		
CH_3Br		19,5	+1	8,0
CH_3J		31,4	−0,5	17
CH_2Cl_2		29		
$CHCl_3$	31			
C_2H_5Cl		31,9	+1,5	16

Man sieht, daß die chemische Natur der Hydratbildner die Bildungswärme fast nicht beeinflußt. Die Hydrate der Formel $M \cdot 6\,H_2O$ haben Bildungswärmen von 15 bis 16 Cal, die der Formel $M \cdot 8\,H_2O$ Bildungswärmen von etwa 20 Cal, und die der Formel $M \cdot 15\,H_2O$ Bildungswärmen von ~31 Cal. Die Gleichheit der Wärmetönung der Adduktbildung so heterogener Stoffe wie der Edelgase, des SO_2 und der Kohlenwasserstoffe ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß bei der Einlagerung dieser Stoffe in das Gitter keine spezifischen, sondern lediglich VAN DER WAALSsche Kräfte am Werk sein können. Vergleicht man die Bildungswärmen der Hydrate mit der Summe der Verfestigungswärme von 1 Mol des betreffenden Hydratbildners und der Verfestigungswärme der betreffenden Anzahl Mole H_2O (6 bzw. 8 bzw. 15), so ergibt sich, daß die Beträge fast genau gleich groß sind; die Bildung der Hydrate aus den *festen* Komponenten weist also keine merkliche Wärmetönung auf.

Der Zusammenhang zwischen Bildungswärme und Molverhältniszahl der Hydrate läßt sich unter Verwendung eines einfachen Rechenansatzes zur Ermittlung der Zusammensetzung von Hydraten benutzen. Man bestimmt die Bildungswärme des betreffenden Hydrates aus flüssigem Wasser (Wa) und aus Eis (Wb). Dann ist die Differenz der beiden Werte

gleich der Krystallisationswärme der gebundenen n-Moleküle Wasser, also gleich $n \cdot 1437$ cal. Es ist also $n = \frac{Wa - Wb}{1437}$.

Die Struktur der Gashydrate weist große Ähnlichkeit zur Struktur der Boride Ca B_6, La B_6, Th B_6 auf. Hier liegt nach v. STACKELBERG ein dreidimensionales Gerüst von Boratomen vor, das Hohlräume birgt, in denen sich die Metallatome befinden. Wie die Hohlräume der Wasser-Käfigverbindungen von je 24 Molekülen Wasser, so sind die der Boride von 24 Boratomen umgeben. Die genannten Boride krystallisieren ebenfalls im kubischen System. Die Gitterkonstante ist unabhängig (oder fast unabhängig) von der Art der eingeschlossenen Metallatome.

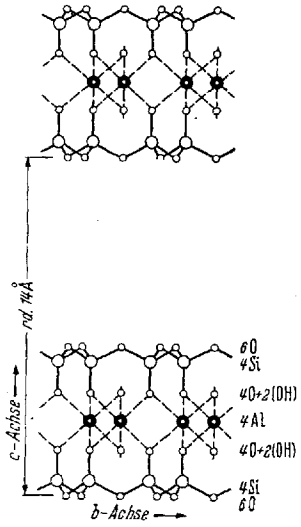


Abb. 26. Das Gitter des Montmorillonits [nach U. HOFMANN].

IV. Schicht-Einschlußverbindungen.

1. Tonmineralsorbate.

Die Tonmineralien Halloysit, $Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 4 H_2O$ und Montmorillonit $[Al_2O_3 \cdot 4 SiO_2 \cdot H_2O] + n H_2O$ zeigen Schichtstruktur folgender Art: Ebene, krystalline, in sich durch Atombindung zusammengehaltene Silikatschichten von etwa 10 Å Dicke liegen übereinander. Von der parallelen Lagerung und vom konstanten Abstand abgesehen, besteht keine periodisch wiederkehrende Regelmäßigkeit in der relativen Lage der Silikateinzelschichten zueinander. Die Einzelschichten sind nur durch verhältnismäßig schwache Kräfte miteinander verbunden.

Im Halloysit $Al_2O_3 \cdot 2 SiO_2 \cdot 4 H_2O$ sind 2 von den 4 Molekülen Wasser der Bruttoformel in Gestalt von etwa 3 Å dicken Zwischenschichten zwischen den etwa 10 Å dicken Silikatschichten eingelagert. Das Schichtwasser ist verhältnismäßig locker gebunden und kann durch gelinde Erwärmung oder durch Auswaschen mittels Dioxan entfernt werden. Dabei geht der Halloysit in Metahalloysit über, $Al_2O_3 \cdot 2 SiO_2 \cdot 2 H_2O$. Die Entquellung ist irreversibel.

Im Montmorillonit $[Al_2O_3 \cdot 4 SiO_2 \cdot H_2O] + n H_2O$ ist die in der Bruttoformel ausgeklammerte Menge Wasser gleichfalls schichtförmig zwischen Silikateinzelschichten von 9,6 Å Dicke eingelagert (Abb. 26). Die Silikatschichten tragen negative Ladung, in den Zwischenschichten befindet sich eine äquivalente Zahl von austauschbaren Kationen wie Na^+ und Ca^{++}. Die Zwischenschichten können die Dicke von etwa 3, 6, 9 oder 12 Å haben, das entspricht bei der VAN DER WAALSschen „Dicke" 3 Å der

Wassermoleküle mono-, di-, tri- und tetramolekularen Wasserschichten. Für gewöhnlich sind diese verschieden dicken Wasserschichten in den Montmorillonitpräparaten gleichzeitig und in ungeregelter Folge enthalten. Wasserhaltiger Montmorillonit ist reversibel entquellbar.

Wie GIESEKING (*18*) und HENDRICKS (*21*) durch ausführliche Untersuchungen belegt haben, können die in den Zwischenschichten enthaltenen Kationen (Na^+, Ca^{++} oder H^+) des Montmorillonits nicht nur durch anorganische, sondern auch durch organische Kationen ausgetauscht werden. Es ergab sich, daß große organische Kationen wesentlich fester gebunden werden als die anorganischen Kationen, und daß die Sättigung mit diesen Kationen das Wasserbindevermögen des Montmorillonits schwächt oder völlig aufhebt. Die organischen Kationen in den Zwischenschichten nehmen die flachest-mögliche Stellung an: Ohne Zweifel sind an der Bindung nicht nur die COULOMBschen Kräfte, die von der ionogenen Gruppe ausgehen, sondern auch VAN DER WAALSsche Kräfte, die vom ganzen Molekül ausgehen, beteiligt.

Sehr große Moleküle, wie z. B. Brucin und Codein verdrängen trotz ihrer starken Basizität nur etwa $^2/_3$ der austauschbaren H^+-Ionen des Montmorillonits. Der Grund liegt in der Raumbeanspruchung: das restliche Drittel der Wasserstoffionen wird durch die großflächigen Alkaloid moleküle zugedeckt und so dem Austausch entzogen. o-Phenylendiamin-Montmorillonit enthält monomolekulare, Benzidin-Montmorillonit di- molekulare Zwischenschichten. Manche Kationen bilden, je nach den Versuchsbedingungen, sowohl monomolekulare als dimolekulare Schichten.

Die röntgenographische Bestimmung der Zwischenschichtdicken gibt eine Möglichkeit zur Abschätzung der „VAN DER WAALSschen Dicke" einlagerungsfähiger Moleküle.

Es erwies sich z. B. Piperidin erwartungsgemäß „dicker" als aromatische Amine. Messungen der Montmorillonitsorbate von 2,5- und 2,7-Diaminofluoren machten, in Übereinstimmung mit den chemischen Erfahrungen und im Gegensatz zu dem Ergebnis der einzigen vorliegenden Krystallstrukturuntersuchung (*23*) coplanare Lage der Fluorenringe wahrscheinlich. Ebenso erwiesen sich Adenin und Guanin bei diesen Messungen als eben. Für Codein ergab sich eine Dicke des Moleküls, die gut mit der Strukturformel von GALLAND und ROBINSON vereinbar ist, nach der sich der N-Heterocyclus aus der Ebene der vier anderen, annähernd coplanaren Ringe erhebt (Abb. 27). Bei der Einlagerung der Nucleoside Guanosin und Adenosin (Abb. 28) scheinen sich, nach der Raumbeanspruchung zu schließen, die Ribofuranoseringe angenähert parallel zu den Ringen der Purinbasen einzustellen.

Die bisher besprochenen Sorbate sind Kationenaustauschprodukte und nehmen dem Verbindungscharakter nach eine eigentümliche Mittel-

stellung ein: ihrer Architektur nach sind sie typische Einschlußverbindungen, dem Bindungscharakter nach jedoch Salze.

Es lassen sich aber, wie BRADLEY (*8*) und MCEWAN (*29*) gezeigt haben, auch *nicht*-ionogene organische Verbindungen schichtförmig in Tonminerale einlagern. Hierbei findet ein Austausch gegen das Quellwasser, nicht aber gegen die vorhandenen anorganischen Kationen, die unverändert im Mineral bleiben, statt. Der Mechanismus der Bindung ist also bei diesen Sorbaten anders als bei den Amineinschlußprodukten. Dort sind am Zusammenhalt der Komplexe nebeneinander die in den Aminogruppen lokalisierten COULOMBschen Kräfte und die vom Gesamtmolekül ausgehenden VAN DER WAALSschen Kräfte beteiligt, hier dagegen sind die eingelagerten Moleküle am stöchiometrischenLadungsausgleich der negativ geladenen Silikatschichten unbeteiligt, die lokalisierte elektrostatische Anziehung entfällt also. Völlig unpolar dürfen die Moleküle allerdings *nicht* sein, z. B. gelingt es nach MCEWAN nicht, aliphatische Kohlenwasserstoffe einzulagern.

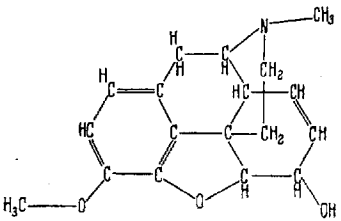


Abb. 27. Codein.

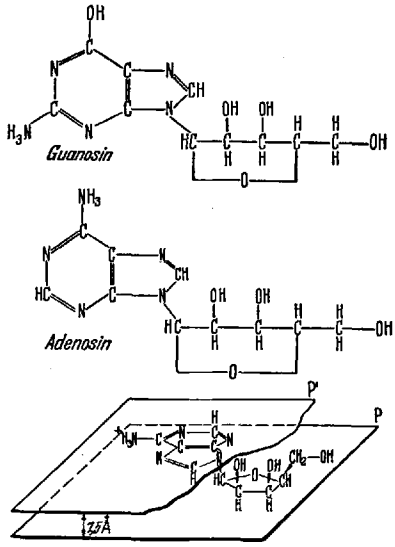


Abb. 28. Adenosin und Guanosin.

Als Verbindungspartner der letztgenannten Art wurden unter anderem insbesondere ein- und mehrwertige Alkohole sowie Äther untersucht.

Die organischen Komplexe des Montmorillonits können durch Einlagerung der organischen Partner in das bei 100° im Vakuum entwässerte Mineral oder aus dem wasserhaltigen Mineral durch direkte Verdrängung des gebundenen Wassers dargestellt werden. Für die Gewinnung der Organoaddukte des Halloysits (MCEWAN) ist nur der letztgenannte Weg gangbar, da die Entwässerung von Halloysit auch unter mildesten Bedingungen zu irreversiblem „Verkleben" der Silikatschichten führt. Lediglich Äthylenglykol vermag, in unvollständigem Maß, auch in entwässerten Halloysit noch einzudringen.

Strukturell wird durch die Einlagerung der organischen Komponenten nichts als der gegenseitige Abstand der parallelen Silikatschichten

geändert. Dieser läßt sich genau wie bei den eingangs besprochenen organischen Montmorillonit*salzen* leicht aus der Identitätsperiode in der Richtung c aus Pulverdiagrammen ermitteln. Der im folgenden zur Kennzeichnung des freien Lumens benutzte Wert Δ errechnet sich aus dem senkrechten Abstand zwischen den die Mittelpunkte der Oberflächensauerstoffatome oder Hydroxylgruppen enthaltenden, durch die Zwischenschicht getrennten Ebenen je zweier aufeinanderfolgender Silikatschichten, indem man zweimal den VAN DER WAALSschen Radius des Sauerstoffs in Abzug bringt. In der Abb. 29, die schematisch den Querschnitt durch Glykol-Halloysit wiedergibt, sind die randlichen Sauerstoffatome zweier Silikatschichten, die durch deren Atommittelpunkte bestimmten Ebenen (punktiert), das freie Lumen Δ und zwei eingelagerte Glykolmoleküle gezeichnet.

Tabelle 20 gibt die Ergebnisse von MCEWANS Untersuchung über organische Montmorillonit- und Halloysitsorbate wieder.

Wenn man die ermittelten Werte für die Zwischenschichtlumina (Spalte I und V) mit dem einfachen oder verdoppelten Durchmesser der jeweils eingelagerten Moleküle vergleicht (Spalte III und VII), so ergibt sich in guter Annäherung, daß die organischen Partner entweder in monomolekularer oder in bimolekularer Schicht eingelagert sind (Spalte II und VI). Unter den einwertigen Alkoholen bilden mit Halloysit lediglich Methanol und Äthanol Addukte, dagegen nicht die höheren Homologen (s. Spalte VI); mit Montmorillonit bilden Methanol und Äthanol doppelte, die höheren Homologen einfache Schichten. Hierfür gibt MCEWAN folgende Interpretation. Die Oberflächen der Silikatschichten des Montmorillonits tragen negative Ladung und üben deshalb auf polare Moleküle in ihrer Umgebung einen Orientierungseffekt aus, dergestalt, daß die positiven Enden angezogen werden. Da *jede* Schicht in dieser Weise wirkt, besteht zwischen den beiden Silikatschichten a priori die Tendenz zur Ausbildung *bimolekularer* Zwischenschichten. Dieser Fall ist bei Methanol und Äthanol verwirklicht. Den schwächer polaren, höheren Alkoholen gegenüber wirken die Silikatschichten vorwiegend durch die VAN DER WAALSschen Kräfte anziehend, die keinen Orientierungseffekt ausüben, in diesen Fällen bilden sich daher nur monomolekulare Schichten aus. Beim Halloysit besteht überhaupt keine Tendenz zur Ausbildung bimolekularer Zwischenschichten, da die einander zugekehrten Silikatschichtoberflächen selber polar sind. Die Verhältnisse werden durch die Abb. 30 illustriert.

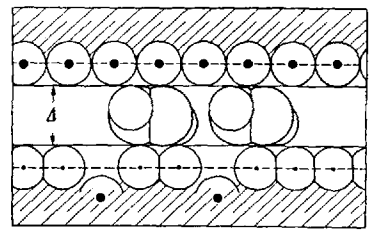


Abb. 29. Schematischer Querschnitt durch Halloysit mit eingelagertem Glykol [nach MCEWAN (*29*)].

Tabelle 20. *Montmorillonit- und Halloysiteinschlußverbindungen nicht-jonogener organischer Substanzen.*

Organischer Adduktpartner	Anorganischer Adduktpartner: Montmorillonit: △ beobachtet	Montmorillonit: Zahl der Molekülllagen in der Zwischenschicht	Montmorillonit: △ berechnet aus Wirkungssphäre und Zahl der Molekülllagen	Montmorillonit: Kationen im Mineral	Halloysit: △ beobachtet	Halloysit: Zahl der Molekülllagen in der Zwischenschicht	△ berechnet aus Wirkungssphäre und Zahl der Molekülllagen
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Methanol	7,4	2	6,9	NH_4^+	3,4	1	
Äthanol	7,9	2	8,1	NH_4^+	2,8	1	
Propanol-1	4,5	1	4,5	NH_4^+	0,3	0	
Butanol-1	4,6	1	4,5	NH_4^+	0,3	0	
Pentanol-1	4,6	1	4,5	NH_4^+			
Hexanol-1	4,1	1	4,5	NH_4^+			
Heptanol-1	4,1	1	4,5	NH_4^+			
Hexadecanol-1	4,1	1	4,5	NH_4^+			
Heptanol-4	3,7	1	4,5	NH_4^+			
Octanol-2	4,1	1	4,5	Ca^{++}			
2-Äthylbutanol-1	4,2	1	4,5	NH_4^+			
2-Methylbutanol-2	5,4	1	5,4	NH_4^+			
Cyclohexanol	5,6	1	5,5	NH_4^+			
Äthylenglykol	7,6	2	7,3	NH_4^+, Ca^{++}	3,7	1	
Propandiol-1,3	8,6	2	8,6	NH_4^+, Ca^{++}	4,4	1	4,5
Butandiol					4,0	1	4,5
Glycerin	8,3	2	8,3	NH_4^+, Ca^{++}	3,8	1	3,9
1,4-Dioxan	5,6	1	5,9	Ca^{++}			
Glykolmonomethyläther					3,5	1	
Glykolmonoäthyläther					3,6	1	
Glykolmonobutyläther					3,6	1	
Diäthylenglykol					3,6	1	
Triäthylenglykol					3,5	1	
n-Hexan	1—2	0		Ca^{++}			
n-Heptan	0,6	0		NH_4^+			
Benzol	4,6	2		NH_4^+			
Naphthalin	3,5			NH_4^+			
Tetrahydronaphthalin	4,6	2		NH_4^+			
Decahydronaphthalin	0,6	0		NH_4^+			
Chloräthanol	8,0	2	7,8	NH_4^+	3,6	1	
Äthylendiamin	4,3	1	4,4	Ca^{++}	4,5	1	4,4
Aceton	8,2	2	8,1	Ca^{++}	3,9	1	
Acetaldehyd					3,6	1	
Acetonitril	10,2	3	10,6	Ca^{++}	3,4	1	
Nitromethan	10,4	3	10,5	NH_4^+	3,3	1	
Nitrobenzol	5,7	2					

Daß ganz unpolare Verbindungen, wie Paraffinkohlenwasserstoffe, zur Addition nicht befähigt sind, wird wohl so zu deuten sein, daß die Bildungsenergie rein VAN DER WAALSscher Additionskomplexe allein nicht ausreicht, um die Dilatation der Silikatschichten zu erzwingen, die beim Montmorillonit wie beim Halloysit durch relativ starke elektrostatische Kräfte zusammengezogen werden.

Polarität oder starke Polarisierbarkeit des Verbindungspartners ist unter den sonstigen bisher besprochenen Einschlußverbindungen nur noch bei den Addukten des 4,4'-Dinitrodiphenyls eine conditio sine qua non. Bei der Harnstoff-, Thioharnstoff- und Desoxycholsäureaddition ist Polarität des Partners nicht notwendig, verhindert aber andererseits Adduktbildung nicht. Bei den H_2O-Käfigverbindungen sind Moleküle mit polar gebundenem Wasserstoff zur Einlagerung ungeeignet.

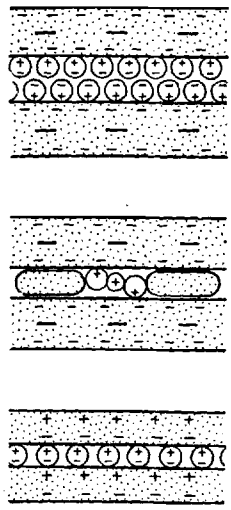
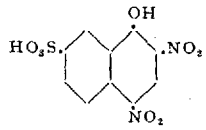


Abb. 30. Schematischer Querschnitt durch Montmorillonit-sorbate (oben und in der Mitte) und durch ein Halloysit-sorbat (unten) [nach McEWAN (*29*)].

2. Basische Zinksalze organischer Säuren.

Strukturelle Ähnlichkeit zu den Schichteinschlußverbindungen der Tonmineralien zeigen die von FEITKNECHT und Mitarbeitern (*12*) sowie von McEWAN und Mitarbeitern (*31*) beschriebenen Additionsverbindungen von Zinkhydroxyd und organischen Säuren. Basische Salze des α-Zinkhydroxyds besitzen nach FEITKNECHT eine Schichtstruktur der Art, daß in sich krystallin geordnete Schichten von $Zn(OH)_2$, getrennt durch Anionenhaltige Zwischenschichten, parallel und in konstantem Abstand, aber ohne sonstige periodisch wiederkehrende Orientierung zusammengelagert sind (*13*). Als Zwischenschichten können großflächige Moleküle organischer Säuren, wie Naphtholgelb



und andere saure Farbstoffe eingelagert werden. Die Bruttoformel derartiger Addukte ist nach FEITKNECHT 4 $Zn(OH)_2 \cdot Zn \cdot N^{II}$, wobei N^{II} das bivalente Anion des Farbstoffs bedeutet. Es ist wahrscheinlich, daß die Farbstoffmoleküle flach ausgebreitet in vierfacher Schicht zwischen den $Zn(OH)_2$-Schichten liegen.

Interessanterweise gelang es McEWAN und Mitarbeitern, in die FEITKNECHTschen Schichtkomplexe zusätzlich neutrale Verbindungen,

wie Methanol, Äthanol, Glykol, Glycerin, Acetonitril und Propionitril einzulagern (*30*). Es werden hierbei definierte Sättigungswerte erreicht, die mit einer Dilatation der $Zn(OH)_2$-Schichtabstände auf charakteristische Beträge verknüpft sind. Der Eigenschichtabstand des Naphtholgelb-primärkomplexes ist 19,6 Å. Die für die einzelnen Mischeinschlußverbindungen beobachteten totalen Schichtabstände und die auf die neutralen Gastmoleküle entfallenden Teilbeträge der Schichtabstände sind in Tabelle 21 zusammengestellt.

Tabelle 21. *Sekundäre Schichtkomplexe von Naphtholgelb-Zinkhydroxyd.*

	d_{001} in Å	Δ in Å ($= d_{001} - 19{,}6$)
Wasser	30,7	11,1
Methanol	27,8	8,2
Äthanol	30,8	11,2
Äthylenglykol . . .	29,6	10,0
Glycerin	30,1	10,5
Acetonitril	23,7	4,1
Propionitril	25,1	5,5

Es fällt auf, daß die Δ-Werte (3. Spalte der Tabelle 21) keine ganzzahligen Vielfachen der Wirkungssphären der betreffenden Gastmoleküle sind, im Gegensatz zu den Δ-Werten der Tonmineralschichtsorbate (s. Tabelle 20 S. 138). Man kann sich daher von der Lagerung der neutralen Moleküle in den Zwischenschichten vorerst noch kein Bild machen.

3. *Pferde-Methämoglobin-Hydrat.*

Die Untersuchungen von PERUTZ (*35*), (*36*), (*37*) über die Struktur von krystallisiertem Pferde-Methämoglobin haben hinsichtlich der Lokalisation und Bindungsweise des eingelagerten Wassers zu einem Bild geführt, das in wesentlichen Zügen dem für die vorausgehend besprochenen Schichteinlagerungsverbindungen gültigen gleicht.

52,4% des Volumens normaler Pferde-Methämoglobinkrystalle besteht aus Flüssigkeit, je nach Gewinnungsweise aus Wasser oder Salzlösung variabler Konzentration. In den Krystallen wechseln parallel gelagerte Schichten von Methämoglobinmolekülen und Flüssigkeit. Quellung und Entquellung läßt die Dicke und die Struktur der Proteinschichten unberührt und verändert lediglich die Dicke der Flüssigkeitszwischenschichten sowie den Winkel β der monoklinen Elementarzelle. Nur ein kleiner Betrag, nämlich 0,3 g Wasser pro 1 g Protein, ist nicht als Schichtwasser reversibel entfernbar, sondern fester gebunden, möglicherweise unmittelbar auf der Oberfläche der einzelnen Methämoglobinmoleküle.

Die Quellung und Schrumpfung des Methämoglobinkrystalls erfolgt nicht kontinuierlich, sondern in definierten, reproduzierbaren Stufen, wobei die Dicke der Flüssigkeitszwischenschicht sich jeweils um einen Betrag von etwa 4 Å ändert. Dies läßt auf laminare Struktur der Zwischenschichten schließen.

Die Abb. 31 zeigt die Elementarzelle in verschiedenen Stufen des Quellungszustandes. Man sieht, daß die Quellung und Schrumpfung nur Änderungen in der Höhe der Elementarzelle hervorruft, wobei der Winkel β zwischen 84,5° in den sauer gequollenen Krystallen und 137,5° in den langsam getrockneten Krystallen stufenweise variiert. Der schraffierte Teil der Diagramme deutet die relative Dicke der eingelagerten Flüssigkeitsschicht an. Die Schichten der Proteinmoleküle werden je nach der Änderung des Winkels β parallel zueinander verschoben; doch ändert sich dabei weder ihre Dicke noch ihre innere Struktur.

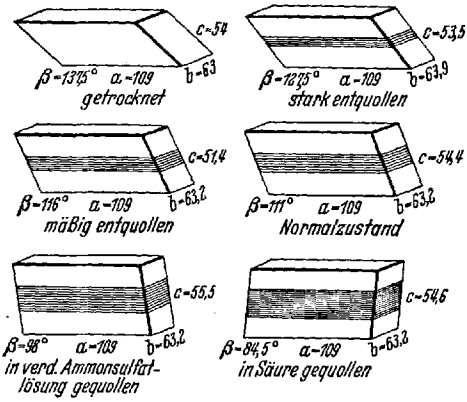


Abb. 31. Die Elementarzelle von Pferde-Methämoglobin in verschiedenem Quellungszustand [nach PERUTZ (35)].

In Abb. 32 ist das von PERUTZ auf Grund der röntgenographischen Untersuchungen für die Anordnung der Methämoglobinmoleküle und der Flüssigkeitsschichten im Krystall entworfene idealisierte Bild wiedergegeben. Die Zylinder, deren Höhe 34 Å und deren Durchmesser 57 Å beträgt, bedeuten die einzelnen Moleküle des Methämoglobins, Molekulargewicht 67500.

Ob die für den Methämoglobinkrystall wahrscheinlich gemachte Art der schichtförmigen Wassereinlagerung ein Sonderfall ist oder auch für andere wasserhaltige Proteine gilt, ist noch ungewiß. Beim krystallisierten turnip yellow mosaic virus scheinen die Oberflächen der Moleküle durch sehr viel dickere Wasserschichten (78 Å dick) voneinander getrennt zu sein. Bei diesem Virus, das man in jüngster Zeit sowohl röntgenographisch wie elektronen-mikroskopisch näher zu untersuchen begonnen hat (6), (10), (28), läßt eine andere, sehr merkwürdige Beobachtung an die Möglichkeit denken, daß Architektur und kräftemäßiger Zusammenhalt des Krystalls durch gleichartige Erscheinungen bedingt sein könnten, wie man sie an den viel einfacheren Einschlußsystemen, die in dem vorliegenden Aufsatz besprochen wurden, kennen gelernt hat. Das turnip

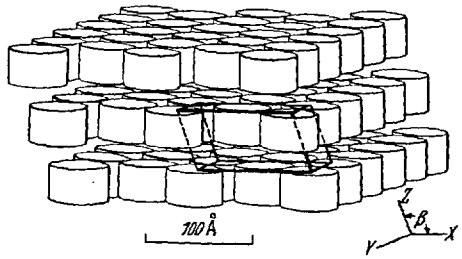


Abb. 32. Anordnung der Methämoglobinmoleküle im Krystall. Vorn rechts der Bereich einer Elementarzelle [nach PERUTZ (37)].

yellow mosaic virus besteht in reiner infektiöser Form aus einem Protein und einer Nucleinsäure. Das Protein konnte auch für sich allein, ohne die Nucleinsäure, die im virus 28% des Gewichtes ausmacht, krystallisiert erhalten werden. Die Krystallstruktur dieses (nicht-infektiösen) Proteins scheint die gleiche zu sein wie die des nucleinsäurehaltigen Materials (*6*)! Es sind lediglich die Maße der Elementarzelle des reinen Proteins ein wenig größer als die des kompletten Virus, so daß der Gegenwart der Nucleinsäure eine kontrahierende Wirkung auf die Proteinsäuremoleküle zugeschrieben werden muß, ohne daß die räumliche Anordnung dieser Moleküle im Prinzip geändert wird.

V. Schlußbemerkung.

Der engen Verwandtschaft der Krystallstruktur der verschiedenen Einschlußverbindungen steht, wie in den einzelnen Abschnitten hervorgehoben worden ist, Mannigfaltigkeit der Kräfte gegenüber, die am Zusammenhalt der Moleküle in den Addukten mitwirken. Gemeinsam aber in dynamischer Hinsicht ist allen Einschlußverbindungen, von den Edelgas-Käfigverbindungen und Paraffinaddukten bis zu den Montmorillonitschichtverbindungen organischer Basen, daß am Aufbau in wesentlichem Ausmaß VAN DER WAALSsche Kräfte beteiligt sind. Das überall erkennbare Prinzip der optimalen Ausfüllung vorgegebener Hohlräume ist schwerlich anders zu deuten, denn als Manifestation der von den ganzen Molekülen ausgehenden Anziehungskräfte, die nach weitest möglicher Absättigung mit den von den Molekülen der vorgegebenen Grundgitter ausgehenden Kräften, d. h. nach einem Potentialminimum des Systems, streben. Geraten diese Kräfte mit lokalisierten Kräften, wie sie beim Zusammentritt ionogener Partner auftreten, in Widerstreit, so setzen sie sich dennoch in weitem Maß durch. Dies ist selbst bei derjenigen Verbindungsgruppe, die als Grenzfall echter Einschlußverbindungen bezeichnet werden muß, nämlich bei den Montmorillonitsorbaten organischer Amine, noch deutlich erkennbar. Das Komponentenverhältnis dieser Sorbate im Sättigungszustand wird nicht durch die Zahl der verfügbaren elektronegativen Ladungen des Grundgitters, sondern durch die Größe der eingelagerten Moleküle bestimmt.

Die Aufgaben für weitere Arbeit auf dem Gebiet der Einschlußverbindungen sind mannigfacher Art. Allein für die bisher bearbeiteten, zumeist erst in jüngster Zeit entdeckten Verbindungsgruppen harrt noch eine Fülle von Problemen der Lösung; unter anderem bedarf die Frage gründlicher Bearbeitung, ob die Verbindungspartner wenigstens einiger der Einschlußverbindungen auch im flüssigen Zustand Assoziate bilden, die als charakteristisch bezeichnet werden können und die über das hinausgehen, was man an beliebigen anderen zur Assoziation geneigten, jedoch *nicht* zur Bildung von krystallisierten Einschlußverbindungen be-

fähigten Systemen bisher kennen gelernt hat. Man wird nach weiteren Additionsverbindungen vom Einschlußtyp suchen. Und man wird sicher manches von dem, was man an den bisher untersuchten Verbindungsgruppen gelernt hat, zur Vertiefung der Kenntnisse von den zwischenmolekularen Kräften im allgemeinen und vom krystallisierten Zustand der Materie im besonderen nützen können.

Von den technischen Anwendungsmöglichkeiten der Einschlußverbindungen wurde im vorliegenden Aufsatz kaum gesprochen. Aber es sei als günstiges Vorzeichen für die weitere Entwicklung dieses neuen Zweiges der Krystallchemie erwähnt, daß von seiten der Industrie dem Gebiet lebhaftes Interesse entgegengebracht wird, zunächst besonders im Hinblick auf die sich bietenden Möglichkeiten, Verbindungen oder Verbindungsgruppen auf dem Weg über Einschlußverbindungen aus Gemischen abzutrennen,

Unter welchem Gesichtspunkt immer man das Kapitel der Einschlußverbindungen betrachtet: zweifellos liegt hier ein Feld, das zu weiterer Durchforschung einlädt.

Literatur.

1. ANGLA, B.: Sur les complexes moléculaires fournis par la thiourée avec les composés organiques. C. R. hebd. Seances Acad. Sci. **224**, 402 (1947).
2. BARRER, R. M,: Synthesis of a Zeolitic Mineral with Chabazite-like Sorptive Properties. J. chem. Soc. (London) **1948**, 127.
3. — Fractionation of mixtures of hydrocarbons. USA.-Patentschrift 2 306 610 (1942).
4. —, u. D. A. IBBITSON: Occlusion of hydrocarbons by Chabazite and Analcite. Trans. Faraday Soc. **40**, 195 (1944).
5. BENGEN, F., u. W. SCHLENK jr.: Über neuartige Additionsverbindungen des Harnstoffs. Experientia **5**, 200 (1949).
6. BERNAL, J. D., u. C. H. CARLISLE: Unit-cell measurements of wet and dry cryst. turnip yellow mosaic virus. Nature (London) **162**, 139 (1948).
7. BÖDECKER, FR.: Zur Kenntnis ungesättigter Gallensäuren. Ber. dtsch. chem. Ges. **53**, 1852 (1920).
8. BRADLEY, W. F.: Molecular associations between Montmorillonite and some polyfunctional organic liquids. J. Amer. chem. Soc. **67**, 975 (1945).
9. CAGLIOTI, V., u. G. GIACOMELLO: L'analisi strutturale ed i legami chimici. Gazz. chim. ital. **69**, 245 (1939).
10. COSSLETT, V. E., u. R. MARKHAM: Structure of turnip yellow mosaic virus crystals in the electron microscope. Nature (London) **161**, 250 (1948).
11. CRAMER, FRIEDRICH: Die Cyclodextrine aus Stärke. Dissertation Heidelberg, 1949.
12. FEITKNECHT, W., u. H. BÜRKI: Basische Salze organischer Säuren mit Schichtstruktur. Experientia **5**, 154 (1949).
13. —, u. H. WEIDMANN: Zur Chemie und Morphologie der basischen Salze zweiwertiger Metalle. Helv. chim. Acta **26**, 1560, 1564 (1943).
14. — — Fällung und Alterung basischer Zinkverbindungen. Helv. chim. Acta **26**, 1911 (1943).
15. FREUDENBERG, K., u. F. CRAMER: Über die Schardinger-Dextrine aus Stärke. Ber. dtsch. chem. Ges. **83**, 296 (1950).

16. GIACOMELLO, G.: La struttura degli acidi coleinici determinate con l'analisi Patterson. Atti R. Accad. naz. Lincei, Rend. VI. **27**, 101 (1938).
17. —, u. E. BIANCHI: Su alcuni composti molecolari fra l'acido desossicolico e gli esteri degli acidi grassi: relazione fra numero di coordinazione e lunghezza della molecola dell'estere. Gazz. chim. ital. **73**, 3 (1943).
18. GIESEKING, J. E.: Der Mechanismus des Kationenaustausches in dem Montmorillonit-Beidellit-Nontronittyp von Tonmineralien. Soil Sci. **47**, 1 (1939).
19. GO, Y., u. O. KRATKY: Röntgenographische Studien an Choleinsäuren. Z. Kristallogr. Mineral., Petrogr. Abt. A **92**, 310 (1935); Z. physik. Chem. Abt. B **26**, 439 (1934).
20. HAMMERSCHMIDT, E. G.: Formation of gashydrates in natural gastransmission lines. Ind. Engng. Chem. ind. Edit. **26**, 851 (1934).
21. HENDRICKS, ST. B.: Base exchange of the clay mineral Montmorillonite for organic cations and its dependence upon adsorption due to VAN DER WAALS forces. J. phys. Chem. **45**, 65 (1941).
22. HUNTRESS, E. H., u. R. PH. PHILLIPS: Alkane-choleic Acids. J. Amer. chem. Soc. **71**, 458 (1949).
23. IBALL, J.: Die Krystallstruktur von kondensierten Ringverbindungen. IV. Fluoren und Fluorenon. Z. Kristallogr., Mineral., Petrogr. Abt. A **94**, 397 (1936).
24. JAMES, R. W., u. D. H. SAUNDER: Some apparent periodic errors in the crystal lattice of the molecular complexes of 4,4'-dinitrodiphenyl with 4-Jodo- and 4-Bromodiphenyl. Proc. Roy. Soc. (London) (A) **190**, 518 (1947).
25. KRATKY, O., u. G. GIACOMELLO: Der Krystallbau der Paraffincarbon-Choleinsäuren. Mh. Chem. **69**, 427 (1936).
26. KUTHY, A. VON: Zur Theorie der hydrotropischen Lösung. Biochem. Z. **244**, 308 (1932).
27. MANTELL: Adsorption. New York 1945, S. 238.
28. MARKHAM, R., R. E. F. MATTHEWS u. K. M. SMITH: Specific crystalline protein and nucleoprotein from a plant virus having insect vectors. Nature (London) **162**, 88 (1948).
29. MCEWAN, D. M. C.: Complex formation between Montmorillonite and Halloysite and certain organic liquids. Trans. Faraday Soc. **44**, 349 (1948).
30. — u. O. TALIB-UDDEN: Adsorption complexes of α-Zink hydroxyde. Nature (London) **1949**, 177.
31. PALIN, D. E., u. H. M. POWELL: Hydrogen-bond linking of quinol molecules. Nature (London) **156**, 334 (1945).
32. — — Crystal structure of addition complexes of quinol with certain volatile compounds. J. chem. Soc. (London) **1947**, 208.
33. — — The clathrate compound of quinol and methanol. l. c. **1948**, 571.
34. — — The β-type clathrate compounds of quinol. l. c. **1948**, 816.
35. PERUTZ, M. F.: The composition and swelling properties of haemoglobin crystals. Trans. Faraday Soc. **42**, 187 (1946).
36. — An X-ray study of horse methaemoglobin. Proc. Roy. Soc. (London) (A) **195**, 474 (1949).
37. — X-ray studies of crystalline proteins. Research **2**, 52 (1949).
38. PFEIFFER, PAUL: Lokalisation und spezifische Wirkung der Nebenvalenzkräfte. Z. anorg. allg. Chem. **137**, 275 (1924).
39. POWELL, H. M.: Clathrate compounds. J. chem. Soc. (London) **1948**, 61.
40. —, u. M. GUTER: An inert gas compound. Nature (London) **164**, 240 (1949).

41. —, u. J. H. RAYNER: Clathrate compound formed by benzene with an ammonia-nickel cyanide complex. Nature (London) **163**, 566 (1949).
42. RAPSON, W. S., D. H. SAUNDER u. E. THEAL STEWART: Some compounds formed by 4,4'-Dinitrodiphenyl. J. chem. Soc. (London) **1946**, 1110.
43. H. RHEINBOLDT: Choleinsäuren aliphatischer Kohlenwasserstoffe. J. prakt. Chem. N. F. **153**, 313 (1939).
44. — Organische Molekülverbindungen mit Koordinationszentren. Liebigs Ann. Chem. **451**, 256 (1927).
45. — O. KÖNIG u. R. OTTEN: Die Koordinationszahl der Fettsäurealkylester in den Choleinsäuren. Liebigs Ann. Chem. **473**, 249 (1929).
46. SAUNDER, D. H.: The crystal structure of some molecular complexes of 4,4'-Dinitrodiphenyl. Proc. Roy. Soc. (London) (A) **188**, 31 (1946); **190**, 508 (1947).
47. SCHLENK jr., W.: Die Harnstoffaddition der aliphatischen Verbindungen. Liebigs Ann. Chem. **565**, 204 (1949).
48. — Einschluß-Verbindungen des Thioharnstoffs. Experientia **6**, 292, (1950).
49. — Die Thioharnstoff-Addition organischer Verbindungen. Liebigs Ann. Chem. 1950 (im Druck).
50. SOBOTKA, H.: Choleic acids. Chem. Reviews **15**, 358—366 (1934).
51. —, u. A. GOLDBERG: Choleic acids. Biochem. J. **26**, 905 (1932).
52. —, u. S. KAHN: Keto-Enol tautomerism and coordination compounds. Biochem. J. **26**, 898 (1932).
53. STACKELBERG, M. v.: Feste Gashydrate. Naturwiss. **36**, 327; 359 (1949).
54. WERNER, ALFRED: Neuere Anschauungen auf dem Gebiet der anorg. Chem. 5. Aufl. Braunschweig 1923. S. 41.
55. WIELAND, H., u. H. SORGE: Zur Kenntnis der Choleinsäure. Hoppe-Seylers Z. physiol Chem. **97**, 1 (1916).
56. WILCOX, W. J., D. B. CARSON u. D. L. KATZ: Natural gas-hydrates. Ind. Engng. Chem. **33**, 662 (1941).

(Abgeschlossen im Mai 1950.)

Dr. WILHELM SCHLENK,
Badische Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen a. Rh.

Fortschr. chem. Forsch. Bd. 2, S. 146—228 (1951)

Wuchsstoffe und mikrobiologische Stoffwechselanalyse.

Von

ERNST-FRIEDRICH MÖLLER.

Mit 11 Textabbildungen.

Inhaltsübersicht.

Seite

I. Einleitung 146
II. Vitamin B_1 (Aneurin, Thiamin) 149
III. Vitamin B_2 (Lactoflavin, Riboflavin) 158
IV. Vitamin B_6 (Adermin, Pyridoxin) 165
V. Pantothensäure 171
VI. Biotin (Vitamin H) 183
VII. Nicotinsäure 192
VIII. *m*-Inosit (Bios I) 202
IX. Schlußwort 204
X. Zusammenfassung 204

Literatur 205

I. Einleitung.

Im Jahre 1901 wurde der bekannte Streit zwischen LIEBIG (*209*) und PASTEUR (*294*), (*295*), mit dem 1871/72 die Wuchsstoff-Forschung begann, durch WILDIERS (*435*) [im Pharmakologischen Institut der Universität *Löwen*, unter M. IDE (*437*)] völlig eindeutig zugunsten LIEBIGS entschieden. Der von WILDIERS benutzte Hefestamm zeigte bei kleiner Impfmenge in einem Nährmedium, das nur aus Glucose, Ammonsalz und Hefe-Asche bestand, weder normales Wachstum noch gute Gärung, wenn nicht winzige Mengen einer unbekannten, in der Natur weit verbreiteten organischen Substanz zugegeben wurden. Jedoch war die Zeit noch nicht reif, diese grundlegende Entdeckung zu würdigen. Die meisten Gärungsforscher, die damals ganz unter der Lehrmeinung von PASTEUR standen, konnten den Ausführungen von WILDIERS, die in ihrem klaren französischen Stil auch heute noch einen Genuß zu lesen bedeuten, keinen Glauben schenken. Es bedurfte noch langer Auseinandersetzungen, bis die WILDIERS-IDEschen Befunde allgemeine Anerkennung fanden [1]. Auch waren wohl die Chemiker vor dem ersten Weltkriege nicht in der Lage, die Anreicherung so kleiner

[1] Vgl. z. B. die ausführliche Darstellung der Geschichte des Bios-Problems bei KÖGL und TÖNNIS (*164*).

Substanzmengen, wie sie bei den Wuchsstoffen vorliegen, in Angriff zu nehmen. Es gelang erst im Jahre 1928 VERA EASTCOTT (*79*) in *Toronto*, das relativ wenig wirksame *Bios I* aus Teestaub zu isolieren und als *m-Inosit* zu identifizieren.

Die Erkenntnis der folgenden Jahre, daß verschiedene *Vitamine*, wie B_1 und B_2, auch Wuchsstoffe für Mikroorganismen sind, führte dann u. a. dazu, die langwierigen und kostspieligen Vitaminteste an Tieren weitgehend durch mikrobiologische Teste zu ersetzen und auch bei neuentdeckten Vitaminen danach zu suchen, ob sie nicht Wuchsstoffe bei bestimmten Mikroorganismen sind. So wurde z. B. an unserem Institut die Anreicherung der Pantothensäure, die zunächst nur als ein Wachstumsfaktor für Ratten („Filtratfaktor") bekannt war, ganz wesentlich beschleunigt, als es gelang, sie mit *Streptobacterium plantarum* auszutesten (*183*), (*252*), (*253*).

Gleichzeitig stellten namentlich Biologen mit den bei einigen wenigen Mikroorganismen als Wuchsstoffen erkannten Substanzen das *Wuchsstoffbedürfnis* zahlreicher weiterer Arten fest. Die biologischen Chemiker prüften an vielen Derivaten und Analogen aller Wuchsstoffe die *Konstitutionsspezifität*, die sich vielfach größer als bei den Vitaminen der höheren Tiere erwies. Solche Untersuchungen sind allmählich zur „Routine-Forschung" geworden (*161*), wie auch die *Isolierung neuer Wuchsstoffe*, besonders seit die eleganten Methoden der Mikrochemie, der Chromatographie, der Elektrophorese und der Gegenstromverteilung entwickelt wurden.

Als man erkannt hatte, daß einige Vitamine, bzw. Wuchsstoffe, in enger chemischer Beziehung zu bestimmten *Fermenten* stehen, begann eine äußerst fruchtbare Zusammenarbeit zwischen Enzym- und Wuchsstoff-Forschung. Wir wissen heute, daß fast alle Wuchsstoffe und Vitamine Vorstufen der sog. *Cofermente* sind, die in Bindung an spezifische Proteine, die sog. Apofermente, eine große Reihe von Stoffwechselreaktionen katalysieren. Die Wuchsstoffe sind deshalb bei *allen* Mikroorganismen von lebenswichtiger Bedeutung, und es hat sich nach und nach herausgestellt, daß alle untersuchten Mikroorganismen, die einen bestimmten Wuchsstoff zu ihrer Ernährung nicht benötigen, ihn im allgemeinen dennoch enthalten, d. h. die *Fähigkeit zu seiner Synthese besitzen*.

Die bisher studierten Wuchsstoffe sind demnach Stoffwechselkatalysatoren, haben also *direkt* mit dem Wachstum nichts zu tun, weder mit dem Massenwachstum der Einzelzelle noch mit der Teilung. Ob es überhaupt spezifische *Teilungsfaktoren* gibt, so wie spezifische *Streckungsfaktoren* für die Zellen höherer Pflanzen in den *Auxinen* bekannt sind, ist eine offene Frage.

In den letzten 10 Jahren ist es gelungen, die mikrobiologischen Methoden soweit auszubauen, daß mit ihnen allein bereits ungeahnte Einblicke in die Stoffwechsel-Funktionen der Wuchsstoffe, ja in ihren

Auf- und Abbau selbst möglich geworden sind. 3 Methoden haben sich vor allem herausgebildet: 1. Die *Ersatz*analyse, 2. die *Hemmstoff*analyse, 3. die *genetische Blockierung*. Man kann sie unter dem Begriff: *Mikrobiologische Stoffwechselanalyse* zusammenfassen (*363*).

Die 1. Methode beruht auf den schon frühzeitigen Befunden, daß sich manche Wuchsstoffe ersetzen lassen: nicht nur durch eines oder mehrere ihrer Bruchstücke (z. B. Pantothensäure durch β-Alanin), sondern in bestimmten Fällen auch durch völlig *konstitutionsfremde* Substanzen (z. B. Biotin durch Asparaginsäure). Auf Grund seiner chemischen Natur und seines wirksamen Konzentrationsbereichs läßt sich besonders unter Hinzuziehung der Hemmstoffanalyse entscheiden, ob der Ersatzstoff 1. ein Vorläufer in der Synthese des Wuchstoffs, 2. ein höheres Aufbauprodukt in der Reaktionsfolge zum zugehörigen Coferment, 3. ein Katalysator für irgend eine Zwischenstufe der Wuchsstoff- oder Coferment-Bildung, 4. ein Zwischen- oder Endprodukt der letztlich durch den Wuchsstoff bedingten enzymatischen Reaktionsfolge ist.

Bei der 2. Methode hemmt man die Synthese der Wuchsstoffe oder ihren weiteren Aufbau zu den Fermenten durch sog. *Antagonisten*. Nachdem der erste Wuchsstoffantagonismus zwischen Sulfonamiden und *p*-Aminobenzoesäure im Jahre 1940 von WOODS (*455*) entdeckt worden war, hat man bei allen Wirkstoffen Antagonisten gefunden. Es zeigte sich nämlich, daß geringfügige Änderungen am Molekül eines Wuchsstoffs seine Wirkung nicht nur herabsetzen oder völlig annullieren, sondern sogar in ihr Gegenteil umkehren können. Daneben sind auch Antagonisten bekannt geworden, deren Konstitution in gar keiner Beziehung zu der des Wuchsstoffs steht. Wenn auch die große Hoffnung der *Chemotherapie*, unter den Analogen der Wuchsstoffe weiterhin leicht neue Heilmittel mit günstigen chemotherapeutischen Eigenschaften zu finden, bisher nur zu einem geringen Grade in Erfüllung gegangen ist, so wurde doch der reinen Forschung durch das Wechselspiel zwischen Antagonist und Wuchsstoff (Ersatzstoff) ein äußerst variationsfähiges Mittel zur Stoffwechselanalyse in die Hand gegeben.

Die 3. Methode endlich verwendet Wuchsstoff-bedürftige *Mutanten* autotropher Mikroorganismen. Man kann sie durch Bestrahlung oder chemische Mutationsauslösung gewinnen (*13*), (*14*), (*15*), (*15a*). Bei den Mutanten wird — in der Regel durch den Ausfall eines einzigen Gens — auch ein einzelner durch dieses Gen gesteuerter Schritt in der Synthese des Wuchsstoffs unmöglich (Genetischer Block). Zunächst verwendete man die genetisch genauer analysierten Schimmelpilze, heute werden — nach Entwicklung der eleganten Penicillin-Methode — in steigendem Maße die mikrobiologisch günstigeren Bakterienmutanten benutzt (*64*). Wuchsstoff-bedürftige Mutanten können zu denselben Stoffwechselanalysen herangezogen werden wie normale Wuchsstoff-bedürftige Mikroorganismen.

Ihre Verwendung bringt aber verschiedene Vorteile: Es lassen sich aus *einem* Originalstamm leicht viele Mutanten züchten, die sich immer nur durch *eine einzige* Eigenschaft unterscheiden. Bei normalen Stämmen ist man dagegen häufig gezwungen, auf ganz verschiedene Arten zurückzugreifen, die natürlich noch in sehr vielen anderen Eigenschaften voneinander abweichen können. Es liegt auf der Hand, daß man unter den Mutanten Stämme findet, die normalerweise in der Natur überhaupt nicht vorkommen, die aber allein geeignet sind, eine bestimmte Fragestellung zu beantworten.

Die mit rein mikrobiologischen Methoden gewonnenen Ergebnisse können durch andere biologisch-chemische, besonders *enzymatische* Untersuchungen erhärtet oder weiter ausgebaut werden. Die *Kombination* vom mikrobiologischen und enzymatischen Methoden verdient besondere Beachtung. So läßt sich die Beteiligung eines Wuchsstoffs an bestimmten enzymatischen Leistungen der Mikroorganismen leicht bestimmen, wenn man dabei 2 Kulturen miteinander vergleicht, die einmal mit dem betreffenden Wuchsstoff gerade optimal (bzw. sogar unteroptimal), das andere Mal mit einem Überschuß desselben ernährt worden sind. Experimenta crucis von besonderem Wert können schließlich angestellt werden, wenn man Wuchsstoffe oder Ersatzstoffe mit *radioaktiven* Atomen markiert (*142a*), (*430*).

II. Vitamin B_1.

Aneurin-Bedürfnis der Mikroorganismen. Aufbau von Aneurin aus den Komponenten „Pyrimidin" und „Thiazol", deren Vorläufer bei Mikroorganismen noch unbekannt sind. Abbau des Aneurins unter Erhaltung von „Pyrimidin" und Zerstörung von „Thiazol" (Schimmelpilze), Kopplung von Aneurin-Aufnahme (-Speicherung) und -Phosphorylierung (Hefe). Aneurinpyrophosphat als Coferment verschiedener Fermente des Kohlenhydrat-Stoffwechsels: Decarboxylierung und Carboxylierung (WOOD-WERKMAN-Reaktion) von Brenztraubensäure, ihre Oxydation zu Essigsäure und deren weitere Umwandlung. Antagonisten der Aneurin-Aufnahme: 2-Methyl-4-amino-5-*amino*methyl-pyrimidin und Pyrithiamin. Gründe für die großen quantitativen Unterschiede im Aneurinbedürfnis der Mikroorganismen. Bedeutung der Aneurin-sparenden und -ersetzenden Wirkung durch andere Wuchsstoffe und Stoffwechselprodukte.

Vitamin B_1 (Aneurin, Thiamin), das Anti-Beri-Beri-Vitamin wurde im Jahre 1926 von JANSEN und DONATH (*142*) aus Reiskleie in krystallisiertem Zustand isoliert. R. J. WILLIAMS (*436*) zeigte schon 1919, daß verschiedene Heferassen durch B_1-Konzentrate (aus Reiskleie oder Hefe) stark im Wachstum gefördert werden, konnte aber seine Befunde erst einwandfrei bestätigen (*440*), als ihm reines krystallisiertes Aneurin von JANSEN und DONATH zur Verfügung stand. Auch VERA READER (*317*), (*291*) fand, daß zum Wachstum eines Aktinomyceten (*Streptothrix corallinus*) B_1-Konzentrate erforderlich sind, aber diese behielten nach

Behandeln mit Alkali (bei 120° C) ihre Aktivität (*298*), was in den Vitaminversuchen bei höheren Tieren nicht der Fall war. DAVIS und MATTICK (*66*), (*67*) glaubten ebenfalls, Vitamin B_1 als Wuchsstoff, und zwar bei verschiedenen Milchsäurebakterien, erkannt zu haben, mußten aber ihre Ergebnisse widerrufen, als sie zu reineren Konzentraten übergingen (*65*). Dennoch benötigen viele Milchsäurebakterien Aneurin, wie später WOOD und Mitarb. (*450*), sowie MÖLLER (*253*) fanden. Daß auch Schimmelpilze ohne Aneurin nicht wachsen können, bewies zuerst BURGEFF (*41*) an einigen Symbionten der Orchideen mit einem krystallisierten natürlichen Präparat, und SCHOPFER (*338*), (*339*) bestätigte in demselben Jahre seine Befunde, später auch mit synthetischem Aneurin (*340*).

Eine zunächst rätselhafte Lage entstand durch den Befund SCHOPFERS (*351*), daß alkalisch autoklavierte Weizenkeimextrakte, die also kein Aneurin mehr enthalten, bei verschiedenen Mikroorganismen trotzdem B_1-aktiv sind (Faktor M). Hierin gehören möglicherweise auch die READERschen Ergebnisse bei *Streptothrix*. Des weiteren fand KNIGHT (*158*), (*159*), daß sich in seinen Wuchsstoffkonzentraten für *Staphylococcus aureus* nur Nicotinsäure nachweisen ließ, obwohl die Wirkung dieser Konzentrate erst durch Nicotinsäure *und* Aneurin ersetzbar war. Die Aufklärung erfolgte durch die wichtige Entdeckung KNIGHTS (*160*), daß Aneurin bei den Staphylokokken durch die *Mischung seiner Bruchstücke*, der „Thiazol"- und „Pyrimidin"-Komponente, ersetzbar ist. Die meisten Aneurin-bedürftigen Bakterien (s. Tab. 1) kommen schon mit dieser Mischung aus, nur wenige benötigen das „intakte" Aneurin, z. B. *Streptococcus salivarius* (*278*) und *Lactobacillus fermentum* 36 (*332*), (*97a*), (*52*[1]), die deshalb für exakte Aneurinbestimmungen wichtig geworden sind.

Bei Schimmelpilzen, Hefen, Protozoen und Algen ist vielfach sogar *nur eine* Komponente des Aneurins zum Wachstum ausreichend, wie im einzelnen aus Tab. 1 hervorgeht. Hier sei der interessante Fall einer *künstlichen Symbiose*, wie sie z. B. SCHOPFER bereits vor Jahren gelang (*341*), mitgeteilt. Der Schimmelpilz *Mucor rammanianus* wächst bereits in Anwesenheit von „Thiazol", die farbige Hefe *Rhodotorula flava* benötigt nur „Pyrimidin", während die jeweils im Nährmedium nicht erforderliche Komponente synthetisiert wird. Impft man beide Mikroorganismen gleichzeitig in ein „Thiazol"- und „Pyrimidin"-freies Medium das natürlich auch kein Aneurin enthalten darf, so entwickeln sie zusammen lebhaftes Wachstum, indem offenbar jeweils der eine Stamm dem anderen diejenige Komponente, die er nicht synthetisieren kann, zur Verfügung stellt.

Erst in letzter Zeit hat man sich Gedanken darüber gemacht, daß zur *Vereinigung der beiden Komponenten* ebenfalls ein Faktor erforderlich

Tabelle 1. *Bedarf an Aneurin und seinen Komponenten beim Wachstum von Mikroorganismen.*

Mikroorganismen	Bedürfnis an				
	Aneurin	Thiazol + Pyrimidin	Thiazol	Pyrimidin	O
Bakterien:					
Lactobact. fermentum 36	+				
Streptococcus salivarius	+				
Andere Streptokokken		+			
Staphylococcus aureus, albus		+			
Staphylococcus flavus					+
Streptobacterium plantarum 10 S (u. a.)		+	(+)		
Andere Milchsäurebakterien	+ ?	+			
B. suboxydans	+				
Andere Essigbakterien	+ ?				
Propionsäurebakterien	+ ?	+			
B. subtilis					+
B. pyocyaneus					+
B. coli					+
B. proteus u. viele andere					+
Hefen:					
Saccharomyces cerevisiae		+			+
,, ,, CL 1.				+	
Torula (versch. Arten)		+			
,, , *Rhodotorula* (versch. Arten)				+	
Torula, Rhodotorula (and. Arten)					+
Schimmelpilze:					
Phytophtora (viele Arten)	+				
Trichophyton discoides	+				
Phycomyces Blakesleeanus		+			
Ustilago longissima		+			
Polyporus (viele Arten)		+			
Mucor Rammanianus			+		
Ophiostoma pini u. a.			+		
Phytophtora (einige Arten)				+	
Polyporus adustus				+	
Ustilago nuda				+	
Ophiostoma (versch. Arten)				+	
Absidia glauca, Aspergillus niger und viele andere					+
Protozoen und Algen:					
Glaucoma piriformis	+				
Strigomonas (versch. Arten)	+				
Euglena pisciformis		+			
Polytomella caeca		+			
Polytoma ocellatum			+		
Euglena viridis			+		
Polytoma obtusum u. a.					+

Erläuterung: + vorhanden + ? fraglich; (+) erst höhere Konzentration wirksam.

sein könnte (s. Abb. 1, Schritt I), wofür VAN LANEN und Mitarb. (*412*) bei Hefe, KIDDER und DEWEY (*149*) bei Protozoen Anhaltspunkte gefunden haben. Stämme, die einen solchen Faktor nicht synthetisieren, müßten natürlich auf intaktes Aneurin angewiesen sein, selbst wenn sie „Pyrimidin" oder „Thiazol" oder sogar beide Komponenten synthetisieren. Wenn die synthetisierten Komponenten nicht zu Aneurin weiter-

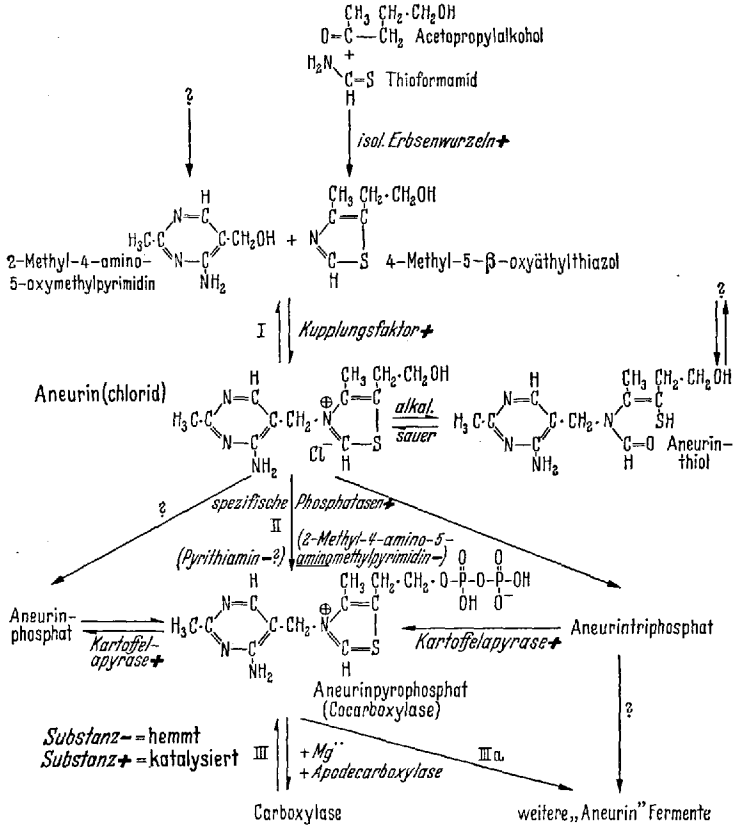


Abb. 1. Auf- und Abbau von Aneurin und „Aneurin"-Fermenten.

verarbeitet werden, könnte es ferner zu einer Anhäufung derselben kommen. Solche Verhältnisse sind tatsächlich bei *Neurospora*-Mutanten von TATUM und BELL (*402*) gefunden worden, wie aus Tab. 2 hervorgeht.

Die Biosynthese des Aneurins aus den beiden Komponenten dürfte nur streng bewiesen sein für Mikroorganismen, die beide Komponenten zum Wachstum benötigen. Besonders bei „Pyrimidin"-bedürftigen Stämmen sprechen viele Gründe dafür, daß auch sukzessiver Anbau von Thiazolspaltstücken an das „Pyrimidin" über Aneurinthiol (*478*),

(*479*) zum Aneurin führen könnte. Die mikrobiologische Synthese der *Komponenten* selbst liegt noch völlig im Dunkel. BONNER und BUCHMAN (*29*) konnten zwar nachweisen, daß isolierte Erbsenwurzeln „Thiazol" aus Thioformamid und Acetopropylalkohol aufbauen, aber bei keinem der untersuchten Mikroorganismen können diese Verbindungen „Thiazol" ersetzen.

Tabelle 2. *Biosynthese von Aneurin durch Neurospora-Mutanten* (nach TATUM und BELL [1946] (*402*)).

Mutante Nr.	Synthese von		Kupplung	Speicherung von	
	„Thiazol"	„Pyrimidin"		„Thiazol"	„Pyrimidin"
18 558	−	+	+	−	+
9 185	+	+	−	+	+
17 084	−	−	+	−	−
1 090	−	−	+	−	−

Die meisten Mikroorganismen vermögen Aneurin zum eigentlich wirksamen Aneurinpyrophosphat zu phosphorylieren (*368*). *Streptococcus salivarius* scheint diesen Schritt (Abb. 1, Schritt II) nicht schnell genug auszuführen, da das Pyrophosphat als Wuchsstoff etwa 40% aktiver ist als äquimolare Mengen Aneurin (*278*). Gonokokken sind überhaupt nicht in der Lage, die Phosphorylierung zu bewerkstelligen (*11*), (*191*). Für sie ist deshalb nur Aneurinpyrophosphat ein aktiver Wuchsstoff, Aneurin selbst erwies sich sogar als Hemmstoff (Kompetitiver Antagonist des Pyrophosphats).

Bei *Streptobacterium plantarum* [1] und *Phycomyces Blakesleeanus* (*369*) ist andererseits die Wirksamkeit von Aneurinpyrophosphat nach den üblichen Bebrütungszeiten 100- bis 1000mal geringer und gleicht sich erst in längeren Zeiten derjenigen des Aneurins an. SCHOPFER (*369*) nimmt deshalb an, daß viele Mikroorganismen gar nicht in der Lage sind, das Pyrophosphat als solches aufzunehmen, sondern daß sie es vorher erst in Aneurin spalten müssen.

Dies ist von großem Interesse, denn gerade die *Aufnahme des Aneurins* (jedenfalls durch Hefe) ist mit seiner *Phosphorylierung zu Aneurinpyrophosphat* gekoppelt. Die Aneurinaufnahme der Hefe „Rotebro" läßt sich nämlich nach SPERBER (*388*) durch dasselbe Pyrimidinanalogon, das 2-Methyl-4-amino-5-*amino*methyl-pyrimidin, hemmen, das auch die Dephosphorylierung des Aneurinpyrophosphats durch Hefephosphatase spezifisch hemmt; zudem vollziehen sich beide Vorgänge unter denselben p_H-Bedingungen. Die Aneurinaufnahme durch Hefe ist ferner mit Energie-liefernden Reaktionen gekoppelt, denn unter anaeroben Bedingungen verläuft sie nur in Gegenwart eines vergärbaren Sub-

[1] E.-F. MÖLLER, unveröffentlicht, s. MÖLLER und WEYGAND (*260*).

strats unter aeroben nur, wenn ein veratembares Substrat vorhanden ist (*389*).

Ein weiterer Antagonist, der die Aneurin-Aufnahme zu hemmen scheint (*460*), (*346*), (*473*), ist im *Pyrithiamin* gefunden worden, einem Analogon, in dem der Thiazolring durch einen entsprechend substituierten Pyridinring ersetzt ist[1]. WOLLEY und WHITE (*466*) zeigten, daß das Wachstum von Mikroorganismen, die das intakte Aneurin benötigen, am empfindlichsten gegenüber Pyrithiamin ist. „Thiazol"- oder „Pyrimidin"-Bildner werden erst bei höheren Konzentrationen, und Aneurinnichtbedürftige, also selbst-synthetisierende Stämme meist überhaupt nicht im Wachstum gehemmt. Wenn eine Hemmung vorliegt, wird sie immer durch höhere Aneurinkonzentrationen, gelegentlich auch durch die als Wuchsstoff wirksame Komponente aufgehoben. Jedoch kann die von den verschiedenen Mikroorganismen synthetisierte Aneurinmenge zumindest nicht der alleinige Grund für ihre Resistenz sein, da sie viel zu gering ist. Auch konnt WOOLLEY (*460*), (*346*) feststellen, daß ein künstlich resistent gemachter „Pyrimidin"-bedürftiger Stamm sein Aneurin- bzw. „Pyrimidin"-Bedürfnis gegenüber dem Ausgangsstamm nicht geändert, also auch nicht die Fähigkeit zur Aneurinsynthese gewonnen hatte. Er hatte aber die Fähigkeit angenommen, Pyrithiamin zu spalten, erkenntlich daran, daß er nunmehr Pyrithiamin als „Pyrimidin"-Quelle verwerten konnte. Trotzdem lag darin nicht der Grund für seine Resistenz, denn in der Nährlösung fand sich immer noch viel mehr Pyrithiamin als zur Hemmung des Ausgangsstamms erforderlich gewesen wäre. Es blieb deshalb kaum eine andere Erklärung übrig, als anzunehmen, daß Pyrithiamin, die Aufnahme von Aneurin durch die Mikroorganismen unterbindet. Wenn Aneurin-Aufnahme und -Phosphorylierung ganz allgemein gekoppelt sind, so darf man sagen, daß Pyrithiamin Schritt II hemmt.

Im Jahre 1937 fand LOHMANN (*215*) hier am Kaiser-Wilhelm-Institut (Abt. MEYERHOF), daß Aneurinpyrophosphat das *Coferment der Carboxylase* ist. Diese ermöglicht bekanntlich eine der wichtigsten Teilreaktionen der alkoholischen Gärung, die Decarboxylierung der Brenztraubensäure.

$$CH_3 \cdot CO \cdot COOH \xrightarrow{B_1\,(+\,Mg^{++})} CO_2 + CH_3 \cdot C\begin{matrix} H \\ \diagup \\ \diagdown \\ O \end{matrix}$$

[1] Die hier mitgeteilten Ergebnisse werden an sich nicht durch die Befunde von WILSON und HARRIS (*448*) [vgl. auch DORNOW und SCHACHT (*74*) und RAFFAUF (*309*)] berührt: Das von WOOLLEY und Mitarb., sowie anderen benutzte Präparat hat nämlich nicht die oben angegebene Struktur. EUSEBI und CERECEDO (*92*), die das richtige Pyrithiamin (Neo-pyrithiamin) einer mikrobiologischen Analyse unterzogen, konnten nicht entscheiden, ob es die Synthese oder die Funktion des Aneurins stört.

Aneurinpyrophosphat verbindet sich mit Mg^{++} und einem spezifischen Protein, der Apocarboxylase, zur Carboxylase (Abb. 1, Schritt III). Kürzlich wurde von VELLUZ und Mitarb. (*413*), (*414*), (*415*), s. a. (*421*) eine Aneurin*tri*phosphorsäure synthetisiert, die die Diphosphorsäure erst in 4- bis 5facher Konzentration zu 80% im Carboxylasetest vertreten kann. Die von KARRER und Mitarb. (*143a*) synthetisierte *Homo*-Aneurintriphosphorsäure ist etwas aktiver! Nach ROUX und CALLANDRE (*325a*) nimmt die Cocarboxylase-Aktivität linearer Aneurin*poly*phosphorsäuren mit steigender Kettenlänge stetig ab (bei P_5 z. B. auf ~30%). *Anorganische* Polyphosphate sind kompetitive (?) Antagonisten der Cocarboxylase.

Am blockierten Herzpräparat zeigt Aneurintriphosphorsäure jedoch pharmakologische Wirkungen, die weder das Pyrophosphat noch Adenosintriphosphorsäure auszuüben vermögen, und scheint damit für den Herzmuskel eine ähnliche Rolle zu spielen wie Adenosintriphosphorsäure für den quergestreiften Muskel. Es ist anzunehmen, daß in ihr ein neues B_1-Coferment vorliegt, dessen Substrat noch entdeckt werden muß.

Um bei Hefe maximale *Gärung* hervorzurufen, ist mehr Aneurin notwendig als zum Wachstum; man erkennt dies leicht durch die Gärungssteigerung, die Aneurin-Zusatz bei manchen (gerade Aneurin-optimal ernährten) Hefen hervorruft (*162*), (*355*), (*62*). Aneurin gehört deshalb zu den Bestandteilen des sogenannten *Faktor-Z-Komplexes* (v. EULER) (*91*). Bietet man Hefe in der Nährlösung noch weit größere Aneurin-Mengen an, so werden diese begierig von ihr unter Phosphorylierung aufgenommen und *gespeichert* [FINK und JUST (*96*)]. Die Speicherung, die 1700% und mehr der normalerweise in Hefe vorkommenden Aneurin-Menge ausmachen kann, erfolgt aber nach WESTENBRINK und VELDMANN (*429*) nicht in Form von Carboxylase, sondern unter Bindung an andere Proteine, da der Carboxylasegehalt gegenüber der Ausgangshefe nicht geändert ist.

Diese Proteine dürften die Apofermente von *weiteren Fermenten* sein, die ebenfalls Aneurinpyrophosphat als Coferment enthalten. Man hat sie aufgefunden, als man eine Förderung bestimmter Stoffwechselreaktionen beobachtete, die Aneurin bzw. sein Pyrophosphat (evtl. auch seine Komponenten) in Gegenwart Aneurin-arm ernährter Mikroorganismen hervorrufen. Diese Reaktionen gehen interessanterweise wieder von der Brenztraubensäure aus und können aerober oder anaerober Natur sein. Die wichtigsten sind die *Oxydation* von *Brenztraubensäure* zu Essigsäure (*366*), (*368*), (*11*), (*307*), (*398a*), die weiterhin über „Acetylphosphat" abgebaut wird (*212*), und die als WOOD-WERKMAN-Reaktion (*453*), (*449*) bekannte Carboxylierung der Brenztraubensäure zu Oxalessigsäure (*123*), (*371*), *367*).

$$HOOC \cdot CO \cdot CH_3 \xrightarrow{B_1\,(+\,B_2\,+\,Mn^{++}\text{ oder }Mg^{++})} CH_3 \cdot COOH$$

$$\xrightarrow{B_1\,(+\,\text{Adenosintriphosphat}\,+\,X)} \text{„Acetylphosphat“} \xrightarrow{B_1?} \text{(usw. s. S. 174)}$$

$$HOOC \cdot CO \cdot CH_3 + CO_2 \xrightarrow{B_1\,(+\,Y)} HOOC \cdot CO \cdot CH_2 \cdot COOH$$

Es ist möglich, daß der vielfach diskutierte Mechanismus der durch Aneurin katalysierten biologischen Oxydationsreaktionen nun endlich durch KARRERS Entdeckung der Existenz des o-Dihydro-aneurins (*142c*) seine Aufklärung findet.

Sehr reizvolle Schlüsse lassen sich häufig aus einem einzigen, oft wenig bedeutungsvoll erscheinenden Tatbestand herausholen, wenn man ihn von verschiedenen Seiten bis in alle Einzelheiten konsequent zu begründen sucht. Dies ist ein charakteristisches Vorgehen der mikrobiologischen Analyse, und ich will deshalb den Befund, daß die für optimales Wachstum der einzelnen Mikroorganismen erforderlichen Aneurinkonzentrationen außerordentlich unterschiedlich sein können (Konzentrationsbereich 10^{-10} bis 10^{-4} g/cm³ s. Tab. 3), in dieser Weise betrachten.

Tabelle 3. *Die für optimales Wachstum notwendige Konzentration an Aneurin bei verschiedenen Mikroorganismen.*

	g Aneurin/cm³
Ustilago violacea	$4 \cdot 10^{-10}$
Strigomonas culicidarum	$1{,}7 \cdot 10^{-9}$
Polyporus abietinus	$4 \cdot 10^{-9}$
B. radicicola	$6 \cdot 10^{-9}$
Saccharomyces cer. (Old Proc.)	$8 \cdot 10^{-9}$
Phycomyces Blakesleeanus 15° C	$1 \cdot 10^{-8}$
Lactobacillus lycopersici	$1 \cdot 10^{-8}$
Sarcina flava	$5 \cdot 10^{-8}$
Streptobacterium plantarum 10 S	$5 \cdot 10^{-8}$
Trichophyton interdigitale	$2 \cdot 10^{-7}$
Polytomella Pascheri MOEWUS	$1 \cdot 10^{-6}$
Torula utilis (russ. Stamm)	$1 \cdot 10^{-5}$
Chlamydomonas	$1 \cdot 10^{-5}$
Brucella abortus	$2{,}5 \cdot 10^{-5}$
B. tuberculosis	$3{,}5 \cdot 10^{-3}$ (?)
Phycomyces Blakesleeanus 25° C	10^{-6} bis 10^{-4}

Bei anderen Wuchsstoffen ist der wirksame Konzentrationsbereich viel kleiner und umfaßt etwa 2 Zehnerpotenzen. Er dürfte in der Hauptsache dadurch bedingt sein, daß sich die in einer Kultur maximal erzeugte Zellsubstanz bei den verschiedenen Mikroorganismen ebenfalls in einem Konzentrationsbereich dieser Größe bewegt. Es seien nun zunächst die theoretisch möglichen Ursachen für ein erhöhtes Aneurinbedürfnis während des Wachstums zusammengestellt:

1. Erhöhter Aneurinbedarf bei Stoffwechselvorgängen, die Vermehrung der Zellsubstanz bedingen.

2. Geschwindigkeit des Stoffwechsels von Aneurin selbst. a) Verlangsamte Aufnahme und Phosphorylierung, b) gesteigerte Ausscheidung, c) gesteigerter Abbau.

3. Fehlen anderer Wuchs- oder Nährstoffe im Nährmedium.

Die Punkte 1) und 2a) sind schon an früherer Stelle behandelt, über 2b) ist nichts bekannt. Der Einfluß von Punkt 1) kann mehr als eine Zehnerpotenz ausmachen, der von Punkt 2a) im Extremfalle (z. B. bei völlig fehlender Phosphorylierungsfähigkeit) bis zu vollkommener Inaktivität von Aneurin führen. Jedoch phosphorylieren die meisten Mikroorganismen Aneurin mit ausreichender Geschwindigkeit. Größere allgemeine Bedeutung für unser Problem kommt dem Abbau von Aneurin zu (Punkt 2c)), der nach BONNER und BUCHMAN (*30*) bei verschiedenen Schimmelpilzen mit relativ großer Geschwindigkeit verläuft. Bei *Phytophtora*- und *Phycomyces*-Arten kann der Abbau bereits nach eintägigem Wachstum einsetzen bzw. rascher als die Synthese verlaufen; nach 7 Tagen ist er vielfach schon beendet. Dabei kommt es zu einer vollkommenen Zerstörung des „Thiazols", während das „Pyrimidin" zum größten Teil erhalten bleibt. Der enzymatische Abbau in Schimmelpilzen ist also nicht vergleichbar mit dem durch die Thiaminase aus Fischorganen, die lediglich eine Spaltung in die beiden Komponenten hervorruft (*176*). Da der „Thiazol"-Abbau nur in Anwesenheit einer kleinen Menge „Pyrimidin" oder verschiedener seiner Analoga erfolgt, die zwar keine Wuchsstoffaktivität mehr zu besitzen brauchen, aber noch dazu befähigt sein müssen, mit dem „Thiazol" zu einer quaternären Ammoniumverbindung zu reagieren, ist dem „Pyrimidin" die Rolle eines natürlichen Katalysators des „Thiazol"-Abbaus zuzuschreiben. Dieser verläuft also unter intermediärer Bildung von Aneurin. Der Abbau des „Thiazols" ist temperaturabhängig. Wenn nun „Thiazol"-Abbau und Aneurinbedürfnis in einem ursächlichen Zusammenhang stehen, dann muß auch das Aneurinbedürfnis mit steigender Temperatur größer werden. BURKHOLDER und MCVEIGH (*45*) fanden dann auch, daß *Phycomyces Blakesleeanus* bei 15° C schon mit 10^{-8} g Aneurin/cm³ optimales Wachstum erzeugt, während bei 25° C hierzu 10^{-6} bis 10^{-4} g/cm³ notwendig sind. Es ist ferner zu erwarten, daß in Wachstumsversuchen, auf Grund der raschen „Thiazol"-Zerstörung, nicht eine Mischung äquimolarer Mengen der Aneurinkomponenten, sondern solche mit einem Überschuß der „Thiazol"-Komponente am aktivsten ist, und daß die Wirkung suboptimaler Aneurinkonzentrationen durch Zugabe von „Thiazol" gesteigert wird. BONNER und BUCHMAN (*30*) beobachteten tatsächlich, daß bei den von ihnen untersuchten Schimmelpilzen das wirksamste molare Verhältnis „Thiazol"/„Pyrimidin" (bzw. Aneurin) ≥ 10 ist. Die Wirkung des „Thiazols" kann man also als eine „Pyrimidin"(Aneurin)-sparende bezeichnen.

Aneurin-*Einsparungen* in der Größenordnung von Zehnerpotenzen werden mit anderen Wuchsstoffen und auch mit Aminosäuren erzielt. Dem Fehlen dieser Substanzen (Punkt 3) scheint die größte Bedeutung zuzukommen, um Befunde über ein abnorm hohes Aneurinbedürfnis zu erklären. Dies wird verständlich, wenn man bedenkt, daß besonders die anfänglichen Untersuchungen über das Aneurinbedürfnis von Mikroorganismen in sehr einfachen, zumindest unvollständigen Nährmedien durchgeführt worden sind. Nach KÖGL und VAN WAGTENDONK (*165*) setzt z. B. Biotin bei *Staphylococcus aureus* die zu optimalem Wachstum erforderliche Aneurinmenge von 10^{-6} auf 10^{-8} g/cm³ herab. Der Effekt wird schon mit so kleinen Biotin-Konzentrationen erreicht, wie zum Wachstum anderer, Biotin unbedingt benötigender Mikroorganismen erforderlich ist ($5 \cdot 10^{-9}$ g/cm³). Bei Mikroorganismen, die nur *Zuwachs* mit Aneurin oder anderen Wuchsstoffen zeigen, also diese in suboptimalen Mengen synthetisieren, sind sparende Effekte noch viel ausgeprägter; sie können dabei in vollständige *Ersetzbarkeit* selbst mehrerer Wuchsstoffe durch einen einzigen (evtl. in höherer Konzentration) übergehen. Diese sog. *Korrelationen* zwischen den Wuchsstoffen sind zuerst durch WILLIAMS und Mitarb. bei verschiedenen Heferassen (*439*) und bei *Trichophyton interdigitale* (*263*) studiert worden.

Vollständiger Ersatz von Aneurin wurde beobachtet bei *Lactobacillus mannitopoeus* und *L. lycopersici* durch Lactoflavin (*451*), bei *Sbm. plantarum* durch *l*-Tyrosin (*254*), bei anderen Milchsäurebakterien durch verschiedene Aminosäuren. Wir sind hiermit beim Aneurin auf das Problem der Ersatzstoffe gestoßen und der „Mikrostoffwechselanalytiker" würde heute sofort folgende Fragen formulieren: 1. Im Falle Aneurin/Lactoflavin: Kann das Bakterium seinen Stoffwechsel so umstellen, daß es einmal nur mit Aneurin, das andere Mal nur mit Lactoflavin auskommt, oder synthetisiert es in Anwesenheit von Aneurin Lactoflavin und umgekehrt in Anwesenheit von Lactoflavin Aneurin? 2. Im Falle Aneurin/Aminosäure: Ist Aneurin nur dazu da, einen bestimmten Schritt in der Reaktionsfolge zu katalysieren, deren Endprodukt die Aminosäure ist, oder ist die Aminosäure für irgend einen Teilschritt der Aneurinsynthese erforderlich oder gar ein Vorläufer des Aneurins? Diese Fälle sind noch nicht im Sinne der mikrobiologischen Stoffwechselanalyse ausgewertet worden; ein genau untersuchter Fall der letzten Art wird uns später beim Adermin beschäftigen.

III. Vitamin B_2.

Lactoflavin als Vitamin und Fermentbestandteil. Bedürfnis und Überproduktion von Lactoflavin bei Mikroorganismen. Aufbau aus 1-Ribitylamino-2-amino-4,5-dimethylbenzol und Alloxan (*Lactobacillus casei*). Abbau zu Lumichrom und Hemmung desselben durch Lactoflavinanaloga (*Pseudomonas riboflavinus*). Lactoflavinphosphorsäure und Flavindinucleotide als Wirkgruppen

der Gelben Fermente. Der Dinucleotid-Cyclus. Notatin und andere extrazelluläre Gelbe Fermente. Wirkungsmechanismus von B_2-Antagonisten: Dichlorlactoflavin, Lumilactoflavin, Phenazin- und Chinolin-Derivate, Atebrin, Chinin (Anti-Malaria-Mittel).

Vitamin B_2 (*Lactoflavin, Riboflavin*) ist ein typisches Wachstumsvitamin und wurde im Jahre 1933 von KUHN, GYÖRGY und WAGNER-JAUREGG (*179*) aus Molke in reiner, krystallisierter Form erhalten. Ein Jahr vorher war bereits WARBURG und CHRISTIAN (*426*) die Reindarstellung eines Gelben Fermentes gelungen. Aus beiden Substanzen wurde durch Bestrahlung ein und dasselbe Abbauprodukt erhalten. Dies war ein historisches Ereignis in den Naturwissenschaften, da damit zum erstenmal eine Beziehung zwischen einem Vitamin und einem Enzym hergestellt wurde.

BÜNNING (*39*) sah zuerst den fördernden Einfluß von Lactoflavin auf das Wachstum von Mikroorganismen, als er den Kulturen von *Aspergillus niger* in einem synthetischen Medium hohe Konzentrationen (1 mg%) des Vitamins zusetzte. Eingehender befaßte sich ORLA-JENSEN (*290*) mit der Lactoflavin-Bedürftigkeit von *Milchsäurebakterien*. Die von ihm untersuchten, hauptsächlich an die Lactoflavin-reiche Milch angepaßten Arten benötigten meist Lactoflavin zum Wachstum, und zwar die Thermobakterien $0{,}5 \cdot 10^{-6}$ g/cm³, Milch-Streptokokken eine „viel kleinere" Konzentration. ORLA-JENSENS Untersuchungen wurden von WOOD, WERKMAN und Mitarb. (*450*) sowie von SNELL, STRONG, PETERSON, TATUM u. a. (*386*), (*382*), (*177*) fortgesetzt und auf *andere Bakterien*, besonders Propionsäurebakterien und pathogene Streptokokken ausgedehnt. Nach ihnen dürfte die optimal benötigte Lactoflavinkonzentration bei sonst optimalen Bedingungen $0{,}5 \cdot 10^{-7}$ g/cm³ nicht übersteigen. Des weiteren fand man Lactoflavin-bedürftige Stämme unter Enterokokken und hämolysierenden Streptokokken (*463*), (*464*) und kürzlich wurden von MÖLLER, WEYGAND und WACKER (*261*) auch solche bei Staphylokokken beschrieben. Interessant ist die Beobachtung von DOUDOROFF (*75*), daß für Wachstum und Atmung von Leuchtbakterien wenig, für ihre Lumineszenz viel Lactoflavin erforderlich ist. Selten benötigen *Schimmelpilze* Lactoflavin: der Ulmenparasit *Ophiostoma ulmi* nur zusätzlich (*99*) und die pathogene Art *Trichophyton interdigitale* nur in Abwesenheit bestimmter anderer Wuchsstoffe (*263*). Lactoflavin-bedürftige *Hefen* sind bisher nicht angetroffen worden. Die Synthesefähigkeit für Lactoflavin scheint überhaupt nur bei wenigen Mikroorganismen zu fehlen.

Unter den Flavin-Bildnern fallen vielmehr einige auf, die *extrem hohe Flavinmengen synthetisieren*. Zu ihnen gehören: *Eremothecium Ashbyii* (*105*), (*313*), (*310*), (*311*), (*312*), (*246*), *Aspergillus niger* (*195*), (*196*), *Clostridium acetobutylicum* (*474*), (*475*), ein *Torula*-Stamm (CHE-

VALIER) (*54*), verschiedene *Candida*-Hefen (*43*), (*44*), *Ashbya gossypii* (*431*), (*399*) und *Aerob. aerogenes* (*284*). Die produzierten Lactoflavinmengen sind so groß, daß es sogar zu Ausscheidung von Flavinkrystallen in der Nährlösung und auch in den Zellen (z. B. von *Eremothecium Ashbyii*) kommen kann. CHEVALIER (*54*) beschrieb, daß sich bei der Kultur seines *Torula*-Stamms ein grünlich-gelber Ring an der Oberfläche bildet, der offenbar eine gesättigte Lactoflavinlösung darstellt. Bei einer Stock olmer untergärigen Brauereihefe kann nach PETT (*300*), (*301*) die Flavinsynthese durch anaerobe Bedingungen, Cystein oder Pyridin und besonders durch Cyanid gesteigert werden. SCHOPFER zeigte, daß bei *Eremothecium Ashbyii* die Flavinsynthese durch Spurenelemente und eine unbekannte Substanz aus Pepton gefördert (*343*), (*349*), durch Gammexan (s. S. 202/203) stark gehemmt wird (*352*). KITAWIN (*156*), (*157*) erhöhte die Flavinproduktion von bestimmten *Aspergillus niger*-Stämmen durch kleine Mengen Hg-Salze, und MAYER (*225*), (*226*), (*227*), (*228*), (*229*) fand beträchtlich größere Mengen Flavin in Mykobakterien (besonders *Mycobact. smegmatis*) bei Zugabe von *p*-Aminobenzoesäure oder *p*-Aminosalicylsäure. Die Bedingungen für eine möglichst hohe Flavinausbeute sind in den letzten Jahren wegen der Bedeutung, die die mikrobiologische Flavinsynthese, besonders mit *Clostridium acetobutylicum* und *Eremothecium Ashbyii*, für die Technik erlangt hat, auch von industriellen Kreisen eingehend studiert worden und in einer großen Zahl von Patenten niedergelegt. Besonders wichtig ist die richtige Einstellung des Fe-Gehaltes natürlicher Nährböden, da schon geringe Überschreitung der kleinen für Wachstum und Flavinbildung unbedingt notwendigen Konzentration zu starker Hemmung der Flavinsynthese führt. Die höchste Ausbeute scheint bis heute die Firma Pfizer, Chas & Co. (*302*) bei *Eremothecium Ashbyii* erreicht zu haben mit einer Konzentration von 0,18%. Setzt man den mittleren Bedarf eines nicht synthetisierenden Stammes mit $3 \cdot 10^{-8}$ g Lactoflavin/cm³ an, so stellt die Menge von 0,18% $= 18 \cdot 10^{-4}$ g/cm³ eine 60 000fache Überproduktion dar.

Vorstufen der biologischen Flavinsynthese sind im 1-Ribitylamino-2-amino-4,5-dimethylbenzol und Alloxan bekannt geworden (Abb. 2, Schritt 1). SARETT (*331*) konnte nämlich die geringe Lactoflavinaktivität der Ribitylamino-Verbindung bei *Lactobacillus casei* durch Zugabe von Alloxan von 0,003 auf 0,35% erhöhen[1]. Daß verschiedene Aufbauwege existieren, mag daraus geschlossen werden, daß *Neurospora*-Mutanten aufgefunden wurden, die in einem bestimmten Temperaturbereich Lactoflavin benötigen, in einem anderen nicht (*247*). Wenn die Mutante bei höherer Temperatur Lactoflavin-bedürftig ist, könnte auch — ähnlich dem größeren Aneurinbedarf von *Phycomyces*

[1] Es ist nicht klar erwiesen, ob dies nicht durch rein chemische Reaktion der Komponenten im Nährmedium vorgetäuscht wird.

bei höheren Temperaturen — ein gesteigerter Abbau von Lactoflavin dafür verantwortlich sein. Ein Abbau des Lactoflavins durch verschiedene Hefen und Bakterien ist von PETT (*299*), (*300*), ROGOSA (*325*) und THOMPSON (*406*) festgestellt worden; FOSTER (*98*) hat ihn genauer bei *Pseudomonas riboflavinus* studiert. Dabei entsteht durch vollkommene Aboxydation der Ribose-Seitenkette Lumichrom (s. Abb. 2,

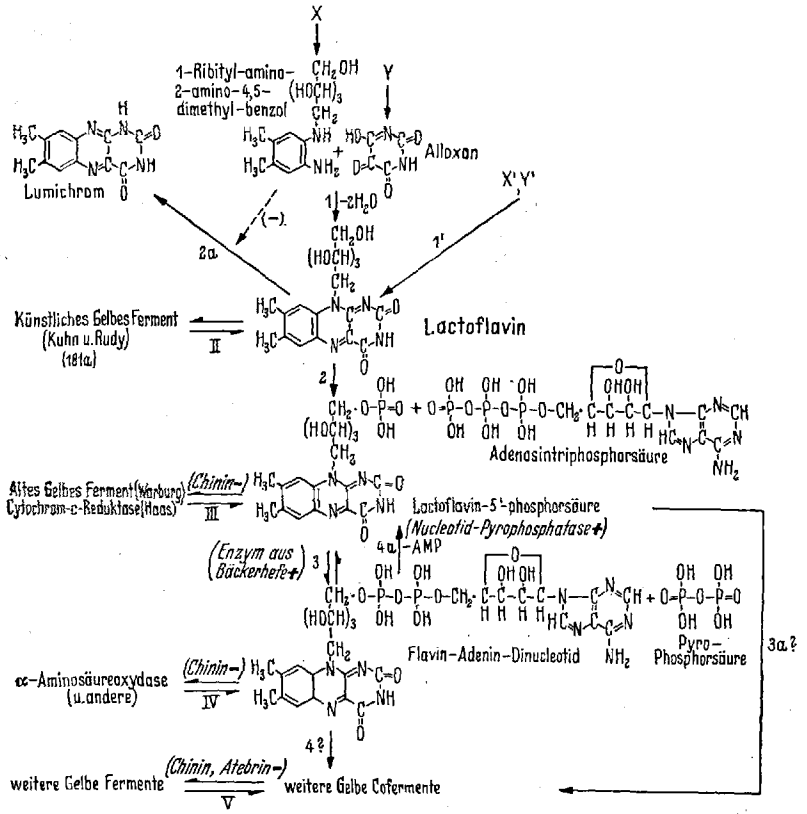


Abb. 2. Auf- und Abbau von Lactoflavin und „Lactoflavin"-Fermenten.

Schritt 2a). Der Abbau läßt sich durch verschiedene Lactoflavinanaloga stark hemmen, auch durch solche, die das Wachstum von *L. casei* (Lactoflavin-bedürftig) selbst in höchsten Konzentrationen nicht beeinflussen. Diese Hemmungen sollen durch weiteren Lactoflavinzusatz nicht aufhebbar sein.

Beim Eintritt in die Zelle wird Lactoflavin, genau wie Aneurin, phosphoryliert (Abb. 2, Schritt 2), und zwar zu Lactoflavin-5'-phosphorsäure (Flavinmononucleotid), der Wirkgruppe des sog. Alten Gelben Fermentes von WARBURG (*425*) und der Cytochrom c-Reduktase von

HAAS (*414*). Die prosthetische Gruppe anderer *Gelber Fermente*, wie Diaphorase, *d*-Aminosäure-oxydase und Fumarathydrase, ist ein Flavin-Adenin-Dinucleotid, das aus Flavinphosphorsäure und Adenosin-5-phosphorsäure durch pyrophosphatische Verknüpfung aufgebaut ist. Seine Synthese und Spaltung (Schritt 3) erfolgt nach SCHRECKER und KORNBERG (*354*) durch ein aus Bäckerhefe weitgehend angereichertes Enzym in folgender reversibler Reaktion: Lactoflavin-5'-phosphorsäure + Adenosintriphosphorsäure $\rightleftharpoons$ Flavinadenindinucleotid + Pyrophosphorsäure.

Für den *Abbau* des Flavin-Adenin-Dinucleotids ist nach KORNBERG und PRICER (*171*) eine aus Hefe, Nieren und bes. Kartoffeln isolierbare Dinucleotid-pyrophosphatase wichtiger. Sie spaltet das Dinucleotid in Flavin-5'-phosphorsäure und Adenosin-5-phosphorsäure (Schritt 4 a), eine Reaktion, die für seine Konstitution beweisend ist. Da auch die Codehydrasen durch das Enzym angegriffen werden, so lassen sich Substratantagonismen zwischen den verschiedenen Dinucleotiden nachweisen. Auf Grund dieser Befunde hat KORNBERG (*168*)

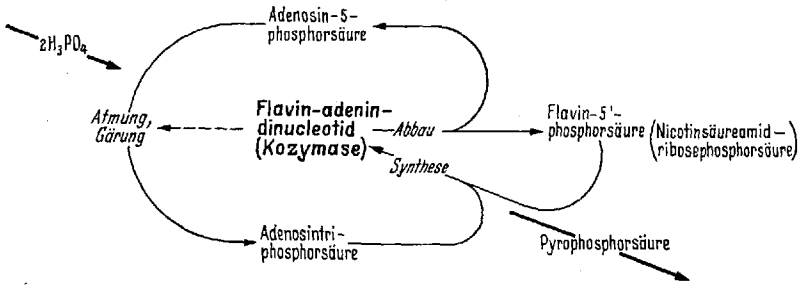


Abb. 3. Dinucleotid-Cyclus nach Kornberg [1950] (*168*).

einen *Dinucleotid-Cyclus* (s. Abb. 3) aufgestellt, bei dem Auf- und Abbau der Dinucleotide mit ihrer Funktion gekoppelt sind. Gleichzeitig wird damit eine Erklärung für die bei Atmung oder Gärung auftretende Anreicherung von anorganischem Pyrophosphat gewonnen, die schon OCHOA, CORI und CORI (*287*) vor längerer Zeit besonders in tierischen Zellen gefunden hatten.

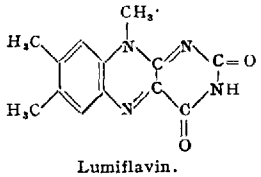
Weitere Dehydrasen, wie Xanthin- und Aldehyd-Dehydrase, sowie Glucose-Oxydase, enthalten Flavin-Nucleotide mit bisher unbekannter Zusammensetzung (s. Abb. 2). Auch das Antibioticum Notatin gehört zu den Gelben Fermenten und stellt eine Glucose-Oxydase dar (*147*), (*148*). Es wird von *Penicillium notatum* erzeugt, der es in die Nährlösung ausscheidet (*58*). Die antibiotische Wirkung beruht offenbar darauf, daß bei der Oxydation von Glucose zu Gluconsäure — wie bei allen Dehydrierungen — Wasserstoffperoxyd entsteht, das ein starkes Zellgift ist (*218 a*). Katalase und andere Wasserstoffsuperoxyd-zerstörende Agenzien sind deshalb Antagonisten des Notatins. Kürzlich zeigten BENDER und KREBS (*20*), daß *Neurospora crassa*-Stämme Fermente in die Nährlösung ausscheiden, ein bisher selten exakt beobachtetes Phänomen. *l*-Aminosäure-Oxydase findet sich bis zu 80% in der Nährlösung, von der *d*-Oxydase jedoch nichts, was vielleicht damit zusammenhängt, daß die *l*-Oxydase, verglichen mit anderen Schimmelpilzen, eine 100fache Überproduktion zeigt. Ein sehr sonderbarer Befund besteht in der fast vollständigen Hemmung, die die Synthese der *l*-Oxydase in Anwesenheit von nur $5 \cdot 10^{-9}$ g Biotin/cm³ erleidet.

Da *Neurospora crassa* gleichzeitig Katalase in die Nährlösung ausscheidet, bildet sich im Gegensatz zu *P. notatum* kein Wasserstoffperoxyd.

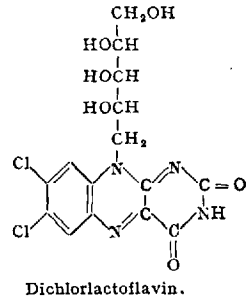
Nach einer kürzlich erschienen Notiz von STICH und EISGRUBER (*393*), s. a. (*393a*), (*394*), soll Lactoflavin die Porphyrinsynthese und Häminproteid-Bildung in Hefe steuernd beeinflussen.

Der erste Antagonist des Lactoflavins wurde 1943 von KUHN, WEYGAND und MÖLLER (*182*) gefunden, als dessen benachbarte Methylgruppen durch 2 Chlor-Atome ersetzt wurden. Die Wachstumshemmung des Dichlorlactoflavins (s. Formel) wird durch Lactoflavin aufgehoben. Hemmung und Enthemmung vollziehen sich bei einer Reihe Lactoflavinbedürftiger wie -synthetisierender Bakterien-Stämme in streng kompetitiver Weise, jedenfalls in einem bestimmten Konzentrationsgebiet [1]. Dies äußert sich formal darin, daß man bei Steigerung der Dichlorlactoflavin-Konzentration auch die Konzentration des Lactoflavins um *denselben Faktor* erhöhen muß, damit gleiche Stärke des Wachstums erhalten bleibt. Das könnte bedeuten, daß Dichlorlactoflavin und Lactoflavin bei der Bildung von Lactoflavinphosphorsäure (Abb. 2, Schritt 2) um ein Protein des phosphorylierenden Fermentsystems konkurrieren, oder anders ausgedrückt, daß Lactoflavin von diesem Protein durch Dichlorflavin verdrängt wird. Es ist aber noch unklar, ob nicht (wie wir später beim Desoxyadermin sehen werden) zuerst eine Phosphorylierung des Hemmstoffs erfolgt, der sich vielleicht noch weiter aufbauende Reaktionsfolgen anschließen, die den Schritten II, 3—IV, 3—4—V analog sind. Die so letztlich entstehenden „falschen" Gelben Fermente dürften die entsprechenden Dehydrierungen nicht mehr ausführen können, da sich ihre Redoxpotentiale entsprechend dem des Dichlorflavins (*182*) zu stark in positiver Richtung verschieben. Daß Dichlorlactoflavin das Wachstum von *Eremothecium Ashbyii* hemmt (*345*), ist im Hinblick auf die extrem hohen von ihm produzierten Lactoflavinmengen verwunderlich und läßt auf ein Eingreifen in weitere Reaktionsmechanismen schließen.

Konstitution von verschiedenen Lactoflavin-Analogen.

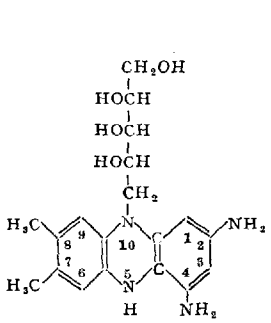


Lumiflavin.

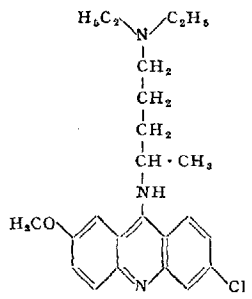


Dichlorlactoflavin.

[1] E.-F. MÖLLER und F. WEYGAND: unveröffentlicht.



2,4-Diamino-7,8-dimethyl-10-ribityl-5,10-dihydrophenazin.



Atebrin.

WOOLLEY (*459*) fand im 2,4-Diamino-7,8-dimethyl-10-ribityl-5,10-dihydrophenazin (s. Formel) einen kompetitiven Antagonisten des Lactoflavins beim Wachstum von *Lactobacillus casei, L. arabinosus* und *Streptococcus haemolyticus* H 69 D. Während nach SARETT (*331*) zur Hemmung von Lactoflavin- und Flavin-Adenin-Dinucleotid-bedingtem Wachstum von *L. casei* gleiche Mengen dieses Phenazinderivats notwendig sind, genügen bei Lumilactoflavin (s. Formel), in Anwesenheit des Dinucleotides, bereits kleinere Konzentrationen als in Gegenwart von Lactoflavin. Daraus wird der etwas gewagte Schluß gezogen, daß Lactoflavin bereits vor der Cofermentbildung an die spezifische Eiweißkomponente eines Gelben Ferments gebunden wird, und daß Lumiflavin nur in die Bindung des Proteins an die 3-Imino-Gruppe von Lactoflavin und seinen Derivaten eingreift.

Bei anderen Lactoflavin-Antagonisten, bes. verschiedenen *Anti-Malaria*-Mitteln (*222*), (*131*), (*59*), (*60*), (*61*), kennen wir heute genau den gehemmten Schritt, da hier Fermentversuche vorliegen. So konnte HAAS (*113*) mit weitgehend gereinigten Fermentpräparaten zeigen, daß im Enzymsystem der Glucose-6-phosphorsäure-Dehydrase Atebrin (s. Formel) und Chinin das Coferment der Cytochrom c-Reduktase vom spezifischen Fermentprotein (teilweise irreversibel) verdrängen, also Schritt III unterbinden. Hochgereinigte *d*-Alanin-oxydase wird nach HELLERMANN, LINDSAY und BOVARNICK (*120*) ebenfalls durch diese Substanzen gehemmt, stärker noch durch Auramin, gleich stark durch Plasmochin und andere Chinolinderivate, schwächer durch heterocyclische Sulfonamide, wobei *streng*-kompetitiver Antagonismus zu Flavinadenin-Dinucleotid zumindest bei Chinin auftritt. Hier ist also Schritt IV betroffen.

Wenn KARRER (*143*), (*328*) keine Hemmung der *d*-Alanin-oxydase und des Schardinger Enzyms durch Dichlorlactoflavin finden konnte, so dürfte dies z. T. daran liegen, daß er so rohe Enzympräparate wie Leberextrakt und Milch verwendet hat, die natürlich sehr reich an Flavinverbindungen sind. — Nach den

Untersuchungen der amerikanischen Autoren wäre zu erwarten, daß auch Dichlorlactoflavin direkt in die Schritte III, IV und vielleicht auch V eingreifen kann[1]. Das soll nicht besagen, daß nicht auch Phosphorylierung des Dichlorflavins usw. stattfinden könnte. Die dabei entstehenden „falschen" Cofermente wären möglicherweise auch aktiver in der Hemmung der Schritte III, IV und V.

IV. Vitamin B_6.

Adermin-Bedürfnis der Mikroorganismen, quantitative Unterschiede (Hefe, Milchsäurebakterien): Pyridoxal und Pyridoxamin. Ersatz durch Aminosäuren: Pyridoxalphosphat als Coferment der Transaminasen (Racemiase) und Aminosäure-Decarboxylasen; das Eingreifen von B_6 in den Auf- und Abbau von Tryptophan. B_6 als Schlüsselsubstanz zwischen Eiweiß- und Kohlenhydratstoffwechsel. Wirkungsmechanismus der B_6-Katalysen. Aufbau von B_6-Fermenten aus Adermin, und Wirkungsmechanismus des Wachstumsantagonisten 4-Desoxyadermin.

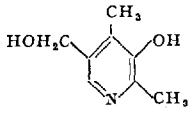
Vitamin B_6 (*Adermin, Pyridoxin*) wurde zuerst von GYÖRGY (*109*), (*23*) als ein Wachstumsfaktor bei Ratten erkannt, der gleichzeitig die bei seinem Mangel auftretende Pellagra-ähnliche Dermatitis zu heilen vermag. 1938 wurde es von KUHN und WENDT (*181*), s. a. (*110*), (*199*), (*337*) aus Hefe isoliert [2].

Kurze Zeit danach konnte MÖLLER (*251*) die Wuchsstoff-Natur krystallisierter Präparate aus Hefe und aus Reiskleie feststellen, und zwar bei *Streptobacterium plantarum*, bei verschiedenen anderen Milchsäurebakterien sowie bei einer untergärigen Hefe aus Sauerkraut. Später erwiesen sich auch synthetische Präparate als gleich aktiv (*262*). Die Wuchsstoffwirkung des Adermins bei Milchsäurebakterien wurde durch SNELL und PETERSON (*380*), (*188*), die bei verschiedenen Hefe-Arten und -Stämmen durch SCHULTZ, ATKIN und FREY (*356*) sowie EAKIN und WILLIAMS (*78*) im Jahre 1939 bestätigt. Weiterhin zeigten sich viele Enterokokken und Streptokokken als B_6-bedürftig (*132*), (*230*), (*293*), (*464*), (*357*), während manche *Staphylococcus albus-* (*420*) und wenige *Staphylococcus aureus-* (*261*) Stämme durch B_6 im Wachstum nur in geringem Ausmaß gefördert werden. Die ersten Beobachtungen über B_6-bedingte Zuwachseffekte bei Schimmelpilzen dürften von SCHOPFER (*342*) (*Ustilago violacea*) und von BENHAM (*21*) (*Pityrosporum ovale*) stammen. Später wurde erkannt, daß B_6-Bedürfnis be-

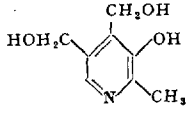
[1] Wie ganz kürzlich SINGER und KEARNY (*369a*) berichten, wird tätsächlich die Hemmung verschiedener Gelber Fermente durch Dichlorflavin bei weiterem Zusatz von Lactoflavinphosphorsäure bzw. Lactoflavin-Adenin-Dinucleotid aufgehoben. Bei der *l*-Aminosäure-Oxydase aus Schlangengift, die das Dinucleotid als prosthetische Gruppe enthält, sind aber die Hemmungen durch Lactoflavin-Analoga irreversibel. Bedeutungsvoll erscheint, daß in diesem Falle Dichlorlactoflavin schwach, Lactoflavin selbst aber am stärksten hemmt.

[2] Adermin war an sich schon früher als ein Nebenprodukt der B_1-Darstellung aus Reiskleie isoliert worden, von S. OHDAKE (*288*), der jedoch die biologische Bedeutung dieser Substanz damals nicht ahnte.

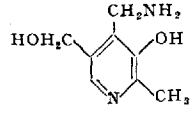
sonders unter den *Ophiostoma*-Arten stark verbreitet ist (*46*), (*321*), (*322*), (*100*).



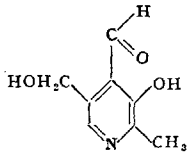
4-Desoxyadermin.



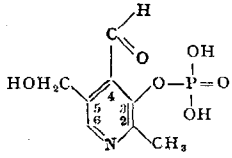
Pyridoxin (Adermin)



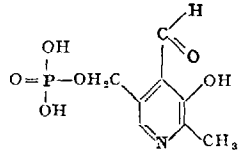
Pyridoxamin (Superadermin).



Pyridoxal.



Pyridoxal-3-phosphat.



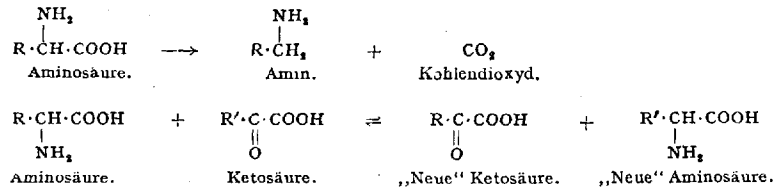
Pyridoxal-5-phosphat.

Die *Konzentrationen*, die an Adermin zu *optimalem* Wachstum von den verschiedenen Mikroorganismen benötigt werden, schwanken zwischen 10^{-8} und 10^{-6} g/cm³. Eine so hohe Konzentration, wie 10^{-6} g/cm³, die auch bei Milchsäurebakterien als notwendig gefunden wurde (*251*), erschien verdächtig. MÖLLER erkannte später, daß die benötigte Adermin-Konzentration von der Zusammensetzung des Nährmediums abhängig ist. Wurden gar Adermin und Adermin-freies Nährmedium getrennt sterilisiert, so war die Wirksamkeit des Adermins verschwindend klein. Es mußte also während des Sterilisierens mit einem Bestandteil des Nährmediums reagiert haben, um erst die eigentliche Wirksubstanz zu bilden. Dieser Bestandteil erwies sich als *Ammoniak*. Nach Verbessern der Reaktionsbedingungen konnte die aktive Substanz als Pikrat und als Dichlorhydrat isoliert und bald darauf in ihrer Konstitution als ein Adermin-Derivat erkannt werden, in dem die CH_2OH-Gruppe in 4-Stellung durch eine CH_2NH_2-Gruppe ersetzt ist (s. Formel). Die neue Substanz wurde *Superadermin* genannt (*260*). SNELL (*376*), der während des Krieges zu den gleichen Ergebnissen gekommen war, bezeichnete sie als *Pyridoxamin*. Weiterhin konnte er noch — fußend auf den Beobachtungen von BOHONOS, HUTCHINGS und PETERSON (*26*), wonach Adermin bei Milchsäurebakterien umso aktiver wird, je aerober die Bedingungen sind — ein weiteres durch *Oxydation* gebildetes, hochaktives Derivat des Adermins, das *Pyridoxal* (s. Formel), erhalten. Die genaue Austestung der reinen Substanzen ergab, daß alle drei bei der Ratte und verschiedenen Hefen (10^{-8} g/cm³) gleich wirksam sind, während Milchsäure- und ähnliche Bakterien sehr unterschiedlich darauf ansprechen. Nun wurde es auch verständlich, warum die mikrobiologischen Teste mit Hefe recht gute, in Übereinstimmung mit den Rattentesten stehende Werte ergeben hatten, während Teste mit Milchsäure-

bakterien häufig völlig versagten, indem sie schwankende und viel zu hohe Ergebnisse zeigten [*Pseudopyridoxin* (*374*)]. RABINOWITZ und SNELL (*308*), (*333*) arbeiteten mit Hilfe von 3 Mikroorganismen die Bestimmung von Adermin, Pyridoxal und Pyridoxamin nebeneinander aus: *Saccharomyces carlsbergensis* erfaßt alle 3 Komponenten, *Streptococcus faecalis* R unter bestimmten Bedingungen Pyridoxal + Pyridoxamin, *Lactobacillus casei* nur Pyridoxal.

B_6 läßt sich nach STOKES und GUNNESS (*396*), (*221*) bei *Lactobacillus arabinosus* durch größere Konzentrationen verschiedener Aminosäuren, besonders durch *l*-Alanin, *l*-Threonin oder *l*-Lysin ersetzen. Noch interessanter ist, daß die sog. unnatürliche Aminosäure *d*-Alanin zu einem fast vollständigen Ersatz von B_6 bei *Streptococcus faecalis* R führt (*378*), (*379*). Das ließ darauf schließen, daß die Funktion des Adermins im Auf-, Um- und Abbau von Aminosäuren besteht. Tatsächlich wurde gefunden, daß ein phosphoryliertes Pyridoxal das Cofermentverschiedener *Aminosäure-Decarboxylasen* (*107*), (*407*), (*336*), (*142b*), (*24a*) und der *Transaminasen* (*206*) ist. Ob es sich bei der Decarboxylase um das von KARRER (*144*), (*145*) synthetisierte 3-Phospho-pyridoxal oder um 5-Phospho-pyridoxal (s. Formel) handelt, war lange eine Streitfrage [GUNSALUS und UMBREIT (*108*), (*408*)], die nun im Sinne der amerikanischen Autoren entschieden ist. Auch beim Aufbau des Tryptophans aus Indol und Serin durch *Neurospora sitophila*, sowie beim Abbau dieser Aminosäure zu Indol, Brenztraubensäure und Ammoniak durch *E. coli* (CROOKS Stamm) ist nach GUNSALUS und Mitarb. (*409*), (*454*) ein Phospho-pyridoxal wirksam (s. a. S. 93ff.). BROQUIST und SNELL (*37*), (*221*) fanden B_6 auch bei verschiedenen Milchsäurebakterien in die Synthese von Histidin aus Purinen (besonders aus Xanthin) verwickelt, indem es Imidazolbrenztraubensäure, die direkte Vorstufe des Histidins in dieser Reaktionsfolge, umaminiert.

Decarboxylierung und Transaminierung vollziehen sich nach folgenden Gleichungen:



wobei R und R' die Reste verschiedener Amino- bzw. Ketosäuren darstellen. Das Charakteristische der Umaminierung besteht also formal darin, daß bei der Reaktion einer Keto- mit einer Aminosäure die Reste der beiden Säuren miteinander vertauscht werden. Die Bedeutung der Umaminierung ersieht man leicht daraus, daß bei intaktem Ablauf des

Kohlenhydratstoffwechsels, der außer den beiden schon erwähnten Ketosäuren, Brenztraubensäure und Oxalessigsäure, mindestens noch Ketoglutarsäure liefert, durch Anwesenheit *einer* Aminosäure bereits die Synthese von 3 weiteren Aminosäuren gewährleistet ist. B_6 stellt somit die wichtige Schlüsselsubstanz dar, die Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel miteinander verbindet.

Die *Katalyse durch Pyridoxalphosphat* können wir uns, in Anlehnung an andere Umsetzungen der Aminosäuren mit Carbonylverbindungen [s. z. B. HEYNS (*122*)] etwa nach folgendem Schema vorstellen (Abb. 4): Es kondensiert

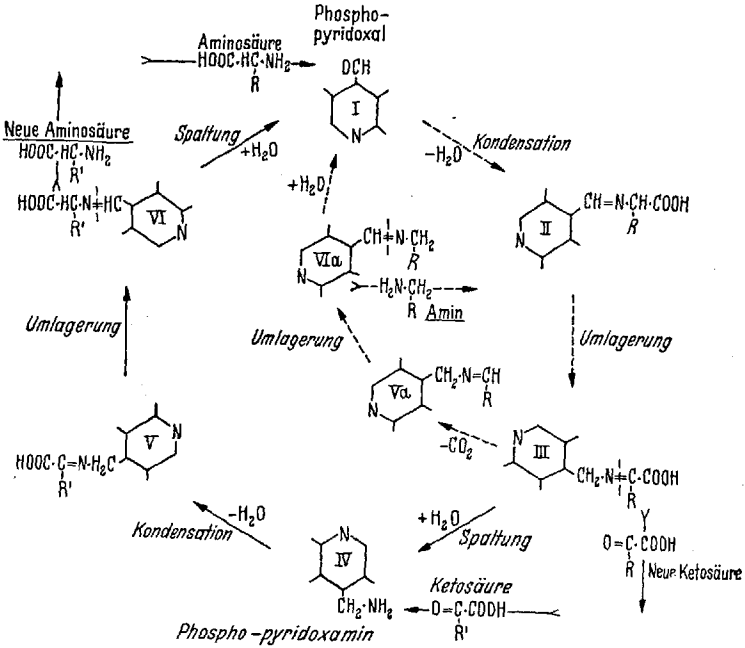


Abb. 4. Wirkungsmechanismus der B_6-Katalyse.

sich zuerst Phosphopyridoxal I mit der Aminosäure zur SCHIFFschen Base II, die nach Verschiebung der Doppelbindung zu III in Phosphopyridoxamin IV und die „Neue" Ketosäure zerfällt. Phosphopyridoxamin reagiert nun mit der zugesetzten Ketosäure zur SCHIFFschen Base V, die nach Umlagerung zu VI unter Abspaltung der „Neuen" Aminosäure wieder Phosphopyridoxal I zurückbildet, das den Kreislauf von neuem beginnen kann. Beim Mechanismus der Decarboxylierung wird III nicht hydrolysiert, sondern decarboxyliert zu Va. Durch Umlagerung von Va zu VI a kann das entsprechende Amin unter Rückbildung von Phospho-pyridoxal I entstehen. Für dieses Schema spricht der Befund von SNELL und RABINOWITZ (*381*), daß die SCHIFFschen Basen aus Pyridoxal und vielen Aminosäuren oder Aminen als Wuchsstoffe bei Milchsäurebakterien dieselbe molare Aktivität wie Pyridoxal besitzen[1].

[1] Weitere Erklärungsmöglichkeiten zum Mechanismus der B_6-Katalyse siehe bei KARRER (*142c*).

Ein sehr schönes Beispiel, wie weit man bei erschöpfender Anwendung rein mikrobiologischer Methoden zu neuen Erkenntnissen vordringen kann, bietet die Ersetzbarkeit von Pyridoxal durch *d*-Alanin. SNELL und Mitarb. (*129*), (*130*) legten sich die Frage vor: Ist *d*-Alanin ein Vorläufer des Pyridoxals oder ist Pyridoxal ein Katalysator bei der Synthese des *d*-Alanins? SNELL und GUIRARD (*379*) hatten anfänglich angenommen, daß die erste Alternative zutrifft, und wurden darin noch bestärkt, als die chemische Synthese des Adermins auf einem Wege gelang, bei dem Alanin eines der Ausgangsmaterialien ist (*55*). Bedenklich stimmte aber bereits, warum nur *d*-Alanin und nicht das „natürliche" *l*-Alanin die Vorstufe sein sollte. Die Bestimmung von Gesamt-B_6 mit *Saccharomyces carlsbergensis* ergab nun, daß *Lactobacillus casei* und *Streptococcus faecalis* R in Anwesenheit optimaler Mengen *d*-Alanin mindestens 15mal weniger B_6 enthalten als in Anwesenheit einer bereit *unter*-optimalen Pyridoxalkonzentration. In *Bact. coli* und *Aspergillus niger*, die B_6 selbst synthetisieren, wurde außerdem die B_6-Synthese durch *d*-Alanin nicht gesteigert. *d-Alanin* kann also *kein Vorläufer von* B_6 sein. Umgekehrt zeigten *d-Alanin*-Bestimmungen mit *Lactobacillus casei*, die mit einem großen Aufwand von Sicherheitsmaßnahmen erst neu ausgearbeitet werden mußten, daß in Anwesenheit von Pyridoxal große *d*-Alaninmengen gebildet werden. Gleichzeitige Bestimmungen von Gesamt-Alanin mit *Leuconostoc citrovorus* ließen in *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis* R, *L. arabinosus*, *Leuc. mesenteroides* 20—45% des Alanins als in seiner *d*-Form vorliegend erkennen. Da der Gesamt-Alaningehalt für *Streptococcus faecalis* R etwa 4% der Trockenmasse beträgt, ist die Menge von *d*-Alanin auf jeden Fall so groß, daß man ihm eine wichtige Rolle im Stoffwechsel zugestehen muß. Es ist auffallend, daß in Hefen, z. B. *Torula cremoris* kein *d*-Alanin nachzuweisen ist. SNELL vermutet, daß Pyridoxal bei der Bildung von *d*-Alanin die Rolle einer „*Coracemiase*" spielen könnte, d. i. eines Coferments, das die Reaktion

$$l\text{-Aminosäure} \rightleftharpoons d\text{-Aminosäure}$$

katalysiert. Der Wirkungsmechanismus müßte durch eine spezielle Art der Umaminierung erklärt werden. Den Anschauungen SNELLS stehen die Befunde von LYMAN und KUIKEN (*220*) nicht entgegen, daß *d*-Aminosäuren von verschiedenen Milchsäurebakterien besser oder überhaupt erst verwertet werden, wenn das Medium größere Konzentrationen an B_6 enthält[1].

Über den *Mechanismus* der *B_6-Synthese* durch Mikroorganismen weiß man bisher sehr wenig. Nach EPPRIGHT und WILLIAMS (*88*) verstärkt Galaktose die Aderminsynthese bei verschiedenen Heferassen ganz erheblich, während sie durch Xylose stark herabgesetzt wird. Möglicherweise gibt es verschiedene Wege des B_6-Aufbaus, was man daraus schließen kann, daß nach STOKES (*395*) und Mitarb. eine Mutante von *Neurospora sitophila* B_6 bei $p_H < 5{,}8$ zum Wachstum benötigt, bei größeren p_H-Werten jedoch synthetisiert. Der *weitere Aufbau* zu den Cofermenten und Fermenten erfolgt dann nach folgendem Schema (Abb. 5).

[1] Vgl. ebenfalls die Verwertbarkeit von *d*-Methionin durch *Lactobacillus arabinosus* 17—5 in Gegenwart von Pyridoxal oder besser Pyridoxamin [CAMIEN und DUNN (*51*)] und diejenige von *allo*-Isoleucin (an Stelle von Isoleucin) durch denselben Bakterienstamm (nicht durch *Sc. faecalis* R oder *Leuc. mesenteroides* P-60) in Anwesenheit von viel Pyridoxamin (nicht von Pyridoxin) [HOOD und LYMAN (*130a*)].

Die Schritte 2 und 2a, also die Bildung von Pyridoxal und Pyridoxamin, dürften von Mikroorganismen, die Adermin an ihrer Stelle nicht zum Wachstum verwerten können, nicht ausgeführt werden. Jedoch muß das Funktionieren einer der beiden Schritte schon zur Auswertbarkeit von Adermin führen, wenn die Bedingungen für Schritt I gegeben sind. Für die Umwandlung von Pyridoxamin zu Pyridoxal ist auf Grund von Versuchen mit ruhenden *Streptococcus faecalis*-Zellen die Anwesenheit einer Ketosäure notwendig (*19*). Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß bei diesen Versuchen die Reaktion auch über die Schritte 3a und II führte, da nur die Bildung von Phosphopyridoxal nachgewiesen wurde. Als rein chemische Reaktion (bei höherer Tem-

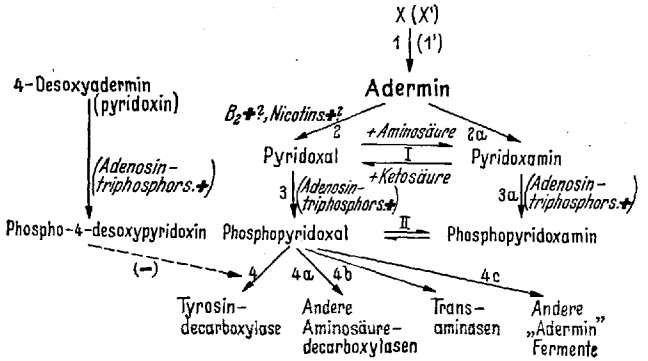


Abb. 5. Aufbau von Adermin und B_6-Fermenten (Mechanismus der 4-Desoxyadermin-Hemmung).

peratur) wurde der Schritt I übrigens in beiden Richtungen durch SNELL (*377*) verwirklicht.

Die *Phosphorylierung* von Pyridoxal und Pyridoxamin (Schritte 3 und 3a) wird nach BELLAMY, UMBREIT und GUNSALUS (*19*) durch wachsende *Streptococcus faecalis*-Zellen 10 bis 20mal rascher ausgeführt als durch ruhende. In letzteren ist das Adenosintriphosphorsäure-System weitgehend ausgeschaltet, so daß Zugabe von Adenosintriphosphorsäure reaktiviert, ein Effekt, der überhaupt erst zur Auffindung der phosphorylierten B_6-Derivate geführt hatte (*107*). *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus* und *L. Delbrückii* ATCC 9649 können die Phosphorylierungen nicht ausführen, denn zu ihrem Wachstum fanden MCNUTT und SNELL (*240*), (*241*) nur Phospho-Pyridoxal und -Pyridoxamin befähigt, die erwartungsgemäß meist durch *d*-Alanin ersetzbar sind [KITAY und SNELL (*157a*)]. Warum die phosphorylierten Verbindungen bei *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptococcus faecalis* R und *Lactobacillus casei* als Wuchsstoffe völlig inaktiv sind, ist noch nicht näher analysiert (*308*).

Die Verknüpfung von Pyridoxalphosphat mit der Apodecarboxylase (Schritt 4) wird durch Phospho-4-desoxyadermin gehemmt, wie BEILER und MARTIN (*17*) sowie UMBREIT und WADDELL (*410*) im Enzymtest fanden (Tyrosin + *Streptococcus faecalis*-Apoenzym[1] + Pyridoxal-phosphat).

Bei verschiedenen B_6-bedürftigen Stämmen von Milchsäurebakterien wird das Wachstum aber bereits durch das unphosphorylierte Analogon gehemmt. Schon 1939 hatte MÖLLER (*251*) bei Prüfung der B_6-Spezifität an *Streptobacterium plantarum* (*105*) gefunden, daß 4-Desoxyadermin (s. Formel S. 166) in höherer Konzentration teilweise B_6-ersetzend wirkt (Niveau 30% desj. von Adermin), ohne daß man damals schon daran dachte, bei Wirkstoffanalogen nach Hemmstoffen zu suchen. UMBREIT und WADDELL (*410*) konnten nun den Wirkungsmechanismus der Wachstumshemmung durch 4-Desoxyadermin aufklären: Diese Substanz hemmt nicht Schritt 2, denn Pyridoxal wirkt nicht besser enthemmend als die beiden anderen aktiven B_6-Derivate; auch nicht Schritt 3, denn die Phosphorylierung von Pyridoxal mit ruhenden *Sc. faecalis*-Zellen unter Zugabe von Adenosintriphosphat wird nicht beeinflußt; und schließlich auch nicht Schritt 4, da die Tyrosindecarboxylierung mit *Sc. faecalis*-Apoenzym + Pyridoxalphosphat nicht gehemmt wird. Da 4-Desoxyadermin aber entsprechend Schritt 3 durch ruhende *Sc. faecalis*-Zellen + Adenosintriphosphat phosphoryliert wird, muß angenommen werden, daß die Wachstumshemmung so zustande kommt, daß sich erst Phospho-4-desoxyadermin bildet, das dann die Synthese der Tyrosindecarboxylase aus Co- und Apoferment (Schritt 4) hemmt.

V. Pantothensäure.

Pantothensäure als Wuchsstoff (Bioskomponente), Vitamin und Bestandteil von Coenzym A, dem Acetylierungscoferment: Acetylierung von Sulfonamiden zu Acetylsulfonamiden, von Cholin zu Acetylcholin, von Essigsäure zu Acetessigsäure und von Oxalessigsäure zu Citronensäure über „Acetylphosphat". Dadurch Verbindung zum Fettstoffwechsel und zum Kohlenhydratstoffwechsel (Citronensäure-Cyclus). Aufbau von Pantothensäure aus den Komponenten: Pantoyltaurin und β-Alanin. Diskussion der Stoffwechselanalyse der Pantoylsäurebildung aus Valin und der β-Alaninbildung aus Asparaginsäure. Typen der Antagonisten: Sulfopantothensäure (Pantoyltaurin), β-Aminobuttersäure, Salicylsäure, Cysteinsäure u. a. Kompetitiver und nicht-kompetitiver Antagonismus. Andere Möglichkeiten der mikrobiologischen Pantothensäuresynthese. Kopplung von Pantothensäure-Abbau und Glycolyse (Streptokokken), Hemmung des Abbaus durch Pantoyltaurin. Pantothensäure-Conjugate (*L. bulgaricus*-Faktor).

[1] Um geeignete Präparate von Tyrosin-Apodecarboxylase aus *Streptococcus faecalis* zu erhalten, bedient man sich eines interessanten Kunstgriffes: Man verwendet nämlich einfach in *d*-Alanin gezüchtete Zellen (*18*), die ja nach SNELL und Mitarb. (*129*) arm an B_6, also auch an Pyridoxalphosphat sind.

Die bisher besprochenen Wuchsstoffe waren zuerst als Vitamine erkannt und isoliert worden; in der Pantothensäure begegnen wir zum ersten Mal einem Wirkstoff, der lange Zeit nur als Wuchsstoff für *Hefe* bekannt war. Ihre Existenz wurde von WILLIAMS und Mitarb. (*438*) in den Jahren 1931—33 erwiesen, als ihnen eine weitere Aufspaltung des Bioskomplexes gelang und die Anreicherung einer Substanz möglich wurde, die neben *m*-Inosit und Aneurin für den Zuwachs bei einigen Hefestämmen erforderlich war. Später wurde auch in *Trichophyton interdigitale* erstmals ein *Schimmelpilz* gefunden, dessen Wachstum durch Pantothensäure beschleunigt wird (*263*). Erst 1939 konnte im WILLIAMS-schen Arbeitskreis (*438*) durch hydrolytische Spaltung eine Komponente der Pantothensäure, das *β-Alanin*, erhalten werden. Der Zufall wollte es, daß diese Forscher schon 3 Jahre vorher β-Alanin als Wuchsstoff verschiedener Hefestämme erkannt hatten, ohne sofort zu ahnen, daß in ihm ein Bestandteil der Pantothensäure vorlag. Dies hing wohl zum Teil damit zusammen, daß es erst in viel höheren Konzentrationen als Pantothensäure wirksam ist. Die zweite Komponente wurde zur gleichen Zeit als eine Polyoxycarbonsäure angesehen; ihre genaue Struktur konnte aber erst 1940 als *α, γ-Dioxy-β,β-dimethylbuttersäure* (Pantoylsäure) aufgeklärt werden (*438*). In der Pantothensäure sind die beiden Komponenten peptidartig miteinander verknüpft, ihre Struktur ist somit die folgende:

$$HO \cdot CH_2 \cdot C(CH_3)_2 \cdot CH(OH) \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH.$$

Inzwischen hatten SNELL, STRONG und PETERSON (*383*), (*384*), (*385*), s. a. (*452*) die Identität ihres Säure- und Alkali-labilen Faktors für *Milchsäurebakterien* mit der Pantothensäure gezeigt [vgl. a. MÖLLER (*252*), (*253*)]. Die Pantothensäure konnte auch den Leberfaktor für hämolysierende Streptokokken von HUTCHINGS und WOOLLEY (*132*) ersetzen. Weiterhin stellten MUELLER und KLOTZ (*269*) fest, daß Pantothensäure das Wachstum gewisser Diphtherie-Stämme weit besser, d. h. in kleineren Konzentrationen, ermöglicht als β-Alanin, das diese Autoren bereits 1937 als Wuchsstoff bei *B. dysenteriae* erkannt hatten (*266*), (*268*). Schließlich wurden Fälle mitgeteilt, zuerst von WOOLLEY (*456*) bei einem Stamm von *Streptococcus haemolyticus*, in denen die Pantoylsäure Pantothensäure ersetzen kann. Meist müssen recht hohe Konzentrationen dieser Komponente angewendet werden, z. B. bei *Proteus morganii* (*133*), (*134*) 10 000mal mehr als von Pantothensäure, die im Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-8} g/cm³ optimales Wachstum bei den verschiedenen Mikroorganismen ermöglicht. Die Bedürftigkeit weiterer Mikroorganismen an Pantothensäure und ihre Ersetzbarkeit durch die Komponenten, die durchaus derjenigen beim Aneurin vergleichbar ist, kann aus Tab. 4 ersehen werden. — Bald nach der

Tabelle 4. *Bedarf von Mikroorganismen an Pantothensäure und ihren Komponenten.*

Mikroorganismen	Stärke des Wachstums in Gegenwart von:				
	Panto-thensäure	Pantolacton + β-Alanin	Panto-lacton	β-Alanin	O
E. coli					
Proteus vulgaris					
Aerobacter aerogenes	+++	+++	+++	+++	+++
B. pyocyaneus					
B. subtilis					
Neurospora crassa (Wildstamm)	+++	+++	+++	+++	+++
Neurospora crassa (Mutante) .	+++				O
Milchsäurebakterien	+++	O ?	O	O	O
Propionsäurebakterien	+++				O
Streptokokken	+++	(+)	(+)	O	O
Pneumokokken	+++				O
Clostridien (einige Stämme) .	+++				O
B. paradysenteriae (gewisse Flexner-Stämme)	+++				O
C. diphtheriae . . . . . a)	+++	O	O	O	O
b)	+++	+++	O	+++	O
c)	+++	+++	+++	+++	+++
Saccharomyces cerevisiae . a)	+++	+++	O	++	O
b)	+++	+++	+(+)	+++	+(+)
c)	+++	+++	+++	+++	+++
Brucella suis 1662 u. a. . . .	+++	++	+	+	+−
Brucella abortus, B. suis (andere Stämme)	+++				++
Clostridium septicum	+++	++	++	O	O
Acetobacter suboxydans ATTC 621	+++	++	++	O	O
Sc. haemolyticus H 69 D . . .	+++	++	++	O	O
Proteus morganii	+++	+	+	O	O

Isolierung der Pantothensäure wurde auch ihr Vitamincharakter festgestellt; sie war identisch mit dem sog. Filtratfaktor bei Ratten, der als Wachstumsvitamin und Achromotrichiefaktor wirkt (*438*), (*358*), (*359*).

Nach SHIVE und Mitarb. (*362*) wird der Pantothensäure-Bedarf von *Proteus morganii* durch Citronen-, cis-Aconit-, α-Ketoglutar-, Oxalessig- und Brenztraubensäure mindestens auf den 10. Teil herabgesetzt (Pantothensäure-sparender Effekt). Da alle diese Substanzen dem Citronensäure-Cyclus angehören, wurde auf eine Beteiligung der Pantothensäure an der *Citronensäuresynthese* geschlossen. Ältere Befunde wiesen auf ein Eingreifen in die *Oxydation der Brenztraubensäure*. DORFMAN, BERKMAN und KOSER (*73*) sowie HILLS (*124*) konnten nämlich eine starke Erhöhung der Brenztraubensäure-Oxydation feststellen,

wenn Pantothensäure-arm ernährten *Proteus morganii*-Zellen Pantothensäure zugefügt wurde. Nach LIPMANNS (*212*) Untersuchungen weiß man heute, daß diese Oxydation über Essigsäure und „Acetylphosphat" führt. Die Reaktion Essigsäure → „Acetylphosphat", die man als Acetylierung der Phosphorsäure auffassen kann, und viele andere *Acetylierungen*, z. B. von Sulfonamiden zu Acetylsulfonamiden, von Cholin zu Acetylcholin, werden durch das sog. *Coenzym A* katalysiert. LIPMANN und Mitarb. (*213*), (*214*) fanden nun kürzlich, daß dieses Coenzym neben Adenylsäure, Phosphorsäure, Cystein, Glutaminsäure und anderen Aminosäuren *11* bis *12%* *Pantothensäure* enthält [1]. Bei der Anreicherung waren Aktivität und Pantothensäuregehalt parallel miteinander gestiegen. Glutaminsäure und Cystein sind wahrscheinlich peptidartig mit der COOH-Gruppe der β-Alanin-Komponente verbunden, Adenylsäure dürfte über Phosphat mit einer der OH-Gruppen der Pantoylsäure-Komponente verknüpft sein. Die andere OH-Gruppe scheint für die Funktion des Coenzyms A wesentlich zu sein und deshalb frei vorzuliegen (Coenzym A läßt sich z. B. mit Acetylphosphat „verestern") (*214a*). Damit ist also in jüngster Zeit auch die Pantothensäure als Bestandteil eines Coferments erkannt worden, das nicht nur in den *Kohlenhydrat-*, sondern auch in den *Fettstoffwechsel* eingreift, denn eine Verknüpfung der beiden besteht durch die Reaktionsfolge:

$$\text{Essigsäure} \xrightarrow{\text{Coenzym A } (+ B_1 + \text{Adenosintriphosphorsäure})} \text{„Acetylphosphat"}$$

$$\xrightarrow{\text{Coenzym A}} \text{Acetessigsäure } (387) \longrightarrow \text{Triacetsäure} \longrightarrow \text{Polyketofettsäuren} \longrightarrow \text{Fettsäuren.}$$

Es ist anzunehmen, daß die von SHIVE (*362*) vermutete Beteiligung der Pantothensäure an der „Citronensäure"-Synthese letzten Endes ebenfalls auf die Reaktion Essigsäure → „Acetylphosphat" zurückgeht. Ganz kürzlich zeigten in der Tat NOVELLI und LIPMANN (*283*), daß die Kondensation von Oxalessigsäure mit Acetat zu Citronensäure in Hefe durch Coenzym A + Adenosintriphosphat katalysiert wird. Bei *E. coli Werkmann Nr. 26* konnte Acetat + Adenosintriphosphat sogar durch *synthetisches* Acetylphosphat ersetzt werden, was weder bei der Citronensäuresynthese in Hefe und Taubenleber [s. z. B. STERN und OCHOA (*392*)], noch bei der Pyruvat-Synthese aus Acetat durch den benutzten *E. coli*-Stamm möglich ist [2]. Neben der Synthese der Acetessigsäure dürfte also

[1] Über zwei Formen von Coenzym A im Enzymkomplex der Leber-„Cyclophorase", die beide weniger Alkali-empfindlich sind als freie Pantothensäure (!), berichteten kürzlich NEILANDS, HIGGINS und STRONG (*271*).

[2] Weiteres über das Enzym-System der Citronensäure-Synthese in *E. coli*, *Cl. butylicum*, *Sc. faecalis*, *Azotobacter agilis*, *Mycobact. tuberculosis* und Hefe bei STERN, SHAPIRO und OCHOA (*392a*).

die Beteiligung am *Citronensäure-Cyclus* die *Hauptfunktion* des Coenzyms A darstellen.

SEVAG und GREEN (*361*) vermuten auf Grund der Ersetzbarkeit von Tryptophan durch Glucose + Pantothensäure beim Wachstum von 2 Staphylokokken-Stämmen, daß Pantothensäure auch in die Tryptophan-Synthese eingreift (s. S. 193ff.).

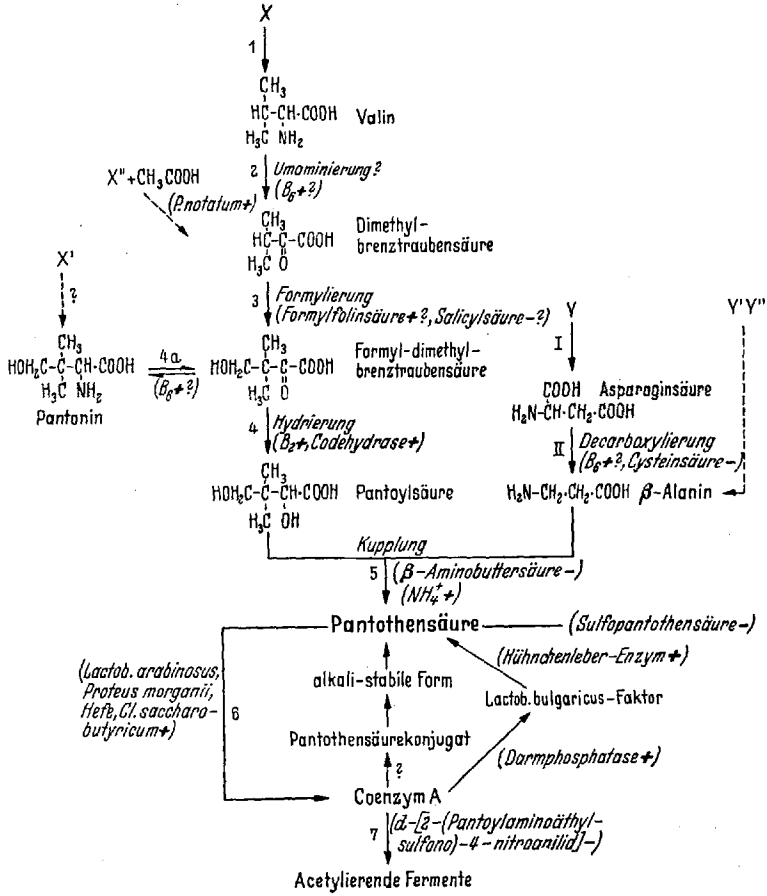


Abb. 6. Aufbau von Pantothensäure und Coenzym A.

Die Beteiligung der Pantothensäure an einer Acetylierung läßt sich einfach und eindeutig am folgenden mikrobiologischen Beispiel beweisen. Gewisse Stämme von *Streptobacterium plantarum* (*B. acetylcholini*) haben nach KEIL und Mitarb. (*146*), s. a. (*258*) die Fähigkeit, *Acetylcholin* zu bilden, eine Fähigkeit, die übrigens bis heute unter vielen untersuchten Mikroorganismen nur noch bei *Trypanosoma rhodesiense* (*38*) gefunden wurde. MARJORIE STEPHENSON (*391*), (*115*), (*326*) zeigte noch kurz vor ihrem Tode, daß die durch dieses Bakterium gebildete Acetylcholinmenge von der Pantothensäurekonzentration des Nähr-

mediums abhängig ist, und daß ferner Pantothensäure-arm ernährte Zellen in Puffer + Glucose + Cholin viel mehr Acetylcholin bilden, wenn Pantothensäure zugegeben wird.

Über den *Mechanismus der Pantothensäure-Synthese* haben sich R. KUHN und TH. WIELAND (*184*) schon 1942 Gedanken gemacht. Die biologische Entstehung der *β-Alanin-Komponente* durch Decarboxylierung von Asparaginsäure (s. Abb. 6, Schritt II) ist lange bekannt und kürzlich bei Bakterien *(Rhizobium trifolii, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Azotobacter vinelandii)* von LICHSTEIN und Mitarb. (*22*), (*63*) mittels des mikrobiologischen β-Alanin-Tests mit *Saccharomyces fragilis* exakt nachgewiesen worden. Schritt II wird durch Analoge der Asparaginsäure, z. B. Oxyasparaginsäure oder *l*-Cysteinsäure gehemmt, offenbar im kompetitiven Substratantagonismus bei der Asparaginsäuredecarboxylierung. Denn die β-Alanin- bzw. Pantothensäure-Synthese wachsender *E. coli*-Stämme ist nach SHIVE und Mitarb. (*316*), (*363*) vom Verhältnis der Konzentrationen *l*-Asparaginsäure/*l*-Cysteinsäure abhängig, und die Wachstumshemmung von *E. coli, Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus arabinosus* und *L. casei* durch nicht zu hohe Konzentrationen an *l*-Cysteinsäure, *d, l* (para)-Oxyasparaginsäure oder *m*-Diaminobernsteinsäure wird kompetitiv durch *l*-Asparaginsäure, nicht-kompetitiv durch β-Alanin oder besser Pantothensäure aufgehoben (*362*) (s. Abb. *7*).

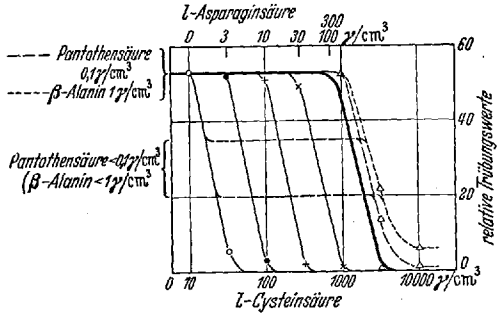


Abb. 7. Kompetitiver und nicht-kompetitiver Antagonismus bei der Hemmung von *E. coli* durch *l*-Cysteinsäure (nach tabellarischen Werten von J. M. RAVEL und W. SHIVE [1946] (*316*) erweitert).

Die ausgezogene Kurven-Schar zeigt deutlich den kompetitiven Antagonismus zwischen *l*-Cysteinsäure und *l*-Asparaginsäure. Bei 1000—3000 γ *l*-Cysteinsäure/cm³ hört das Gebiet ihrer spezifischen Hemmung auf: keine weitere Enthemmung durch steigende Asparaginsäure-Konzentrationen (fette Kurve). Bis zu diesem Konzentrationsgebiet erfolgt auch keine Hemmung in Anwesenheit schon *kleiner* Pantothensäure- (— — —) bzw. β-Alanin- (....) Mengen. Erniedrigt man die letzteren noch weiter, so werden die Kurven in anderer Richtung als beim kompetitiven Antagonismus verschoben. Im Gebiet der spezifischen Cysteinsäurehemmung treten Hemmungsniveaus auf, da die zugegebene Pantothensäure-(β-Alanin-)Menge zu optimalem Wachstum nicht mehr ausreicht.

Zum näheren Verständnis der *nicht-kompetitiven* Hemmung bzw. Enthemmung diene die folgende Erläuterung: Rein äußerlich kommt die Erscheinung dadurch zum Ausdruck, daß schon eine sehr kleine Konzentration an Wuchsstoff, theoretisch gerade diejenige, die zu optimalem Wachstum bedürftiger Stämme erforderlich ist, die Hemmung beseitigt. Diese Wuchsstoff-Konzentration ist ausreichend, um auch die Wirkung über ein großes Konzentrationsgebiet ansteigender Hemmstoff-Konzentrationen zu kompensieren. Hemmstoff und Wuchs-

stoff stehen also nicht in einem konstanten Verhältnis. Eine Hemmung bei Wuchsstoff-bedürftigen Stämmen ist sinngemäß nicht zu erreichen, denn bei diesen muß, um überhaupt Wachstum zu erhalten, schon die enthemmende Konzentration an Wuchsstoff anwesend sein. Hemmung tritt deshalb nur bei Stämmen ein, die den Wuchsstoff synthetisieren. Hieraus muß der Schluß gezogen werden, daß bei nicht-kompetitiver Enthemmung die *Synthese* des Wuchsstoffs durch den Antagonisten gehemmt wird. Wenn bereits ein Vorläufer des Wuchsstoffs nicht-kompetitiv enthemmt, muß natürlich die Synthese dieses Vorläufers gehemmt werden. Betrachten wir den etwas schwierig erscheinenden Fall des nicht-kompetitiven Antagonismus nochmals von der umgekehrten Seite: Wenn Hemmung des Wachstums durch Hemmung der Synthese des Wuchsstoffs zustande kommt, dann kann unter Bedingungen, die seine Synthese überflüssig machen (Zuführung des Wuchsstoffs von außen) überhaupt keine Wachstumshemmung mehr auftreten.

Wäre die Decarboxylierung der *l*-Asparaginsäure der einzige Weg, auf dem *β*-Alanin mikrobiologisch gebildet werden kann, dann müßten alle Mikroorganismen, die keine *l*-Asparaginsäure-Decarboxylase enthalten, *β*-Alanin als Wuchsstoff benötigen. Unter den von LICHSTEIN und Mitarb. (*22*), (*63*) als frei von *l*-Asparaginsäure-Decarboxylase gefundenen Stämmen: *Lactobacillus bulgaricus*, *L. casei*, *L. arabinosus*, *Streptococcus faecalis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Saccharomyces fragilis* u. a., *Micrococcus pyogenes aureus*, *Staph. aureus* und *Aerobacter aerogenes* kommen aber die untersuchten Stämme bei den beiden letzteren ohne Pantothensäure aus[1]. Einen weiteren Syntheseweg für *β*-Alanin könnte man vielleicht in der Hydrolyse des Anserins oder Carnosins erblicken. Das letztere ersetzt nach MUELLER (*267*) in der Tat *β*-Alanin als Wuchsstoff bei *C. diphtheriae*, wenn auch erst in 10fach höherer Konzentration. Jedoch können diese beiden Substanzen in *l*-Asparaginsäure-Decarboxylase-freien Mikroorganismen nicht als Vorläufer des *β*-Alanins angesehen werden, da ihre Synthese kaum anders als aus den Bruchstücken *l*-Histidin bzw. *l*-Methylhistidin und *β*-Alanin(!) denkbar ist. Schließlich liegen in der Reaktion von C_3-Körpern der Glykolyse mit NH_3 noch verschiedene Bildungsmöglichkeiten des *β*-Alanins [ENDERS (*87*), NIELSEN und HARTELIUS (*274*), (*118*)].

Für die *Synthese der Pantoylsäure-Komponente* der Pantothensäure nehmen KUHN und WIELAND (*184*) Valin als Muttersubstanz an, das

[1] Möglicherweise enthielten diese Stämme auch nur *so wenig* *l*-Asparaginsäure-Decarboxylase, daß sie sich der angewendeten Bestimmungsmethode entzog. Hierfür spricht, daß viele *Aerobacter*-Stämme Zuwachseffekte mit Pantothensäure zeigen [KING u. CHELDELIN (*151a*)], manche Staphylokokken dieselbe sogar unbedingt benötigen [MÖLLER, WEYGAND u. WACKER (*261*)], mithin das Synthesevermögen für Pantothensäure durch diese Bakterienarten nur gering sein dürfte. — Umgekehrt besteht übrigens völlige Klarheit: Alle *l*-Asparaginsäure-Decarboxylase-haltigen Bakterien (s. S. 176) hatten kein Wuchsstoffbedürfnis für Pantothensäure.

über Dimethylbrenztraubensäure[1] und Formyldimethylbrenztraubensäure in Pantoylsäure übergehen könnte. Nur der letzte Schritt (Abb. 6, Schritt 4) ist biologisch verifiziert worden: gärende Hefe ist in der Lage, diese Hydrierung auszuführen. Die Kuhn-Wielandsche Hypothese gewann sehr an Wahrscheinlichkeit, als Iványovics (*134*) zeigen konnte, daß die Pantothensäuresynthese von *Esch. coli* durch Caseinhydrolysat auf das 8fache gesteigert wird. Weiterhin wird die spezifische Hemmung durch *Salicylsäure*[2] bei *E. coli* nicht nur nicht-kompetitiv durch Pantothensäure oder höhere Konzentrationen Pantoylsäure aufgehoben, woraus ersichtlich ist, daß die Synthese der Pantoylsäure gehemmt wird, sondern auch durch verschiedene α-Aminosäuren, bes. Valin, Leucin, Isoleucin und Lysin. Aus den 3 letzteren Aminosäuren könnten sich analog dem Kuhn-Wielandschen Schema entsprechende Homologe der Pantothensäure bilden, von denen auch bekannt ist, daß sie bei gewissen Bakterien Pantothensäure mehr oder weniger gut ersetzen (*132*), (*434*). Da Valin wahrscheinlich kompetitiv enthemmt, was man aus den Iványovicsschen Versuchen (*135*), (*136*), (*137*), (*138*), (*139*) nur vermuten kann, dürfte die Valinsynthese nicht durch Salicylsäure gehemmt werden. Daß aber auch Schritt 4 für diese Hemmung nicht in Frage kommt, zeigt die Enthemmbarkeit von Salicylsäure mit Pantonin = α-Aminopantoylsäure, die nach Ackermann und Shive (*2*) mit denselben Konzentrationen wie mit Pantoylsäure gelingt. Pantonin kann zwar bei *Acetobacter suboxydans* (*2*) Pantoylsäure genau so wenig ersetzen wie die entsprechende α-Aminopantothensäure die Pantothensäure bei *Streptobacterium plantarum* (*432*), aber es wird durch *E. coli* leicht in Pantoylsäure umgewandelt (*2*) (Schritte 4a und 4). Da also offenbar die Pantoylsäure der eigentliche Enthemmstoff ist[3], können die zu dessen Bildung notwendigen Schritte nicht der Angriffspunkt der Salicylsäurehemmung sein. Dies gilt sicher auch für Schritt 2, der Schritt 4a analog ist (Ketosäure → Aminosäure). Als Angriffspunkt

[1] Dimethylbrenztraubensäure ist von Hockenhull, Ramachandran und Walker (*124 a*) kürzlich auch als Zwischenprodukt der Penicillinsynthese in *P. notatum* erkannt worden (Vorstufe des Bausteins β-Oxyvalin). Es soll aus Acetat gebildet werden. Die Säure ist übrigens schon 1935 durch den Japaner Gida [zitiert bei Hockenhull u. Mitarb. (*124 a*)] als normales Stoffwechselprodukt von *Aspergillus niger* aufgefunden worden.

[2] Eine ähnliche Wirkung besitzen *Mandelsäure* und *Phenylglyoxylsäure* [Pérault u. Greib (*297*)], sowie *2-Chlor-4-aminobenzoesäure* [King, Stearman u. Cheldelin (*154*)]. Die hemmende Wirkung nicht zu hoher Konzentrationen der letzteren wird durch *p*-Aminobenzoesäure kompetitiv, durch Pantothensäure nicht-kompetitiv aufgehoben [King u. Cheldelin (*151 a*)].

[3] Pantonin erscheint im Wieland-Kuhnschen Schema höchstens als *Neben-*, nicht als Zwischenprodukt der Pantyolsäure-Synthese, für welch letzteres Ackermann u. Shive (*2*) es halten. Sein natürliches Vorkommen [Ackermann u. Kirby (*1*)] dürfte nicht sicher erwiesen sein.

der Salicylsäurehemmung bliebe also nur Schritt 3 übrig, die Formylierung der Dimethylbrenztraubensäure. Vielleicht wird diese durch Formylfolinsäure ermöglicht, die nach SHIVE und Mitarb. (*104*) ein Formylierungskatalysator bei der Synthese von Purinen sein soll.

Unter den von IVÁNOVICS (*134*) gefundenen Aminosäuren, welche die Salicylsäurehemmung aufzuheben vermögen, befinden sich auch solche, bei denen der Aufbau nach dem KUHN-WIELANDschen Schema nicht zu aktiven Pantoylsäure-Analogen führt. Da ihre Wirkung durch Methionin ganz erheblich verstärkt wird, wäre zu erwägen, ob nicht auch ein anderer Weg der Pantoylsäuresynthese möglich ist, bei dem Methionin die Einführung von Methylgruppen, vielleicht in bestimmte Umwandlungsprodukte unverzweigter Aminosäuren besorgt (*Transmethylierung*).

Die Vereinigung der beiden Komponenten (Schritt 5) gelingt nach MÖLLER und WIELAND (*433*) mit einem Enzympräparat aus Hefe (Rasse M). Dabei wirken NH_4^+-Ionen fördernd. Als Zwischenprodukt wurde deshalb Pantoylsäureamid vermutet, das durch „Umamidierung" mit β-Alanin Pantothensäure bilden könnte. Pantoylsäureamid erwies sich jedoch als weniger aktiv als Pantolacton. KUHN und WIELAND (*184*) nehmen an, daß die „Kupplung" auch schon bei früheren Teilschritten einsetzen, daß also etwa Valylasparaginsäure die Muttersubstanz der Pantothensäure sein könnte. Eine Hemmung der „Kupplung" müßte theoretisch von 2 Seiten aus möglich sein, einmal durch Verdrängung von β-Alanin, das andere Mal von Pantoylsäure. Die Wachstumshemmung von Hefe durch β-Aminobuttersäure, Taurin oder Serin (*272*), (*273*), (*275*), (*276*), (*117*), und von Hefe und *Acetobacter suboxydans* durch Propionsäure (*151*) läßt sich nur im Sinne einer β-Alaninverdrängung erklären [1], denn bei den β-Alanin-benötigenden Hefen zeigt β-Alanin kompetitive, Pantothensäure nicht-kompetitive Enthemmung. Beim β-Alanin-synthetisierenden Acetobacter-Stamm wirken erst höhere Propionsäurekonzentrationen hemmend, und die enthemmenden β-Alanin-Konzentrationen liegen ganz entsprechend höher. Für den zweiten Fall ist mir bisher kein Beispiel bekannt geworden: die Hemmung durch γ-Oxybuttersäure, die als Analogon der Pantoylsäure aufzufassen ist, ist bei *Clostridium septicum* (Pantoylsäure-synthetisierende *und* -benötigende Stämme) nicht sehr stark und deshalb wohl unspezifisch (*329*) Für viele Pantothensäure-bedürftige *Neurospora*-Mutanten muß ebenfalls ein Mechanismus angenommen werden, der die Vereinigung der beiden Komponenten behindert, und *keine* genetische Blockierung der *Synthese* der Komponenten oder des „Kupplungs"-Enzyms, die sich alle nach WAGNER (*423*), (*424*) in ausreichender Konzentration in den Extrakten solcher Mutanten nachweisen lassen. Da die oben genann-

[1] Siehe dagegen die Versuche mit Propionsäure an *E. coli*, *B. subtilis* und Schimmelpilzen von WRIGHT und SKEGGS (*471*) und mit Taurin an *Cl. septicum* von RYAN, SCHNEIDER und BALLENTINE (*329*).

ten Hemmstoffe der „Kupplung" sämtlich normale Stoffwechselprodukte sind, ist es durchaus denkbar, daß der zu Pantothensäure-Bedarf führende Mutationsschritt eine Überproduktion solcher oder ähnlicher Substanzen auslöst.

Der *weitere Aufbau* der Pantothensäure zu Coenzym A schließlich (Schritt 6) kann nach NOVELLI und LIPMANN (*281*), (*282*) z. B. von *Lactobacillus arabinosus*, *Proteus morganii* und *Saccharomyces cerevisiae* ausgeführt werden. Bietet man Pantothensäure-bedürftigen Mikroorganismen einen Überschuß von Pantothensäure an, so wird diese vollständig zu Coenzym A umgewandelt und in dieser Form (?) gespeichert. Bei Pantothensäure-synthetisierenden Stämmen tritt jedoch keine Speicherung auf, sondern Ausscheidung der überproduzierten Menge in das Nährmedium, und zwar in Form von *freier* Pantothensäure. Nach COHEN, COHEN-BAZIRE und MINZ (*57*) kann Coenzym A durch *Clostridium saccharobutyricum* (GR_4), das Brenztraubensäure mit Hilfe dieses Coenzyms über Acetessigsäure (?) in Buttersäure umwandelt, aus Pantothensäure nur in Anwesenheit von Phosphat, Glucose und *Glutaminsäure* gebildet werden. Die letztere läßt sich durch keine andere Aminosäure ersetzen. Das kann dahin ausgelegt werden, daß Glutaminsäure ein integrierender Bestandteil von Coenzym A ist. Ein partieller Abbau des Coenzyms A gelingt mit *Leberextrakten* (*280*), wobei es in das sog. Pantothensäure-Conjugat übergeht, das schon CHELDELIN und Mitarb. (*152*), (*153*) aus Schweineherz isolieren konnten. und das wahrscheinlich nur noch Pantothensäure, Glutaminsäure und Phosphorsäure enthält. Ein weiteres enzymatisches Abbauprodukt ist vermutlich identisch mit der sog. alkali-stabilen Form der Pantothensäure von NEAL und STRONG (*270*). Obwohl das Conjugat keine Coenzym A-Aktivität mehr besitzt, ist es als Wuchsstoff, wie das Coenzym selbst z. B. bei *B. suboxydans*, mindestens 2 mal aktiver als Pantothensäure (auf gleiche Pantothensäuremengen umgerechnet), bei *L. arabinosus* und vielen anderen Milchsäurebakterien aber völlig inaktiv. Dagegen ist beim Wachstum von *L. arabinosus* die „alkalistabile Form" aktiver als Pantothensäure (*152*), (*153*), (*279*).

Coenzym A läßt sich durch Leberextrakt + Darmphophatase quantitativ zu Pantothensäure abbauen [s. z. B. LIPMANN (*214a*)]. Bei alleiniger Verwendung von Darmphophatase entsteht, wie SNELL und Mitarb. (*37a*) ganz kürzlich fanden, ein weiteres Pantothensäure-Derivat, das wahrscheinlich mit dem sog. *Lactobacillus bulgaricus*-Faktor von WILLIAMS, HOFF-JÖRGENSEN und SNELL (*446a*) identisch ist (s. Abb. 6)[1]. Dieser neue Wuchsstoff, der nur für einige Stämme von *L. bulgaricus* und *L. helveticus* notwendig ist, wird von vielen anderen Milchsäurebakterien, Hefen und Schimmelpilzen synthetisiert, vor allem von

[1] CHELDELINS Conjugat hat keine *L. bulgaricus*-Faktor-Aktivität (*37a*).

Ashbya gossypii NRRL-1056, die 3- bis 5mal mehr als durchschnittlich Hefen erzeugt (*315a*). Aus letzteren wurde der Faktor in fast reinen Präparaten isoliert, die nach Verdauung mit Leberenzym den sehr hohen Pantothensäure-Gehalt von 65—75% (mikrobiologisch) ergeben haben. Diese Ergebnisse und die bisher bekannten Tatsachen über CHELDELINS Faktor und die Konstitution von Coenzym A (s. S. 174) berechtigen dazu, im *L. bulgaricus*-Faktor ein Peptid der Pantothensäure mit Glutaminsäure (oder Cystein) zu erblicken. SNELL und Mitarb. (*37a*) sowie W. L. WILLIAMS (*241a*) zeigten des weiteren, daß Pantothensäure nicht nur *L. bulgaricus*-Faktor-sparende Wirkung besitzt, sondern daß sie (bzw. äquimolare Mengen Coenzym A) in sehr hohen Konzentrationen diesen Faktor ersetzen kann (bei bedürftigen *L. bulgaricus*- und *L. helveticus*-Stämmen). Somit dürfte also der *L. bulgaricus*-Faktor ein Zwischenprodukt der biologischen Coenzym A-Synthese aus Pantothensäure sein. Dagegen spricht nicht, daß er nur mittlere Pantothensäure-Aktivität für *L. casei*, schwache für *L. arabinosus*, gar keine für *Saccharomyces carlsbergensis* zeigt. Hieraus muß vielmehr geschlossen werden, daß in diesen Mikroorganismen nur wenig bzw. gar kein spaltendes Enzym vorkommt, und daß Pantothensäure nicht nur Vorstufe des *L. bulgaricus*-Faktors und des Coenzyms A ist, sondern noch andere Funktionen zu erfüllen hat.

Der Aufbau über die Pantothensäure-Stufe hinaus (Schritt 6) wird durch viele ihrer Analoga antagonistisch beeinflußt; sie wirken alle mehr oder weniger kompetitiv gegenüber dem Wuchsstoff. Interessant ist das Verhalten der *Oxypantothensäure* (*250*), die bei verschiedenen Milchsäurebakterien und Hefestämmen 1 bis 25% der Wuchsstoffaktivität der Pantothensäure entfaltet, in höheren Konzentrationen aber „sich selbst" hemmt. — Das erste stark hemmende Analogon wurde in der *Sulfopantothensäure* = Pantoyltaurin fast gleichzeitig von SNELL (*372*), (*373*), KUHN, WIELAND und MÖLLER (*185*) und MCILWAIN (*232*), (*233*) gefunden. In ihr ist β-Alanin durch sein Sulfonsäureanalogon, das natürlich vorkommende Taurin, ersetzt. Die Autoren erwarteten von ihr eine gute Hemmwirkung in Analogie zu dem damals gerade bekannt gewordenen Antagonismus zwischen Sulfonamiden und *p*-Aminobenzoesäure (*455*), (*259*). In Abb 8a ist die Hemmung von *Streptobacterium plantarum* durch die beiden optischen Antipoden der Sulfosäure wiedergegeben. Man ersieht die besondere Spezifität dieser Hemmung daraus, daß nur derjenige optische Antipode nennenswert hemmt, der mit der optischen Konfiguration der natürlichen (+)-Pantothensäure übereinstimmt. Als Wuchsstoff hatte sich nämlich auch nur die (+)-Pantothensäure als aktiv erwiesen. Die Enthemmung ist über ein großes Konzentrationsgebiet streng kompetitiv, wie aus den Enthemmungskurven in Abb. 8b hervorgeht. Das konstante Verhältnis zwischen Sulfonsäure

und Carbonsäure beträgt unter den vorliegenden Bedingungen etwa 2000:1 und wird als Bakteriostatischer Index bezeichnet [1]. Ganz kürzlich fanden KING und CHELDELIN (*151a*), daß Pantoyltaurin durch Pantothensäurekonjugat in nicht-kompetitiver Weise enthemmt wird, was darauf schließen läßt, daß das Konjugat in den Zellen aus Pantothensäure aufgebaut wird und entweder selbst ein Coferment oder die Vorstufe eines solchen (z. B. von Coenzym A) ist. — Von weiteren Analogen der Pantothensäure ist noch *Phenylpantothenon*

$$CH_2(OH) \cdot C(CH_3)_2 \cdot CH(OH) \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot C_6H_5$$

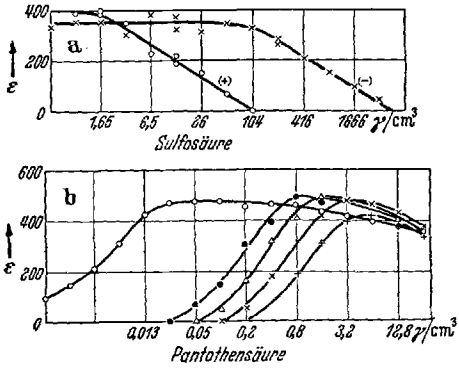


Abb. 8. Antagonismus zwischen Pantothensäure und Sulfopantothensäure bei *Streptobacterium plantarum* 10 S (nach R. KUHN, Th. WIELAND u. E. F. MÖLLER [1941] (*185*)).

a) Hemmung durch die beiden optischen Antipoden der Sulfosäure bei etwa optimaler Pantothensäure-Konzentration. b) Enthemmung steigender Konzentrationen der (+)-Sulfosäure durch Pantothensäure.

○———○ 0 γ (+)-Sulfosäure/cm³
●———● 52 γ (+)- „ „
△———△ 104 γ (+)- „ „
×———× 208 γ (+)- „ „
+———+ 416 γ (+)- „ „

bemerkenswert, das ebenfalls in Anlehnung an einen *p*-Aminobenzoesäure-Antagonisten, und zwar das *p*, *p'*-Diaminobenzophenon von AUHAGEN (*5*), s. a. (*180*) durch WOLLEY und COLLYER (*462*) synthetisiert wurde. Es ist ein sehr wirksamer Antagonist der Pantothensäure und hemmt nicht nur Pantothensäure-bedürftige sondern auch viele Pantothensäure-synthetisierende Stämme (nicht jedoch *E. coli*). Der Befund, daß bei den letzteren eine Enthemmung mit Pantothensäure meist nicht gelingt, ist noch ungeklärt.

Genau so wie der an der Pantothensäure beginnende Aufbau muß natürlich auch ihr *Abbau* durch Analoga hemmbar sein. Da aber die Verdrängung u. U. an einem anderen Fermentprotein erfolgt, kann die Wirksamkeit ein und desselben Analogons in beiden Fällen äußerst verschieden sein. In der Tat konnte MCILWAIN (*234*), der die Beziehungen von Sulfopantothensäure zu Wachstum, Glykolyse, Pantothensäureaufbau und -abbau in einer Reihe umfangreicher Arbeiten besonders eingehend studiert hat, in der Sulfopantothensäure einen Hemmstoff finden, der den Pantothensäureabbau durch bestimmte Streptokokkenstämme schon bei einem Verhältnis Sulfonsäure/Carbonsäure = 10:1 um mindestens 80% hemmt. Der Abbau ist mit der Glykolyse gekoppelt, aber

[1] Man gibt ihn am besten als Quotienten der molaren Konzentrationen bei 50%iger Hemmung an.

nicht so eng, daß auch die Pantothensäure in diesen Stoffwechselvorgang eingreift. Über den Abbauweg ist bisher nichts bekannt geworden. Die Vereinigung des Coenzyms A mit seinem spezifischen Protein (Schritt 7) wird offenbar durch *d-[2-(Pantoylamino)äthylsulfono]-4-nitroanilid* gehemmt, daß sich nach COHEN und Mitarb. (*56*), (*57*) wie ein Analogon des Coenzyms A, nicht wie ein solches der Pantothensäure verhält. Denn die durch das Nitroanilid hervorgerufene Hemmung der Buttersäurebildung von *Clostridium saccharobutyricum* (GR 4) tritt noch in Anwesenheit physiologischer Coenzym-A-Konzentrationen auf. Da der Antagonist ein N-substituiertes Sulfosäureamid ist, glauben die Autoren, daß auch im Coenzym A eine amidartige Bindung vorliegt, und zwar zwischen der freien Carboxylgruppe der Pantothensäure und einem weiteren Baustein (Glutaminsäure ?).

In der Tab. 5 (s. S. 184/*85*) sind die 6 bisher bekannt gewordenne Typen der Pantothensäure-Antagonisten, ihr charakteristisches mikrobiologisches Verhalten und die daraus gezogenen Schlüsse nochmals zusammengestellt.

VI. Biotin.

Biotin als Wuchsstoff (Bioskomponente) und Vitamin. Biotin-Analoga als Wuchs- und Hemmstoffe. Aufbau des Biotins aus Pimelinsäure und Cystein, des Desthiobiotins aus Pimelinsäure und α-Alanin; Hemmung einzelner Aufbaustufen durch Antagonisten. Wirkungsmechanismus des Avidins. Biotin als Bestandteil eines Coferments der WOOD-WERKMAN- und ähnlicher Reaktionen (Kohlenhydratstoffwechsel), verschiedener Aminosäuredesaminasen (Eiweißstoffwechsel) und sein Eingreifen in die Synthese der Ölsäure aus Acetat (Fettstoffwechsel).

Biotin stellt ein interessantes Beispiel dar für einen Wirkstoff, dessen biologische Bedeutung in ganz verschiedenen biologischen Testen gefunden wurde. Jahrelang blieb der Zusammenhang zwischen diesen verborgen, bis dann schlagartig mit der Entdeckung der Identität der „einzelnen" Faktoren eine ungeheure Bereicherung unserer Kenntnisse einsetzte. Eine ganz ähnliche Entwicklung nahm auch die Erforschung vieler erst in jüngster Zeit in den Mittelpunkt des Interesses gerückter Wirkstoffe, wie z. B. der Folinsäure und des Vitamins B_{12}.

BOAS (*25*) studierte schon 1927 eine Mangelkrankheit an Ratten, die durch eine an rohem Eiklar sehr reiche Diät entstand. Aber erst im Jahre 1940 wurde die Identität des Faktors, der diese Krankheit heilt (Vitamin H), mit Biotin durch GYÖRGY, MELVILLE, BURK und DU VIGNEAUD (*111*) bewiesen.

Ausgehend von den älteren Untersuchungen des LASH-MILLERschen Arbeitskreises [z. B. (*194*)] über die komplexe Natur des WILDIER-IDESchen Bios suchten KÖGL und TÖNNIS (*164*) den als Bios IIb bezeichneten, an Kohle adsorbierbaren Faktor anzureichern. Es gelang ihnen im Jahre 1935 mit Hilfe eines genau ausgearbeiteten Tests mit

Tabelle 5. *Antagonisten der Pantothensäure.*

Antagonisten	Hemmung	Enthemmung durch				Wirkungsmechanismus
		Pantothensäure	Pantolacton	β-Alanin	andere Substanzen	
d-(2-(Pantoylamino)-äthylsulfono)-4-nitroanilid	*Cl. saccharobutyricum*	—	—	—	+ kompetitiv Coenzym A	Hemmung der Vereinigung vom Coenzym A mit dem zugehörigen Apoenzym (durch Verdrängung von Coenzym A)
d-Sulfopantothensäure	nur bei Pantothensäure-bedürftigen (oder wenig synthetisierenden) Stämmen: *Sbm. plantarum*	+ kompetitiv	—	—	+ nicht-kompetitiv Pantothensäure-Konjugat	Hemmung des Aufbaus zu Coenzym A bzw. einer Vorstufe desselben (durch Verdrängung von Pantothensäure)
Phenylpantothenon	auch bei Pantothensäure-synthetisierenden Stämmen	+ kompetitiv (meist nur bei bedürftigen Stämmen)	—	—		
β-Aminobuttersäure (Propionsäure)	nur bei Stämmen, die β-Alanin-bedürftig sind (oder es wenig synthetisieren): Hefe (*Acetob. suboxydans*)	+ nicht-kompetitiv	—	+ kompetitiv		Hemmung der Synthese aus den Komponenten (durch Verdrängung von β-Alanin)

Salicylsäure	nur bei Stämmen, die Pantothensäure (Pantoylsäure) synthetisieren: Staphylokokken, *B. coli*, (Hefe)	+ nichtkompetitiv			+ kompetitiv (?) Valin, Lysin, Leucin, Isoleucin; ander Aminosäuren, bes. in Kombination mit Methionin	Hemmung der Synthese von Pantoylsäure
l-Cysteinsäure	nur bei Stämmen, die Pantothensäure (β-Alanin) synthetisieren: *B. coli*	+ nichtkompetitiv	+ nichtkompetitiv	+ nichtkompetitiv	+ kompetitiv *l*-Asparaginsäure	Hemmung der Synthese von β-Alanin aus Asparaginsäure (durch Verdrängung von Asparaginsäure)

Hefe (Rasse M) eine krystallisierte Substanz aus chinesischem Enteneigelb zu gewinnen, deren Wirksamkeit im Bereich von 10^{-9} g/cm³ lag und die sie nun *Biotin* nannten. Es ist der wichtigste Faktor des Bioskomplexes.

Etwa um dieselbe Zeit erkannten ALLISON, HOOVER und BURK (*4*) die Existenz einer hochaktiven Substanz — Coenzym R — die verschiedene Stämme der Knöllchenbakterien (*B. radicicola* = *Rhizobia*) zum Wachstum benötigen und die auch ihre Atmung steigert. Von *Azotobacter*-Stämmen wird sie jedoch reichlich synthetisiert (*3*). NILSON, BJÄLFVE und BURSTRÖM (*277*) sowie WEST und WILSON (*428*) zeigten dann 1939, daß sich Coenzym R quantitativ durch Biotin ersetzen läßt.

Die ersten Untersuchungen über das Biotinbedürfnis von *Schimmelpilzen* stammen von KÖGL und FRIES (*163*), solche über das von *Protozoen* von KIDDER und DEWEY (*150*). Danach sind noch bei zahlreichen weiteren Mikroorganismen Biotin-bedürftige Stämme gefunden worden, unter den *Bakterien* besonders bei Milchsäurebakterien, Brucellen, Clostridien, Streptokokken, weniger bei Staphylokokken, vereinzelt bei Proteus.

Die *Konstitution* des Biotins wurde von DU VIGNEAUD und Mitarb. (*416*) endgültig aufgeklärt (s. Formel). Bei den bis jetzt synthetisierten zahlreichen *Analogen* fällt besonders auf, daß sie nicht entweder Wuchsstoffe *oder* Antagonisten sind, gleichgültig welcher Mikroorganismus vor-

liegt, sondern daß ein Analogon für *einen* Stamm Wuchsstoff, für den *anderen* Hemmstoff sein kann. So hemmt z. B. *Biotinsulfon* (s. Formel) das Wachstum von *Lactobacillus casei, L. arabinosus, Staphylococcus aureus* und verschiedene Pneumokokken, während es bei *Saccharomyces cerevisiae* Biotin vertritt (*72*). Ein besonders interessanter Stoff ist das *Oxybiotin* (früher auch Heterobiotin genannt) (*127*), (*128*), (*8*), (*9*), (*178*), das bei Hefe in der doppelten, bei verschiedenen Milchsäurebakterien sogar in der gleichen Konzentration Biotin ersetzen kann; es wird aber durch Hefe, wie durch verschiedene Methoden exakt bewiesen wurde, nicht in Biotin übergeführt [s. dagegen (*327*)], muß also die Funktionen [1] des Biotins übernehmen können. Dies ist der erste Fall, daß eine

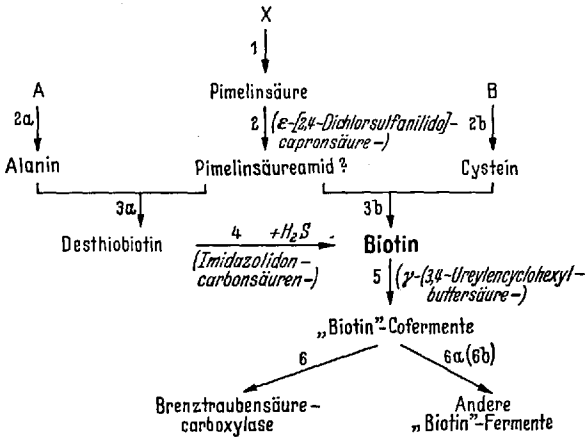


Abb. 9. Aufbau von Biotin und „Biotin"-Fermenten.

schwefelhaltige Verbindung nach Eliminierung des Schwefels noch ihre biologische Aktivität beibehält. Auch das *Desthiobiotin* (*70*) (s. Formel) ist bei Hefe als Wuchsstoff wirksam; es wird aber durch diese [2] quantitativ in Biotin übergeführt (*69*). Bei *L. casei* hemmt es, bei *L. pentosus* 124—2 verhält es sich indifferent [s. f. (*210*)].

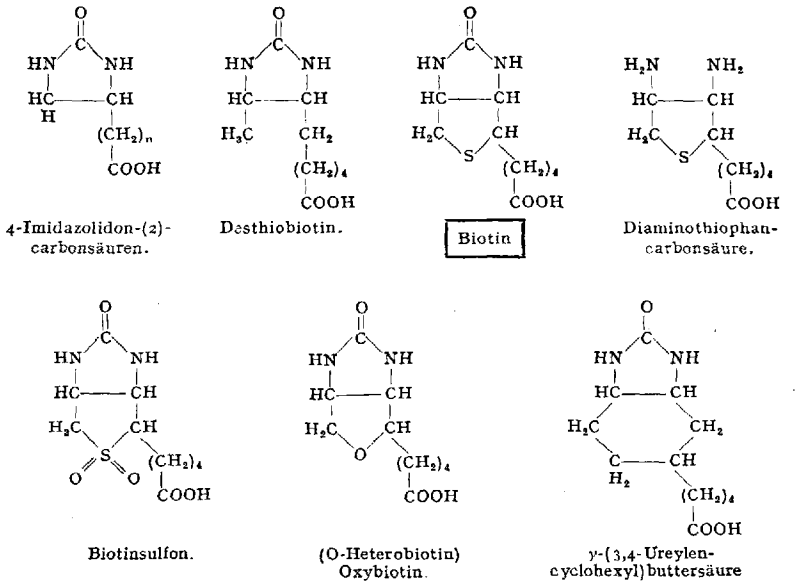
Bisher sind *2* Wege des *Biotin-Aufbaus* in Mikroorganismen erkannt worden, die beide von der *Pimelinsäure* ausgehen (s. Abb. 9). Mit dieser

[1] Nach POTTER und ELVEHJEM (*305*) übernimmt Oxybiotin am wenigsten gut die Funktionen der Brenztraubensäurecarboxylase (s. S. 190), denn das Wachstum von *L. arabinosus in Abwesenheit von Asparaginsäure* erreicht mit Oxybiotin erst bei höheren p_H-Werten das mit Biotin erzielbare, wozu überdies mindestens 3mal mehr Oxybiotin als Biotin erforderlich ist. — Weitere Arbeiten über die Stoffwechselfunktion von Oxybiotin, sowie von Desthiobiotin, „Homobiotin" und „Norbiotin" siehe bei BELCHER und LICHSTEIN (*17a*), VILLELA und CURY (*419*) und WRIGHT (*468a*).

[2] Über die Umwandlung von Desthiobiotin in Biotin durch *andere* Hefen und Schimmelpilze s. LEONIAN und LILLY (*198*).

war bereits 1937 von MUELLER (*264*) ein aus Harn isolierter Wuchsstoff für verschiedene Diphtherie-Stämme (Park 8, Allen) identifiziert worden. 1942 konnten DU VIGNEAUD und Mitarb. (*417*) beim Allen-Stamm Pimelinsäure durch Biotin ersetzen, das sich (auf molarer Basis) nur bei kleineren suboptimalen Konzentrationen wirksamer als Pimelinsäure erwies. Die Synthese des Biotins aus Pimelinsäure läßt sich nicht nur an Diphtherie-, sondern auch bei *Aspergillus niger*-Stämmen zeigen, bei den letzteren besonders schön, da dieser Schimmelpilz weder Pimelinsäure noch Biotin zum Wachstum benötigt. EAKIN und EAKIN (*76*) fanden, daß Zugabe von $2 \cdot 10^{-6}$ g Pimelinsäure/cm³ die Biotinsynthese auf das mehr als 100fache erhöht. Bei beiden Mikroorganismen wird diese noch durch *Cystein*, das als der 2. Biotinbaustein anzusehen ist, gesteigert. — Bei der anderen Biotinsynthese wird der Schwefel erst nachträglich eingebaut, sie geht also von schwefelfreien Bausteinen aus. Die schwefelfreie Vorstufe erwies sich als Desthiobiotin, das sich nach AUHAGEN (*7*) z. B. in *E. coli* anreichert. Eine solche Anreicherung ist noch ausgesprochener in einer Mutante von *Penicillium chrysogenum*, bei der Schritt 4 (Desthiobiotin → Biotin) genetisch blockiert ist (*400*). Die Unterbindung dieser Reaktion ist auch durch einen Antagonisten möglich, die 4-Imidazolidon(2)-capronsäure (s. untenstehende Formeln).

Konstitution von Biotin und von verschiedenen Biotin-Analogen.



Denn das in Anwesenheit dieses Desthiobiotin-Analogons gehemmte Wachstum von *E. coli* wird nach ROGERS und SHIVE (*324*), (*71*) durch

Desthiobiotin kompetitiv, durch Biotin nicht-kompetitiv enthemmt. Daß Pimelinsäure auch die Vorstufe von Desthiobiotin ist, folgt aus der weiteren Anhäufung dieser Substanz bei Zugabe von Pimelinsäure zu *Penicillium chrysogenum* (*400*). Der zweite Baustein müßte bei dieser Synthese *Alanin* an Stelle von Cystein sein. — In beiden Synthesen fehlt noch ein 3. Baustein, für den formal Ammoniak genügen würde. Es ist deshalb daran zu denken, daß dieser womöglich vorher eingebaut wird, und deshalb vielleicht Pimelinsäureamid als die direkte Vorstufe des Biotins bzw. Desthiobiotins anzusehen wäre (Schritte 3a, 3b). Ob die kürzlich von E. WORK (*467*) in Diphtherie-Bakterien entdeckte α,ε-Diaminopimelinsäure eine Vorstufe des Biotins ist, wurde noch nicht untersucht. Eine Hemmung der Biotinsynthese durch Verdrängung von Pimelinsäure mit verschiedenen ihrer Sulfonsäureanalogen und deren Amiden (Schritt 2, 3a, 3b) erscheint fraglich, da IVÁNOVICS und VARGHA (*140*) weder bei Pimelinsäure-bildenden noch -benötigenden Diphtherie-stämmen und auch nicht bei *E. coli*, Staphylokokken und Streptokokken Wachstumshemmung durch diese Substanzen beobachten konnten. Jedoch gelang ganz kürzlich WOOLLEY (*461*) eine Verdrängung der Pimelinsäure mit ε-[2,4-Dichlorsulfanilido]-capronsäure, die der Theorie entsprechend bei allen untersuchten Biotin-synthetisierenden Stämmen (*B. tenuis*, *Acetobacter suboxydans*, *Mycobacterium tuberculosis*) mit Ausnahme von *E. coli* Hemmung zeigt, Biotin-bedürftige Individuen jedoch unbeeinflußt läßt. Des weiteren ist die Enthemmung mit Pimelinsäre kompetitiv, mit Biotin nicht-kompetitiv (*B. tenuis*).

Es ist schon erwähnt worden, daß die Diät bei den Vitamin H-Testen eine auffallend große Menge rohes Eiklar enthält, was zu der Vermutung Anlaß gab, daß Biotin gar nicht in der Diät fehlt, sondern nur durch Bindung an Eiweiß inaktiviert ist. In der Tat konnten EAKIN, SNELL und WILLIAMS (*77*) einen mikrobiologischen Antagonisten des Biotins im Eiklar nachweisen. Diese Autoren, sowie WOOLLEY und LONGSWORTH (*465*) reicherten den Faktor aus Eiklar an und charakterisierten ihn als ein Albumin vom ungefähren Molekulargewicht 70 000. PENNINGTON, SNELL und EAKIN (*296*) gewannen ihn in krystallisierter Form und zeigten, daß er überdies noch eine Kohlenhydrat-Komponente enthält. *Avidin*[1], wie der Faktor genannt wurde, verbindet sich mit Biotin stöchiometrisch, im molaren Verhältnis 1:1, zu einem Proteid, das erst durch Erhitzen auf 100° unter Denaturierung der Eiweißkomponente Biotin wieder abspalten kann. Avidin stellt also einen Antagonistentyp dar, den wir bisher noch nicht kennengelernt haben. —

[1] Kürzlich sind von FRAENKEL-CONRAT (*98a*) 2 verschiedene Avidine isoliert worden: das erste enthält eine Nucleinsäure-Komponente, das zweite ist völlig Nucleinsäure-frei. Mikrobiologisch verhalten sich beide quantitativ gleich.

Es hemmt nur solche Mikroorganismen, die Biotin zum Wachstum benötigen, wie *Saccharomyces cerevisiae* (*77*), *Clostridium butylicum* (*465*), *Lactobacillus casei*, *L. arabinosus* 17—5, *Streptococcus faecalis* R, verschiedene Staphylokokkenstämme, *Clostridium acetobutylicum* und einige Diphtherie- und Pneumokokken-Stämme (*189*), nicht solche, die es synthetisieren (*418*). Dies ist verständlich, denn zur Bindung von in der Zelle entstandenem Biotin müßte Avidin in diese eindringen, was bei seinem hohen Molekulargewicht unwahrscheinlich ist. Hiermit steht die Beobachtung von DU VIGNEAUD und Mitarb. (*417*), daß Diphtherie-Stämme nur in Gegenwart von Biotin, nicht von Pimelinsäure, durch Avidin gehemmt werden, in bestem Einklang: Aus Pimelinsäure muß sich erst in der Zelle Biotin bilden, und Pimelinsäure selbst hat keine Affinität zu Avidin. Es ist auch leicht einzusehen, daß der Antagonismus Avidin/Biotin dasselbe Bild ergeben muß wie der kompetitive Antagonismus bei der Konkurrenz von Wuchsstoff und Analogon um ein Fermentprotein: Bei Erhöhung der Avidin-Konzentration muß diejenige des Biotins um denselben Faktor erhöht werden, damit die Konzentration an freiem Biotin, die optimales Wachstum ermöglicht, nicht absinkt. Die Enthemmung von Avidin erfolgt nicht nur durch Analoga, die Biotin-aktiv sind, sondern nach DU VIGNEAUD und Mitarb. (*418*), s. a. (*472*) auch durch indifferente Analoga, bei denen der Harnstoffring intakt sein muß und die Seitenkette nicht zu sehr verändert sein darf (z. B. verschiedene Imidazolidoncarbonsäuren, s. Formel). Die Bindung an das Avidin dürfte sich also am Harnstoffring des Biotins vollziehen. Hier liegt wieder eine Verdrängungsreaktion vor, und die Ähnlichkeit mit dem schon bekannten kompetitiven Antagonismus ist noch größer: Der Wuchsstoff und ein inaktives Analogon konkurrieren um eine an sich indifferente Eiweißkomponente. — Avidin soll mit *Lysozym* und *Hyaluronidase* nahe verwandt sein [z. B. (*243*)].

Die ersten Hinweise, in welche Stoffwechselvorgänge Biotin eingreift, gehen auf die Untersuchungen von KOSER, WRIGHT und DORFMAN (*175*) zurück, die 1942 fanden, daß sich Biotin als Wuchsstoff für *Torula cremoris* teilweise durch Asparaginsäure ersetzen läßt, zum anderen auf die Beobachtungen von BURK und WINZLER (*42*), die annahmen, daß es an der CO_2-Fixierung beteiligt sein muß. STOKES, LARSEN und GUNNESS (*397*) wiesen dann auch bei vielen Milchsäurebakterien Ersetzbarkeit von Biotin durch Asparaginsäure nach, nicht aber durch andere Aminosäuren oder Wirkstoffe. Sie zeigten vor allem, daß in Gegenwart von Biotin Asparaginsäure synthetisiert wird. LARDY, POTTER und ELVEHJEM (*193*) konnten bei *L. arabinosus* Biotin außer durch Asparaginsäure auch durch Oxalessigsäure, nicht durch andere Säuren des Kohlenhydratstoffwechsels, ersetzen. Der Ersatz des Biotins durch diese Substanzen erwies sich aber nur in Gegenwart von CO_2 als

möglich. Schließlich fanden SHIVE und ROGERS (*364*), daß bei *L. arabinosus* der Bakteriostatische Index von γ-(3,4-Ureylencyclohexyl)-buttersäure (s. Formel), die ein kompetitiv wirkender Antagonist gegenüber Biotin ist, also die Bildung hypothetischer Biotin-Cofermente hemmen müßte (s. Abb. 9, Schritte 6a u. 6b), in Anwesenheit von Oxalessigsäure oder Asparaginsäure auf das 10fache erhöht ist. Dies kann so ausgelegt werden, daß die Bildung der beiden Säuren durch ein „Biotin-Cofermente" katalysiert wird. Wenn man nämlich z. B. Oxalessigsäure zusetzt, müßte die Bildung dieses Coferments überflüssig werden. Der Antagonist würde jetzt nur noch auf die Bildung anderer „Biotincofermente" wirken, die allerdings schwerer zu hemmen sein müßte.

Eine Erhöhung des Bakteriostatischen Index ist vergleichbar einer wuchsstoffsparenden Wirkung. Nimmt der Bakteriostatische Index im Grenzfall den Wert ∞ an, d. h. hat der Hemmstoff überhaupt keine Wirkung mehr, dann geht der Effekt in den des nicht-kompetitiven Antagonismus über. Der Ersatzstoff übernimmt nicht nur einen Teil der enthemmenden Wirkung des Wuchsstoffs, sondern diese ganz, vergleichbar dem vollständigen Ersatz in hemmstofffreien Versuchen.

Damit war es sehr wahrscheinlich geworden, daß Biotin in die WOOD-WERKMAN-Reaktion eingreifen muß, d. h. der Bestandteil eines Coferments der *Brenztraubensäure-Carboxylase* ist:

$$CO_2 + H_3C \cdot CO \cdot COOH \xrightarrow{B_1 + \text{Biotin}} HOOC \cdot CH_2 \cdot CO \cdot COOH \xrightarrow{B_6} HOOC \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH.$$

LARDY, POTTER und BURRIS (*192*) krönten dann diese Untersuchungen durch Anwendung von Kohlensäure, die mit radioaktivem C^{14} markiert war: In Gegenwart von Asparaginsäure wurde keine, in Gegenwart von Biotin fast alle Radioaktivität in der aus den Zellen isolierten Asparaginsäure wiedergefunden. Ähnliche Untersuchungen mit „schwerem" C^{13} an *Micrococcus lysodeikticus* stammen von WESSMAN und WERKMAN (*427*). Damit war der endgültige Beweis für die Beteiligung des Biotins an der WOOD-WERKMAN-Reaktion erbracht. Wahrscheinlich greift Biotin auch noch in eine ähnliche Carboxylierung ein, und zwar die Carboxylierung der α-Ketoglutarsäure:

$$\underset{\alpha\text{-Ketoglutarsäure}}{HOOC \cdot CO \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH} + CO_2 \overset{\text{Biotin}}{\rightleftharpoons} \underset{\text{Oxalbernsteinsäure}}{HOOC \cdot CO \cdot CH(COOH) \cdot CH_2 \cdot COOH}$$

die eine Teilreaktion des *Citronensäurecyclus* ist. Denn nach SHIVE und ROGERS (*364*) wird bei *E. coli* die Konzentration des Desthiobiotin-Analogons 4-Imidazolidoncapronsäure, die zur Hemmung der Biotinsynthese erforderlich ist, durch α-Ketoglutarsäure (und die daraus leicht durch Umaminierung entstehende Glutaminsäure) auf das 3fache erhöht.— Die Vermutung von BURK und WINZLER (*42*), daß der Mechanis-

mus der CO_2-Fixierung durch ein „Biotincoferment" auf reversibler Abspaltung von CO_2 aus dem Harnstoffring des Biotins (s. Formel) beruht [1], wurde von MELVILLE, PIERCE und PARTRIDGE (*242*) nicht bestätigt: Biotin, dessen Harnstoff-C-Atom mit C^{14} markiert ist, verliert in CO_2-fixierenden Milchsäurebakterien seine Radioaktivität nicht und gibt auch keine an die mit seiner Hilfe synthetisierte Asparaginsäure ab. Biotin scheint in *E. coli* die umgekehrte WOOD-WERKMAN-Reaktion, die Decarboxylierung der Oxalessigsäure, zu katalysieren (*207*), (*208*) s. dagegen (*303*), in Form einer Bernsteinsäure-Codecarboxylase die Bildung der Propionsäure in Propionsäurebakterien zu bedingen (*68*) sowie in *E. coli* ein wesentlicher Faktor für die erste Stufe der Oxydation der Bernsteinsäure zu sein (*2a*).

V. R. WILLIAMS und FIEGER (*442*), (*443*), (*444*), (*445*) zeigten bei verschiedenen Milchsäurebakterien, SHULL, THOMA und PETERSON (*365*) bei *Clostridium sporogenes*, daß auch Lipoide, vor allem *Ölsäure*, Biotin, teilweise ersetzen können. Dabei kommt es zu keiner Biotinsynthese Das Wachstum von Milchsäurebakterien mit Ölsäure an Stelle von Biotin wird weiterhin erst durch sehr hohe Konzentrationen an Avidin gehemmt (*36*), (*447*). Biotin spielt also offenbar eine Rolle bei der *Synthese der Ölsäure*, die nach GUIRARD, SNELL und R. J. WILLIAMS (*106*) (bei Milchsäurebakterien) aus Acetat aufgebaut wird. Damit wäre es nicht ausgeschlossen, daß die Beteiligung des Biotins an der Ölsäure-Synthese letzten Endes auch auf die WOOD-WERKMAN- oder eine ähnliche Reaktion zurückgeht. Für die Ölsäurebildung ist etwa 10mal weniger Biotin notwendig als für die der Asparaginsäure, wie POTTER und ELVEHJEM (*304*) bei *Lactobacillus arabinosus* fanden, dessen Biotin-Bedürfnis (beim Wachstum) vollständig durch Ölsäure + Asparaginsäure gedeckt werden kann.

LICHSTEIN und UMBREIT (*207*), (*208*); s. a. (*201*), (*203*), (*204*), (*205*); s. dagegen (*469*) schreiben dem Biotin noch die Funktion einer *Codesaminase* bei verschiedenen Aminosäuren (Asparaginsäure, Serin, Threonin) zu. Doch wurde die Versuchstechnik von AXELROD, HOFMANN, PURVIS und MAYHALL (*10*) stark angegriffen [2]. — Die Asparaginsäure-

[1] Die Wuchsstoffwirkung der Diaminothiophancarbonsäure bei *Sacch. cerevisiae* 139 ist vom CO_2-Partialdruck abhängig.

[2] Es dürfte aber nunmehr gesichert sein, daß Biotin die *Vorstufe* der Codesaminasen ist. Der Ersatz dieser Cofermente durch Biotin + Adenylsäure ist bei verschiedenen Bakterien sehr unterschiedlich möglich und bei *E. coli* außerdem von den Züchtungsbedingungen abhängig [H. C. LICHSTEIN (*202*)]. Des weiteren läßt sich aus der Codesaminase nur durch sehr kräftige Hydrolyse (2-6n H_2SO_4) eine Biotin-aktive Substanz abspalten [CHRISTMAN und LICHSTEIN (*54a*)]. Andere Autoren haben im Hinblick auf die Säure-Empfindlichkeit des Biotins schonender hydrolysiert. — Ähnlich werden sich wohl u. a. die negativen Befunde (*303*) beim Ersatz der Oxalessigsäure-Codecarboxylase aus *Azotobacter vinelandii* durch Biotin erklären lassen.

Codesaminase aus *B. cadaveris* ist nach LICHSTEIN, CHRISTMAN und BOYD (*205*) nicht identisch mit dem *Biocytin*, einem Biotinkonjugat [1], das die vereinigten Arbeitskreise von SHARP und DOHME und von MERCK und Co. (*470*) kürzlich aus Hefe in krystallisierter Form isolieren konnten (Einige mg aus 10 Tonnen Hefe!)

Als Wuchsstoff vermag übrigens Biocytin bei *Lactobacillus arabinosus, L. pentosus* und *Leuconostoc mesenteroides* P-60 Biotin nicht zu ersetzen, bei *L. casei, L. Delbrückii* LD 5, *L. acidophilus, Streptococcus faecalis* R, *Neurospora crassa* und *Saccharomyces carlsbergensis* ist es biotinaktiv (*470*), bei Hefen (*S. cerevisiae* 139 und Java) in kleineren Konzentrationen sogar wirksamer als eine äquivalente Menge Biotin (*205*).

VII. Nicotinsäure.

Nicotinsäure als Bestandteil der Codehydrasen, als Vitamin und als Wuchsstoff. Die Nicotinsäuresynthese in Neurosporamutanten (und anderen Mikroorganismen) aus Anthranilsäure über Indol, Tryptophan, Kynurenin und der weitere Aufbau zu den Codehydrasen. Verbindung der mikrobiologischen Nicotinsäuresynthese mit dem Tryptophanabbau in höheren Tieren (Kynurensäure, Xanthurensäure, Chinolinsäure) und der Gen-gesteuerten Bildung von Insektenfarbstoffen. Eingreifen von Hemm- und Wirkstoffen in die einzelnen Syntheseschritte. Der Tryptophancyclus. Andere Möglichkeiten des Nicotinsäure-Aufbaus. Strenge Kopplung von Abbau und Funktion der Nicotinsäure (Abnützung der Codehydrasen bei ihrer Wirkung). Hemmung des Abbaus.

Während bei allen bisher behandelten Wuchsstoffen zuerst die einfachen Verbindungen als biologisch wirksam erkannt wurden, und erst später ihre komplizierteren Derivate, war es bei der Nicotinsäure gerade umgekehrt. Durch WARBURG und Mitarb. (*425*) wurde im Jahre 1935 gefunden, daß Nicotinsäure ein integrierender Bestandteil der beiden *Codehydrasen*: Cozymase (= Codehydrase I) und Codehydrase II, ist. Diese beiden Coenzyme, von denen die Cozymase schon seit 1906 durch HARDEN und YOUNG (*116*) in ihrer Wirkung erkannt war, und später in zahlreichen Arbeiten der v. EULERschen Schule studiert wurde, spielen eine fundamentale Rolle bei Atmung und Gärung: Sie fungieren zusammen mit den Gelben Fermenten als Wasserstoffübertragende Katalysatoren bei vielen Hydrierungen und Dehydrierungen.

1936 fanden LWOFF und LWOFF (*217*), (*218*), daß sich der schon lange bekannte *V-Faktor*, ein Wuchsstoff für hämophile Bakterien, durch Codehydrase I oder II ersetzen läßt. Nun erst wurden die biologischen Eigenschaften der Nicotinsäure selbst erkannt: KNIGHT (*158*), (*159*), (*160*) konnte einen Faktor seines Wuchsstoffkonzentrats für *Staphylococcus aureus* durch Nicotinsäure (oder besser ihr Amid) er-

[1] Über weitere gebundene Formen des Biotins (nieder- und hochmolekulare) vgl. GYÖRGY und ROSE (*112*), BURK und WINZLER (*42*), BOWDEN und PETERSON (*33*) und HOFMANN, DICKEL und AXELROD (*126*).

setzen: MUELLER (*265*) isolierte einen Wuchsstoff für bestimmte Stämme von *C. diphtheriae* aus Harn und identifizierte ihn mit Nicotinsäure. Noch in demselben Jahre (1937) wurde auch die *Vitamin*-Natur der Nicotinsäure entdeckt: Sie ist nach ELVEHJEM und Mitarb. (*84*), (*85*) der „Antiblack-tongue"-Faktor bei Hunden, heilt die menschliche Pellagra und spielt auch bei anderen Mangelkrankheiten eine Rolle (*86*).

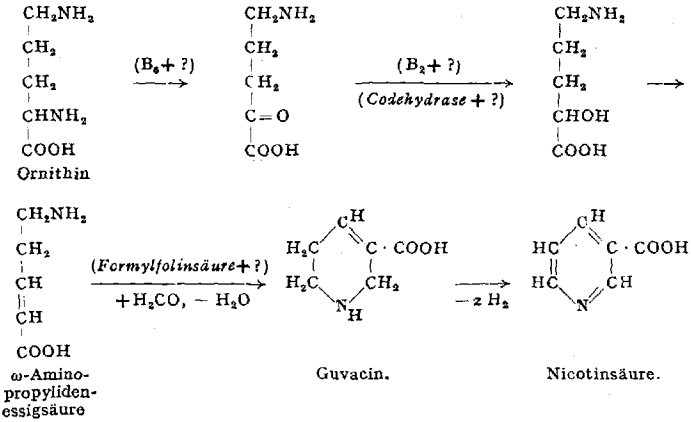
In der Folgezeit fand man viele Nicotinsäure-bedürftige Bakterien, z. B. verschiedene *Proteus*-Arten, zahlreiche Stämme der verschiedensten Milchsäurebakterien, einige von Propion- und Essigsäurebakterien, Streptokokken, Pneumokokken, Brucellen, Clostridien, Dysenteriebakterien, hämophilen Bakterien und einen einzelnen Stamm bei *E. coli* (*398*). Bei Hefen wurden zunächst keine Stämme bekannt, die auf Nicotinsäure ansprechen, bis KOSER und WRIGHT [1943] (*174*), s. a. (*446*) einen solchen bei *Torula cremoris* entdeckten. Ein Nicotinsäure-bedürftiger *Schimmelpilz* wurde erst ganz kürzlich von GEORG (*102*) in einem Stamm von *Trichophyton equinum* aufgefunden. Die meisten Hefen sind starke Nicotinsäure*bildner* (bis zu 0,1% der Trockensubstanz). Jedoch übertrifft *B. tuberculosis* bei weitem alle anderen Mikroorganismen in seiner Synthesefähigkeit für Nicotinsäure, da bestimmte Stämme nach BIRD (*24*) den Gehalt der Kultur (in 21 Tagen) von 0,07 auf $61 \cdot 10^{-6}$ g Nicotinsäure/cm³ steigern können, d. h. um das etwa 900fache.

Bei der Prüfung von Mikroorganismen auf Nicotinsäure-Bedürftigkeit muß beachtet werden, daß sich nach BOVARNICK (*32*) durch Erhitzen von Asparagin + Glutaminsäure kleine Mengen Nicotinsäureamid bilden. Sie sind immer noch größer, als für optimales Wachstum erforderlich ist (10^{-8} bis 10^{-6} g/cm³). Nährböden, die diese Bestandteile enthalten, müssen also entweder durch Filtration sterilisiert, oder es muß eine der beiden Aminosäuren getrennt hitzesterilisiert werden.

Ob die Natur auch einen so einfachen Weg der Nicotinsäure-*Synthese*, wie die eben genannte, beschreiten kann, ist bisher nicht bewiesen worden, aber durchaus nicht unwahrscheinlich. Jedenfalls nehmen ELLINGER und ABDEL-KADER (*80*), (*82*) Ornithin, Arginin oder Glutaminsäure als die wichtigsten Vorläufer der Nicotinsäure in *B. coli* und der Ratte an. Für die Synthese der Nicotinsäure aus Ornithin ist von WOPK und WORK (*468*) der umstehend dargestellte Mechanismus vorgeschlagen worden, bei dem B_2, Codehydrase, B_6 und Formylfolinsäure mitwirken könnten. Als direkte Vorstufe der Nicotinsäure ist das Guvacin = Tetrahydronicotinsäure angenommen, da es nach v. EULER, KARRER und Mitarb. (*90*) Nicotinsäure beim Wachstum von *Staphyl. aureus* und *Proteus vulgaris* bereits in wenig höherer Konzentration zu ersetzen vermag.

Exakt bewiesen wurde ein anderer, weit komplizierterer Weg, der von der Anthranilsäure ausgehend über Tryptophan in vielen einzelnen Schritten zur Nicotinsäure und darüber hinaus schließlich zu den Code-

Biologisch mögliche Synthese von Nicotinsäure aus Ornithin nach T. S. WORK und E. WORK [The Basis of Chemotherapy (1948) (*468*)].



hydrasen führt (Abb. 10). So ist also eine Verknüpfung der Nicotinsäuresynthese mit dem *Auf-* und *Abbau* des Tryptophans vorhanden, welch letzterer in höheren Tieren unter Beteiligung von Vitamin B_6 die Endprodukte Kynuren- und Xanthurensäure ergibt, die im Harn ausgeschieden werden. — Bis zur Nicotinsäure selbst (Schritt 1 bis 8b) sind alle Schritte auf genetischem Wege, hauptsächlich mit Neurospora-Mutanten, verifiziert worden [BEADLE, BONNER, MITCHELL, TATUM und Mitarb. (*15*), s. spez. (*16*), (*28*), (*31*), (*121*), (*197*), (*248*), (*249*), (*286*), (*403*), (*404*), (*405*), (*476*), (*27*)]. Ist z. B. in einer Mutante das Schritt 6 steuernde Gen ausgefallen, so gibt sich das dadurch zu erkennen, daß die Mutante Kynurenin und alle seine Vorläufer bis zurück zur Anthranilsäure nicht mehr verwerten kann, also auf Oxykynurenin (oder natürlich auf alle dieser folgenden Verbindungen) als Wuchsstoff angewiesen ist. Außerdem könnte es zur Anhäufung von Kynurenin kommen, das ja nicht mehr weiter umgesetzt wird. Wie YANOFSKY und BONNER (*476*) ganz kürzlich nachwiesen, häuft sich zwar bei bestimmten Mutanten von *Neurospora* nicht Kynurenin selbst an sondern α-N-Acetylkynurenin, das offenbar mit Hilfe von Coenzym A aus ersterem entsteht (Abb. 10, Schritt 6a). — Gleichzeitig führten die Untersuchungen von KÜHN und von BUTENANDT [z. B. (*49*), (*50*)] über die Gen-gesteuerte Pigmentbildung aus Tryptophan bei Insekten (bes. *Drosophila melanogaster)* zu Teilschritten, die sich teilweise als identisch mit denen der mikrobiologischen Nicotinsäure-Synthese erwiesen. So kam es zu wechselseitigen Befruchtungen dieser beiden Arbeitsrichtungen.

Nach neueren Untersuchungen von NYC, HASKINS und MITCHELL (*285*) mit *Neurospora*-Mutanten muß die Anthranilsäure aus einer

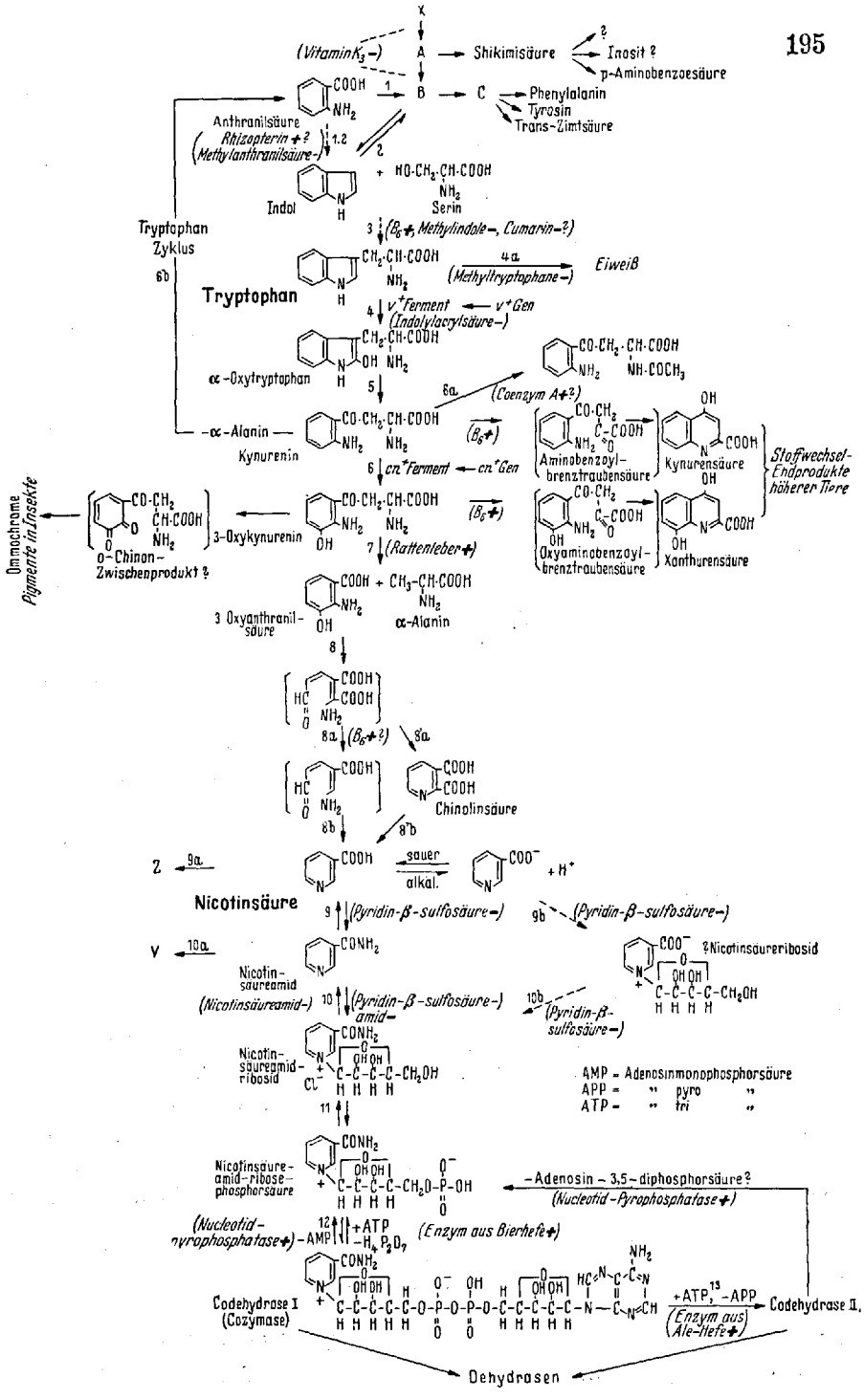


Abb. 10. Auf- und Abbau von Tryptophan, Nicotinsäure und Codehydrasen.

Muttersubstanz X hervorgehen, die zugleich der gemeinsame Vorläufer von Tyrosin und Phenylalanin ist. Wie aus dem schönen Vortrag von DAVIS (*64*) hervorgeht, haben die Versuche dieses Autors an *Coli*-Mutanten auch noch die Synthese der p-Aminobenzoesäure auf jene noch unbekannte Muttersubstanz zurückführen können, wobei als Zwischenstufe *Shikimi*-Säure = Tetrahydrogallus-Säure (s. Abb. 10 und Formel S. 202) durchlaufen wird.

Nach SCHOPFER und BOSS (*348*) wird die Synthese der Anthranilsäure oder ihr Aufbau (Abb. 10, Schritt 1, 2) zu Indol durch 2-Methylnaphthochinon- (1,4) = *Vitamin* K_3 unterbunden, da das durch dieses Chinon gehemmte Wachstum von *Phycomyces Blakesleeanus*, *Saccharomyces Willianus* und *Neurospora* (Cholin$^-$) in Anwesenheit von Nicotinsäure-(amid), Kynurenin, Tryptophan, Indol oder *Anthranilsäure* wieder möglich wird. Auf Grund der Konstitution des Hemmstoffs ist zu vermuten, daß die *Synthese* der Anthranilsäure, und zwar bereits bei einem recht frühen Schritt, etwa X→A oder A→B unterbrochen ist. Um aus Anthranilsäure den Indolring zu bilden, ist der Einbau einer C-Einheit notwendig, der möglicherweise wieder durch die katalytische Wirkung der *Formylfolinsäure* verursacht wird. An dieser Stelle könnte also (indirekt) der Angriffspunkt der Sulfonamide liegen, die nach SEVAG und GREEN (*360*) „oxydo-reduktive Schritte" in der Tryptophansynthese durch *Staphylococcus aureus* hemmen. Schritt 1, 2 wird nach RYDON (*330*) durch 4- oder 5-*Methylanthranilsäure* betroffen, was eindeutig aus der Art der Enthemmung mit Anthranilsäure, Indol bzw. Tryptophan bei einem Anthranilsäure-synthetisierenden Stamm von *E. typhosa* hervorgeht, dessen Wachstum mit diesem Antagonisten gehemmt war. FILDES und RYDON (*95*) konnten in ähnlichen Versuchen auch die Schritte 3 (Tryptophanbildung aus Indol + Serin) und 4a (Tryptophan-Einbau bei der Eiweiß-Synthese) durch verschieden *methylierte Indole* bzw. *Tryptophane* stören. Ob *Methylacryl*säure, in der man einen direkten Tryptophan-Antagonisten vermuten sollte, Schritt 3 oder 4 hemmt, also Indol oder Tryptophan verdrängt, ist noch nicht klar zu erkennen. Die von FILDES (*93*), (*94*) beobachtete Enthemmung durch Serin kann dies nicht entscheiden. Ganz unverständlich bleibt noch der Befund von UMBREIT und Mitarb. (*409*), daß Schritt 3 durch Pyridoxalphosphat katalysiert wird. Wenn eine Umaminierung vorliegen sollte, müßte er in mehr als zwei Einzelschritte aufgelöst werden.

ELLINGER und ABDEL-KADER (*81*), (*83*) beobachteten eine Hemmung der Nicotinsäuresynthese durch *E. coli* aus Ornithin mit verschieden methylierten Tryptophanen. Sie glauben aus ihren Versuchen schließen zu müssen, daß Tryptophan, jedenfalls bei *E. coli* (und bei der Ratte) kein Zwischenprodukt, sondern ein *Katalysator* der Nicotinsäure-

Synthese ist. Diese Annahme bekam für *Neurospora* erst Bedeutung, als HASKINS und MITCHELL (*119*) zeigen konnten, daß Tryptophan durch alle untersuchten Mutanten sehr rasch, hauptsächlich zu Anthranilsäure abgebaut wird [s. a. (*34*)]. Rein formal lag es natürlich nahe, in Analogie zur Oxyanthranilsäure-Bildung aus Oxykynurenin (Schritt 7) auch eine solche von Anthranilsäure aus Kynurenin anzunehmen. Dieser neue Schritt (6b) würde also einen Ring schließen, der von der Anthranilsäure über Indol, Tryptophan, α-Oxytryptophan und Kynurenin wieder zur Anthranilsäure zurückführt. Jedes Glied dieses Ringes, der als *Tryptophan-Cyclus* bezeichnet wird, müßte also als Katalysator der Nicotinsäure-Bildung wirken, so lange nicht ein Schritt innerhalb des Cyclus blockiert ist, und (in höherer Konzentration) Ersatzstoff der Nicotinsäure sein, selbst wenn Blockierung im Cyclus vorliegt. Während die Austrittsstelle am Cyclus eindeutig beim Kynurenin liegt, ist es wahrscheinlich, daß der Eintritt nicht bei der Anthranilsäure, die bisher als Ausgangssubstanz der Nicotinsäure angesehen wurde, sondern bei einer Substanz erfolgt, die zwischen Anthranilsäure und Indol eingeschoben werden muß. Dieses hypothetische Zwischenprodukt ist aus chemischen Gründen ohnedies anzunehmen. Der Tryptophan-Cyclus erlaubt verschiedene bis dahin nicht verständliche Befunde einzuordnen: z. B. die Enthemmung von Indolylacrylsäure beim Wachstum von *E. coli* durch Kynurenin, Indol, Anthranilsäure (*315*) oder Phenylalanin (*224*) und die Aufhebung der Hemmung, die das Wachstum dieses Bakteriums durch das dem Indol isostere Cumarin erleidet, durch *p*-Aminobenzoesäure oder *m*-Inosit (*314*).

Antagonistische Beeinflussungen der Schritte vom α-Oxytryptophan bis zur Nicotinsäure (5—8) scheinen bisher noch nicht studiert worden zu sein. Mit dem weiteren Aufbau von der Nicotinsäure bis zu den Codehydrasen (Schritte 9—12) hat man sich jedoch frühzeitig beschäftigt. So können die Mikroorganismen die Bildung des Nicotinsäureamids aus Nicotinsäure (Schritt 9) in verschiedenem Grade ausführen, was man leicht aus der Aktivität der beiden Substanzen als Wuchsstoffe ersehen kann. Tab. 6 zeigt, daß *Proteus vulgaris* Amid und Säure gleich gut verwertet, die Bildung des Amids also mindestens mit ausreichender Geschwindigkeit durchführt. Staphylokokken und Dysenterie-Bakterien

Tabelle 6. *Relativer Wuchsstoff-Effekt von Nicotinsäureamid und Nicotinsäure* [nach KOSER und Mitarbeitern (*172*), ergänzt nach KOSER und KASAI (*173*)].

Bakterien	Verhältnis der Aktivitäten von Amid : Säure
Leuconostoc mesenteroides	0
C. diphtheriae	1 : 10
Proteus vulgaris	1 : 1
Staphylococcus aureus	5 : 1
Dysenterie-Bakterien	10 : 1
Verschiedene *Pasteurella*-Stämme	∞

bilden das Amid langsamer, und einige *Pasteurella*-Arten müssen diese Fähigkeit ganz verloren haben, da Nicotinsäure hier völlig inaktiv ist.

Bei diesen Versuchen muß beachtet werden, daß die Wirksamkeit der Nicotinsäure im Gegensatz zu ihrem Amid p_H-abhängig ist. ROEPKE, LIBBY und SMALL (*323*) fanden bei *E. coli*-, BONNER und BEADLE (*28*) bei *Neurospora*-Mutanten und BRUECKNER (*40*) bei *Staphylococcus aureus*, daß mit fallendem p_H die zu optimalem Wachstum benötigte Nicotinsäurekonzentration kleiner wird, was bedeutet, daß nur die undissoziierte Säure aktiv, also das Ausgangsprodukt für die Amidierung ist.

Diese (Schritt 9) wird nach MCILWAIN (*231*) durch *Pyridin-β-sulfosäure* gehemmt. Denn Nicotinsäure-bedürftige Proteus- und Staphylokokkenstämme lassen sich durch die Sulfosäure im Wachstum hemmen, wobei steigende Nicotinsäurekonzentrationen kompetitiv enthemmen. Die Enthemmung mit Nicotinsäureamid dürfte nicht-kompetitiv sein, wenn auch ein hierbei auftretender sonderbarer Effekt die Interpretation erschwert. Die Sulfosäure zeigt sich nämlich nicht indifferent bei Nicotinsäureamid-bedingtem Wachstum, wie es theoretisch bei nicht-kompetitivem Antagonismus der Fall sein müßte, sondern ruft eine zusätzliche Wachstums*steigerung* hervor. Diese tritt auch bei Nicotinsäure-synthetisierenden Stämmen auf (*E. coli*), gleichgültig ob Nicotinsäureamid anwesend ist oder nicht. Läßt man schließlich letzteres auch bei den bedürftigen Stämmen weg, so ergibt die Sulfosäure noch zu einem gewissen Grade Wachstum, wenn auch dieses bei weitem nicht optimal wird. Die Sulfosäure kann also Nicotinsäure als Wuchsstoff teilweise ersetzen, wozu häufig außerordentlich hohe Konzentrationen erforderlich sind, wie von MCILWAIN (*231*) bei *Staphylococcus aureus* und *Proteus vulgaris*, von LWOFF und QUERIDO (*219*) bei *Proteus* X 19 und von MÖLLER und BIRKOFER (*256*) bei *Proteus vulg.* und *Sbm. plant.* festgestellt wurde. Zu einer völligen Umkehrung der Verhältnisse kommt es, wenn man nach ERLENMEYER und Mitarb. (*89*) zu den isosteren *Thiazol*-5-Analogen übergeht: Bei diesen erwies sich das Carbonsäureamid als Hemmstoff und die Sulfosäure als vollwertiger Wuchsstoff für die Nicotinsäure-bedürftigen Staphylokokken[1].

Ähnliche Erscheinungen sind auch bei anderen Sulfosäuren bekannt geworden. So führen nach KUHN, MÖLLER, WENDT und BEINERT (*180*) sehr kleine Konzentrationen an Sulfonamiden, die unterhalb derjenigen liegen, die bei optimaler p-Aminobenzoesäure-Menge gerade hemmen, zu teilweisem Ersatz dieses Wuchsstoffs bei *Sbm. plantarum*. Gleiche Verhältnisse bestehen für Sulfopantothensäure bei *A. suboxydans* (*53*), für verschiedene Sulfosäure-Analoga des Oxybiotins und des Homooxybiotins bei *Saccharomyces cerevisiae* 139 und vor allem *Lactobacillus arabinosus* (*125*). Kleine Konzentrationen ε-(2,4-Dichlorsulfanilido)-capronsäure zeigen nach WOOLLEY (*461*) schwache Biotinaktivität bei

[1] *6-Amino-nicotinsäure* und ihr Amid wirken nach SCHMIDT-THOMÉ (*336a*) bei Staphylokokken ebenfalls antagonistisch. Nicotinsäureamid enthemmt besser als Nicotinsäure.

B. tenuis und rufen — ähnlich der Pyridin-β-sulfosäure — in Anwesenheit von Biotin oder Pimelinsäure zusätzliche Wachstumssteigerung hervor. Bei *E. coli*, das von Sulfopantothensäure nicht gehemmt wird, bewirkt diese Enthemmung von Salicylsäure (*390*). Fördernde Wirkungen von Sulfonamiden auf das Wachstum von p-Aminobenzoesäure-synthetisierenden Bakterien in natürlichen Nährmedien sind z. B. von LEWIS und SNYDER (*200*) bei Milch- und Propionsäuerbakterien, von MÖLLER (*255*) bei *Coli*-Stämmen und von LAMANNA (*187*) bei verschiedenen Bakterien und Hefen beobachtet worden. Ob die Sulfosäuren die natürlichen Wuchsstoffe wirklich ersetzen, d. h. ob sich aus ihnen aktive Cofermente, wenn auch sehr schwach wirksame, bilden können, ob eine Umwandlung von Sulfo- in Carbonsäure vorliegt, was chemisch sehr unwahrscheinlich ist, oder ob es endlich zu einer Umstellung des Stoffwechsels z. B. zu andersartiger Synthese der Cofermente kommt, sind hochinteressante Probleme, die noch der Aufklärung harren. (Die für Sulfopantothensäure genannten Fälle lassen sich vielleicht mit STANSLY und ALVERSON (*390*) durch eine Spaltung dieser Sulfosäure in Taurin und Pantoylsäure erklären, da hier schon die letztere als Wuchs- bzw. Enthemmstoff wirksam ist.)

Da Pyridin-β-sulfosäure in Gegenwart von Nicotinsäureamid keine Hemmung zeigt, wäre zu erwarten gewesen, daß auch in Anwesenheit von Cozymase keine Hemmung auftritt. Das durch Cozymase bedingte Wachstum von *Proteus vulgaris* wird aber nach MCILWAIN (*231*) noch stärker durch die Sulfosäure als das Nicotinsäure-bedingte gehemmt. Hierfür erscheint keine andere Erklärung möglich, als anzunehmen, daß über Nicotinsäureamid noch andere Wirkstoffe außer den bekannten Codehydrasen gebildet werden müssen (Y, Schritt 10a), und daß dazu ein Abbau der Cozymase nötig ist. Für wirksame Umwandlungsprodukte der Nicotin*säure* (Z, Schritt 9a) spricht auch das sonderbare Verhalten von Diphtherie-Bakterien, bei denen Nicotinsäure als Wuchsstoff 10mal wirksamer ist als ihr Amid, vor allem aber dasjenige einiger *Leuconostoc*-Stämme, bei denen überhaupt nur noch Nicotinsäure aktiv ist (s. Tab. 6). Allerdings könnten die beiden letzteren Fälle auch nach KOSER und KASAI (*173*) mit der Annahme erklärt werden, daß sich bei der Cozymase-Synthese durch diese Bakterien zuerst Ribosid- und dann Amidbildung vollziehen (Schritt 9b und 10b). Es gibt aber Leuconostoc-Stämme, bei denen auch die beiden Codehydrasen Nicotinsäure als Wuchsstoff nicht ersetzen können. Will man die Existenz wirksamer Nicotin*säure*-Derivate wiederum ausschließen, so wäre noch an das mögliche Vorkommen einer dritten Codehydrase zu denken, wobei zusätzlich anzunehmen ist, daß letztere durch die betreffenden Leuconostoc-Stämme nicht aus den Codehydrasen I und II gebildet werden dürfte. — Auf jeden Fall ist also das Vorhandensein eines weiteren Coferments gesichert; ob dasselbe aber Nicotinsäure oder ihr Amid als Baustein enthält, bedarf noch der Klärung [1].

[1] Ganz kürzlich wurden von CHAUDHURI und KODICEK in Weizenkleie Conjugate gefunden, die sich von der Nicotin*säure* ableiten (Nicotinsäurepeptide).

Pyridin-β-sulfonamid müßte die Ribosidbildung aus Nicotinsäureamid hemmen (Schritt 10). MCILWAIN (*231*) fand in Pyridin-β-sulfonamid auch einen kompetitiven Antagonisten des Nicotinsäureamids. Bei Nicotinsäure-bedingtem Wachstum ist die Hemmung aber geringer, was wiederum für die Möglichkeit des Umweges über Schritt 9b und 10b spricht. Leider ist die Enthemmung mit Nicotinsäureamidribosid, die nicht-kompetitiv sein müßte, noch nicht untersucht worden. — Wie schwierig die Verhältnisse auf dem Gebiete der Nicotinsäure(amid)-Antagonisten liegen, ist in einer Arbeit von MÖLLER und BIRKOFER (*257*) diskutiert worden; diese Autoren fanden, daß die oben beschriebenen Antagonismen noch von solchen, bei denen Schwermetalle mitwirken, überlagert werden können.

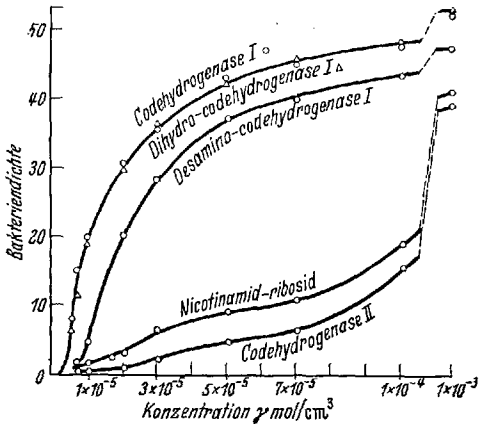


Abb. 11. Wirkung von Codehydrasen und ihren Abbauprodukten auf das Wachstum von *Haemophilus parainfluenzae* [nach GINGRICH u. SCHLENK [1944] (*103*)].

Der Übergang von Nicotinsäureamidribosid in Cozymase (Schritt 11 und 12) wird von vielen hämophilen Bakterien noch ausgeführt, da SCHLENK und GINGRICH (*335*), (*103*) fanden, daß bereits höhere molare Konzentrationen des Ribosids Cozymase beim Wachstum zu ersetzen vermögen. Der von den Autoren benutzte Stamm kann, wie aus Abb. 11 hervorgeht, Codehydrase II schlecht verwerten, im Gegensatz zu den früher von LWOFF und LWOFF (*217*), (*218*) untersuchten Stämmen, bei denen die beiden Codehydrasen gleichwertig waren. Vielleicht ist die Cozymase für *Haemophilus parainfluenzae* wichtiger als die Codehydrase II, und die Dephosphorylierung der letzteren (Schritt 13 in umgekehrter Richtung) verläuft bei diesem Stamm mit zu geringer Geschwindigkeit. Möglicherweise liegt aber auch hier ein gegenseitiger kompetitiver Antagonismus vor, wie er von MCILWAIN und RODNIGHT (*238*) beim Abbau der beiden Coenzyme im Zentralnervensystem gefunden wurde.

Offenbar erfolgt bei der Cozymasebildung aus dem Ribosid zunächst Phosphorylierung (Schritt 11), denn KORNBERG (*167*), (*168*) reicherte z. B. aus Bierhefe ein Enzym an, das Nicotinsäureamidribosephosphorsäure mit Adenosintriphosphorsäure zu Cozymase und *anorganischer Pyrophosphorsäure* (reversibel) umsetzt (Schritt 12). Diesen neuen, sehr bemerkenswerten Reaktionstyp haben wir bereits bei der Bildung von Flavinadenindinucleotid angetroffen (s. S. 162). Auf ganz

ähnliche Weise vollzieht sich auch die Bildung der Codehydrase II (*169*) (Schritt 13):

$$\text{Cozymase} + \text{Adenosintriphosphorsäure} \xrightarrow{\text{Enzym aus Ale-Hefe}} \text{Codehydrase II} + \textit{Adenosinpyrophosphorsäure.}$$

Ab- und Aufbau der Codehydrasen in Mikroorganismen sind in den letzten Jahren, besonders von der quantitativen Seite, eingehend durch McILWAIN und Mitarb. studiert worden. Schon die beiden LWOFFS (*217*), (*218*) hatten in feinsinnigen Untersuchungen gefunden, daß ihr Abbau mit ihrer Funktion gekoppelt sein muß, und deshalb von einer „Abnutzung" der Codehydrasen während ihrer Wirkung gesprochen. Nach McILWAIN und HUGHES (*237*) ist der Abbau von Cozymase durch Staphylokokken, *E. coli*, *Proteus morganii* und *H. parainfluenzae* etwa 20mal rascher als ihr Aufbau, so daß diese Bakterien in etwa 4 Stdn. ihren eigenen Cozymasegehalt völlig verbrauchen. Bei Milchsäurebakterien ist der Abbau viel geringer (Halbwertszeit etwa 3 Tage und größer) und ist deshalb hier weiter untersucht worden (*235*), (*237*), (*239*). *L. arabinosus*, der Nicotinsäure als Wuchsstoff benötigt, nimmt sie während des Wachstums innerhalb eines Tages vollständig auf und führt sie zu 90% in Cozymase über. Ist das Medium dann Substrat(Glucose)-frei, so erfolgt in etwa 6 Tagen wieder langsame Abgabe an dasselbe, wohl in Form des Ribosids oder der Ribosephosphorsäure, wobei der Gesamtnicotinsäure-Gehalt der Kultur immer gleich bleibt. Enthält das Medium aber Glucose, so wird innerhalb und außerhalb der Zelle der Gesamtnicotinsäuregehalt kleiner. Um 1 Mol Milchsäure zu bilden, werden etwa 2 μMole Nicotinsäure verbraucht. Dieses Verhältnis ist konstant, unabhängig vom p_H und vor allem von der Reaktionsgeschwindigkeit, was eindeutig die Kopplung von Abbau und Funktion der Nicotinsäure beweist. Der Abbau beider Codehydrasen wird, wie erstmals MANN und QUASTEL (*223*) in tierischen Zellen beobachteten, durch Nicotinsäureamid blockiert. McILWAIN (*236*) fand im 5(4)-3'-Pyridylimidazol einen 10mal stärkeren Hemmstoff. Nach KORNBERG (*171*) wird die Nucleosidase, die eine Spaltung der Bindung zwischen Ribose und Nicotinsäureamid in den Codehydrasen hervorruft, also auch Schritt 10, durch diese Substanzen spezifisch gehemmt. Auf Grund der Abbau-Hemmung durch Nicotinsäureamid erkannte CASMAN (*52*) dessen Cozymase-sparende Wirkung beim Wachstum von *Haemophilus influenzae*.

Ein andersartiger Abbau der Codehydrasen erfolgt durch die Dinucleotidpyrophosphatase von KORNBERG (*166*), (*170*), die zur Abspaltung von Nicotinsäureamidribosephosphorsäure führt. Bei Cozymase ist das zweite Spaltstück Adenosin-5-phosphorsäure, bei Codehydrase II wahrscheinlich Adenosin-3,5-phosphorsäure, jedenfalls nicht

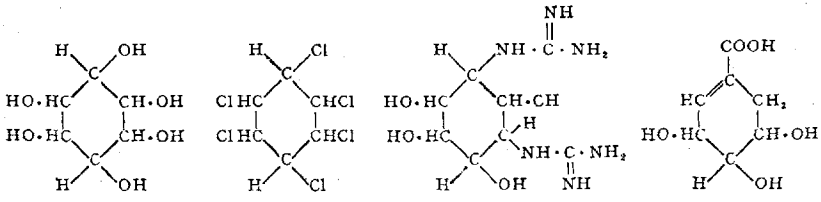
Adenosinpyrophosphorsäure. Der KORNBERGsche Dinucleotid-Cyclus (s. Abb. 3) ist in der gleichen Art wie beim Flavinadenin-Dinucleotid (s. S. 162) auch für Cozymase anzunehmen. Dabei kommt es nicht nur zu einer Kopplung zwischen Funktion und Abbau, sondern sogar zu einer solchen zwischen Funktion, Abbau, Aufbau und Pyrophosphatanreicherung.

VIII. m-Inosit.

m-Inosit als Vitamin und Wuchsstoff (Bicskomponente). Probleme der Beteiligung von *m*-Inosit an Stoffwechselvorgängen: Coferment der α-Amylase? Möglichkeit eines Antagonismus zwischen *m*-Inosit und Hexachlorcyclohexanen bzw. Streptomycin. *Shikimi*-Säure als mögliche Vorstufe des *m*-Inosits bei Mikroorganismen.

Obwohl *meso*-Inosit = *meso*-Hexaoxycyclohexan (s. Formel) der erste Wuchsstoff war, der isoliert wurde, ist seine *Vitamin*wirkung bei Mäusen (Anti-Alopecie-Faktor) erst 13 Jahre später (1941) von WOOLLEY (*457*) entdeckt worden. Er ist außer bei *Hefen* noch bei einigen *Schimmel-*

Konstitution von Inosit und verwandten Verbindungen.



pilzen Wuchsstoff (*48*), (*163*), (*343*), (*344*), (*350*). Während bei allen in der Natur vorkommenden Stämmen bisher nur mehr oder weniger starke Zuwachseffekte beobachtet wurden, hat BEADLE (*12*), s. a. (*353*) eine *Neurospora*-Mutante isoliert, die *m*-Inosit unbedingt zum Wachstum benötigt. Diese Mutante ist also heute der Stamm der Wahl für mikrobiologische *m*-Inosit-Bestimmungen. *m*-Inosit-benötigende *Bakterien* sind noch nicht aufgefunden worden. Da aber *m*-Inosit nach WOOLLEY (*458*) in Bakterien vorkommt, dürfte an seiner Bedeutung auch für den Stoffwechsel der Bakterien nicht gezweifelt werden.

Bis jetzt ist aber kein Stoffwechselvorgang mit Sicherheit erkannt worden, in den dieser Wuchsstoff eingreift. Zwar vermuteten R. J. WILLIAMS, SCHLENK und EPPRIGHT (*441*) auf Grund mikrobiologischer Bestimmungen in hochgereinigten Amylase-Präparaten im *m*-Inosit die Wirkgruppe dieses Ferments, und LANE und WILLIAMS (*190*) bekräftigten diese Annahme, da sie reinste α-(nicht β-)Amylase durch das Kontaktinsekticid *Gammexan* = γ-Hexa*chlor*cyclohexan (s. Formel) hemmen und diese Hemmung durch *m*-Inosit wieder aufheben konnten.

FISCHER und BERNFELD (*97*) vermochten dagegen weder *m*-Inosit in *krystallisierter* α-Amylase aus Schweine-Pankreas oder Menschenspeichel nachzuweisen, noch auf diese einen Einfluß von Gammexan oder *m*-Inosit festzustellen. Nach KIRKWOOD und PHILLIPS (*155*) hemmen Hexachlorcyclohexane das Wachstum der *m*-Inosit-bedürftigen Gebr. Mayer-Hefe, aber nur die Hemmung durch das γ-Isomere, das auch am wirksamsten ist, wird durch *m*-Inosit aufgehoben. Ein *m*-Inosit-synthetisierender Hefestamm war entsprechend schwerer zu hemmen. Ganz ähnliche Ergebnisse erzielten BUSTON, JACOBS und GOLDSTEIN (*47*) bei *Nematospora gossypii*, die ebenfalls *m*-Inosit benötigt. Von SCHOPFER und Mitarb. (*347*), (*352*) wurde zwar gefunden, daß nur das *m*-Inosit-bedürftige *Eremothecium Ashbyii* von Gammexan gehemmt wird, während *m*-Inosit-nicht-bedürftige Schimmelpilze und Hefen resistent sind, aber eine Enthemmung mit *m*-Inosit war nicht eindeutig zu zeigen. Andere Autoren (*101*), (*306*), (*319*), (*320*), (*401*)[1], die allerdings nur *m*-Inosit-nicht-benötigende Bakterien untersuchten, konnten ebenfalls keinen Antagonismus feststellen, auch nicht für das bei diesen meist stärker hemmende δ-Isomere (*319*), (*320*). Nachdem v. VLOTEN, KRUISSINK, STRIJK und BIJVOET (*422*) Gammexan und *m*-Inosit auf Grund von WEISSENBERG-Diagrammen eindeutig von verschiedener sterischer Struktur fanden, im Gegensatz zu den früheren Angaben von SLADE (*370*), dürfte es wohl unwahrscheinlich sein, daß die beiden Substanzen in einem antagonistischen Verhältnis zueinander stehen. Vielleicht erklären sich die Ergebnisse der verschiedenen Autoren durch die Annahme, daß die verwendeten Gammexan-Präparate teilweise mit einem tatsächlich antagonistisch wirkenden Isomeren verunreinigt waren. Schließlich sind antagonistische Beziehungen zwischen *m*-Inosit und *Streptomycin* anzunehmen, da einer von dessen Bausteinen, das *Streptidin* (*186*), ein Cyclohexanderivat ist, das eindeutig *meso*-Struktur besitzt (s. Formel). Allerdings konnten PAINE jr. und LIPMANN [(*292*), s. a. (*289*)] im Gegensatz zu RHYMER und Mitarb. (*318*) keine Enthemmung durch verschiedene *m*-Inosithaltige Liposide bei *E. coli* beobachten, dessen Wachstum mit Streptomycin gehemmt war.

Daß aber tatsächlich Beziehungen zwischen *m*-Inosit und Streptomycin bestehen müssen, ergibt sich aus den höchst interessanten Befunden, daß bei der Züchtung Streptomycin-resistenter Bakterien häufig gleichzeitig Streptomycin (= Inosit ?)-*Bedürftigkeit* auftritt [s. z. B. (*141*), (*211*), (*244*), (*245*), (*477*)], und daß verschiedene Hefen *(Torula utilis, Hansenula anomala)* Streptomycin-*empfindlich* werden, wenn sie durch Adaptation die Fähigkeit zur Verwertung von *m*-Inosit an Stelle

[1] Weitere Literatur, bes. von CHAIX und Mitarb. s. bei FISCHER und BERNFELD (*97*).

von Glucose gewonnen haben (*216*). Die Streptomycin-Hemmung solcher adaptierter Hefen (und auch anderer, in der Natur vorkommender Streptomycin-empfindlicher Mikroorganismen) läßt sich durch Hexosen kaum, durch Hexosen + Fumarsäure mäßig, durch phosphorylierte Hexosen jedoch leicht aufheben. Es wäre also nicht abwegig, im Streptomycin einen Hemmstoff bei der Bildung phosphorylierter Hexosen zu vermuten [vgl. a. (*334*)]. Welche Rolle aber der *m*-Inosit dabei spielt, läßt sich aus den vorliegenden Versuchsergebnissen noch nicht übersehen.

Vielleicht darf man in der schon erwähnten *Shikimi*-Säure (s. Formel) eine Vorstufe des *m*-Inosits annehmen, obwohl DAVIS (*64*) bisher keine Anhaltspunkte dafür gefunden hat.

IX. Schlußwort.

Die mikrobiologische Stoffwechselanalyse bei den hier behandelten Wuchsstoffen zeigt deutlich, wie ein Stoffwechselvorgang in den anderen eingreift. Besonders reizvoll erscheint z. B., daß bestimmte Wuchsstoffe für die Synthese anderer notwendig sind. In noch größerem Maße bestehen solche Verflechtungen zwischen der Folinsäure (p-Aminobenzoesäure), dem Vitamin B_{12} und den Nucleinsäuren (Purinen, Pyrimidinen). Obwohl bereits ein überwältigendes Material über diese Stoffe vorliegt, sind viele Probleme noch nicht genügend geklärt, und die Forschung ist gerade hier noch in so lebhaftem Fluß, daß eine Besprechung im Augenblick noch nicht angezeigt erscheint und einem späteren Zeitpunkt vorbehalten bleiben soll.

X. Zusammenfassung.

Nach kurzer Besprechung der *Geschichte* der Wuchsstoff-Forschung wird an den Wuchsstoffen Aneurin, Lactoflavin, Adermin, Pantothensäure, Biotin, Nicotinsäure und *m*-Inosit gezeigt, wie die *mikrobiologische Stoffwechsel-Analyse* das Eingreifen der Wuchsstoffe als Bestandteile von Cofermenten in den *intermediären Stoffwechsel* und den *Auf-* und *Abbau* der Wuchsstoffe selbst aufklären kann. *Hemmstoffe* (Antagonisten) und *Ersatzstoffe* der Wuchsstoffe haben sich als Schlüssel erwiesen, die ein Eindringen bis in feinste Stoffwechselvorgänge gestatten. Dabei ist es gleichzeitig möglich geworden, den *Mechanismus*, auf Grund dessen die Antagonisten das *Wachstum hemmen*, zu erforschen. Die Wirkungsweise einiger *Antiseptica*, *Chemotherapeutica* und *Anti-Biotica* ist so festgelegt oder dem Verständnis näher gebracht worden.

Literatur.

1. ACKERMANN, W. W., and H. KIRBY: Evidence for the natural occurrence of α-amino-β,β-dimethyl-γ-hydrooxybutyric acid (pantonine). J. biol. Chem. **175**, 483 (1948).
2. —, and W. SHIVE: α-Amino-β,β-dimethyl-γ-hydroxybutyric acid precursor of pantoic acid. J. biol. Chem. **175**, 867 (1948).

2a. AJL, S. J., W. R. HART and C. H. WERKMAN: Biotin in succinic acid oxidation. Enzymologia (Den Haag) **14**, 1 (1950).

3. ALLISON, F. E., and S. R. HOOVER: An accessory factor for the root nodule bacteria of leguminoses. J. Bacteriol. **27**, 561 (1934).
4. — —, and D. BURK: A respiration coenzyme. Science (New York) **78**, 217 (1933).
5. AUHAGEN, E.: p-Aminophenylketone als Antagonisten der p-Aminobenzoesäure. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **274**, 48 (1942).
7. — Über ein durch B. coli gebildetes Probiotin. Naturwiss. **33**, 221 (1946).
8. AXELROD, A. E., J. DE WOODY and K. HOFMANN: The differential effect of biotin sulfone and γ-(3,4-ureylencyclohexyl)-butyric acid on the microbiological activity of biotin and oxybiotin. J. biol. Chem. **163**, 771 (1946).
9. —, B. C. FLINN and K. HOFMANN: The metabolism of oxybiotin in yeast. J. biol. Chem. **169**, 195 (1947).
10. —, K. HOFMANN, S. E. PURVIS and M. MAYHALL: Action of biotin. J. biol. Chem **175**, 991 (1948).
11. BARRON. F. S. G., and C. M. LYMAN: Studies on biological oxidations XI. The metabolism of pyruvic acid by animal tissues and bacteria. J. biol. Chem. **127**, 143 (1939).
12. BEADLE, G. W.: An inositol-less mutant strain of Neurospora and its use in bioassays. J. biol. Chem. **156**, 683 (1944).
13. — Biochemical genetics. Chem. Reviews **37**, 15 (1945).
14. — Genetics and metabolism in Neurospora. Physiologic. Rev. **25**, 643 (1945).
15. — Physiological aspects of genetics. Annu. Rev. Biochem. **17**, 727 (1948).

15a. — Some recent developments in chemical genetics. Fortschr. Chem. org. Naturst. **5**, 20 (1948).

16. — H. K. MITCHELL and J. F. NYC: Kynurenine as an intermediate in the formation of nicotinic acid from tryptophan by Neurospora. Proc. nat. Acad. Sci. USA **33**, 155 (1947).
17. BEILER, J. M., and G. J. MARTIN: Inhibition of the action of tyrosine decarboxylase by phosphorylated desoxypyridoxine. J. biol. Chem. **169**, 345 (1947).

17a. BELCHER, M. R., and H. C. LICHSTEIN: Growth promotion and antibiotin effect of homobiotin and norbiotin. J. Bacteriol. **58**, 579 (1949).

18. BELLAMY, W. D., and I. C. GUNSALUS: Tyrosine decarboxylase II. Pyridoxine-deficient medium for apoenzyme production. J. Bacteriol. **50**, 95 (1945).
19. —, W. W. UMBREIT and I. C. GUNSALUS: The function of pyridoxine: conversion of members of the vitamin B_6-group into codecarboxylase. J. biol. Chem. **160**, 461 (1945).
20. BENDER, A. E., and H. A. KREBS: Amino-acid oxidase of Neurospora crassa. Biochem. J. **45**, XXI (1949).
21. BENHAM, R. W.: Cultural characteristics of Pityrosporum ovale — a lipophylic fungus. Nutrient and growth requirements. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **46**, 176 (1941).

22. BILLEN, D., and H. C. LICHSTEIN: Studies on the aspartic acid decarboxylase of Rhizobium trifolii. J. Bacteriol. **58**, 215 (1949).
23. BIRCH, T. W., P. GYÖRGYI and L. J. HARRIS: The vitamin B_2-complex. Differentiation of the anti-black tongue and the P-P-factors from lactoflavin and vitamin B_6 (so called 'rat pellagra' factor). Biochem. J. **29**, 2830 (1935).
24. BIRD, O. D.: Vitamin content of tubercle bacilli. Nature (London) **159**, 33 (1947).
24 a. BLASCHKO, H.: Substrate specifity of amino acid decarboxylases. Biochem. Biophys. Acta **4**, 130 (1950).
25. BOAS, F.: The effect of desiccation upon the nutritive properties of egg white. Biochem. J. **21**, 712 (1927).
26. BOHONOS, N., B. L. HUTCHINGS and W. H. PETERSON: Pyridoxine nutrition of lactic acid bacteria. J. Bacteriol. **44**, 479 (1942).
27. BONNER, D.: Identification of a natural precursor of nicotinic acid. Proc. nat. Acad. Sci. USA **34**, 5 (1948).
28. —, and G. W. BEADLE: Mutant strains of Neurospora requiring nicotinamide or related compounds for growth. Arch. Biochem. **11**, 319 (1946).
29. BONNER, J., and E. R. BUCHMAN: Synthesis carried out in vivo by isolated pea roots. Proc. nat. Acad. Sci. USA. **24**, 431 (1938).
30. — — The synthesis and destruction of vitamin B_1 by Phycomyces. Proc. nat. Acad. Sci. USA **25**, 164 (1939).
31. BONNER, D. M., and C. YANOFSKY: Quinolinic acid accumulation in the conversion of 3-hydroxyanthranilic acid to niacin in Neurospora. Proc. nat. Acad. Sci. USA **35**, 576 (1949).
32. BOVARNICK, M. R.: Formation of a nicotinamide-like substance from various amino acids and related compounds. J. biol. Chem. **151**, 467 (1943).
33. BOWDEN, J. P., and W. H. PETERSON: Release of free and bound forms of biotin from proteins. J. biol. Chem. **178**, 533 (1949).
34. BRAUNSTEIN, A. JE., und JE. W. GORJATSCHENKOWA (T. Ss. PASSCHINA): Die enzymatische Bildung von Alanin aus *l*-Kynurenin und *l*-Tryptophan, sowie die Rolle des Vitamins B_6 bei diesem Prozeß. Biochimia **14**, 163 (1949) — Chem. Zbl. **1950** I, 884.
35. BREUSCH, F. L.: Verbrennung der Fettsäuren im tierischen Organismus. Angew. Chem. **62**, 66 (1950).
36. BROQUIST, H. P., and E. E. SNELL: The interaction of avidin and oleic acid. J. biol. Chem. **173**, 435 (1948).
37. — — Studies of the mechanisms of histidine synthesis in lactic acid bacteria. J. biol. Chem. **180**, 59 (1949). — Federation Proc. **8**, 188 (1949).
37 a. G. M. BROWN, J. A. CRAIG and E. E. SNELL: Relation of the *Lactobacillus bulgaricus*-factor to pantothenic acid and coenzyme A. Arch. Biochem. **27**, 473 (1950).
38. BÜLBRING, E., L. M. LOURIE and U. PARDOE: The presence of acetylcholine in Trypanosoma rhodesiense and its absence from Plasmodium gallinaceum. J. Pharmacol. **4**, 290 (1949).
39. BÜNNING, E.: Wachstum und N-Assimilation bei Aspergillus niger unter dem Einfluß von Wachstumsregulatoren und von Vitamin B_1. Ber. dtsch. bot. Ges. **52**, 423 (1934).
40. BRUECKNER, A. H.: Sulfonamide activity as influenced by variation in pH of culture media. Yale J. Biol. Med. **15**, 813 (1943).
41. BURGEFF, H.: Pflanzliche Avitaminose und ihre Behebung durch Vitaminzufuhr. Ber. dtsch. bot. Ges. **52**, 385 (1934).

42. BURK, D., and R. G. WINZLER: Heat-labile avidin-uncombinable species-specific and other vitamers of biotin. Science (New York) **97**, 57 (1943).
43. BURKHOLDER, P. R.: Influence of some environmental factors upon the production of riboflavin by a yeast. Arch. Biochem. **3**, 121 (1943).
44. — Synthesis of riboflavin by a yeast. Proc. nat. Acad. Sci. USA **29**, 166 (1943).
45. —, and I. MCVEIGH: Growth of Phycomyces Blakesleeanus in relation to various environmental conditions. Amer. J. Bot. **27**, 634 (1940).
46. — — Synthesis of vitamins by intestinal bacteria. Proc. nat. Acad. Sci. USA **28**, 285 (1942).
47. BUSTON, H. W., S. E. JACOBS and A. GOLDSTEIN: Cause of physiological activity of gammexane. Nature (London) **158**, 22 (1946).
48. —, and S. KASINATHAN: The accessory factor necessary for the growth of Nematospora gossypii III. The preparation of concentrates of the second accessory factor. Biochem. J. **27**, 1859 (1933).
49. BUTENANDT, A.: Über die Bildung der Insekten-Ommochrome. Forsch. u. Fortschr. **21/23**, 54 (1947).
50. —, W. WEIDEL und H. SCHLOSSBERGER: 3-Oxykynurenin als cn^+-Gen-abhängiges Glied des intermediären Tryptophanstoffwechsels. Z. Naturforsch. **4 b**, 242 (1949).
51. CAMIEN, M. N., and M. S. DUNN: The utilization of *d*-methionine by Lactobacillus arabinosus 17—5. J. biol. Chem. **182**, 119 (1950).
52. Casman, E. P.: The inactivation of the V-factor by erythrocytes and the V-sparing property of nicotinamide. J. Bacteriol. **53**, 561 (1947).
52 a. CHAUDHURI, D. K. and E. KODICEK: Purification of a precursor of nicotinic acid from wheat bran. Nature (London) **165**, 1022 (1950).
52 b. CHELDELIN, V. H., M. J. BENNET and H. A. KORNBERG: Modifications in the *Lactobacillus fermenti* 36 assay for thiamin. J. biol. Chem. **166**, 799 (1946).
53. —, and C. A. SCHINK: Pantothenic acid studies I. Growth effect of pantothenic acids analogs. J. Amer. chem. Soc. **69**, 2625 (1947).
54. CHEVALIER, P.: Une torula productive de flavine. Bull. Soc. Chim. biol. **23**, 421 (1941).
54 a. CHRISTMAN, J. F., and H. C. LICHSTEIN: The relationship of biotin to the coenzyme of certain amino acid deaminases. J. Bacteriol. **60**, 107 (1950).
55. COHEN, A.: The synthesis of compounds related to pyridoxine (vitamin B_6). Festschr. EMIL BARELL **1946**, 71.
56. COHEN, G. N.: Nature et mode de formation des acides volatiles trouvés dans les cultures de bactéries anaérobies strictes. Ann. Inst. Pasteur **77**, 471 (1949).
57. —, G. COHEN-BAZIRE et B. MINZ: Synthèse biologique du coenzyme de la diastase acétylante (coenzyme A) à partir de pantothénate et de glutamate par les suspensions lavées de Clostridium saccharobutyricum. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **229**, 260 (1949).
58. COULTHARD, C. E., R. MICHAELIS, W. F. SHORT, G. SYKES, G. E. H. SKRIMSHIRE, A. F. B. STANDFAST, J. H. BIRKINSHAW and H. RAISTRICK: Notatin, an antibacterial glucose-aerodehydrogenase from Penicillium notatum Westling and P. resticulosum spec. nov. Biochem. J. **39**, 24 (1945).
59. CURD, F. H. S., M. I. DAVIS, E. C. OWEN, F. L. ROSE and G. A. P. TUCY: Synthetic antimalarials VI. Some 4-arylamino-2-aminoalkylamino-6-methylpyrimidines. J. chem. Soc. (London) **1946**, 370.

60. CURD, F. H. S., C. G. RAISON, and F. L. ROSE: Synthetic antimalarials V. 2-Naphthylamino-4-aminoalkylamino-6-methylpyrimidines. J. chem. Soc. (London) **1946**, 366.
61. —, and F. L. ROSE: Synthetic antimalarials IV. 2-Phenylguanidino-4-aminoalkylamino-6-methylpyrimidines. J. chem. Soc. (London) **1946**, 362.
62. DAMMANN, E., O. Z. ROTINI und F. F. NORD: Enzymatische Umsetzungen durch Fusarium gramminearum (Schwabe) (Giberella Saubinettii), zugleich Beitrag zur Wirkungsweise der Blausäure und des Vitamins B_1 Biochem. Z. **297**, 184 (1938).
63. DAVID, W. E., and H. C. LICHSTEIN: Aspartic acid decarboxylase in bacteria. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **73**, 216 (1950).
64. DAVIS, B. D.: Studies on nutrionally deficient bacterial mutants isolated by means of penicillin. Experientia **6**, 41 (1950).
65. DAVIS, J. G., and J. GOLDING: The question of the identity of a bacterial growth promoting factor with vitamin B_1. Biochem. J. **24**, 1503 (1930).
66. —, and A. T. R. MATTICK: J. Dairy Res. **1**, 50 (1929).
67. — — J. Dairy Res. **2**, 136 (1930).
68. DELWICHE, E. A.: Biotin function in succinic acid decarboxylation by Propionibacterium pentosaceum. J. Bacteriol. **59**, 439 (1950).
69. DITTMER, K., D. B. MELVILLE and V. DU VIGNEAUD: The possible synthesis of biotin from desthiobiotin by yeast and the anti-biotin effect of desthiobiotin for Lactobacillus casei. Science (New York) **99**, 203 (1944).
70. —, and V. DU VIGNEAUD: Antibiotins. Science (New York) **100**, 129 (1944).
71. — — Antibiotin activity of imidazilidone aliphatic acids. J. biol. Chem. **169**, 63 (1947).
72. — —, P. GYÖRGY and C. S. ROSE: A study of biotin sulfone. Arch. Biochem. **4**, 229 (1944).
73. DORFMAN, A., S. BERKMAN and ST. A. KOSER: Pantothenic acid in the metabolism of Proteus morganii. J. biol. Chem. **144**, 393 (1942).
74. DORNOW, A., und W. SCHACHT: Über eine Darstellung des Heterovitamins B_1. Chem. Ber. **82**, 117 (1949).
75. DOUDOROFF, M.: Lactoflavin and bacterial luminiscence. Enzymologia (Den Haag) **5**, 239 (1938).
76. EAKIN, R. E., and E. A. EAKIN: A biosynthesis of biotin. Science (New York) **96**, 187 (1942).
77. —, E. E. SNELL and R. J. WILLIAMS: The concentration and assay of avidin, the injury producing protein in raw egg white. J. biol. Chem. **140**, 535 (1941).
78. —, and R. J. WILLIAMS: Vitamin B_6 as a yeast nutrilite. J. Amer. chem. Soc. **61**, 1932 (1939).
79. EASTCOTT, E. V.: Wildier's Bios. The isolation and identification of "Bios I". J. physic. Chem. **32**, 1094 (1923).
80. ELLINGER, P., and M. M. ABDEL KADER: Die Bildung von Nicotinsäureamid durch B. coli. Biochem. J. **42**, IX (1948). — Chem. Zbl. **1948** II, 1309.
81. — — Role of tryptophan in the biosynthesis of nicotinamide. Nature (London) **163**, 799 (1949).
82. — — The nicotinamide-saving action of tryptophan and the biosynthesis of nicotinamide by the intestinal flora of the rat. Biochem. J. **44**, 285 (1949).
83. — — Nicotinamide biosynthesis by intestinal bacteria as influenced by methyltryptophanes. Biochem. J. **44**, 507 (1949).

84. ELVEHJEM, C. A., R. J. MADDEN, F. M. STRONG and D. W. WOOLLEY: Relation of nicotinic acid and nicotinic acid amide to canine black tongue. J. Amer. chem. Soc. **59**, 1767 (1937).
85. — — — — The isolation and identification of the anti-black tongue factor. J. biol. Chem. **123**, 137 (1938).
86. —, and L. J. TEPLY: The structure and estimation of natural products functionally related to nicotinic acid. Chem. Rev. **33**, 185 (1943).
87. ENDERS, D.: Eine neue Bildungsweise von β-Alanin. Naturwiss. **31**, 209 (1943).
88. EPPRIGHT, M. A., and R. J. WILLIAMS: Effect of certain limiting conditions on the synthesis of B-vitamins by yeast. J. gen. Physiol. **30**, 61 (1946).
89. ERLENMEYER, H., H. BLOCH und H. KIEFER: Über die Wirkung einiger Pyridin- und Thiazolderivate auf das Wachstum von Staphylococcus aureus. Helv. chim. Acta **25**, 1066 (1942).
90. v. EULER, H., B. HÖGBERG, P. KARRER, H. SALOMON und H. RUCKSTUHL: Tetrahydronicotinsäure und Hexahydronicotinsäure als Wachstumsfaktoren bei Staphylococcus aureus und Proteus vulgaris. Helv. Chim. Acta **27**, 382 (1944).
91. —, und F. PHILIPSON: Wasserlösliche Wachstumsfaktoren. Biochem. Z. **245**, 418 (1932).
92. EUSEBI, A. J., and L. R. CERECEDO: Anti-thiamine effect of oxythiamine and Neo-pyrithiamine. Science (New York) **110**, 162 (1949).
93. FILDES, P.: Inhibition of bacterial growth by indole acrylic acid and its relation to tryptophan; illustration of inhibitory action of substances chemically related to essential metabolites. Brit. J. exp. Pathol. **22**, 293 (1941).
94. — The biosynthesis of tryptophan by Bacterium typhosum. Brit. J. exp. Pathol. **26**, 416 (1945).
95. —, and H. N. RYDON: Inhibition of growth of Bacterium typhosum by methyl derivatives of indole and tryptophan. Brit. J. exp. Pathol. **28**, 211 (1947).
96. FINK, H., und F. JUST: Über den Vitamin B_1-Gehalt verschiedener Hefen und seine Beeinflussung. I.—VII. Mitt. Biochem. Z. **308**, 15 (1941); **309**, 1, 212, 219 (1941); **311**, 61, 285 (1942); **313**, 39 (1942).
97. FISCHER, E. H., und P. BERNFELD: Die Abwesenheit von Inosit in α-Amylase. Helv. chim. Acta **32**, 1146 (1949).
97 a. FITZGERALD, E. E., and E. B. HUGHES: Microbiological assay of aneurine; an improved employing Lactobacillus fermenti 36. Analyst **74**, 340 (1949).
98. FOSTER, J. W.: Microbiological effects of riboflavin I. Introduction, II. Bacterial oxidation of riboflavin to lumichrome. III. Oxidation studies with Pseudomonas riboflavina. J. Bacteriol. **47**, 27 (1944); **48**, 97 (1944).
98 a. FRAENKEL-CONRAT, H. L., W. H. WARD, N. S. SNELL and E. D. DUCAY: The nucleic acid of avidin. J. Amer. chem. Soc. **72**, 3826 (1950).
99. FRIES, N.: Adermin (Vitamin B_6) als Wachstumsfaktor für Ophiostoma ulmi (Buisman) Nannf. Naturwiss. **30**, 685 (1942).
100. — Vitamin B_1, Vitamin B_6 and biotin as growth substances for some ascomycetes. Nature (London) **152**, 105 (1943).
101. FROMAGEOT, C., et M. CONFINO: Hexachlorcyclohexène et méso-inosite. Biochim. Biophys. Acta **2**, 142 (1948).
102. GEORG, L. K.: Conversion of tryptophan to nicotinic acid by Trichophyton equinum. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **72**, 653 (1949).

103. GINGRICH, W., and F. SCHLENK: Codehydrogenase I and other pyridinium compounds as V-factor for Hemophilus influenzae and H. parainfluenzae. J. Bacteriol. **47**, 535 (1944).
104. GORDON, M., J. M. RAVEL, R. E. EAKIN and W. SHIVE: Formylfolic acid, a functional derivative of folic acid. J. Amer. chem. Soc. **70**, 878 (1948).
105. GUILLIERMOND, A., M. FONTAINE et A. RAFFY: Sur l'existence dans l'Eremothecium Ashbyii d'un pigment jaune, se rapportant au groupe des flavines. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **201**, 1077 (1935).
106. GUIRARD, B. M., E. E. SNELL and R. J. WILLIAMS: The nutritional role of acetate for lactic acid bacteria I. The response to substances, related to acetate. II. Fractionation of extracts of natural minerals. Arch. Biochem. **9**, 361, 381 (1946).
107. GUNSALUS, I. C., W. D. BELLAMY and W. W. UMBREIT: A phosphorylated derivative of pyridoxal as the coenzyme of tyrosine decarboxylase. J. biol. Chem. **155**, 685 (1944).
108. —, and W. W. UMBREIT: Codecarboxylase *not* the 3-phosphate of pyridoxale. J. biol. Chem. **170**, 415 (1947).
109. GYÖRGY, P.: Vitamin B_2 and the Pellagra-like dermatitis in rats. Nature (London) **133**, 498 (1934).
110. — Crystalline Vitamin B_6. J. Amer. chem. Soc. **60**, 983 (1938).
111. —, D. B. MELVILLE, D. BURK and V. DU VIGNEAUD: The possible identity of Vitamin H with biotin and coenzyme R. Science (New York) **91**, 243 (1940).
112. —, and C. S. ROSE: Distribution of biotin and avidin in hen egg. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **49**, 294 (1942).
113. HAAS, E.: Effects of atabrine and quinine on isolated respiratory enzymes. J. biol. Chem. **155**, 321 (1944).
114. —, B. L. HORECKER and T. R. HOGNESS: The enzymatic reduction of cytochrome. Cytochrome reductase. J. biol. Chem. **136**, 747 (1940).
115. HARRISON, K.: Isolation of acetylcholine as a salt (hexylate) of hexanitrodiphenylamine. J. gen. Microbiology **1**, 296 (1947).
116. HARDEN, A., and W. J. YOUNG: The coferment of yeast juice. Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B **77**, 405 (1906); **78**, 369 (1906).
117. HARTELIUS, V.: Hemmung der Wirkung von β-Alanin auf die Atmung der Hefe durch β-Aminobuttersäuren. Naturwiss. **31**, 440 (1943).
118. —, und N. NIELSEN: Bildung von Hefewuchsstoff durch Erwärmung von Zucker mit Ammoniumhydroxyd. Biochem. Z. **307**, 333 (1941).
119. HASKINS, F. A., and H. K. MITCHELL: Evidence for a tryptophan cycle in Neurospora. Proc. nat. Acad. Sci. USA **35**, 500 (1949).
120. HELLERMANN, L., A. LINDSAY and M. R. BOVARNICK: Flavoenzym-catalysis-inhibition of *d*-amino acid-oxidase by competition with flavin-adenine-dinucleotide of atabrine, quinine and certain other compounds. J. biol. Chem. **163**, 553 (1946).
121. HENDERSON, L. N.: Quinolinic acid metabolism II. Replacement of nicotinic acid for the growth of the rat and Neurospora. J. biol. Chem. **181**, 677 (1949).
122. HEYNS, K.: Die Bedeutung der Transaminierung im Stoffwechsel. Angew. Chem. **61**, 474 (1949).
123. HILLS, G. M.: Aneurin (Vitamin B_1) and pyruvate metabolism by Staphylococcus aureus. Biochem. J. **32**, 383 (1938).
124. — Experiments on the function of pantothenate in bacterial metabolism. Biochem. J. **37**, 418 (1943).

124 a. HOCKENHULL, D. J. D., K. RAMACHANDRAN and T. K. WALKER: The biosynthesis of penicillins. Arch. Biochem. **23**, 161 (1949).
125. HOFMANN, K., A. BRIDGEWATER and A. E. AXELROD: Furan and tetrahydrofuran derivatives X. The synthesis of the sulfonic acids analogs of oxybiotin and homooxybiotin. J. Amer. chem. Soc. **71**, 1253 (1949).
126. —, D. F. DICKEL, and A. E. AXELROD: The preliminary characterisation of two biotin containing fractions in beef liver. J. biol. Chem. **183**, 481 (1950).
127. —, and P. WINNICK: The determination of oxybiotin in the presence of biotin. J. biol. Chem. **160**, 449 (1945).
128. — —, and A. E. AXELROD: The use of Raney Nickel in a differential assay for oxybiotin and biotin. J. biol. Chem. **169**, 191 (1947).
129. HOLDEN, J. T., C. FURMAN and E. E. SNELL: The vitamin B_6-group XVI. *d*-Alanin and the vitamin B_6 content of microorganisms. J. biol. Chem. **178**, 789 (1949).
130. —, and E. E. SNELL: The vitamin B_6-group XVII. The relation of *d*-alanin and vitamin B_6 to growth of lactic acid bacteria. J. biol. Chem. **178**, 799 (1949).
130a. HOOD, D. W., and C. M. LYMAN: The utilization of alloisoleucine by Lactobacillus arabinosus. J. biol. Chem. **186**, 195 (1950).
131. HULL, R., B. J. LOVELL, H. T. OPENSHAW, L. C. PAYMAN and A. R. TODD: Synthetic antimalarials III. Some derivatives of mono- and dialkylpyrimidines. J. chem. Soc. (London) **1946**, 357.
132. HUTCHINGS, B. L., und D. W. WOOLLEY: Growth of some hemolytic streptococci on an chemically defined medium. Science (New York) **90**, 41 (1939).
133. IVÁNOVICS, G.: Der antiseptische Wirkungsmechanismus verschiedener Benzolderivate mit besonderer Rücksicht auf die Salicylat-Wirkung. Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **102**, 238 (1942).
134. — Das Salicylat-Ion, als spezifischer Hemmungsstoff der Biosynthese der Pantothensäure. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **276**, 33 (1942).
135. — Worin besteht die antiseptische Wirkungsweise der Salicylsäure? Klin. Wschr. **21**, 343 (1942).
136. — Mechanismus der antiseptischen Wirkung der Salicylsäure. Naturwiss. **30**, 104 (1942).
137. — The specifity of the antibacterial action of sodium salicylate. Schweiz. Z. Pathol. Bakteriol. **11**, 54 (1948) — Chem. Abstr. **42**, 4644 (1948).
138. — Antagonism between effects of *p*-aminosalicylic acid and salicylic acid on growth of Mycobacterium tuberculosis. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **70**, 462 (1949).
139. —, J. CSÁBI and E. DICZFALUSY: Some observations on the antibacterial action of sodium salicylate. Hung. Acta Physiol. **1**, 171 (1948). — Chem. Abstr. **43**, 9146 (1949).
140. —, und L. VARGHA: Über die biologische Bedeutung und Synthese von Sulfonsäureanaloga der Pimelinsäure. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **281**, 157 (1944).
141. IVERSON, W. P., and S. A. WAKSMAN: Effect of nutrients on growth of streptomycin-dependent strains of Escherichia coli. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **69**, 586 (1948).
142. JANSEN, B. C. P., und W. F. DONATH: Über die Isolierung des Anti-Beri-Beri-Vitamins. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam **35**, 923 (1926). — Chem. Zbl. **1927** I, 1851.

142 a. Kamen, M. D.: Radioactive tracers in biology. Academic Press, New York (1948).
142 b. Karrer, P.: Aminosäuredecarboxylase. Schweiz. Z. Path. Bakt. **10**, 351 (1947).
142 c. — Einige Untersuchungen auf dem Vitamingebiet. Vortr. Ges. Dtsch. Chem. Hauptversammlung Frankf. 10.—15. 7. 1950. — Ref. Angew. Chem. **62**, 444 (1950); s. a. Helv. Chim. Acta **33**, 555 (1950).
143. —, (und H. Ruckstuhl): Zur Frage der Ursache der antagonistischen Wirkung von Vitaminen und Antivitaminen. Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. **1**, 236 (1945).
143a. —, R. Schwyzer und A. Kostić: Über Cocarboxylase-Wirkung. Der Triphosphorsäure-Ester eines niedrigeren und eines höheren Thiaminhomologen. Helv. Chim. Acta **33**, 1482 (1950).
144. — und M. Viscontini: Synthetische krystallisierte Codecarboxylase. Helv. chim. Acta **30**, 52 (1947).
145. — —, und O. Forster: Pyridoxal-3-phosphat als Coferment der *l*-Aminosäure-Decarboxylase. Helv. chim. Acta **31**, 1004 (1948).
146. Keil, W., und L. Weyrauch: Zur Pharmakologie und Chemie vergorener Nahrungsmittel V. Weitere Untersuchungen über das Acetylcholinbildende Bacterium. Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh., Abt. II, **97**, 90 (1937).
147. Keilin, D., and E. F. Hartree: Prosthetic group of glucose-oxidase (notatin). Nature (London) **157**, 801 (1946).
148. — — Properties of glucose-oxidase (notatin). Biochem. J. **42**, 221 (1928).
149. Kidder, G. W., and V. C. Dewey: The biosynthesis of thiamine by normally athiaminogenic microorganisms. Growth **6**, 405 (1942).
150. — — Biochemistry of Tetrahymena VII. Riboflavin, pantothen, biotin, niacin and pyridoxin in the growth of T. gelii W. Biologic. Bull. **89**, 229 (1945).
151. King, T. E., and V. H. Cheldelin: Pantothenic acid studies IV. Propionic acid and β-alanin utilization. J. biol. Chem. **174**, 273 (1948).
151 a. — — Pantothenic acid studies VIII. Growth of microorganisms and counteraction of antimetabolites with a pantothenic acid conjugate (PAC). J. Bacteriol. **59**, 229 (1950).
152. —, I. G. Fels and V. H. Cheldelin: Pantothenic acid studies VI. A biologically active conjugate of pantothenic acid. J. Amer. chem. Soc. **71**, 131 (1949).
153. —, L. M. Locher and V. H. Cheldelin: Pantothenic acid studies III. A pantothenic acid conjugate for Acetobacter suboxydans. Arch. Biochem. **17**, 483 (1948).
154. —, R. L. Stearman and V. H. Cheldelin: Pantothenic acid studies V. Reversal of 2-chloro-4-aminobenzoic acid inhibition in Escherichia coli by pantothenic acid. J. Amer. chem. Soc. **70**, 3969 (1948).
155. Kirkwood, S., and P. H. Phillips: The anti-inositol effect of γ-hexachlorocyclohexane. J. biol. Chem. **163**, 251 (1946).
156. Kitawin, G. S.: Gewinnung von krystallinischem Riboflavin durch Einwirkung von Quecksilbersalzen auf Aspergillus niger. C. R. (Doklady) Acad. Sci. URSS **28**, 517 (1940). — Ber. ges. Physiol. exp. Pharmakol. **123**, 640 (1941).
157. — Der Einfluß von Quecksilbersalzen auf die Säure- und Lactoflavinbildung bei Aspergillus niger. Biochimia **4**, 283 (1939). — Ber. ges. Physiol. exp. Pharmakol. **124**, 94 (1941).

157 a. KITAY, E., and E. E. SNELL: Some additional nutritional requirements of certain lactic acid bacteria. J. Bacteriol. **60**, 49 (1950).
158. KNIGHT, B. C. J. G.: The nutrition of Staphylococcus aureus; nicotinic acid and vitamin B_1. Biochem. J. **31**, 731 (1937).
159. — The nutrition of Staphylococcus aureus. The activities of nicotinic amide, aneurine (vitamin B_1) and related compounds. Biochem. J. **31**, 966 (1937).
160. — Nicotinic acid and the growth of Staphylococcus aureus. Nature (London) **139**, 628 (1937).
161. — Growth factors in microbiology. Vitamins and Hormones **3**, 105 (1945).
162. KÖGL, F., und W. A. J. BORG: Hefewachstum, Gärung und Faktor Z-Wirkung. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **269**, 97 (1941).
163. —, und N. FRIES: Über den Einfluß von Biotin, Aneurin und meso-Inosit auf das Wachstum verschiedener Pilzarten. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **249**, 93 (1937).
164. —, und B. TÖNNIS: Über das Bios-Problem. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **242**, 43 (1936).
165. —, und W. J. VAN WAGTENDONK: Über die Bedeutung von Biotin für das Wachstum von Staphylococcus pyogenes aureus. Recueil Trav. chim. Pays-Bas **57**, 747 (1938).
166. KORNBERG, A.: Nucleotide pyrophosphatase and triphosphopyridine structure. J. biol. Chem. **174**, 1051 (1948).
167. — The participation of inorganic pyrophosphate in the reversible enzymic synthesis of diphosphopyridine nucleotide. J. biol. Chem. **176**, 1475 (1948).
168. — Reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide and inorganic pyrophosphate. J. biol. Chem. **182**, 779 (1950).
169. — Enzymatic synthesis of triphosphopyridine nucleotide. J. biol. Chem. **182**, 805 (1950).
170. —, and O. LINDBERG: Diphosphopyridine nucleotide pyrophosphatase. J. biol. Chem. **176**, 665 (1948).
171. —, and W. E. PRICER jr.: Nucleotide pyrophosphatase. J. biol. Chem. **182**, 763 (1950).
172. KOSER, A. ST., S. BERKMAN and A. DORFMAN: Comparative activity of nicotinic acid and nicotinamide as growth factors for microorganisms. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **47**, 504 (1941).
173. —, and G. J. KASAI: The growth response of Leuconostoc to nicotinic acid, nicotin amide and some related compounds. J. infect. Diseases **83**, 271 (1948).
174. —, and M. H. WRIGHT: Vitamin requirements of Torula cremoris. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **53**, 249 (1943).
175. — —, and A. DORFMAN: Aspartic acid as a partial substitute for the growth stimulating effect of biotin on Torula cremoris. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **51**, 204 (1942).
176. KRAMPITZ, L. O., D. W. WOOLLEY and A. G. C. WHITE: Manner of inactivation of thiamine by fish tissue. J. biol. Chem. **152**, 9 (1944).
177. KRAUSKOPF, E. J., E. E. SNELL and E. MCCOY: Growth factors for bacteria XI. A survey of the pantothenic acid and riboflavin requirements of various groups of bacteria. Enzymologia (Den Haag) **7**, 327 (1939).
178. KRÜGER, K. K., and W. H. PETERSON: The nutritional requirements of Lactobacillus pentosus 124—2. J. Bacteriol. **55**, 683 (1948).

179. KUHN, R., P. GYÖRGY und TH. WAGNER-JAUREGG: Über eine neue Klasse von Naturfarbstoffen. Ber. dtsch. chem. Ges. **66**, 317 (1933).
180. —, E. F. MÖLLER, G. WENDT und H. BEINERT: 4,4'-Diaminobenzophenon und andere schwefelfreie Verbindungen mit Sulfonamidwirkung. Ber. dtsch. chem Ges. **75**, 711 (1942).
180a. —, und H. RUDY: Lactoflavin als Coferment; Wirkstoff und Träger. Ber. dtsch. chem. Ges. **69**, 2557 (1936).
181. —, und G. WENDT: Über das antidermatitische Vitamin der Hefe. Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 780, 1118, 1534 (1938).
182. —, F. WEYGAND und E. F. MÖLLER: Über einen Antagonisten des Lactoflavins. Ber. dtsch. chem. Ges. **76**, 1044 (1943).
183. —, und TH. WIELAND: Über Dioxyacyl-derivate des β-Alanins und *l*-Leucins aus der Leber des Thunfisches. Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 962 (1940).
184. — — Zur Biogenese der Pantothensäure. Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 121 (1942).
185. — —, und E. F. MÖLLER: Synthese des (α,γ-Dioxy-β,β-dimethyl-butyryl) taurins, eines spezifischen Hemmstoffs für Milchsäurebakterien. Ber. dtsch. chem. Ges. **74**, 1605 (1941).
186. KUEHL jr., F. A., R. L. PECK, CH. E. HOFFHINE jr., E. W. PEEL and K. FOLKERS: Streptomyces Antibiotics XIV. The position of the linkage of streptobiosamine to streptidine in streptomycin. J. Amer. chem. Soc. **69**, 1234 (1947).
187. LAMANNA, C.: Growth stimulation by sulfanilamide in low concentration. Science (New York) **95**, 304 (1942).
188. LANDY, M. and D. M. DICKEN: A microbiological assay method for six B-vitamins using Lactobacillus casei and a medium of essentially known composition. J. Lab. clin. Med. **27**, 1086 (1942).
189. — —, M. M. BICKING and W. R. MITCHELL: Use of avidin in studies of biotin requirements of microorganisms. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **49**, 441 (1942).
190. LANE, R. L., and R. J. WILLIAMS: Inositol, an active constituant of pancreatic (α) amylase. Arch. Biochem. **19**, 329 (1948).
191. LANKFORD, CH. E., and P. K. SKAGGS: Cocarboxylase as a growth factor for certain strains of Neisseria gonorrhoeae. Arch. Biochem. **9**, 265 (1946).
192. LARDY, H. A., R. L. POTTER and R. H. BURRIS: Metabolic functions of biotin. I. The role of biotin in bicarbonate utilization by Lactobacillus arabinosus, studied with C^{14}. J. biol. Chem. **179**, 721 (1949).
193. — —, and C. A. ELVEHJEM: The role of biotin in bicarbonate utilization by bacteria. J. biol. Chem. **169**, 451 (1947).
194. LASH-MILLER, W., E. V. EASTCOTT and J. E. MACONACHIE: Wildiers' Bios: The fractionation of bios from yeast. J. Amer. chem. Soc. **55**, 1502 (1933).
195. LAVOLLAY, J., et F. LABOREY: Caractérisation de la lactoflavine produite par Aspergillus niger van Tgh. partiellement carencé en magnésium. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **208**, 1056 (1939).
196. — — Sur les circonstances d'apparition de pigments jaunes dans le liquide de culture d'Aspergillus niger. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **206**, 1055 (1938), s. a. Annales Fermentat. **6**, 129 (1941).
197. LEIN, J., H. K. MITCHELL and M. B. HOULAHAN: A method for selection of biochemical mutants in Neurospora. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **34**, 435 (1948).

198. Leonian, L. H., and V. G. Lilly: Conversion of desthiobiotin into biotin or biotin-like substances by some microorganisms. J. Bacteriol. **49**, 291 (1945).
199. Lepkovsky, S.: The isolation of factor I in crystalline form. J. biol. Chem. **124**, 125 (1938).
200. Lewis, K. H., and J. E. Snyder: The action of sulfanilamide in vitro on various species of Lactobacillus and Propionibacteria. J. Bacteriol. **39**, 28 (1940).
201. Lichstein, H. C.: Probable existence of a coenzyme form of biotin. J. biol. Chem. **177**, 125 (1949).
202. — On the mode of action of biotin. J. biol. Chem. **177**, 487 (1949).
203. —, and J. F. Christman: The role of biotin and adenylic acid in amino acid deaminases. J. biol. Chem. **175**, 649 (1948).
204. — — The nature of the coenzyme of aspartic acid, serine and threonine deaminases. J. Bacteriol. **58**, 565 (1949).
205. — —, and W. L. Boyd: The comparitive effects of biocytin and a yeast extract concentrate on aspartic acid deaminase. J. Bacteriol. **59**, 113 (1950).
206. —, I. C. Gunsalus and W. W. Umbreit: Function of the vitamin B_6-group: pyridoxal phosphate (codecarboxylase) in transamination. J. biol. Chem. **161**, 311 (1945).
207. —, and W. W. Umbreit: A function for biotin. J. biol. Chem. **170**, 329 (1947).
208. — — Biotin activation of certain deaminases. J. biol. Chem. **170**, 423 (1947).
209. Liebig, J.: Sur la fermentation et la source de la force musculaire. Ann. Chim. Phys. 4. Serie **23**, 5 spez. 42 (1871).
210. Lilly, V. G., and L. H. Leonian: The anti-biotin effect of desthiobiotin. Science (New York) **99**, 205 (1944).
211. Linz, R., et J. Lane: Sur un variant de Micrococcus lysodeikticus dépendant de la streptomycine. C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **144**, 441 (1950).
212. Lipmann, F.: Acetyl phosphate. Advances Enzymol. **6**, 231 (1946).
213. — On the chemistry and function of coenzyme A. 1. Internat. Congr. Biochem. Cambridge **1949**, 230. — s. a. Federation Proc. **6**, 272 (1947).
214. —, N. O. Kaplan, G. D. Novelli, L. C. Tuttle and B. M. Guirard: Coenzyme for acetylation, a pantothenic acid derivative. J. biol. Chem. **167**, 869 (1947).
214 a. — — — — —: Isolation of coenzyme A. J. biol. Chem. **186**, 235 (1950).
215. Lohmann, K., und Ph. Schuster: Untersuchungen über die Cocarboxylase Biochem. Z. **294**, 188 (1937).
216. Loo, Y. H., H. E. Carter, N. Kehm and B. Anderlik: The effect of streptomycin on a variant of Torula utilis. Arch. Biochem. **26**, 144 (1950).
217. Lwoff, A., et M. Lwoff: Sur le rôle physiologique des codehydrogénases pour Hemophilus parainfluenzae. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **203**, 896 (1936).
218. — — Studies on codehydrogenases I. Nature of growth factor V. II. Physiological function of growth factor V. Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B **122**, 352, 360 (1937).
218 a. —, et M. Morel: Bedingungen des Mechanismus der bactericiden Wirkung des Vitamin C. Die Rolle des Wasserstoffsuperoxyds. Ann. Inst. Pasteur **68**, 323 (1942). — Chem. Zbl. **1942** II, 1814.

219. LWOFF, et A. QUERIDO: Dosage de l'amide de l'acide nicotinique au moyen duteste Proteus. Principe de la methode. C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées. **129**, 1039 (1938).
220. LYMAN, C. M., and K. A. KUIKEN: Federation Proc. **7**, 170 (1948).
221. — O. MOSELEY, S. WOOD, B. BUTLER and F. HALE: The function of pyridoxine in lactic acid bacteria. J. biol. Chem. **162**, 173 (1946).
222. MADINAVEITIA, J.: Antagonism of some antimalarial drugs by riboflavin. Biochem. J. **40**, 373 (1946).
223. MANN, P. J. G., and J. H. QUASTEL: Nicotinamide, coenzyme and tissue metabolism. Biochem. J. **35**, 502 (1941).
224. MARNAY, C.: Action de la phénylalanine sur la croissance du Coli-bacille inhibée par l'acide indole acrylique. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **229**, 1036 (1949).
225. MAYER, R. L.: Pigment production by tubercle bacillus in presence of *p*-aminobenzoic acid. Science (New York) **98**, 203 (1943).
226. — The influence of sulfanilamide upon the yellow pigment, formed by Mycobacterium tuberculosis from *p*-aminobenzoic acid. J. Bacteriol. **48**, 93 (1944).
227. — A yellow pigment formed from *p*-aminobenzoic acid in Mycobacterium tuberculosis var. hominis. J. Bacteriol. **48**, 337 (1944).
228. —, and C. CRANE: A yellow pigment formed from *p*-aminobenzoic acid and *p*-aminosalicylic acid by various strains of Mycobacterium. Nature (London) **165**, 37 (1950).
229. —, and M. RODBART: Production of riboflavin by Mycobacterium smegmatis. Arch. Biochem. **11**, 49 (1946).
230. MCILWAIN, H.: The nutrition of Streptococcus hemolyticus. Growth in a chemically defined mixture: need for vitamin B_6. Brit. J. exp. Pathol. **21**, 25 (1940).
231. — Pyridine-3-sulfonic acid and its amide as inhibitors of bacterial growth. Brit. J. exp. Pathol. **21**, 136 (1940).
232. — Amino-sulfonic acids analogs of natural aminocarboxylic acids. J. chem. Soc. (London) **1941**, 75.
233. — Bacterial inhibition by metabolites analogs; pantoyl taurine. Brit. J exp. Pathol. **23**, 95 (1942).
234. — Interrelations in microorganisms between growth and the metabolism of vitamin-like substances. Advances Enzymol. **7**, 409 (1947).
235. — Metabolic changes which form the bases of a microbiological assay of nicotinic acid. Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B **136**, 12 (1949).
236. — Cozymase degradation and the control of carbohydrate metabolism in brain. Biochem. J. **44**, XXXIII (1949).
237. —, and D. E. HUGHES: Decomposition and synthesis of cozymase by bacteria. Biochem. J. **43**, 60 (1948).
238. —, and R. RODNIGHT: Breakdown of the oxidized forms of coenzymes I and II by an enzyme from the central nervous system. Biochem. J. **45**, 337 (1949).
239. —, D. A. STANLEY and D. E. HUGHES: The behavior of Lactobacillus arabinosus towards nicotinic acid and its derivatives. Biochem. J. **44**, 153 (1949).
240. MCNUTT, W. S., and E. E. SNELL: Phosphates of pyridoxal and pyridoxamine as growth factors for lactic acid bacteria. J. biol. Chem. **173**, 801 (1948).
241. — — Pyridoxalphosphate and pyridoxaminphosphate as growth factors for lactic acid bacteria. J. biol. Chem. **182**, 557 (1950).

241 a. McRorie, R. A., P. M. Masley and W. L. Williams: Relationship of the Lactobacillus bulgaricus factor to pantothenic acid. Arch. Biochem. **27**, 471 (1950).
242. Melville, D. B., J. G. Pierce and C. W. H. Partridge: The preparation of C^{14}-labeled biotin and the study of its stability during carbon dioxide fixation. J. biol. Chem. **180**, 299 (1949).
243. Meyer, K.: The relationship of lysozyme to avidin. Science (New York) **99**, 391 (1944).
244. Miller, C. Ph., and M. Bohnhoff: Development of streptomycin-resistant variants of meningococcus. Science (New York) **105**, 620 (1947).
245. — — Two streptomycin-resistant variants of Meningococcus. J. Bacteriol. **54**, 467 (1947).
246. Mirimanoff, A., et A. Raffy: Obtention de flavine à partir d'un ascomycète: Eremothecium Ashbyii. Helv. chim. Acta **21**, 1004 (1938).
247. Mitchell, H. K., and M. B. Houlahan: Neurospora IV. A temperature-sensitive riboflavinless mutant. Amer. J. Bot. **33**, 31 (1946).
248. —, and J. Lein: A Neurospora mutant deficient in the enzymic synthesis of tryptophane. J. biol. Chem. **175**, 481 (1948).
249. —, and J. F. Nyc: Hydroxyanthranilic acid as a precursor of nicotinic acid in Neurospora. Proc. nat. Acad. Sci. USA **34**, 1 (1948).
250. —, E. E. Snell and R. J. Williams: Pantothenic acid. IX. The biological activity of hydroxypantothenic acid. J. Amer. chem. Soc. **62**, 1791 (1940).
251. Möller, E. F.: Vitamin B_6 (Adermin) als Wuchsstoff für Milchsäurebakterien. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **254**, 285 (1938).
252. — Das Wuchsstoff-System der Milchsäurebakterien. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **260**, 246 (1939).
253. — Nährstoffe und Wuchsstoffe der Milchsäurebakterien. Angew. Chem. **53**, 204 (1940).
254. — Tyrosin als Aneurinvertreter bei Bakterien. Biochem. Vortr. Veranst. (Verein Dtsch. Chem.) Berlin 1943 — Ref.: Chemie **56**, 199 (1943).
255. — Kombination von Dibromsalicil mit Sulfonamiden. Klin. Wschr. **28**, 314 (1950).
256. —, und L. Birkofer: Konstitutionsspezifität der Nicotinsäure als Wuchsstoff bei Proteus vulgaris und Streptobacterium plantarum. Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 1108 (1942).
257. — — Gibt es Antagonisten der Nicotinsäure bei Proteus vulgaris und Streptobacterium plantarum? Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 1118 (1942).
258. —, und R. Ferdinand: Untersuchungen über das Bacterium acetylcholini I. Über die Einheitlichkeit des Stoffwechsels verschiedener Stämme des Bacterium acetylcholini aus biologisch gesäuerten Gemüsen des Handels. Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh. Abt. II, **97**, 94 (1937).
259. —, und K. Schwarz: Der Wuchsstoff H', ein Antagonist der Sulfonamide bei Streptobacterium plantarum (Orla-Jensen); Wachstum von Streptobacterium plantarum in Nährlösungen aus chemisch genau definierten Verbindungen. Ber. dtsch. chem. Ges. **74**, 1612 (1941).
260. —, und F. Weygand: Wuchsstoffe und ihre Antagonisten bei Mikroorganismen. Naturforschung und Medizin in Deutschland (FIAT-Ber.) R. Kuhn: Biochemie IV, 121 (1947).
261. — —, und A. Wacker: Über die Ernährung der Staphylokokken; Lactoflavin und Pantothensäure als unbedingt notwendige Wuchsstoffe bei verschiedenen Staphylokokkenstämmen. Z. Naturforsch. **4b**, 97 (1949).

262. MÖLLER, E. F., O. ZIMA, F. JUNG und TH. MOLL: Biologischer Vergleich von synthetischem und natürlichem Adermin. Naturwiss. **27**, 228 (1939).
263. MOSHER, W. A., D. H. SAUNDERS, L. B. KINGERY and R. J. WILLIAMS: Nutritional requirements of the pathogenic mold Trichophyton interdigitale. Plant. Physiol. **11**, 795 (1936).
264. MUELLER, J. H.: Pimelic acid as a growth acessory for the diphtheria bacillus. J. biol. Chem. **119**, 121 (1937).
265. — Nicotinic acid as a growth accessory for the diphtheria bacillus. J. biol. Chem. **120**, 219 (1937).
266. — Substitution of β-alanine, nicotinic acid and pimelic acid for meat extract in growth of diphtheria bacillus. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **36**, 706 (1937).
267. — The utilization of carnosine by the diphtheria bacillus. J. biol. Chem. **123**, 421 (1938).
268. —, and S. COHEN: β-Alanine as a growth factor for the diphtheria bacillus. J. Bacteriol. **34**, 381 (1937).
269. —, and A. W. KLOTZ: Pantothenic acid as a growth factor for the diphtheria bacillus. J. Amer. chem. Soc. **60**, 3086 (1938).
270. NEAL, A. L., and F. M. STRONG: Microbiological determination of pantothenic acid. Ind. Engng. Chem., Analyt. Edit. **15**, 654 (1943).
271. NEILANDS, J. B., H. HIGGINS and F. M. STRONG: Concentration of bound pantothenic acid. Federation Proc. **8**, 232 (1949), s. a. J. biol. Chem. **185**, 335 (1950).
272. NIELSEN, N.: Aufhebung der Wuchsstoff-Wirkung des β-Alanins auf Hefe durch Zusatz von Taurin, β-Aminobuttersäure und anderen Substanzen. Naturwiss. **31**, 146 (1943).
273. — Über die Anti-Wuchsstoffwirkung von α-Aminosäuren auf Hefe. Naturwiss. **32**, 80 (1944).
274. —, und V. HARTELIUS: Wuchsstoffwirkung der Aminosäuren X. Bildung von Hefewuchsstoff durch Erwärmung von Zucker und Ammoniumhydroxyd. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **23**, 155 (1941).
275. — —, und G. JOHANSEN: Über die Anti-Wuchsstoffe der Pantothensäure und des β-Alanins. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **24**, 39 (1944).
276. — — Über die Wirkung verschiedener β-Alaninderivate als Wuchsstoff oder Anti-Wuchsstoff auf Hefe. Naturwiss. **31**, 235 (1943).
277. NILSSON, R., G. BJÄLFVE und D. BURSTRÖM: Biotin als Zuwachsfaktor für Bacterium radicicola. Naturwiss. **27**, 389 (1939).
278. NIVEN jr., CH. F., and K. L. SMILEY: Microbiological assay method for thiamine. J. biol. Chem. **150**, 1 (1943).
279. NOVELLI, G. D., R. M. FLYNN and F. LIPMANN: Coenzyme A, as a growth stimulant for Acetobacter suboxydans. J. biol. Chem. **177**, 493 (1949).
280. —, N. O. KAPLAN and F. LIPMANN: Liberation of pantothenic acid from coenzyme A. J. biol. Chem. **177**, 97 (1949).
281. —, and F. LIPMANN: Bacterial conversion of pantothenic acid into coenzyme A (acetylation) and its relation to pyruvic oxidation. Arch. Biochem. **14**, 23 (1947).
282. — — The involvement of coenzyme A in acetate oxidation in yeast. J. biol. Chem. **171**, 883 (1947).
283. — — The catalytic function of coenzyme A in citric acid synthesis. J. biol. Chem. **182**, 213 (1950).
284. NOWAK, A. F.: Synthesizing vitamins in stillage. US Pat. 2 447 814 (1948).

285. NYC, J. F., F. A. HASKINS and H. K. MITCHELL: Metabolic relation between the aromatic amino acids. Arch. Biochem. **23**, 161 (1949).
286. —, and H. K. MITCHELL: Synthesis of a biologically active nicotinic acid precursor: 2-amino-3-hydroxybenzoic acid. J. Amer. chem. Soc. **70**, 1847 (1948).
287. OCHOA, S., G. T. CORI and C. F. CORI in C. F. CORI: Symposium on respiratory enzymes. Madison (1942.)
288. OHDAKE: Bull. Agric. chem. Soc. Japan **8**, 11 (1932), zit. bei P. W. WIARDI: Crystalline vitamin B_6 (Adermin). Nature (London) **142**, 1158 (1938).
289. OGINSKY, E. L., P. H. SMITH and W. W. UMBREIT: The action of streptomycin. I. The nature of the reaction inhibited. J. Bacteriol. **58**, 747 (1949).
290. ORLA-JENSEN, S., N. C. OTTE and A. SNOG-KJAER: The vitamin und nitrogen requirements of the lactic acid bacteria. Kgl. danske Vidensk. Selsk. Skr., naturvidensk. math. Afdel. **9**, VI, 5 (1936). — Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II, **94**, 434 (1936).
291. ORR-EWING, J., and V. READER: Streptothrix corrallinus in the estimation of vitamin B_1. Biochem. J. **22**, 440 (1928).
292. PAINE jr., T. F., and F. LIPMANN: No anti-streptomycin activity shown by inositol phospholipides. J. Bacteriol. **58**, 547 (1949).
293. PAPPENHEIMER jr., A. M., and G. A. HOTTLE: Effect of certain purines and CO_2 on growth of strain of group A hemolytic streptococcus. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **44**, 645 (1940).
294. PASTEUR, L.: Mémoire sur la fermentation alcoolique. Ann. Chim. Phys. 3. Serie **58**, 323 spez. 385 (1860).
295. — Note sur un mémoire de M. LIEBIG, relative aux fermentations. Ann. Chim. Phys. 4. Serie **25**, 145 (1872).
296. PENNINGTON, D., E. E. SNELL and R. E. EAKIN: Crystalline avidin. J. Amer. chem. Soc. **64**, 469 (1942).
297. PÉRAULT, R. et E. GREIB: Un inhibiteur de l'action antimicrobienne in vitro de l'acide mandélique: L'acide pantothénique. C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **138**, 506 (1944).
298. PETERS, R. A., H. W. KINNERSLEY, J. ORR-EWING und V. READER: The relation of vitamin B_1 to the growth promoting factor for a streptothrix. Biochem. J. **22**, 445 (1928).
299. PETT, L. B.: Flavin transformation of bacteria. Nature (London) **135**, 36 (1935).
300. — Lactoflavin in microorganisms. Biochem. J. **29**, 937 (1935).
301. — Studies on yeast grown in cyanide. II. Biochem. J. **30**, 1438 (1936).
302. PFIZER, CHAS and Co. INC.: Brit. Pat. 593 953 (1948).
303. PLAUT, G. W. E., and H. A. LARDY: The oxalacetate decarboxylase of Acotobacter vinelandii. J. biol. Chem. **180**, 13 (1949).
304. POTTER, R. L., and C. A. ELVEHJEM: Biotin and the metabolism of Lactobacillus arabinosus. J. biol. Chem. **172**, 531 (1948).
305. — — On the activity of oxybiotin. J. biol. Chem. **183**, 587 (1950).
306. POUSSEL, H.: Sur les actions toxiques des isomères de l'hexachlorocyclohexane. C. R. hebd. Séances Acad, Sci. **228**, 1533 (1949). — Gall. Biol. Acta **1**, 114 (1948).
307. QUASTEL, J. H., and D. M. WEBLEY: Vitamin B_1 and bacterial oxidations. I. Dependence of acetic acid oxidation on Vitamin B_1. II. The effect of magnesium, potassium and hexosediphosphate ions. Biochem. J. **35**, 192 (1941); **36**, 8 (1942).

308. RABINOWITZ, J. C., and E. E. SNELL: Vitamin B_6-group. XI. An improved method for assay of vitamin B_6 with Streptococcus fecalis. XII. Microbiological activity and natural occurence of pyridoxamine phosphate. J. biol. Chem. **169**, 631, 643 (1947).
309. RAFFAUF, R. F.: Neo-pyrithiamin. Helv. chim. Acta **33**, 102 (1950).
310. RAFFY, A.: Propriétés vitaminiques de la flavine d'Eremothecium Ashbyii. C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **126**, 875 (1937).
311. — Spectrographie de fluorescence de la flavine d'Eremothecium Ashbyii en solution et des cultures de ce champignon. C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **128**, 392 (1938).
312. — Production de flavine et vie anaerobie chez Eremothecium Ashbyii. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **209**, 900 (1939).
313. —, et M. FONTAINE: Dosage de la flavine au cour du développement dans les cultures d'Eremothecium Ashbyii. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **205**, 1005 (1937).
314. RAOUL, Y.: Toxicity of coumarin. Favorable antagonistic action of various vitamins and especially nicotinic acid using Escherichia coli as the test organism. Bull. Soc. chim. Biol. **29**, 518 (1947). — Chem. Abstr. **42**, 943 (1948).
315. —, J. CHOPIN et A. AYRAULT: Action sur Bac. coli de l'isostère naphthalénique au tryptophane et action de l'acide anthranilique. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **224**, 1309 (1947).
315 a. RASMUSSEN, R. A., K. L. SMILEY, J. G. ANDERSSON, J. M. VAN LANEN, W. L. WILLIAMS and E. E. SNELL: Microbial synthesis and multiple nature of Lactobacillus bulgaricus factor. Possible role in chick nutrition. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **73**, 658 (1950).
316. RAVEL, J. M., and W. SHIVE: Biochemical transformations as determined by competitive analogue-metabolite growth inhibition. IV. Prevention of pantothenic acid. J. biol. Chem. **166**, 407 (1946).
317. READER, V.: The relation of the growth of certain microorganisms to the composition of the medium III. The effect of the addition of growth promoting substances to the synthetic medium on the growth of Streptothrix corrallinus. Biochem. J. **22**, 434 (1928).
318. RHYMER, I., G. I. WALLACE, L. W. BYERS and H. E. CARTER: The antistreptomycin activity of lipositol. J. biol. Chem. **169**, 457 (1947).
319. RIEMSCHNEIDER, R.: Zur Kenntnis der Kontaktinsektizide. Pharmazie Beiheft 9, Erg. 1 (1950).
320. —, und W. GERISCHER: Über den Einfluß von Halogenkohlenwasserstoffen auf Heferassen und Bakterien. I. Z. Naturforsch. **3b**, 267 (1948).
321. ROBBINS, W. J., and R. MA: Specifity of pyridoxine for Ceratostomella ulmi. Bull. Torrey bot. Club **69**, 342 (1942).
322. — — Vitamin deficiences of twelve fungi. Arch. Biochem. **1**, 219 (1942/43).
323. ROEPKE, R. R., R. L. LIBBY and M. H. SMALL: Mutation or variation of Escherichia coli with respect to growth requirements. J. Bacteriol. **48** 401 (1944).
324. ROGERS, L. L., and W. SHIVE: Biochemical transformations as determined by competitive analogue-metabolite growth inhibitions. VI. Prevention of biotin synthesis by 2-oxo-4-imidazolidine caproic acid. J. biol. Chem. **169**, 57 (1947).
325. ROGOSA, M.: Synthesis of riboflavin by lactose-fermenting yeasts. J. Bacteriol. **45**, 459 (1943).

325 a. ROUX, H., et A. CALLANDRE: Sur l'action biochimique des esters amides polyphosphoriques de l'aneurine et des polyphosphates de sodium. Experientia **6**, 386 (1950).
326. ROWATT, E.: Relation of pantothenic acid to acetylcholine formation by a strain of Lactobacillus plantarum. J. gen. Microbiol. **2**, 25 (1948).
327. RUBIN, S. H., D. FLOWER, F. ROSEN and L. DREKTER: The biological activity of O-Heterobiotin. Arch. Biochem. **8**, 79 (1945).
328. RUCKSTUHL, H.: I. Guvacin und andere Wuchsstoffe. II. Lactaroviolin Diss. Zürich (1946).
329. RYAN, F. J., L. K. SCHNEIDER and R. BALLENTINE: The growth of Clostridium septicum and its inhibition. J. Bacteriol. **53**, 417 (1947).
330. RYDON, H. N.: Anthranilic acid as an intermediate in the biosynthesis of tryptophane by B. typhosum. Brit. J. exp. Pathol. **29**, 48 (1948).
331. SARETT, H. P.: The effect of riboflavin analogues upon the utilization of riboflavin and flavin adenine dinucleotide by Lactobacillus casei. J. biol. Chem. **162**, 87 (1946).
332. —, and V. H. CHELDELIN: Use of Lactobacillus fermentum 36 for thiamine assay. J. biol. Chem. **155**, 153 (1944).
333. SARMA, P. S., E. E. SNELL and C. A. ELVEHJEM: Vitamin B_6-group. VIII. Biological assay of pyridoxal, pyridoxamine and pyridoxine. J. biol. Chem. **165**, 55 (1946).
334. SCHAEFFER, P.: Influence of a deficiency of streptomycin on the anaerobic fermentation of glucose by a streptomycin-dependent strain of Escherichia coli. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **229**, 1032 (1949). — Ref.: Chem. Abstr. **44**, 3073 (1950).
335. SCHLENK, F., and W. GINGRICH: Nicotinamide-containing nutrilites for Hemophilus parainfluenzae. J. biol. Chem. **143**, 295 (1942).
336. —, and E. E. SNELL: Vitamin B_6 and transamination. J. biol. Chem. **157**, 425 (1945).
336 a. SCHMIDT-THOMÉ, J.: Über die antibakterielle Wirkung der 6-Aminonicotinsäure. Z. Naturf. **3 b**, 136 (1948).
337. VAN SCHOOR, A.: Über die Isolierung von Adermin aus Rinderleber und Melasse. Merck's Jber. **52**, 7 (1938).
338. SCHOPFER, W. H.: Les vitamines cristallisées B comme hormones de croissance chez un microorganisme (Phycomyces). Arch. Mikrobiol. **5**, 511 (1934).
339. — Die krystallisierten Vitamine B_1 als Wachstumshormone bei einem Mikroorganismus (Phycomyces). Arch. Mikrobiol. **6**, 139 (1935).
340. — Über die Wirkung des synthetischen Vitamin B_1 auf einen Mikroorganismus. Ber. dtsch. bot. Ges. **54**, 559 (1936).
341. — L'Aneurine et ses constituents, facteur de croissance de mucorinés (Parasitella, Absidia) et de quelques espèces de Rhodotorula. C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **126**, 842 (1937).
342. — Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen mit besonderer Berücksichtigung des Vitamins B_1. Ergebn. Biol. **16**, 1 (1939).
343. — Recherches sur la spécifité d'action de la méso-inosite, facteur de croissance de microorganismes. Helv. Chim. Acta **27**, 468 (1944).
344. — La biotine, l'aneurine et le mésoinositol, facteurs de croissance pour Eremothecium Ashbyii Guilliermond. La biosynthèse de la riboflavine. Helv. Chim. Acta **27**, 1017 (1944).
345. — Recherches sur l'action antivitamine de la dichloro-flavine sur un microorganisme producteur de lactoflavine (Eremothecium Ashbyii). Internat. Z. Vitaminforsch. **20**, 116 (1948).

346. SCHOPFER, W. H.: Pyrithiamine comme anti-vitamine B_1 (en microbiologie). Bull. Soc. Chim. Biol. **30**, 940 (1948).
347. —, und M. L. BEIN: Wirkung der isomeren Hexachlorcyclohexane auf das Wachstum von Erbsenwurzeln in steriler Kultur. Experientia **4**, 147 (1948).
348. —, et M. L. BOSS: Sur les relations tryptophane-acide nicotinique. Une avitaminose nicotinique déterminée par la vitamine K_3 chez un microorganisme. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta **7**, C 20 (1949).
349. —, et M. GUILLOUD: La culture d'Eremothecium Ashbyii an milieu synthétique. Experientia **1**, 22 (1945).
350. — — Recherches expérimentales sur les facteurs de croissance et pouvoir de synthèse de Rhizopus Cohnii Berl. et de Toni (Rhizopus suinus Nielsen). Z. Vitaminforsch. **16**, 181 (1945).
351. —, et V. MÜLLER: Recherches sur la décomposition thermique de l'aneurine. C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **128**, 372 (1938).
352. —, TH. POSTERNAK et M. L. BOSS: Le gammexane (γ-hexachlorocyclohexane) est-il l'antivitamine du mésoinositol? Schweiz. Z. Pathol. Bakteriol. **10**, 443 (1947).
353. — — — Recherches sur la spécificité d'action du mésoinositol, facteur de croissance essentiel pour un mutant de Neurospora crassa. Internat. Z. Vitaminforsch. **20**, 121 (1948).
354. SCHRECKER, A. W., and A. KORNBERG: Reversible synthesis of flavine-adenine-dinucleotide. J. biol. Chem. **182**, 795 (1950).
355. SCHULTZ, A. S., L. ATKIN and CH. N. FREY: A fermentation test for vitamin B_1. J. Amer. chem. Soc. **59**, 948 (1937).
356. — — — Vitamin B_6 a growth promoting factor for yeast. J. Amer. chem. Soc. **61**, 1931 (1939).
357. SCHUMANN, R. L., and M. A. FARELL: A synthetic medium for the cultivation of Streptococcus fecalis. J. infect. diseases **69**, 81 (1941).
358. SCHWARZ, K.: Über die Wirkung der Pantothensäure auf das Wachstum der Ratte. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **275**, 232 (1942).
359. — Achromotrichie durch Pantothensäuremangel. Über die Verschiedenheit der funktionellen Aufgaben der Pantothensäure. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **275**, 245 (1942).
360. SEVAG, M. G., and M. N. GREEN: Metabolism of tryptophan by Staphylococcus aureus as a critical factor in relation to the mode of action of sulfonamides. Amer. J. med. Sci. **207**, 686 (1944).
361. — — The role of pantothenic acid in the synthesis of tryptophan. J. biol. Chem. **154**, 719 (1944).
362. SHIVE, W., W. W. ACKERMANN, J. M. RAVEL and J. E. SUTHERLAND: Biosynthesis involving pantothenic acid. J. Amer. chem. Soc. **69**, 2567 (1947).
363. —, and J. MACOW: Biochemical transformations as determined by competitive analogue-metabolite growth inhibitions. I. Some transformations involving aspartic acid. J. biol. Chem. **162**, 451 (1946).
364. —, and L. L. ROGERS: Involvement of biotin in the biosynthesis of oxalacetic acid and α-Ketoglutaric acid. J. biol. Chem. **169**, 453 (1947).
365. SHULL, G. W., R. W. THOMA and W. H. PETERSON: Amino acid and unsaturated fatty acid requirements of Clostridium sporogenes. Arch. Biochem. **20**, 227 (1949).
366. SILVERMAN, M., and C. H. WERKMAN: Vitamin B_1 in bacterial metabolism. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **38**, 823 (1938).

367. SILVERMAN, M., and C. H. WERKMAN: Die Funktion des Vitamins B_1 beim anaeroben Bakterienstoffwechsel. Iowa State Coll. J. Sci. **13**, 107 (1939). — Chem. Zbl. **1939** II, 4269.
368. — — Bacterial synthesis of cocarboxylase. Enzymologia (Den Haag) **5**, 385 (1939). — Proc. Soc. exp. Biol. Med. **40**, 369 (1939).
369. SINCLAIR, H. M.: Growth factors for Phycomyces. Nature (London) **140**, 361 (1937).
369a. SINGER, Th. P., and E. B. KEARNY: The *l*-amino acid oxidases of snake venom I. Prosthetic group of the *l*-amino acid oxidase of Moccasin venom. Arch. Biochem. **27**, 348 (1950).
370. SLADE, R. E.: The γ-isomer of hexachlorocyclohexane (Gammexane). An insecticide with outstanding properties. Chem. and Ind. **64**, 314 (1945).
371. SMYTHE, D. H.: Vitamin B_1 and the synthesis of oxaloacetate by Staphylococcus. Biochem. J. **34**, 1598 (1940).
372. SNELL, E. E.: A specific growth inhibition reversed by pantothenic acid. J. biol. Chem. **139**, 975 (1941).
373. — Growth inhibition by N-(α,γ-dihydroxy-β,β-dimethylbutyryl) taurine and its reversal by pantothenic acid. J. Biol. Chem. **141**, 121 (1941).
374. — Effect of heat sterilisation on growth promoting activity of pyridoxine for Streptococcus lactis R. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **51**, 356 (1942).
375. — The vitamin activities of "pyridoxal" and "pyridoxamine". J. biol. Chem. **154**, 313 (1944).
376. — Vitamin B_6-group I. Formation of additional members from pyridoxine and evidence concerning their structure. J. Amer. chem. Soc. **66**, 2082 (1944).
377. — Vitamin B_6-group V. The reversible interconversion of pyridoxal and pyridoxamine by transamination reactions. J. Amer. chem. Soc. **67**, 194 (1945).
378. — The vitamin B_6-group VII. Replacement of vitamin B_6 for some microorganisms by *d*-alanine and an unidentified factor from casein. J. biol. Chem. **158**, 497 (1945).
379. —, and B. M. GUIRARD: Some interrelationships of pyridoxine, alanine and glycine in their effect on certain lactic acid bacteria. Proc. nat. Acad. Sci. USA **29**, 66 (1943).
380. —, and W. H. PETERSON: Growth factors for bacteria X. Additional factors required by certain lactic acid bacteria. J. Bacteriol. **39**, 273 (1940).
381. —, and J. C. RABINOWITZ: Microbiological activity of pyridoxylamino acids. J. Amer. chem. Soc. **70**, 3432 (1948).
382. —, and F. M. STRONG: The effect of riboflavin and of certain synthetic flavins on the growth of lactic acid bacteria. Enzymologia (Den Haag) **6**, 186 (1939).
383. — —, and W. H. PETERSON: Growth factors for bacteria VI. Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacteria. Biochem. J. **31**, 1789 (1937).
384. — — — Pantothenic acid and nicotinic acid as growth factors for lactic acid bacteria. J. Amer. chem. Soc. **60**, 2825 (1938).
385. — — — Growth factors for bacteria VIII. Pantothenic and nicotinic acids as essential growth factors for lactic and propionic acid bacteria. J. Bacteriol. **38**, 293 (1939).
386. —, E. L. TATUM and W. H. PETERSON: Growth factors for bacteria III. Some nutritive requirements of Lactobacillus Delbrückii. J. Bacteriol. **33**, 207 (1937).

387. Soodac, M., and F. Lipmann: Enzymic condensation of acetate to acetoacetate in liver extracts. J. biol. Chem. **175**, 999 (1948).
388. Sperber, E.: Aneurin und Bäckerhefe II. Biochem. Z. **313**, 62 (1942).
389. —, und S. Renvall: Über die Aneurinaufnahme durch Bäckerhefe. Biochem. Z. **310**, 160 (1941).
390. Stansly, P. G., and C. M. Alverson: Antagonism of salicylate by pantoyltaurine. Science (New York) **103**, 398 (1946).
391. Stephenson, M., and E. Rowatt: Production of acetylcholine by a strain of Lactobacillus plantarum. J. gen. Microbiol. **1**, 279 (1947).
392. Stern, J. R., and S. Ochoa: Enzymic synthesis of citric acid by condensation of acetate and oxalacetate. J. biol. Chem. **179**, 491 (1949).
392 a. —, B. Shapiro and S. Ochoa: Synthesis and breakdown of citric acid with crystalline condensing enzyme. Nature **166**, 403 (1950).
393. Stich, W.: Eine neue Funktion des Lactoflavins. Steuerung des biologischen Dualismus der Porphyrine und Katalyse der Häminsynthese. Naturwiss. **37**, 212 (1950).
393 a. — Die Bedeutung der B_2-Vitamine für den Dualismus der Porphyrine und den Aufbau von Häminproteiden. Dtsch. med. Wschr. **75**, 1217 (1950).
394. —, und H. Eisgruber: Steuerung der biologischen Porphyrinsynthese und Katalyse der Häminproteidbildung durch Lactoflavin. Klin. Wschr. **28**, 133 (1950).
395. Stokes, J. L., J. W. Foster and C. R. Woodward jr.: Synthesis of pyridoxine by a „pyridoxineless" X-ray mutant of Neurospora sitophila Arch. Biochem. **2**, 235 (1943).
396. —, and M. Gunness: Pyridoxamine and the synthesis of amino acids by lactobacilli. Science (New York) **101**, 43 (1945).
397. —, A. Larsen and M. Gunness: Biotin and the synthesis of aspartic acid. by microorganisms. J. biol. Chem. **167**, 613 (1947). — J. Bacteriol. **54**, 219 (1947).
398. Strauss, E., J. H. Dingle and M. Finland: Studies on the mechanism of sulfonamide bacteriostasis, inhibition and resistance. — Experiments with Staphylococcus aureus. Experiments with E. coli in a synthetic medium. J. Immunology **42**, 313, 331 (1941).
398 a. Stumpf, P. K.: Pyruvic acid oxidase of Proteus vulgaris. J. biol. Chem. **159**, 529 (1945).
399. Tanner jr., F. W., C. Vojnovich and J. M. Van Lanen: Factors effecting riboflavin production by Ashbya gossipyi. J. Bacteriol. **58**, 737 (1949).
400. Tatum, E. L.: Desthiobiotin in the biosynthesis of biotin. J. biol. Chem. **160**, 455 (1945).
401. —, R. W. Baratt and V. M. Cutter jr.: Chemical induction of colonial paramorphs in Neurospora and Syncephalastrum. Science (New York) **109**, 509 (1949).
402. —, and T. T. Bell: Neurospora III. Biosynthesis of thiamine. Amer. J. Bot. **33**, 15 (1946).
403. —, and D. M. Bonner: Synthesis of tryptophane from indole and serine by Neurospora. J. biol. Chem. **151**, 349 (1943).
404 — — Indole and serine in the biosynthesis and breakdown of tryptophane. Proc. nat. Acad. Sci. USA **30**, 30 (1944).
405. — —, and G. W. Beadle: Anthranilic acid and the biosynthesis of indole and tryptophane by Neurospora. Arch. Biochem. **3**, 477 (1943/44).

406. THOMPSON, R. C.: The synthesis of B-vitamins by bacteria in pure culture. Univ. Texas Publ. No. 4237, 87 (1942).
407. UMBREIT, W. W., and I. C. GUNSALUS: The function of pyridoxine derivatives: Arginine and glutamic acid decarboxylases. J. biol. Chem. **159**, 333 (1945).
408. — — Codecarboxylase *not* pyridoxal-3-phosphate. J. biol. Chem. **179**, 279 (1949).
409. —, W. A. WOOD and I. C. GUNSALUS: Activity of pyridoxalphosphate in tryptophan formation by cell-free enzyme preparations. J. biol. Chem. **165**, 731 (1946).
410. —, and J. G. WADDELL: Mode of action of desoxypyridoxine. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **70**, 293. (1949)
411. UTIGER, H., et W. H. SCHOPFER: Nouvelles Recherches sur la symbiose artificielle Rhodotorula rubra — Mucor Rammanianus. Le rôle des catalysateurs métalliques. C. R. Séances Soc. Physique Hist. natur. Genève **58**, 284 (1941).
412. VAN LANEN, J. M., H. P. BROQUIST, M. J. JOHNSON, I. L. BALDWIN and W. H. PETERSON: Synthesis of vitamin B_1 by yeast. Ind. Engng. Chem., ind. Edit. **34**, 1244 (1942).
413. VELLUZ, L., G. AMIARD et J. BARTOS: Acide thiamine-triphosphorique. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **226**, 735 (1948). — Bull. Soc. chim. France **1948**, 871.
414. — — — Thiaminetriphosphoric acid. Its relation to the thiamine pyrophosphate (Cocarboxylase of LOHMANN and SCHUSTER). J. biol. Chem. **180**, 1137 (1949).
415. —, R. JACQUIER et C. PLOTKA: Relations d'activité entre dérivés polyphosphoriques. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **226**, 1855 (1948).
416. DU VIGNEAUD, V.: The structure of biotin. Science (New York) **96**, 455 (1942).
417. —, K. DITTMER, E. HAGUE and B. LONG: The growth stimulating effect of biotin for the diphtheria bacillus in the absence of pimelic acid. Science (New York) **96**, 186 (1942).
418. — —, K. HOFFMANN and D. B. MELVILLE: Yeast growth promoting effect of diaminocarboxylic acids derived from biotin. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **50**, 374 (1942).
419. VILLELA, G. G., and A. CURY: Studies of the vitamin nutrition of Allescheria Boydii Shear. J. Bacteriol. **59**, 1 (1950).
420. VILTER, S. P., and D. T. SPIES: Vitamin B_6 as an accessory growth factor for Staphylococcus albus. Science (New York) **91**, 200 (1940).
421. VISCONTINI, M., G. BONETTI und P. KARRER: Zur Herstellung der Cocarboxylase und des Aneurintriphosphorsäureesters. Helv. chim. Acta **32**, 1478 (1949).
422. VAN VLOTEN, G. W., CH. A. KRUISSINK, B. STRIJK and J. M. BIJVOET: Crystal structure of 1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane (Gammexane). Nature (London) **162**, 771 (1948).
423. WAGNER, R. P.: The in vitro synthesis of pantothenic acid by pantothenic-less and wild type Neurospora. Proc. nat. Acad. Sci. USA **35**, 185 (1949).
424. —, and B. M. GUIRARD: Gene-controlled reaction in Neurospora involving the synthesis of pantothenic acid. Proc. nat. Acad. Sci. USA **34**, 398 (1948).
425. WARBURG, O.: Wasserstoff-übertragende Fermente. Berlin: Dr. W. Saenger (1948.)

426. WARBURG, O,, und W. CHRISTIAN: Über ein neues Oxydationsferment und sein Absorptionsspektrum. Biochem. Z. **254**, 438 (1932).
427. WESSMAN, G. E., and C. H. WERKMAN: Biotin in assimilation of heavy carbon in oxalacetate. Arch. Biochem. **26**, 214 (1950).
428. WEST, P. M., and P. W. WILSON: Biotin as a growth stimulating factor of the root nodule bacteria. Enzymologia **8**, 152 (1940). — Science (New York) **89**, 607 (1939).
429. WESTENBRINK, H. G. K., and H. VELDMANN: On the synthesis and decomposition of aneurine-pyrophosphate by living yeast. Enzymologia **10**, 255 (1942).
430. WEYGAND, F.: Anwendung der stabilen und radioaktiven Isotope in der Biologie. Angew. Chemie **61**, 285 (1949).
431. WICKERHAM, L. J., M. H. FLICKINGER and M. R. JOHNSTON: The production of riboflavin by Ashbya gossypii. Arch. Biochem. **9**, 95 (1946).
432. WIELAND, TH.: Ketopantothensäure und Aminopantothensäure. Chem. Ber. **81**, 323 (1948).
433. —, und E. F. MÖLLER: Über eine biologische Synthese der Pantothensäure I., II. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **269**, 227 (1941); **272**, 232 (1942).
434. — — Über biologisch aktive Homologe der Pantothensäure; 2 diastereomere N-(α,γ-dioxy-β-methyl-β-äthyl-butyryl)-β-alanine. Chem. Ber. **81**, 316 (1948).
435. WILDIERS, E.: Nouvelle substance indispensable au développement de la levure. La cellule **18**, 313 (1901).
436. WILLIAMS, R. J.: The vitamin requirement of yeast. A simple biological test for vitamins. J. Biol. Chem. **38**, 465 (1919); **42**, 259 (1920).
437. — *Manille Ide*, the discoverer of bios. Science (New York) **88**, 475 (1938).
438. — The chemistry and biochemistry of pantothenic acid. Adv. Enzymol. **3**, 253 (1943).
439. —, R. E. EAKIN and E. E. SNELL: The relationship of inositol, thiamine, biotin, pantothenic acid and vitamin B_6 to the growth of yeasts. J. Amer. chem. Soc. **62**, 1204 (1940).
440. —, and R. R. ROEHM: The effect of antineuritic vitamin preparations on the growth of yeasts. J. biol. Chem. **87**, 581 (1930).
441. —, F. SCHLENK and M. A. EPPRIGHT: Assay of purified proteins, enzymes etc. for B-vitamins. J. Amer. chem. Soc. **66**, 896 (1944).
442. WILLIAMS, V. R.: Growth stimulants in the Lactobacillus arabinosus biotin assay. J. biol. Chem. **159**, 237 (1945).
443. —, and E. A. FIEGER: Growth stimulants for microbiological biotin assay. Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. **17**, 127 (1945).
444. — — Oleic acid as a growth stimulant for Lactobacillus casei. J. biol. Chem. **166**, 335 (1946).
445. — — Lipide stimulation of Lactobacillus casei. J. biol. Chem. **170**, 399 (1947).
446. WILLIAMS, W. L.: Yeast microbiological method for the determination of nicotinic acid. J. biol. Chem. **166**, 397 (1946).
446 a. —, E. HOFF-JÖRGENSEN and E. E. SNELL: Determination and properties of an unidentified factor required by Lactobacillus bulgaricus. J. biol. Chem. **177**, 933 (1949).
447. —, H. P. BROQUIST and E. E. SNELL: Oleic acid and related compounds as growth factors for lactic acid bacteria. J. biol. Chem. **170**, 619 (1947).
448. WILSON, A. N., and ST. A. HARRIS: Synthesis and properties of Neopyrithiamine salts. J. Amer. chem. Soc. **71**, 2231 (1949).

449. WOOD, H. G.: The fixation of carbon dioxide and the interrelationships of the tricarboxylic acid cycle. Physiologic. Rev. **26**, 198 (1946).
450. —, A. A. ANDERSON and C. H. WERKMAN: Nutrition of the propionic acid bacteria. J. Bacteriol. **36**, 201 (1938). — Proc. Soc. exp. Biol. Med. **36**, 217 (1937).
451. —, CH. GEIGER and C. H. WERKMAN: Nutritive requirements of the hetero fermentative lactic acid bacteria. Iowa State Coll. J. Sci. **14**, 367 (1940).
452. —, E. L. TATUM and W. H. PETERSON: Growth factors for bacteria IV. An acid ether-soluble factor, essential for growth of propionic bacteria. J. Bacteriol. **33**, 227 (1937).
453. —, and C. H. WERKMAN: The utilization of CO_2 in the dissimilation of glycerol by the propionic acid bacteria. Biochem. J. **30**, 48 (1936).
454. WOOD, W. A., I. C. GUNSALUS and W. W. UMBREIT: Function of pyridoxalphosphate: Resolution and purification of the tryptophanase enzyme of Escherichia coli. J. biol. Chem. **170**, 313 (1947).
455. WOODS, D. D.: The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulfanilamide. Brit. J. exp. Pathol. **21**, 74 (1940).
456. WOOLLEY, D. W.: Biological responses to the constituent parts of pantothenic acid. J. biol. Chem. **130**, 417 (1939).
457. — Identification of the mouse anti-alopecia factor. J. biol. Chem. **139**, 29 (1941).
458. — Synthesis of inositol in mice. J. exp. Medicine **75**, 277 (1942).
459. — Production of riboflavin deficiency with phenazine analogues of riboflavin. J. biol. Chem. **154**, 31 (1944).
460. — Development of resistance to pyrithiamine in yeast and some observations on its nature. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **55**, 179 (1944).
461. — A study of the basis of selectivity of action of anti-metabolites with analogues of pimelic acid. J. biol. Chem. **183**, 495 (1950).
462. —, and M. L. COLLYER: Phenylpantothenone, an antagonist of pantothenic acid. J. biol Chem. **159**, 263 (1945).
463. —, and B. L. HUTCHINGS: Some growth factors for hemolytic streptococci. J. Bacteriol. **38**, 285 (1939).
464. — —, Synthetic media for culture of certain hemolytic streptococci. J. Bacteriol. **39**, 287 (1941).
465. —, and L. G. LONGSWORTH: Isolation of an antibiotin factor from egg-white. J. biol. Chem. **142**, 285 (1942).
466. —, and A. G. C. WHITE: Selective reversible inhibition of microbial growth with pyrithiamine. J. exp. Medicine **78**, 489 (1943).
467. WORK, E.: A new naturally occuring amino acid. Nature (London) **165**, 74 (1950). — Biochem. J. **46**, V (1950); s. a. Bull. Soc. Chim. Biol. **31**, 138 (1949), Biochem. Biophys. Acta **3**, 400 (1949).
468. WORK, T. S., and E. WORK: The basis of chemotherapy. Oliver and Boyd, Ltd. London 1948.
468 a. WRIGHT, L. D.: Oxybiotin in the bacterial deamination of aspartic acid. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **74**, 588 (1950).
469. —, L. D., E. L. CRESSON and H. R. SKEGGS: Biotin in bacterial deamination of certain amino acids. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **72**, 556 (1949).
470. — — —, T. R. WOOD, R. L. PECK, D. E. WOLF and K. FOLKERS: Biocytin, a naturally occuring complex of biotin. J. Amer. chem. Soc. **72**, 1048 (1950). — 1. Internat. Congr. Biochem. Cambridge (1949).

471. WRIGHT, L. D., and H. R. SKEGGS: Reversal of sodium propionate inhibition of Escherichia coli with β-Alanin. Arch. Biochem. **10**, 383 (1946).
472. — —, and E. L. CRESSON: Affinity of avidin for certain analogs of biotin. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **64**, 150 (1947).
473. WYSS, O.: Antibacterial action of a pyridine analogue of thiamine. J. Bacteriol. **46**, 483 (1943).
474. YAMASAKI, I.: Über Flavine, die bei Gärung von Aceton-Butylalkoholbakterien gebildet werden. (Gärungsflavine). I. Über Gärungsflavin aus Reis. Biochem. Z. **300**, 160 (1939).
475. —, und W. YOSITOME: Über die Bildung des Vitamin B_2-Komplexes aus Cerealien bei der Gärung von Aceton-Butylalkoholbakterien. Biochem. Z. **297**, 398 (1938).
476. YANOFSKY, C., and D. M. BONNER: Evidence for the participation of kynurenine as the normal intermediate in the biosynthesis of niacine in Neurospora. Proc. nat. Acad. Sci. USA **36**, 167 (1950).
477. YEGIAN, D., and R. J. VANDERLINDE: The biological characteristics of streptomycin-dependent Mycobacterium ranae. J. Bacteriol. **57**, 169 (1949).
478. ZIMA, O., K. RITSERT und TH. MOLL: Über das Aneurindisulfid. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **267**, 210 (1941).
479. —, und R. R. WILLIAMS: Über ein antineuritisch wirksames Oxydationsprodukt des Aneurins. Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 941 (1940).

(Abgeschlossen im November 1950.)

Dr. ERNST-FRIEDRICH MÖLLER, MaxPlanck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg.