

Nach diesen Bestimmungen ergaben sich für den zeitlichen Verlauf der Gleichgewichtseinstellung folgende Werte:

Zeit in Tagen	Gehalt in Gew.-%		
	Dichlor-formoxim	Salzsäure	Dichlor-furoxan
0	100	0	0
6	88	4	8
12	78	7	15
18	72	9	19
27	66	11	23
40	62	12	26
60	62	12	26
90	62	12	26
120	62	12	26

### 71. Friedrich Weygand und Hildgund Hofmann: Polleninhaltsstoffe, I. Mitteil.: Zucker, Folinsäure und Ascorbinsäure\*).

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg.]

(Eingegangen am 4. März 1950.)

In acht von Bienen eingesammelten Pollenarten wurde der Gehalt an reduzierenden Zuckern und Folinsäure bestimmt. Lediglich Löwenzahnpollen enthielt keinen Zucker; in den anderen wurden erhebliche Mengen Glucose und Fructose gefunden. Die Trennung, die Identifizierung und die quantitative Bestimmung der Zucker wurde mit Hilfe der papierchromatographischen Methodik vorgenommen. In drei Pollenarten wurde der Ascorbinsäuregehalt ermittelt.

Die Bienen sammeln die für die Aufzucht der Bienenbrut erforderlichen Nähr- und Wirkstoffe in Form von Pollen und Nektar ein. Den Eiweißbedarf deckt der Pollen, in dem außer zahlreichen Farbstoffen Lipoide, Zucker, Wirkstoffe, anorganische Salze und Duftstoffe vorkommen. Die Kenntnis der Polleninhaltsstoffe ist nicht nur für die Bienenzucht von großem Interesse, sie ist auch für das Studium pflanzenphysiologischer Probleme von Bedeutung, so z. B. für die Untersuchung von Befruchtungsvorgängen<sup>1)</sup>.

In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über den Gehalt verschiedener, von Bienen eingesammelter Pollen an reduzierenden Zuckern, an Folinsäure und Ascorbinsäure.

Die Pollen wurden mit einer etwas modifizierten Pollenfalle nach F. K. Böttcher<sup>2)</sup> gewonnen (s. Beschreibung der Versuche).

\* Die vorliegende Untersuchungsreihe wurde im Hinblick auf die Ernährung der Bienenbrut 1943 begonnen. Die 1943/44 gewonnenen Ergebnisse, hauptsächlich über den Aneurin- und Lactoflavin-Gehalt sind leider verlorengegangen. Inzwischen konnten die Untersuchungen wieder aufgenommen werden.

<sup>1)</sup> F. Moewus, Biol. Ztrbl., im Druck; R. Kuhn u. I. Löw, B. 82, 474 [1949].

<sup>2)</sup> Leipziger Bienenzeitung 56, Nr. 2 [1941]; Dtsch. Imkerführer 17, 44 [1943].

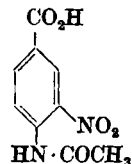
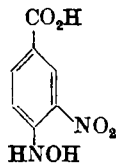
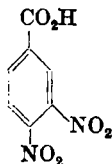
In der vorliegenden Untersuchung wurden 8 Pollenarten verwendet, die in der Tafel I aufgeführt sind.

Tafel I. Untersuchte Pollenarten.

Pollenart	Farbe	Sammelzeit (1949)
A) FrühjahrsLöwenzahn ( <i>Taraxacum off.</i> )	orange gelb	Ende April – Anfang Mai
B) Roßkastanie ( <i>Aesculus hippocastanum</i> )	kastanienbraun	Anfang – Mitte Mai
C) Winterraps ( <i>Brassica napus oleifera</i> )	kräftig gelb	Anfang – Mitte Mai
D) Rotklee ( <i>Trifolium pratense leguminosa</i> )	ocker	Anfang – Mitte Mai
E) Graspollen (mit Spuren Bergahorn?)	hellbraun	Mitte Mai
F) Hahnenfußart ( <i>Ranunculacee</i> )	leuchtend gelb	Mitte – Ende Mai
G) <i>Crataegus</i> -Art (Weißdorn)	grünlich	Ende April – Mitte Mai
H) Obst ( <i>Pirus</i> -Art), wahrscheinlich Apfel	hellerock	Anfang Mai

### Zuckerbestimmungen.

Nach der Entwicklung der Papierchromatographie für Aminosäuren durch R. Conden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin<sup>3)</sup> ist auch die Trennung von Zuckern nach dem gleichen Verfahren durchgeführt worden<sup>4)</sup>. Zur Sichtbarmachung der Zuckerflecken nach der Entwicklung sind zahlreiche Reagenzien herangezogen worden. Wir versuchten zunächst *o*-Dinitro-benzol, das in alkalisch-alkoholischer Lösung aufgesprüht wurde. Da es nicht befriedigte, stellten wir ein lösliches Derivat, nämlich die 3,4-Dinitro-benzoesäure her, die in 1-proz. Lösung in 2*n* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aufgesprüht wurde. Beim Erhitzen im Trockenschrank wird die 3,4-Dinitro-benzoesäure (I) durch die reduzierenden Zucker zu 2-Nitro-4-carboxy-phenyl-hydroxylamin (II) reduziert, dessen *aci*-Nitro-natriumsalz blau ist. Es entstehen also an den Stellen, an denen sich reduzierende Zucker auf dem Papier befinden, blaue Flecken. Kleine Mengen Phenol (erkennbar am deutlichen Phenolgeruch des Papiers) stören die Reaktion nicht. Die Reduktion verläuft analog derjenigen des *o*-Dinitro-benzols, das durch Ascorbinsäure in alkalischem Medium zu *o*-Nitro-phenyl-hydroxylamin reduziert wird<sup>5)</sup>. Daß in der Hauptsache die 4-ständige Nitrogruppe in I reduziert wird, ergab sich aus der Weiterreduzierbarkeit des aus I



erhaltenen 2-Nitro-4-carboxy-phenyl-hydroxylamins (II) mit Schwefelwasserstoff zur 3-Nitro-4-amino-benzoesäure, die als 3-Nitro-4-acetyl-amino-benzoesäure (III) charakterisiert wurde.

<sup>3)</sup> Biochem. Journ. 38, 224 [1944].

<sup>4)</sup> S. M. Partridge, Nature (London) 158, 270 [1946]; Biochem. Journ. 42, 238, 251 [1948]; vergl. die Zusammenfassung von F. Cramer, Angew. Chem. 62, 73 [1950].

<sup>5)</sup> R. Kuhn u. F. Weygand, B. 69, 1969 [1936].

Beim Liegen werden durch Zersetzung von II die blauen Flecke allmählich braun. Wenn man die Entwicklung der blauen Flecke durch eine in den zum Erhitzen dienenden Trockenschrank eingebaute Glasscheibe verfolgt, erkennt man, daß bei etwa gleichen Zuckerkonzentrationen Ketosen wie Fructose oder Sorbose schneller reagieren (in 1–2 Min.) als Aldopentosen und Aldohexosen (2.5–4 Min.). Disaccharide wie Lactose oder Maltose können erst nach 3.5 bis 5 Min. erkannt werden. Die Empfindlichkeitsgrenzen liegen bei Aufbringung von 0.005 ccm Zuckerlösung auf das Papier bei den Monosacchariden bei 0.0075-proz. Zuckerlösungen (rund 0.37  $\gamma$ ), bei den erwähnten Disacchariden bei 0.03-proz. Lösungen (1.5  $\gamma$ ). Ascorbinsäure reagiert schon in der Kälte und gibt sich nach dem Besprühen des Papiers mit dem Reagens alsbald als blauer Fleck zu erkennen. Rohrzucker reagiert nicht, kann aber nach Besprühen des Papiers mit verd. Salzsäure und kurzem Erhitzen im Trockenschrank alsdann mit dem Dinitrobenzoesäure-Reagens leicht nachgewiesen werden.

Wir haben auch das 6-Oxy-2.4.5-triamino-pyrimidin-sulfat zum Zuckernachweis auf Papier verwendet, das in heißer wäßr. Lösung aufgesprüht wurde. Aldomonosaccharide gaben braunrote, Disaccharide hellrote Flecke, Ascorbinsäure einen braunen Fleck. Die Empfindlichkeit ist aber wesentlich geringer als bei Anwendung der 3.4-Dinitro-benzoesäure. Die Nachweisgrenzen liegen für Aldomonosaccharide bei 0.1-proz., für Disaccharide bei 0.25-proz. und für Fructose bei 1–2-proz. Lösungen (je 0.005 ccm auf Papier aufgebracht).

Vor Anwendung der geschilderten Methoden auf die Analyse der Inhaltstoffe der Pollen wurde zunächst qualitativ mit Hilfe des für Rohrzucker spezifischen Reagenzes Diazouracil<sup>6)</sup> festgestellt, daß die mit kaltem oder heißem Wasser aus allen 8 untersuchten Pollenarten hergestellten Extrakte keine mit diesem Reagens nachweisbaren Mengen Rohrzucker enthielten. Die Versuche wurden in Lösung angestellt, wobei sich noch mit 0.25-proz. Rohrzucker-Lösungen innerhalb 5 Stdn. eine deutliche blaugüne Farbreaktion ergab. Auch auf den Chromatogrammen dieser Extrakte fanden wir nach Behandeln mit verd. Salzsäure keine auf Rohrzucker deutende Färbung.

Keinerlei reduzierender Zucker konnte in den Pollen A (FrühjahrsLöwenzahn) nachgewiesen werden. In allen übrigen ergab sich durch Papierchromatographie lediglich das Vorliegen von Glucose und Fructose, wobei sowohl eindimensional mit Butanol + Essigsäure + Wasser bzw. mit Phenol + Wasser oder auch zweidimensional mit den beiden Lösungsmittel-Gemischen gearbeitet wurde. Im Hinblick auf die Auffindung von Milchzucker in *Forsythia*-Pollen durch R. Kuhn und I. Löw<sup>7)</sup> haben wir in unseren Pollenextrakten speziell nach diesem Zucker gesucht, jedoch ohne ihn zu finden. Kleine Mengen zugesetzten Milchzuckers konnten stets als solcher oder nach Hydrolyse als Glucose + Galaktose wiedergefunden werden.

Die verwendeten Papiersorten waren Whatman Nr. 1 und Schleicher & Schüll Nr. 1507. In der Tafel 2 geben wir die von uns gemessenen  $R_F$ -Werte wieder, die sich mit den in der Literatur für Whatman-Papier Nr. 1 angegebenen praktisch decken.

<sup>6)</sup> H. W. Raybin, Journ. Amer. chem. Soc. 55, 2603 [1933]. <sup>7)</sup> B. 82, 479 [1949].

Tafel 2. RF-Werte verschiedener Zucker.

Zucker	Whatman-Papier Nr. 1		Schleicher & Schüll-Papier Nr. 1507	
	P. + W.*)	B. + E. + W.**)	P. + W.*)	B. + E. + W.**)
Glucose .....	0.39	0.19	0.33	0.14
Fructose .....	0.53	0.24	0.45	0.18
Arabinose .....	0.55	0.20	0.47	0.14
Mannose .....	0.46	0.20	0.41	0.15
Xylose .....	0.44	0.28	0.41	0.19
Lactose .....	0.38	0.07	0.34	0.07
Maltose .....	0.37	0.11	0.34	0.08
Rohrzucker .....	0.39	0.13	0.32	0.10

\*) Phenol + Wasser, bei 20° im Gleichgewicht.

\*\*) Butanol + Eisessig + Wasser (40:10:50 Vol.), bei 20° im Gleichgewicht.

Nach diesen Ergebnissen wurden quantitative Zuckerbestimmungen nach zwei Verfahren vorgenommen: Nach der Methode der Fleckengröße (Flächeninhalt)<sup>8)</sup> und nach der Methode von E. L. Hirst und J. K. N. Jones<sup>9)</sup> (Ausführung vergl. im Versuchsteil).

In der Tafel 3 sind die nach beiden Methoden erhaltenen quantitativen Ergebnisse aufgeführt, angegeben für Pollen, der über Silicagel getrocknet worden war, und korrigiert für den bei der Vorextraktion mit Petroläther stattfindenden Gewichtsverlust.

Tafel 3. Prozentgehalte der Pollen an Glucose und Fructose.

Pollen	Aus der Fleckengröße			Nach der Perjodatmethode		
	Gluc.	Fruct.	Gluc. + Fruct.	Gluc.	Fruct.	Gluc. + Fruct.
A	0	0	0	0	0	0
B	4.0	14.1	18.1	3.7	14.2	17.9
C	4.55	10.4	14.95	4.1	10.7	14.8
D	5.0	23.2	28.2	5.0	23.6	28.6
E	4.5	10.3	14.8	4.5	9.3	13.8
F	6.8	9.75	16.55	5.1	8.1	13.2
G	8.85	12.7	21.55	9.3	14.4	23.7
H	5.05	14.1	19.15	6.0	12.9	18.9

Im Durchschnitt ergab sich im Frischpollen (mit 20% Gewichtsverlust beim Trocknen gerechnet) ein Zuckergehalt von etwa 15%, wobei der nicht zuckerhaltige Löwenzahnpollen unberücksichtigt ist, da er mengenmäßig nicht ins Gewicht fiel.

#### Folinsäuregehalt der Pollen.

Von den in den Pollen enthaltenen Wirkstoffen haben wir die Folinsäure mit Hilfe des mikrobiologischen Testes mit *Streptococcus faecalis* R bestimmt<sup>10)</sup>.

<sup>8)</sup> R. B. Fischer, D. B. Parsons u. G. A. Morrison, Nature (London) **161**, 764 [1948], **164**, 183 [1949] (vergl. Versuchsteil).

<sup>9)</sup> Journ. chem. Soc. London **1949**, 1659 (vergl. Versuchsteil).

<sup>10)</sup> Vergl. E. F. Möller, F. Weygand u. A. Wacker, Ztschr. Naturforsch. **4b**, 92 [1949].

Die fein zerriebenen Pollen wurden zunächst zur eventuellen Freilegung von Folinsäure aus gebundenen Formen mit Takadiastase-Lösung behandelt. Wie aus der Tafel 4 hervorgeht, sind die Folinsäuregehalte der verschiedenen Pollen nicht sehr unterschiedlich.

Tafel 4. Folinsäuregehalt von Pollen in  $\gamma/g$  Trockenpollen.

A 6.8	C 5	E 6.3	G 3.4
B 5.7	D 6.4	F 3.7	H 3.9

#### Ascorbinsäuregehalt der Pollen.

Durch Titration mit Jod nach dem von A. Seybold und H. Mehner<sup>11)</sup> ausgearbeiteten, ziemlich spezifischen Verfahren ergaben sich in frischen Pollen folgende Prozentgehalte an Ascorbinsäure und Gesamt-Vitamin C:

A	7 mg %	Ascorbinsäure	und	36 mg %	Gesamt-Vitamin C
B	12 "	"	"	54 "	"
C	15 "	"	"	59 "	"

In einem zwei Jahre alten, getrockneten Mischpollen-Präparat wurden noch 18 mg % Ascorbinsäure und 61 mg % Gesamt-Vitamin C gefunden. In den getrockneten Pollen scheint daher die Ascorbinsäure weitgehend gegen Oxydation geschützt zu sein. In den wäßrigen Extrakten konnte Ascorbinsäure bei nicht zu langer Versuchsdauer (über Nacht) auch papierchromatographisch (Butanol + Eisessig + Wasser-Gemisch) nachgewiesen werden.

Zusatz bei der Korrektur (16. 6. 1950): Inzwischen bestimmten wir in Roßkastanienpollen, die von Hand gesammelt worden waren (Ernte 1950), den Zuckergehalt nach der Methode der Fleckengröße. Wir fanden in den Pollen der weißblühenden Roßkastanie, *Aesculus hippocastanum*, 7.4% Glucose, 14.6% Fructose und sehr viel kleinere Mengen Lactose und Maltose (nach den  $R_F$ -Werten). Die Pollen der rotblühenden Verwandten, *Aesculus pavia*, enthielten nur 1.7% Glucose und 2.5% Fructose.

#### Beschreibung der Versuche.

##### Darstellung der 3.4-Dinitro-benzoesäure (I).

*N*-Acetyl-*p*-toluidin<sup>12)</sup>: 100 g *p*-Toluidin wurden in 170 ccm siedendem Benzol gelöst. Durch einen Rückflußkühler wurden 90 g Essigsäureanhydrid in Anteilen zugegeben. Nach 1-stdg. Erhitzen wurde noch heiß in eine Porzellanschale gegossen. Nach Absaugen und Waschen mit Petroläther lagen 124 g *N*-Acetyl-*p*-toluidin vom Schmp. 145° vor.

3-Nitro-4-acetylamino-toluol<sup>13)</sup>: In 4 Ansätzen wurden je 31 g *N*-Acetyl-*p*-toluidin rasch unter Rühren in ein Gemisch aus 118 ccm Salpetersäure (d 1.4) und 47 ccm konz. Schwefelsäure eingetragen. Durch Kühlung wurde die Temperatur auf 30 bis 40° gehalten. Nach 15 Min. wurde in 700 ccm Wasser gegossen, abgesaugt und mit Wasser gewaschen; Ausb. 116 g vom Schmp. 90–91°.

<sup>11)</sup> Sitz.-Ber. der Heidelberger Akademie der Wissenschaften, 10. Abh. 1948. Wir danken Hrn. Dr. H. Mehner bestens für die Durchführung der Bestimmungen.

<sup>12)</sup> A. Kaufmann, B. 42, 3481 [1909].

<sup>13)</sup> W. A. Noyes, Amer. chem. Journ. 10, 475 [1888].

3-Nitro-4-amino-toluol<sup>13)</sup>: 116 g 3-Nitro-4-acetylamino-toluol wurden in 135 ccm Alkohol heiß gelöst. Durch einen Rückflußkühler gab man vorsichtig eine Lösung von 27 g Kaliumhydroxyd in 35 ccm Wasser zu. Nach 15 Min. Erhitzen wurde die Mischung ausgegossen und abkühlen gelassen; das ausgeschiedene Reaktionsprodukt wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Ausb. 85 g vom Schmp. 114°.

4-Nitroso-3-nitro-toluol<sup>14,15)</sup>: 320 g Kaliumpersulfat wurden mit 280 ccm konz. Schwefelsäure in einer eisgekühlten Reibschale zerrieben; nach 1 Stde. wurde in 3 l Eiswasser eingerührt. Dazu gab man 85 g 3-Nitro-4-amino-toluol und erhitzte unter Rühren 7 Stdn. auf 50–60°. Man saugte die Nitrosoverbindung ab und wusch sie mit Wasser; Ausb. 80 g. Schmp. des Rohprodukts 140°, nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol 145°.

3,4-Dinitro-toluol<sup>16)</sup>: 80 g rohes 4-Nitroso-3-nitro-toluol wurden allmählich unter Kühlung in 265 ccm rauchende Salpetersäure eingetragen; die Temperatur wurde unter 25° gehalten. 5 Min. nach beendetem Eintragen wurde auf Eis gegossen; Ausb. 35 g vom Schmp. 60°.

3,4-Dinitro-benzoesäure (I)<sup>17)</sup>: Die Oxydation der Methylgruppe kann auf verschiedene Weisen vorgenommen werden. Am bequemsten erwies sich die Oxydation mit rauchender Salpetersäure unter Rückfluß; nicht umgesetztes Ausgangsmaterial wurde erneut oxydiert. 20 g 3,4-Dinitro-toluol wurden mit 30 ccm rauchender Salpetersäure 100 Stdn. unter Verwendung eines langen Rückflußkühlers auf 150° erhitzt. Man dampfte dann auf dem Wasserbad zur Trockne ein, zog den Rückstand mit Hydrogencarbonat aus und säuerte den Auszug mit konz. Salzsäure an; Ausb. 2,5 g 3,4-Dinitro-benzoesäure vom Schmp. 160°.

Zum Besprühen der Papiere wurde eine 1-proz. Lösung in 2 n Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> verwendet.

3-Nitro-4-acetylamino-benzoesäure (III): Zur Klärung der Frage, welche der beiden Nitrogruppen der 3,4-Dinitro-benzoesäure bei der alkalischen Reduktion mit Zuckern in der Hitze oder mit Ascorbinsäure in der Kälte in die Oxyaminogruppe übergeführt wird, wurde eine Probe von I zunächst mit Ascorbinsäure in ammoniakalischer Lösung versetzt. Dabei entwickelte sich sofort eine tiefblaue Farbe. Alsdann wurde Schwefelwasserstoff eingeleitet, wobei zunächst ein Farbumschlag nach Graugrün und dann nach Gelbrot erfolgte. Nach dem Ansäuern wurde die ausgeschiedene Nitro-amino-benzoesäure mit Essigester ausgeschüttelt und nach dem Verdampfen des Essigesters einmal aus Natronlauge + Salzsäure umgefällt und einmal aus Alkohol umkrystallisiert. Da die beiden in Frage kommenden Nitro-amino-benzoesäuren am besten in Form ihrer Acetyl-Derivate charakterisiert werden, wurde das erhaltene Produkt mit Essigsäureanhydrid in der Hitze acetyliert. Nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol schmolz die erhaltene gelbe Acetylverbindung bei 219°; sie stellt demnach die 3-Nitro-4-acetylamino-benzoesäure (III)<sup>18)</sup> dar; der Misch-Schmp. mit 3-Nitro-4-acetylamino-benzoesäure (219°) zeigte keine Erniedrigung. Die isomere 4-Nitro-3-acetylamino-benzoesäure schmilzt bei 205–206°<sup>18)</sup>.

#### Gewinnung der Pollen.

Vor den Fluglöchern der Bienenstöcke wird eine Vorrichtung angebracht, deren wesentlicher Bestandteil aus einem Metallstreifen besteht, in dem in regelmäßigem Abstand kreisrunde Löcher von einer Größe angebracht sind, daß die Bienen gerade durchschlüpfen können. Kehren sie vom Fluge mit „Pollenhöschchen“ beladen zurück, so streifen sie die Pollenklümpchen beim Durchkriechen durch die Löcher zum Teil ab. Der Pollen fällt dann durch ein Drahtnetz hindurch in ein Kästchen, aus dem er entnommen werden kann. Die Menge Blütenstaub, die täglich bei uns von einem Volk mittlerer Stärke eingebracht

<sup>13)</sup> E. Bamberger u. R. Hübner, B. 36, 3821 [1903].

<sup>14)</sup> Vergl. R. Kuhn, H. Vetter u. P. Desnuelle, B. 70, 1314 [1937].

<sup>15)</sup> J. Meisenheimer u. E. Hesse, B. 52, 1168 [1919].

<sup>16)</sup> H. A. Sirks, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 27, 221 [1908].

<sup>18)</sup> A. Kaiser, B. 18, 2943, 2947 [1895].

wurde<sup>19)</sup>, schwankte zwischen 20 und 40 g und stieg an besonders günstigen Tagen bis auf 80 g (Trockengewicht). Der abends entnommene Pollen wurde zunächst auf Papier, dann über Silicagel getrocknet, wobei ein Wasserverlust von 15–20% ermittelt wurde.

Die Höschchenpollen zeigten in sich große Einheitlichkeit, da die Biene bekanntlich blütenbeständig ist. Nach dem Trocknen wurden die Pollenklümpchen von Hand nach der Farbe und dem Aussehen sortiert. Zur Identifizierung wurden von den gerade blühenden Pflanzen mikroskopische Vergleichspräparate hergestellt und im übrigen die Bestimmung nach dem Pollenwerk von E. Zander<sup>20)</sup> durchgeführt.

#### Herstellung der Pollenextrakte.

Zur Extraktion der Carotinoide, die besonders reichlich in Roßkastanienpollen enthalten sind, und der Lipoide wurden die über Silicagel getrockneten Pollen zunächst kalt mit Petroläther ausgezogen. In der Tafel 5, in der auch die Trockengewichte von je 100 Pollenklümpchen enthalten sind, sind die Gewichtsverluste angegeben, die sich bei der Extraktion mit Petroläther ergaben.

Tafel 5. Gewichtsverluste bei der Extraktion von Pollen mit Petroläther.

Pollen	% Gewichtsverlust	je 100 Pollenklümpchen wiegen vor der Extraktion trocken
A	?	0.348 g
B	2.6	0.764 ..
C	5.2	0.917 ..
D	5.6	0.893 ..
E	6.3	0.421 ..
F	2.5	0.572 ..
G	2.7	0.784 ..
H	2.7	0.744 ..

Wäßrige Pollenextrakte für die Zuckerbestimmungen: Je 1 g der mit Petroläther vorextrahierten Pollen wurden mit 5 ccm siedendem Wasser übergossen. Nach 30 Min. Erhitzen auf dem siedenden Wasserbad wurde zentrifugiert und nochmals mit 5 ccm heißem Wasser ausgezogen. Die beiden Lösungen wurden vereinigt und auf genau 10 ccm aufgefüllt. Kalt hergestellte Extrakte lieferten bezüglich der Zuckergehalte die gleichen Ergebnisse wie die heiß gewonnenen.

#### Quantitative Zuckerbestimmungen.

1.) Aus der Fleckengröße<sup>8)</sup>: Der Flächeninhalt der Flecken steht in einem bestimmten Verhältnis zu der aufgebrauchten Substanzmenge. Als weitere Variante tritt die Wanderungszeit und damit die Strecke auf, die die Zucker von der Startlinie abwandern. Deshalb ist es notwendig, immer verschiedene bekannte Mengen als Bezugswerte mitlaufen zu lassen. Auch ist es empfehlenswert, jede Konzentration mehrfach aufzusetzen, um eine größere Genauigkeit zu erreichen.

Es wurde Schleicher & Schüll-Papier Nr. 1507 verwendet und absteigend in großen Accu-Kästen aus Glas chromatographiert. Um an allen Stellen der Kammern einen konstanten Feuchtigkeitsgrad zu haben, wurden Papierstreifen aufgehängt, die von unten nach oben die wäßr. Schicht des Lösungsmittels aufsaugten. Abgedichtet waren die Kammern durch Gummi. Das Solvens (Butanol + Eisessig + Wasser) befand sich in einem

<sup>19)</sup> Hrn. Direktor Karl Maier, Leiter der Imkerschule Heidelberg, danken wir bestens für die zum Sammeln von Pollen gebotenen Möglichkeiten.

<sup>20)</sup> Enoch Zander, Beiträge zur Herkunftsbestimmung bei Honig, Bd. 1–4. Hrn. Prof. Dr. E. Zander, Erlangen, danken wir bestens für die Bestimmung einiger Pollenarten.

Porzellanschiffchen. Die Papierbänder waren 55 cm lang und 17 cm breit. Sie waren am unteren Ende fein gezackt (2 cm tiefe Einschnitte), damit unten angelangte Flüssigkeit abtropfen konnte.

Gleichgroße Tropfen (0.005 ccm) Zuckerlösung verschiedener Konzentrationen (1.0-, 0.5- und 0.25-proz.) wurden auf der Startlinie aufgebracht, daneben gleichgroße Tropfen der Pollenextrakte. Nach 50–60 Stdn. Entwicklungszeit bei 20° war die Wanderungstrecke der Zucker 25–30 cm. Die Streifen wurden im Vak.-Trockenschrank bei 100° getrocknet und dann mit dem 3.4-Dinitro-benzoesäure-Reagens besprüht. Nach 5 Min. im Trockenschrank bei 100° waren die blauen Flecke gut entwickelt. Ihre Größe (in einem beliebigen Maßstab) wurde mit dem Planimeter ausgemessen. Diese Werte wurden auf in der Abszisse logarithmisch geteiltem Papier, die bekannten Zuckerkonzentrationen auf der linear geteilten Ordinate aufgetragen. Die Verbindungslinie der Flächengröße der bekannten Konzentrationen ergibt eine Gerade. Durch Aufsuchen des Punktes, der der Flächengröße der unbekannt Konzentration entspricht, ergibt sich unmittelbar deren Prozentgehalt. Sind die Bänder der entwickelten Flecken nicht scharf genug, so empfiehlt sich ein Umkopieren auf photographisches Papier. In den vorliegenden Fällen war das jedoch nicht nötig. Die Ergebnisse sind in Tafel 2 aufgeführt.

2.) Durch Perjodatoxydation<sup>9)</sup>: Das verwendete Papier war wiederum Schleicher & Schüll Nr. 1507. 0.1 ccm des zu untersuchenden Pollenextraktes wurde in einem 1 cm breiten und 15 cm langen Band auf der Startlinie aufgebracht. Als Solvens diente Butanol + Eisessig + Wasser, dem soviel einer titrierten Eisen(III)-acetat-Lösung zugesetzt wurde, daß in 100 ccm 0.035 mg Fe<sup>3+</sup> enthalten waren. Nach 50–60 Stdn. Entwicklungszeit wurde im Vak.-Trockenschrank bei 100° getrocknet. Dabei wurden Glucose und Fructose als gut von einander getrennte, ganz schwach braune Bänder sichtbar. Sie wurden mit der Schere ausgeschnitten, gewogen und mit je 5 ccm Wasser in einem kleinen Soxhlet-Apparat<sup>21)</sup> extrahiert. Zu allen Lösungen gab man danach 2 ccm einer 0.198 m Natriummetaperjodat-Lösung, die gegen Methylrot neutral reagierte. Das Natriummetaperjodat war durch Umkrystallisieren aus konz. Salpetersäure gereinigt worden. Nach 24 Stdn. bei 20° wurden 0.2 ccm Glykol zur Zerstörung überschüss. Perjodats zugesetzt, worauf mit 0.01 n NaOH die gebildete Ameisensäure titriert wurde (Indicator: Methylrot). Eine keinen Zucker enthaltende Zone des Papiers wurde ebenfalls ausgeschnitten und genau gleichartig behandelt. Dadurch wurde der Blindwert des Natronlaugeverbrauchs pro g Papier ermittelt. In unseren Fällen war dieser recht konstant 2.25 ccm 0.01 n NaOH.

Aus Versuchen mit bekannten Mengen Glucose und Fructose ergab sich zunächst, daß aus 1 Mol. Glucose 4.6 Mol. und aus 1 Mol. Fructose 2.6 Mol. Ameisensäure gebildet wurden. Aus diesen Ziffern und dem Natronlaugeverbrauch ergaben sich nach Abzug des Papierblindwertes die Zuckergehalte (s. Tafel 6).

Tafel 6. Kontrollbestimmungen mit bekannten Mengen Glucose + Fructose.

Einwaagen mg/0.1 ccm	Gewicht d. Papierstr.	ccm 0.01 n NaOH	Papier- blindwert	NaOH-Verbr. (ccm) reduziert	mg Zucker
Gluc. 0.50	0.583	2.52	1.31	1.21	0.52
Fruct. 1.00	0.465	2.50	1.06	1.44	1.0
Gluc. 1.24	0.556	4.02	1.25	2.77	1.2
Fruct. 1.01	0.525	2.68	1.18	1.50	1.04
Gluc. 1.32	0.700	4.51	1.56	2.95	1.27
Fruct. 1.81	0.748	3.93	1.68	2.25	1.56
Gluc. 1.15	0.777	4.29	1.74	2.55	1.1
Fruct. 1.32	0.856	3.91	1.92	1.99	1.38

Folinsäurebestimmungen: Je 1 g getrockneter Pollen wurde mit Seesand vermischt und im Achatmörser fein zerrieben. Nach Zugabe von 10 oder 20 ccm einer 2.5-

<sup>21)</sup> Vergl. A. A. Morton, Laboratory Technique in Organic Chemistry, Wasitzky-Apparat, Fig. 99, S. 202.



proz. Takadiastase-Lösung (11.9 g sek. Natriumphosphat + 2.5 g Takadiastase, die frei war von Folin säure, mit Wasser auf 100 ccm gebracht) wurde 20 Stdn. im Brutschrank bei 37° gehalten. Dann wurde auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und zentrifugiert. In den Extrakten wurde die Folin säure nach entsprechender Verdünnung (1 : 100 oder 1 : 50) mit Hilfe von *Streptococcus faecalis* R bestimmt<sup>1)</sup>, und zwar durch Vergleich der Trübungswerte, die mit bekannten Mengen Folin säure nach 20 Stdn. erzielt wurden. Die Ergebnisse finden sich in der Tafel 4.

## 72. Richard Kuhn und Ingrid Hammer: Über aktives Bleidioxyd zur Darstellung empfindlicher Chinone.

[Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]

(Eingegangen am 4. März 1950.)

Durch Zersetzung von Bleitetraacetat mit Wasser wird ein aktives, zur Darstellung von Chinonen aus Oxyverbindungen besonders geeignetes Bleidioxyd gewonnen.

Das *amphi*-Naphthochinon ist von R. Willstätter und J. Parnas<sup>1)</sup> durch Dehydrierung von 2.6-Dioxy-naphthalin in Benzol mit Bleidioxyd erhalten worden. Die Entdecker stellten bereits fest, daß nicht jedes Bleidioxyd geeignet ist: „Die Handelssorten von reinem Bleidioxyd wirken merkwürdig ungleich, viele sind unbrauchbar; recht dunkelfarbiges feinpulvriges Superoxyd hat sich am besten bewährt“. Am hiesigen Institut, aber auch in anderen Laboratorien, waren Versuche zur Neudarstellung dieses interessanten Chinons ergebnislos geblieben. Der vorgeschriebene, ungewöhnlich große Überschuß an Dehydrierungsmittel – etwa das 50-fache der Theorie – nützt offensichtlich gar nichts, wenn dieses nicht die erforderliche Reaktionsfähigkeit besitzt.

Wir haben nun gefunden, daß die Darstellung von *amphi*-Naphthochinon nach Willstätter und Parnas mit Sicherheit gelingt, wenn man Bleidioxyd verwendet, das durch Zersetzung von Bleitetraacetat mit Wasser frisch dargestellt und mit Aceton sowie mit Äther getrocknet ist. So dargestelltes Bleidioxyd ist hell kaffeebraun, d. h. erheblich heller in der Farbe als alle uns bekannten Präparate des Handels (E. Merck u. a.). Im Gegensatz zu diesen löst es sich leicht schon in verdünnter Salzsäure, unter Bildung von Blei(II)-chlorid und Chlor. Der jodometrisch bestimmte Wirkungsgrad beträgt 90–95 % d. Theorie. Die Debye-Scherrer-Linien liegen an denselben Stellen wie bei Handelspräparaten, sind aber viel weniger scharf, was auf einen feineren Verteilungsgrad deutet. Von solchem Bleidioxyd benötigt man nur 6 g an Stelle von 200 g (auf 3 g Dioxynaphthalin), um das *amphi*-Naphthochinon in schönen ziegelroten Kryställchen zu erhalten. Der Umstand, daß man mit dem 1½-fachen der Theorie auskommt, bedeutet, daß das hellbraune Bleidioxyd nahezu durchreagiert.

Das rote *o*-Chinon erhielt Willstätter<sup>2)</sup> aus Brenzcatechin und Silberoxyd. St. Goldschmidt und F. Graef<sup>3)</sup> sowie O. Baudisch und E. Dyer<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> B. 40, 1406 [1907].

<sup>2)</sup> R. Willstätter u. A. Pfannenstiel, B. 37, 4745 [1904]; R. Willstätter u. F. Müller, B. 41, 2581 [1908], 44, 2179 [1911].

<sup>3)</sup> B. 61, 1858 [1928].

<sup>4)</sup> Journ. biol. Chem. 99, 485 [1932/33].