

Es liefert nach dem Einengen und Impfen neben dem Rest des Ketons (0.05 g) reichlich Brenz-desoxy-biliänsäure (1.5—2 g), die durch warme verd. Natronlauge voneinander getrennt werden. Das Keton braucht zur Lösung etwa die 20-fache Menge siedenden Alkohols. Es setzt sich daraus oder aus heißem Eisessig in farblosen, seidenglänzenden Nadeln ab und schmilzt bei 143°.

0.1140 g Sbst.: 0.3530 g CO₂, 0.1072 g H₂O. — 0.1020 g Sbst.: 0.3156 g CO₂, 0.0952 g H₂O.

C₂₂H₃₂O. Ber. C 84.55, H 10.34. Gef. C 84.46, 84.36, H 10.52, 10.44.

In trockenem Chloroform addiert das Keton Brom unter augenblicklicher Entfärbung, das Additionsprodukt war aber bisher noch nicht zur Krystallisation zu bringen. Dagegen krystallisieren gut das Oxim, gewonnen aus 0.2 g Keton, 0.2 g Hydroxylamin-Chlorhydrat und 0.4 g kryst. Natriumacetat in 8 ccm Alkohol durch halbtägiges Erwärmen auf dem Wasserbade. Aus Methylalkohol farblose, derbe Nadeln, die sich bei 100° aufblähen, dann wieder fest werden und bei 169—170° schmelzen.

0.0618 g Sbst.: 0.1776 g CO₂, 0.0574 g H₂O.

(C₂₂H₃₂:NOH)₂, H₂O. Ber. C 78.51, H 10.19. Gef. C 78.40, H 10.39.

Das [4-Cyan-2-nitro-phenyl]-hydrazon fällt fast sofort in leuchtend orangefarbenen Nadeln aus, wenn man die heißen Lösungen von 0.2 g Keton in 15 ccm Alkohol und 0.1 g [Cyan-nitro-phenyl]-hydrazin in 8 ccm Alkohol + 2 ccm *n*-Salzsäure mischt. Ausbeute beinahe quantitativ. Kaum löslich in kochendem Alkohol, leichter in Eisessig, Schmp. 258—259° (unt. Zers.).

0.0607 g Sbst.: 0.1637 g CO₂, 0.0436 g H₂O.

C₂₀H₃₀O₂N₄. Ber. C 73.66, H 7.68. Gef. 73.58, H 8.03.

Anisalverbindung: 0.25 g des Ketons in 25 ccm Alkohol werden mit 0.15 g Anisaldehyd und dann mit 5 Tropfen 25-proz. Natronlauge versetzt. Nach 3—4 Tagen saugt man ab und krystallisiert aus heißem Eisessig um. Farblose Blätter; sie schmelzen bei 215—216° zu einer trüben, sich bei 219° klärenden Flüssigkeit.

0.0715 g Sbst.: 0.2184 g CO₂, 0.0574 g H₂O.

C₃₀H₃₈O₂. Ber. C 83.66, H 8.90. Gef. C 83.33, H 8.98.

Schließlich sei noch erwähnt, daß auch Iso-desoxybiliänsäure, bei 15 mm destilliert, kleine Mengen eines ungesättigten Ketons zu liefern scheint. Doch reichte vorläufig die Ausbeute daran nicht aus, um es zu reinigen und zu charakterisieren.

286. C. Neuberg und O. Rosenthal: Zusammenhang von carboligatischer Synthese mit carboxylatischem Abbau. (Verwendung von Acetaldehyd als Abfangmittel.)

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie u. Biochemie in Berlin-Dahlem.]

(Eingegangen am 31. Juli 1924.)

Die Verknüpfung synthetischer Vorgänge mit der biochemischen Zuckerspaltung gibt sich ohne weiteres dadurch zu erkennen, daß Hefe in einer Lösung von Kohlenhydraten und Nährstoffen niedrigen Molekulargewichtes sich vermehrt, d. h. daß sie aus einfachen Materialien ihre komplizierten Leibessubstanzen aufbaut. Ein ähnliches Verhalten tritt als Gesamtleistung im Stoffwechsel aller Organismen zutage. Einen Einblick indessen, wie, losgelöst von der lebenden Zelle, auf rein enzymatischem Wege, die Synthese

von längeren Kohlenstoffketten aus kürzeren Gliedern zuwege kommt, gewann man erst durch die Auffindung der Carboligase¹⁾. Dieses Enzym vermag in unzweifelhafter Weise Aldehyde mit einem Bruchstück des Zuckers zu vereinigen, das im Verlauf des Gärungsprozesses auftritt. Bringt man beispielsweise Benzaldehyd mit einer gärenden Zuckerlösung zusammen, so erfolgt durch formale Vereinigung des zugefügten Bittermandelöls mit einem intermediären Spaltungsprodukt des Zuckers, mit dem Acetaldehyd, der Aufbau von optisch aktivem [α -Oxy- β -oxo-*n*-propyl]-benzol:

$$C_6H_5 \cdot CHO + HOC \cdot CH_2 = C_6H_5 \cdot \overset{\cdot}{C}H(OH) \cdot CO \cdot CH_2.$$

Wie Benzaldehyd verhalten sich bei dieser Reaktion auch andere Aldehyde²⁾. Der biologische Charakter des Vorganges ergibt sich daraus, daß die Produkte dieser Kohlenstoffketten-Synthese ein starkes Drehungsvermögen besitzen, ganz davon abgesehen, daß die acyloinmäßige Aneinanderreihung eines aliphatischen und aromatischen Aldehyds sich nicht von selbst vollzieht, ja mit rein chemischen Mitteln bisher nicht erreicht ist.

Von Belang für die Deutung des synthetischen Prozesses ist die Feststellung, daß anstatt des Zuckers die Brenztraubensäure Verwendung finden kann¹⁾. Diese Säure ist die biologische Vorstufe des Acetaldehyds, indem sie durch die bekannte Carboxylase-Wirkung auf fermentativem Wege in Kohlendioxyd und Acetaldehyd zerfällt. Da nun bei der Brenztraubensäure-Vergärung Acetaldehyd gebildet wird, der mit noch nicht gespaltener Brenztraubensäure zusammentrifft, ist es verständlich, daß, wie Hirsch³⁾ bewiesen hat, auch bei der Einwirkung von Hefe allein auf Brenztraubensäure gleichfalls der carboligatische Effekt zu beobachten ist, der in diesem Falle zum Acetoin (Acetyl-methyl-carbinol) führt: $CH_3 \cdot CHO + HOC \cdot CH_2 = CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CO \cdot CH_2$. Nach allen bisherigen Erfahrungen scheint ein zugefügter Aldehyd nicht mit fertig vorliegendem Acetaldehyd zu reagieren, sondern lediglich mit solchem Acetaldehyd, der durch carboxylatische Spaltung bei der Gärung — sei es von Zucker, sei es von Brenztraubensäure — erzeugt wird. Mit anderen Worten: der hinzutretende fremde Aldehyd wird carboligatisch nur mit naszierendem Acetaldehyd vereinigt.

Von wesentlicher Bedeutung ist dabei das Verhalten eigens zugegebenen Acetaldehyds, und zwar deshalb, weil diese Substanz bei zahlreichen physiologischen Umsetzungen der pflanzlichen und tierischen Zelle als intermediäres Abbauprodukt des Zuckers von uns erkannt ist. Da sich aber im allgemeinen Acetaldehyd nicht in den Enderzeugnissen des normalen Stoffwechsels anhäuft, so muß die synthetische Verwendung dieses als Zwischenstufe so reichlich und häufig gebildeten Körpers in der belebten Natur eine Rolle spielen. In sinnfälliger Weise offenbart sich dies bei Untersuchungen über die Umformung des Acetaldehyds, den man zu gärenden Zuckerlösungen fügt. Mehrfach waren früher Experimente über das Schicksal von Acetaldehyd unter diesen Umständen angestellt worden, völlig übersehen war aber, daß er in großem Umfange synthetische Benutzung findet. Erst Neuberg und Reinfurth⁴⁾ haben dargetan, daß die normale alkoholische Gärung eine vollständige Abartung erfährt, wenn

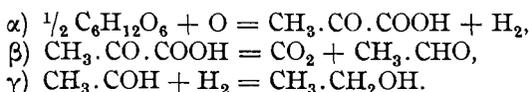
¹⁾ Neuberg und Hirsch, *Bio. Z.* **115**, 282 [1921].

²⁾ Neuberg und Liebermann, *Bio. Z.* **121**, 311 [1921].

³⁾ *Bio. Z.* **131**, 178 [1922]. ⁴⁾ *Bio. Z.* **143**, 553 [1923].

man den Maischen Acetaldehyd beigibt. Einerlei, ob das vergärende Kohlenhydrat Traubenzucker, Fructose, Rohrzucker oder Maltose ist, in allen Fällen kommt es mit Ausbeuten, die bis zu 100% in bezug auf den zugefügten Acetaldehyd reichen, zur Bildung des carboligatischen Aufbauproduktes Acetoin.

Diese Tatsache verdient nach verschiedensten Richtungen Interesse. Obgleich nach unseren heutigen Kenntnissen während der natürlichen alkoholischen Zuckerspaltung Acetaldehyd entsteht, wird dieser normaliter gebildete Acetaldehyd niemals zu Acetoin synthetisiert, und zwar aus dem einfachen Grunde nicht, weil der bei der intermediären Erhebung eines Zuckerhalbmoleküls auf die Stufe der Brenztraubensäure freiwerdende Wasserstoff für die korrelative Reduktion des carboxylatisch aus Brenztraubensäure hervorgegangenen Acetaldehyds dient:



Stört man aber diese Wechselbeziehung, indem man fertigen Acetaldehyd einführt, so erleben wir die seltsame Erscheinung, daß beim Zusammentreffen von ungewöhnlichen Mengen eines intermediären Stoffwechselproduktes, des Acetaldehyds, mit seiner in normaler Umwandlung begriffenen Muttersubstanz (der gärfähigen Zuckerart) eine Umkehr auf der Straße des Abbaus erfolgt und der Weg der Synthese beschriftet wird.

Obzwar wir die carboxylatische Zerlegung der Brenztraubensäure, $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$, heute als einen Teilvorgang der zymatischen Hexosen-Spaltung betrachten, so liegen die Verhältnisse für die erstere insofern ganz verschieden, als hier naturgemäß der Wasserstoff fehlt, der bei der Vergärung von Zucker, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, disponibel ist und schließlich den Acetaldehyd zu Äthylalkohol hydriert. Wenn sich also der Abbau des Zuckers durch Zugabe von Acetaldehyd verändern läßt, indem die Richtung des carboligatischen Wiederaufbaues eingeschlagen wird, so war nicht vorauszusehen, wie sich eine durch Zusatz von freiem Acetaldehyd komplizierte Vergärung von Brenztraubensäure gestalten würde.

Die Bilanz der Brenztraubensäure-Vergärung ist von Neuberg und v. May⁵⁾ aufgestellt und dahin geklärt worden, daß bei einfacher Vergärung von Brenztraubensäure Acetaldehyd und Acetoin entstehen. Sorgt man jedoch für eine Bindung des primär durch die Carboxylase aus der Brenztraubensäure freigemachten Acetaldehyds, beispielsweise durch Kupplung mit zugefügtem schwefligsauren Salz, so wird in praxi alle Brenztraubensäure im Sinne der einfachen carboxylatischen Reaktion der Ketosäuren zerlegt; durch Übertragung dieser Methode auf höhere α -Ketosäuren hat im hiesigen Institut Sen⁶⁾ zeigen können, daß auch die Homologen der Brenztraubensäure sich in dieser Hinsicht ebenso verhalten. In Gegenwart eines Abfangmittels, das den bei der Brenztraubensäure-Vergärung gebildeten Acetaldehyd als solchen durch eine Art Veresterung ($\text{CH}_3 \cdot \text{CHO} + \text{H} \cdot \text{SO}_3\text{Na} = \text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{O} \cdot \text{SO}_2\text{Na}$) fixiert, tritt also die reine Carboxylase-Spaltung zutage.

⁵⁾ Bio. Z. **140**, 299 [1923].

⁶⁾ Bio Z. **140**, 447 u. **143**, 195 [1923].

Anders liegen nun die Dinge, wenn man als Abfangmittel den gleichen Stoff Acetaldehyd selbst — und zwar in fertigem Zustande — benutzt, um den nascierenden Acetaldehyd zu fesseln. Dann wird nämlich der Weg der Synthese begangen. Beide, aus verschiedenen Quellen stammenden Acetaldehyd-Teile werden in die Reaktion hineingezogen, es erfolgt ihr carboligatischer Zusammenschluß zum Acetoin.

Um die Bedingungen hierfür so klar wie möglich zu wählen, haben wir die Umsetzung der Brenztraubensäure rein enzymatisch, mit zellfreien Säften, bei solchen Acetaldehyd-Zusatzversuchen vorgenommen.

Bekanntlich beeinträchtigt eine Zugabe von freier Brenztraubensäure bereits die Gärkraft der empfindlichen Zymase-Lösungen. Diese Schädigung nimmt zu, wenn von vornherein noch der nicht irrelevante Acetaldehyd anwesend ist. Wir haben auch, um keine Komplikationen zu schaffen, von einer dauernden Korrektur der Wasserstoff-ionen-Konzentration Abstand genommen, obgleich sich ersichtlicherweise im Verlaufe der Vergärung von Brenztraubensäure zu Acetaldehyd und Kohlendioxyd die Acidität ändert⁵⁾, und haben uns darauf beschränkt, die Einleitung des Gäraktes dadurch zu fördern, daß ein Gemenge von 1 Mol. freier Brenztraubensäure und 1.5 Mol. Dikaliumphosphat zur Anwendung gelangte. Eine solche Lösung beider Stoffe kann mit Hefensaft gemischt werden, ohne daß eine Flockung auftritt; höchstens stellt sich eine Trübung ein. Wir überzeugten uns zunächst davon, daß neben der gewöhnlichen carboxylatischen Spaltung die Bildung von Acetoin geschieht. Fügt man zu solchen Gärproben unter sonst genau gleichen Bedingungen Acetaldehyd, so steigt die Menge des carboligatischen Erzeugnisses, indem in allen Fällen der Zusatz von Acetaldehyd eine Vermehrung des Acetoin's um das Doppelte und mehr veranlaßt.

Daraus ergibt sich Folgendes: Bei dem einfachen Vorgange der Brenztraubensäure-Vergärung, bei dem an sich Acetaldehyd und durch dessen „Acyloin-Kondensation“ Acetoin entsteht, wird durch eine besondere Beigabe des normalen Spaltungsproduktes Acetaldehyd verstärkte Umdrehung von Abbau in Aufbau der mehrgliedrigen Kohlenstoffkette erzwungen. Dabei wird Acetaldehyd durch Acetaldehyd „abgefangen“ und kernsynthetisch verwertet. Es handelt sich um einen „paarigen“ Aufbau, der sein physiologisches Gegenstück in dem bekannten „paarigen“ Abbau besitzt.

Unzweifelhaft liegt hier ein rein fermentativer synthetischer Prozeß vor, der von Körpern der C₂-Reihe bzw. C₃-Reihe in die 4-Kohlenstoff-Reihe führt. Damit ist nun keineswegs gesagt, daß alle in der Natur auftretenden Substanzen mit viergliedriger Kohlenstoffkette auf diesem Wege erzeugt werden. Für die Vorgänge der Buttersäure-Gärung und Butylalkohol-Bildung ist gezeigt worden⁷⁾; daß bei Abfangung des Acetaldehyds eine Verringerung in der Ausbeute an Butylderivaten erfolgt, indem offenbar der Baustein „Acetaldehyd“ entfernt wird, der zu ihrer Bereitung notwendig ist. Experimentelle Untersuchungen darüber, ob auch die bei verschiedenen Zuckerspaltungen auftretende Bernsteinsäure auf diesem Wege gebildet wird, liegen unseres Wissens nicht vor. Die Theorie, daß diese Bernsteinsäure auch aus 2-Kohlenstoff-Körpern, aus Essigsäure oder aus Acetaldehyd, hervorgeht, rührt von Thunberg⁸⁾, Wieland⁹⁾ und

7) Neuberg und Nord, *Bio. Z.* **96**, 133 [1919]; Neuberg und Arinstein, *Bio. Z.* **117**, 269 [1921]; Neuberg und Cohn, *Bio. Z.* **139**, 527 [1923].

8) Thunberg, *Skandinav. Arch. f. Physiolog.* **40**, 34 [1920].

9) Wieland in Asher-Spiros *Ergebn. d. Physiol.* **20**, 500 [1922].

Knoop¹⁰⁾ einerseits, sowie v. Euler¹¹⁾ andererseits hier. Freilich nimmt der letztgenannte neuerdings in Gemeinschaft mit Myrback¹²⁾ an, daß die Bernsteinsäure bei den Bakterien-Gärungen auf einem grundsätzlich anderen Wege entsteht. Die Autoren scheinen der Meinung zu sein, daß nur bei Koferment enthaltenden Kleinlebewesen der Abbau in der Mitte des Hexose-Moleküls, zwischen dem 3. und 4. Kohlenstoffatom, geschieht, während sie für kofermentfreie Mikroorganismen an die Möglichkeit einer direkten Spaltung der 6-Kohlenstoff-Kette in C₄- und C₂-Körper denken. Als Beleg für diese Anschauung führen sie das Verhalten des *Bacillus lactis aerogenes* an, der frei von Koferment sein und einen unmittelbaren Zerfall von Zucker in Bernsteinsäure, Acetaldehyd und Wasser ($C_6H_{12}O_6 = C_4H_8O_4 + CH_3.CHO + H_2O$) zuwege bringen soll. Es ist jedoch zu bedenken, daß durch denselben Erreger nach den grundlegenden Untersuchungen von A. Harden und Walpole¹³⁾ zugleich eine hälftige Teilung des Hexose-Moleküls bewirkt wird, die zur Entstehung von Milchsäure Anlaß gibt. Da auch sonst beide Säuren nebeneinander als Produkte der Zuckerspaltung angetroffen werden¹⁴⁾, so ist man nicht etwa zu der Herleitung berechtigt, daß Fähigkeit zur Bernsteinsäure-Bildung den nach Art der Glykolyse sich vollziehenden Übergang in Milchsäure ausschließt. Daß mit Gewißheit Bernsteinsäure synthetisch gebildet werden kann, hat Grey¹⁵⁾ dargetan; durch Kultivierung des dem *Bacillus lactis aerogenes* ungemein nahestehenden¹⁶⁾ *Coli-Bacillus* auf Glycerin, C₃H₈O₃, oder Tartronsäure, C₃H₄O₆, hat er Bernsteinsäure, C₄H₈O₄, in bemerkenswerten Mengen zu isolieren vermocht.

Wie auch der Fall der Bernsteinsäure-Entstehung liegen mag, andere Vertreter der 4-Kohlenstoff-Reihe können nach unseren im Vorstehenden mitgeteilten Ergebnissen unzweifelhaft durch Biosynthese, und zwar auf rein enzymatischem Wege, aus Verbindungen mit einer geringeren Kohlenstoffanzahl im Molekül aufgebaut werden. Dabei ist noch Folgendes zu beachten: Die synthetische Funktion der Carboligase äußert sich in der Errichtung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Brücken ohne Mitbeteiligung irgendwelcher Oxydationen oder Reduktionen. Diese Tätigkeit ist völlig verschieden von der Art der sonst beschriebenen enzymatischen Synthesen; denn bei diesen handelt es sich lediglich um rückläufig gemachte Hydrolysen, um die Wiederherstellung von anorganischen oder organischen Ester-Bindungen bzw. von Äther- oder Säure-amid-Strukturen, um einfache Anhydrisierungen, die durch die verschiedensten Änderungen von Milieu, Konzentration und Temperatur ermöglicht werden.

Belege.

Serie A. 1. Zusatzversuch: 4.4 g Brenztraubensäure (frisch rektifiziert) in 50 ccm Wasser wurden mit 13.075 g Dikaliumphosphat in 75 ccm Wasser zusammengebracht. Dazu kamen 425 ccm Macerationssaft (aus Hefe P) sowie 5.5 ccm Toluol. Unmittelbar nach Beginn der Gärung wurden 2.2 g Acetaldehyd in 50 ccm Wasser hinzugegeben.

Ansatz II genau wie I ohne Acetaldehyd.

Als nach 3 Tagen die in besonderen Gasmeßapparaten vorgenommenen Nebenprüfungen Aufhören der Gärung anzeigten, wurden zu beiden Ansätzen je 150 ccm frischer Macerationssaft mit 1¹/₂ ccm Toluol nachgefüllt. Nach 6-tägigem Stehen bei Zimmertemperatur (18–24°) erfolgten die Aufarbeitungen. Die Flüssigkeiten wurden 1 Stde. auf dem Wasserbade am Rückflußkühler zur grobflockigen Koagulation des Eiweißes erhitzt und nach dem Abkühlen abgesaugt. Im Filtrat wurde die noch verbliebene, stickstoffhaltige Materie nach Möglichkeit durch Zugabe von so viel absol. Alkohol entfernt, daß ein erneuter Zusatz des Fällungsmittels keinen Niederschlag

¹⁰⁾ Knoop, *Klin. Wochenschr.* **2**, 61 [1923].

¹¹⁾ v. Euler, *Pflanzenchemie*, Bd. II, 183 [1909].

¹²⁾ B. **57**, 1073 [1924]. ¹³⁾ P. Ch. S. **77** (B), 399 [1906].

¹⁴⁾ vergl. F. Ehrlich, B. **52**, 63 [1919]. ¹⁵⁾ Grey, P. Ch. S. **96** (B), 156 [1924].

¹⁶⁾ W. Kruse, *Allgem. Mikrobiologie*, S. 289.

mehr hervorrief; dazu wurde etwa die 5-fache Volumenmenge reinen Sprits verbraucht. Ein Sechstel des gemessenen Gesamtfiltrats wurde mit 5 g *p*-Nitrophenyl-hydrazin und Essigsäure $2\frac{1}{2}$ Stdn. auf dem Wasserbade gekocht und nach Verjagen des meisten Weingeistes heiß abgenutscht. Es verblieb auf dem Filter ein dunkelvioletter Rückstand, der in warmem Alkohol und Äther unlöslich war und damit ausgekocht wurde. Hierdurch werden etwa anhaftende Mengen von Hydrazonen des Acetaldehyds oder der Brenztraubensäure glatt entfernt. Das Gewicht des unlöslichen Osazons war nach Trocknung im Vakuum-Exsiccator 0.623 g und sein Schmp. 315° , also genau der von Acetoin-*p*-nitrophenylosazon. Die Acetoin-Ausbeute betrug [vgl. Neuberg und v. May⁵⁾] $0.623 \times 0.371 = 0.231$ g, oder für den Gesamtansatz 1.390 g (gegenüber einer möglichen Acetoin-Ausbeute von 4.4 g, entsprechend 2.2 g Gärungsacetaldehyd + 2.2 g zugefügtem Aldehyd). Da aus Ansatz II nur 0.702 g Acetoin erhältlich waren, so hatte der Ertrag an Acetoin eine Steigerung um rund 100% erfahren.

Serie B. Die Zusammenstellung der Ansätze III und IV geschah analog I und II. Die Gärgemische wurden wieder bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt. Von den Ansätzen entnahmen wir je 10.0 ccm und ermittelten durch volumetrische Bestimmung, daß zum Schluß, d. h. nach erneuter Zugabe der betreffenden Mengen frischen Hefensaftes nebst Toluol, ziemlich genau 60% der Brenztraubensäure zerlegt waren. Nach insgesamt 8 Tagen wurden die Ansätze III und IV wie oben aufgearbeitet. Aus $\frac{1}{4}$ des Zusatzversuches wurden 0.750 g Acetoin-*p*-nitrophenylosazon vom Schmp. 313° isoliert. Gesamtausbeute an Acetoin: 1.113 g.

Der Kontrollansatz, von dem gleichfalls $\frac{1}{4}$ aufgearbeitet war, lieferte 0.3075 g Acetoin-nitroosazon, Schmp. 311° . Die Gesamtacetoin-Ausbeute berechnet sich für den Ansatz zu 0.456 g. Im Hauptansatz war also hier die Acetoin-Ausbeute auf das 2.5-fache erhöht.

Serie C. Zusatzansatz V und Kontrollansatz VI wie bei I und II. Die Maischen verblieben diesmal im Brutschrank bei 36° . (Zu beiden Ansätzen wurden Eudiometerkontrollen aufgestellt, die eine rund 35-proz. Totalvergärung¹⁷⁾ der Brenztraubensäure dartaten.) Acetoin-nitroosazon in $\frac{1}{4}$ des Zusatzansatzes 0.458 g; Schmp. 315° . Der Ertrag an Acetoin berechnet sich insgesamt zu 0.679 g.

Der Kontrollansatz, von dem $\frac{1}{4}$ in Arbeit genommen wurde, lieferte 0.224 g Acetoin-*p*-nitrophenylosazon; Schmp. 318° . Gesamtacetoin: 0.332 g. Die Acetoin-Ausbeute war im Zusatzversuch demnach gegen den Kontrollansatz verdoppelt.

Daß tatsächlich Acetoin vorlag, folgt aus dem Verhalten des *p*-Nitrophenylosazons. Im Falle VI wurde auch eine Elementaranalyse ausgeführt. Das schon recht reine Rohprodukt kann ziemlich verlustlos aus heißem Benzonitril umkristallisiert, mit einer Mischung von Cyanbenzol und Alkohol und schließlich mit Alkohol allein ausgewaschen werden. Aus Benzonitril, das von Neuberg¹⁸⁾ früher als Lösungsmittel empfohlen und jüngst auch von Staudinger und Ruzicka¹⁹⁾ mit Erfolg angewendet ist, erhält man die Acetoin-Verbindung in glitzernden, roten Nadeln vom Schmp. 314° (nach Trocknung im Hochvakuum).

0.1015 g Subst.: 21.6 ccm N (23° , 750 mm). — $C_{16}H_{16}O_4N_6$. Ber. N 23.60. Gef. N 23.66.

¹⁷⁾ Der wechselnde Vergärungsgrad der Brenztraubensäure hängt mit den ungleichen Eigenschaften der Enzymlösungen verschiedener Fertigung zusammen. Zu jeder Serie hat aber ein gleichartiges Material gedient.

¹⁸⁾ H. 29, 274 [1900].

¹⁹⁾ Helv. 7, 218 [1924].