

keine Depression. Auch das nicht sublimierte Vasicin (Merck) wies das gleiche Verhalten auf.

Zur Darstellung des Chlorhydrates wurde Peganin in verd. HCl gelöst und im Exsiccator zur Trockne gebracht. Das Salz wurde in absol. Methylalkohol gelöst und mit Äther gefällt. Es schmolz nach gründlichem Trocknen im Vakuum bei 205–207°; Vasicin-Chlorhydrat schmolz bei der gleichen Temperatur und ergab in der Mischprobe keine Depression.

Zur Sicherheit wurde noch das Chlor-desoxy-peganin¹⁾ mit dem entsprechenden Derivat des Vasicins²⁾ verglichen. Beide Verbindungen gingen bei 0.01 mm und 130–140° Luftbad-Temperatur über; sie schmolzen unter Dunkelfärbung bei 137–138° bzw. 135–137° und zeigten in der Mischprobe keine Depression.

Auch die Schmelzpunkte anderer Derivate (Goldsalze, Platinsalze, Pikrate) waren, obwohl stark von der Art des Erhitzens abhängig, gleich; da es sich jedoch um Zersetzungspunkte handelt, sind diese Salze zur Identifizierung nicht besonders geeignet.

Aus den angeführten Ergebnissen folgt, daß das Vasicin mit dem Peganin identisch ist, und daß daher beiden Basen die gleiche Konstitutionsformel (I) zukommt. Für die Konstitution I des Peganins war insbesondere die Auffindung von Hippursäure, welche die Verknüpfung des Allylrestes mit dem Kern-Stickstoffatom beweist, von Wichtigkeit. Wir haben daher den aus Peganin gewonnenen Ester der 4-Oxo-3,4-dihydro-chinazolyl-3-essigsäure (Schmp. 152°) neuerlich der Verseifung unterworfen und in der schon beschriebenen¹⁾ Weise unter den Verseifungsprodukten Glykokoll in Form von Hippursäure (Ausbeute 56.6% d. Th.) isoliert und durch Schmelz- und Misch-Schmelzpunkt identifiziert. Damit ist Formel I für das Peganin und das Vasicin bestätigt und die Formel II, welche die indischen Autoren für das Vasicin annehmen abzulehnen.

Über Einzelheiten der Vasicin-Literatur wollen wir gegenwärtig nicht das Wort ergreifen, sondern die weiteren Ergebnisse der indischen Forscher abwarten.

166. W. Kiessling¹⁾:

Über die Synthese der Dioxy-aceton-phosphorsäure.

[Aus d. Institut für Physiologie am Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung Heidelberg.]

(Eingegangen am 27. März 1934.)

Bei der von H. O. L. Fischer und E. Baer²⁾ synthetisierten 3-Glycerinaldehyd-phosphorsäure haben auf Anraten dieser Autoren Smythe und Gerischer³⁾ die Gärfähigkeit der *d*-Komponente nachgewiesen. O. Meyerhof und W. Kiessling studierten den Umsatz dieser Säure⁴⁾ im Muskel-Extrakt und im Hefe-Macerationssaft. Inzwischen⁵⁾ wurde als erstes Abbauprodukt phosphorylierter Zucker zu Milchsäure eine Triosephosphorsäure isoliert, die mit der Glycerinaldehyd-phosphorsäure in vielen Eigenschaften übereinstimmte, aber sich prinzipiell von dieser in ihrem Verhalten gegen Jod und Brom unterschied. Es lag nahe, hinter dieser Säure

¹⁾ Stipendiat der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft.

²⁾ B. **65**, 337, 1040 [1932]. ³⁾ Biochem. Ztschr. **260**, 414 [1933].

⁴⁾ Biochem. Ztschr. **264**, 63, **267**, 334 [1933].

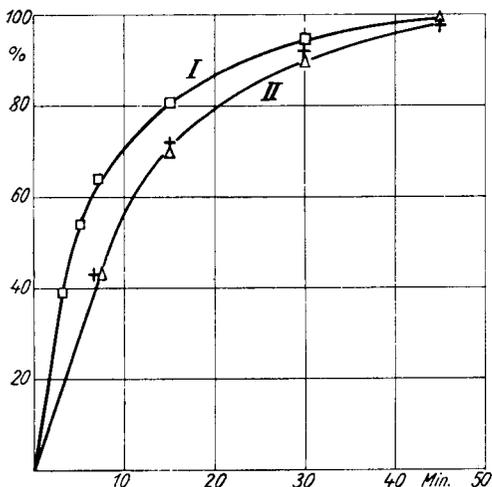
⁵⁾ O. Meyerhof u. K. Lohmann, Naturwiss. **22**, 134 [1934].

das Isomere der 3-Glycerinaldehyd-phosphorsäure, die Dioxy-aceton-phosphorsäure, zu vermuten.

Eine Darstellung der Dioxy-aceton-phosphorsäure ist in dieser Zeitschrift von Langheld durch Einwirkung von Metaphosphorsäure-äthylester auf Dioxy-aceton beschrieben⁶⁾. Präparate nach diesem Verfahren, die wir der Liebenswürdigkeit von Dr. H. Fischer verdanken, zeigten aber keine Ähnlichkeit mit der Glycerinaldehyd-phosphorsäure, die bei der nahen Verwandtschaft anzunehmen war. Die Langheldsche Substanz ist beständig gegen Alkali, bildet nur zum Teil bei der Säure-Hydrolyse

Methyl-glyoxal und enthält nach der Hydrolysen-Kurve⁷⁾ mindestens zwei verschiedene Körper, einen schwer und einen leicht hydrolysierbaren⁸⁾.

Eine neue Synthese der Dioxy-aceton-phosphorsäure war deshalb notwendig⁹⁾. Es lag nahe, mit dem von E. Fischer und Pfähler¹⁰⁾ beim Glycerin und von H. O. L. Fischer und Baer (l. c.) beim Benzyl-cycloacetal-glycerinaldehyd angewandten Verfahren zu phosphorylieren¹¹⁾. Vom Dioxy-aceton existiert nur eine Monophosphorsäure, und es war zu erwarten, daß man ohne Blockierung der anderen OH-Gruppe direkt zur Diphosphorsäure oder mindestens zu einem Gemisch aus Mono- und Disäure gelangen werde. Dies traf zu. Bei ± 0 bis $+10^\circ$ entsteht aus dem umgesetzten POCl_3 bis zu 80% Diphosphorsäure und bei



Hydrolysen-Kurven: $n\text{-HCl}$ bei 100° .

Abscisse: Zeit in Min., Ordinate: % abgespaltene H_3PO_4 .

- Gemisch von 30% Mono- und 70% Di-phosphorsäure des Dioxy-acetons.
- + Glycerinaldehyd-phosphorsäure.
- Δ Dioxy-aceton-monophosphorsäure.

-15 bis -20° fast nur Monosäure. Die Diphosphorsäure wurde nicht isoliert, weil sie in saurer und wahrscheinlich auch in alkalischer Lösung zu unbeständig ist. Mit $n\text{-NaOH}$ entsteht aus der Disäure im Gegensatz zur Monosäure kein anorganisches Phosphat, was zur Bestimmung des Gehaltes an Mono- und Disäure benutzt wurde. Die Existenz dieser Diphosphorsäure ergibt sich aus der Hydrolysen-Kurve, die nicht monomolekular ver-

⁶⁾ B. 45, 1125 [1912].

⁷⁾ K. Lohmann, Biochem. Ztschr. 194, 306 [1928].

⁸⁾ Wie sich später herausstellte, ist ein Teil wahrscheinlich Dioxy-aceton-diphosphorsäure, weil mit fraktionierter Säure-Hydrolyse 10–15% alkali-verseifbar werden.

⁹⁾ Die Darstellung nach Bailly (Rev. géa. Sciences pures appl. 29, 208 [1918]) durch Oxidation von α -Glycerin-phosphorsäure mit Brom führt nicht zum Ziel.

¹⁰⁾ B. 53, 106 [1920].

¹¹⁾ Der Verfasser schuldet Dr. H. O. L. Fischer Dank, daß er ihm die Gelegenheit gab, die Synthese der Glycerinaldehyd-phosphorsäure in seinem Laboratorium in Basel zu lernen. Hrn. Prof. Dr. W. Schoeller und der Firma F. C. Kahlbaum, Berlin, danken wir für die Überlassung größerer Mengen Glycerinaldehyd.

läuft. In der Abbildung ist eine derartige Kurve (I) aufgezeichnet für ein Gemisch mit 70% Disäure. Der K-Wert (für den dekadischen Logarithmus) beträgt z. B. nach 5' 63.1×10^{-3} und ist nach 15' auf 34.2×10^{-3} gesunken. Unterbricht man die Hydrolyse nach 5', so findet man nur anorganisches Phosphat und Monophosphorsäure.

Diese Beobachtung ließ sich zur Reinigung von Produkten verwenden, die viel Diphosphorsäure enthielten. Bei Körpern mit wenig Diphosphorsäure wurde diese in stark kongosaurer Lösung mit Alkohol ausgefällt. Von der Monosäure wurden das Ca- und Ba-Salz isoliert. Die freie Säure darzustellen, wurde nicht versucht. Das Ba- und Ca-Salz sind sowohl in Lösung in der Nähe des Neutralpunktes als auch als feste Salze unbeständiger als die entsprechenden der Glycerinaldehyd-phosphorsäure. Sie zerfallen langsam in anorganisches Phosphat und Polymerisations- und Kondensationsprodukte. Da die Salze der Bisulfit-Verbindung beständiger sind, wurde versucht, sie so zu konservieren.

Die von O. Meyerhof und K. Lohmann (l. c.) gefundenen spezifischen Eigenschaften der Triose-phosphorsäuren, nämlich ihr Verhalten gegen *n*-HCl bei 100° und gegen *n*-NaOH bei 15–20°, gelten auch für die Dioxy-aceton-phosphorsäure. Mit *n*-HCl bei 100° wird sie in anorganisches Phosphat und Methyl-glyoxal gespalten. Wenn man diese Abspaltung zeitlich verfolgt, erhält man eine Hydrolysen-Kurve (II), die mit der der Glycerinaldehyd-phosphorsäure gut übereinstimmt (K-Werte für den dekadischen Logarithmus: Glycerinaldehyd-phosphorsäure 37.5×10^{-3} , Dioxy-aceton-phosphorsäure 33.7×10^{-3}). Bei alkalischer Verseifung mit *n*-NaOH entstehen äquimolekulare Mengen anorganisches Phosphat und Milchsäure. Unterschiedlich gegen die Glycerinaldehyd-phosphorsäure aber und in Übereinstimmung mit der natürlichen Triose-phosphorsäure ist das Verhalten gegen Jod und Brom. Die Dioxy-aceton-phosphorsäure wird von Jod¹²⁾ überhaupt nicht verändert, und bei Brom-Behandlung¹³⁾ werden nach 5 Tagen 82% unverändert wiedergefunden, während die Glycerinaldehyd-phosphorsäure mit Jod und Brom vollständig oxydiert wird. Das Dinitrophenylhydrazon der Dioxy-aceton-phosphorsäure wurde nicht erhalten, es bilden sich wohl P-haltige Produkte, die aber zum größten Teil aus dem Osazon des Methyl-glyoxals bestehen. H. O. L. Fischer (l. c.) hat das Dinitrophenylhydrazon der Glycerinaldehyd-phosphorsäure beschrieben.

Aus den nahezu übereinstimmenden chemischen Eigenschaften dieser Säure mit der Glycerinaldehyd-phosphorsäure muß man den Schluß ziehen, daß es sich hier in Wirklichkeit um Dioxy-aceton-monophosphorsäure handelt, und aus der vollkommenen Übereinstimmung mit der natürlichen Triose-phosphorsäure, daß diese selbst Dioxy-aceton-phosphorsäure ist.

Auch die biologischen Eigenschaften sprechen dafür. Dioxy-aceton-phosphorsäure mußte zu 100% vergären, weil sie optisch inaktiv ist, im Gegensatz zur Glycerinaldehyd-phosphorsäure, bei der nur die *d*-Komponente gärfähig ist. In der Tat wird sie weit über die Hälfte

¹²⁾ Willstätter-Schudel, B. 51, 780 [1918]; Auerbach u. Bodländer, Ztschr. angew. Chem. 1923, 602.

¹³⁾ Neuberger, Biochem. Ztschr. 223, 494 [1930]; O. Meyerhof u. K. Lohmann, Biochem. Ztschr. (im Druck).

vergoren, genau so wie die natürliche Triose-phosphorsäure. Auch zeigt sie das eigentümliche enzymatische Gleichgewicht $1 \text{ Hexose-diphosphat} \rightleftharpoons 2 \text{ Dioxy-aceton-phosphorsäure}^{14)}$, im Gegensatz zur Glycerinaldehyd-phosphorsäure.

Beschreibung der Versuche.

Darstellung des dioxy-aceton-phosphorsäuren Calciums.

In eine auf -15° bis -20° abgekühlte Lösung von 1 g Dioxy-aceton in 30 ccm wasser-freiem Chinolin wird eine bei derselben Temperatur gehaltene Lösung von 2 g POCl_3 in 10 ccm Chinolin innerhalb 10 Min. eingetropft und die Reaktionsflüssigkeit bei dieser Temperatur gehalten, bis sie nach ungefähr $\frac{1}{2}$ Stde. zu einem dicken Krystallbrei erstarrt ist. Darauf wird dasselbe Volumen Eiswasser nebst 5 ccm 25-proz. Ca-Acetat-Lösung zugegeben, mit NaOH bis zu schwach lackmus-saurer Reaktion abgestumpft, zentrifugiert, von dem Chinolin und ausgefallenem Ca-Phosphat abgetrennt und das Ca-Salz der Dioxy-aceton-phosphorsäure mit der 3-fachen Menge Alkohol ausgefällt. In einer kleinen Probe bestimmt man anorganisches, mit NaOH verseifbares und Gesamt-Phosphat. Der Monosäure entspricht verseifbares — anorganisches Phosphat und der Diphosphorsäure Gesamt-phosphat — verseifbares Phosphat. Bei guten Versuchen bilden sich 75 bis 100 mg P der Mono- und 15—20 mg P der Diphosphorsäure. Wenn sich mehr als 30 % Diphosphorsäure gebildet hatten, wurde die weitere Reinigung (der besseren Ausbeute wegen) über die fraktionierte Hydrolyse vorgenommen, unter 30 % wurde die Disäure mit HCl und Alkohol abgetrennt. Im ersten Falle löst man das Rohprodukt in Wasser und verd. Salzsäure, gibt dasselbe Volumen 2-n. HCl zu, hydrolysiert bei 100° 5 Minuten, stumpft mit NaOH bis zu schwach lackmus-saurer Reaktion ab und fällt das anorganische Phosphat mit $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol, den man unter Umschwenken eintropfen läßt. Im anderen Falle löst man das Rohprodukt in 2-n. HCl, gießt 15 Vol.-Tle. Alkohol hinzu, zentrifugiert von der ausgefallenen Disäure ab, stumpft mit NaOH bis zur schwach sauren Reaktion ab, zentrifugiert wieder, löst den Niederschlag in Wasser und etwas HCl und trennt das anorganische Phosphat, wie oben angegeben, ab. Man gewinnt auf diese Weise bis zu 300 mg Calciumsalz, bei der Hydrolyse meist etwas weniger, das noch 10—15 % anorganisches und 90—95 % verseifbares von dem Gesamt-phosphat enthält. Die weitere Reinigung¹⁵⁾ ist verlustreich, weil die Säure in der Nähe des Neutralpunktes, bei der sie nur gefällt werden kann, sich langsam in anorganisches Phosphat und P-haltige Produkte, die von NaOH nicht mehr verseift werden, aufspaltet. Für biologische Arbeiten genügt aber der angegebene Reinheitsgrad.

Das Calciumsalz fällt meist amorph aus, manchmal werden unregelmäßige Blättchen unter dem Mikroskop beobachtet. Es löst sich in viel Wasser, wobei ein Teil schon zerstört wird. Die feste Substanz hält sich im Vakuum bei 0° nur wenige Tage unverändert.

¹⁴⁾ O. Meyerhof u. K. Lohmann, Naturwiss. 22, 220 [1934].

¹⁵⁾ Beim Ausschütteln mit Eisessig, das bei der Glycerinaldehyd-phosphorsäure zu 100-proz. Produkten führte, erreichte man hier einen Reinheitsgrad von höchstens 96 %.

Für die Analyse wurden aus größeren Ansätzen die besten Fraktionen ausgewählt, aber auch sie enthielten noch etwas anorganisches Phosphat, das von der Einwaage abgezogen wurde. Sie wurden im Hochvakuum bei 15–20° getrocknet. Die C- und P-Werte stimmen gut auf eine Verbindung mit $\frac{1}{2}$ Mol Wasser.

1) = Ca-Salz über Hydrolyse, 2) = Ca-Salz mit HCl, Alkohol gereinigt.

1) 5.309 mg Sbst.: 3.18 mg CO₂, 1.525 mg H₂O. — 2) 5.133 mg Sbst.: 3.09 mg CO₂, 1.420 mg H₂O. — 5.193 mg Sbst.: 3.18 mg CO₂, 1.430 mg H₂O.

1) 2.652 mg Sbst.: 1.682 mg CaSO₄. — 2) 4.856 mg Sbst.: 3.092 mg CaSO₄.

P₂O₅ wurde colorimetrisch bestimmt¹⁶⁾: 1) 2.12 mg Sbst., 2) 3.30 mg Sbst.
 C₃H₅O₆PCa + $\frac{1}{2}$ H₂O (217.1). Ber. C 16.58, H 2.78, Ca 18.45, P₂O₅ 32.71.
 Gef. 1) „ 16.34, „ 3.21, „ 18.67, „ 32.1.
 2) „ 16.42, 16.74, „ 3.10, 3.08, „ 18.75, „ 32.4.

Methyl-glyoxal wurde colorimetrisch mit Arsenwolframsäure und *n*-KCN in soda-alkalischer Lösung nach Ariyama¹⁷⁾ bestimmt. Nach 60 Min. langer Hydrolyse gef.: 0.234 mg anorganisches P₂O₅ und 0.231 mg Methyl-glyoxal.

Milchsäure-Bestimmung nach Shaffer, Cotonio und Friedemann. 6.3 mg verseifbares Phosphat: Milchsäure ber. 8.1 mg, gef. 8.8 mg.

Jod-Titration: Bei einer 3.5 mg gebundene Triose enthaltenden Lösung wurde bei 2.5 ccm n_{100} -J₂ das vorher vorhandene verseifbare Phosphat (ausgedrückt in P₂O₅) von 2.71 mg wiedergefunden.

Brom-Titration: In einer 4.6 mg gebundene Triose enthaltenden Lösung war nach 5 Tagen bei 5.97 ccm n_{100} -Br₂-Verbrauch das verseifbare Phosphat (P₂O₅) von 3.48 mg um 0.64 mg verringert, das entspricht 18%. Diese Zunahme kann aber auch durch den freiwilligen Zerfall gebildet worden sein.

Darstellung des Ba-Salzes der Dioxy-aceton-phosphorsäure über die Sulfid-Verbindung: Nach Phosphorylierung und Abtrennung des Chinolins, ohne Zusatz von Calciumacetat, wurde die wäßrige Lösung mit 1 g in etwas Wasser gelöstem Kaliummetabisulfid versetzt und 20' bei 15–20° stehen gelassen. Darauf gibt man 20 ccm 25-proz. Ca-Acetat-Lösung zu, stumpft bis zu schwach lackmus-saurer Reaktion ab und fällt das Ca-Salz mit der gleichen Menge Alkohol. Aus dieser Fällung läßt sich die Bisulfid-Verbindung, die ungefähr dieselbe Löslichkeit wie Ca-Sulfid hat, mit Wasser herauslösen und mit $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ Vol.-Tl. Alkohol fällen, wobei das Ca-Sulfid noch in Lösung bleibt, wenn man 1–2 Tropfen verd. Salzsäure hinzugibt. Diese Reinigung ist mit Verlusten verbunden, weil die Bisulfid-Verbindung ohne Überschuß von Bisulfid dissoziiert. Deshalb wurde vorgezogen, aus diesem Rohprodukt im Bedarfsfalle sofort das Ba-Salz der freien Säure herzustellen. Zu diesem Zweck wird das Rohprodukt mit Wasser extrahiert, schwach angesäuert, mit Ammoniumoxalat das Ca gefällt, mit NaOH alkalisch bis *pH* 7.5–8 gemacht und mit n_{10} Jod bis zum Umschlag mit Stärke titriert. Darauf wird sofort angesäuert, mit Ba-Acetat versetzt, zentrifugiert, zu der schwach lackmus-sauren Lösung $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol gegeben, nochmals zentrifugiert und das Ba-Salz, das meistens reiner als direkt dargestelltes ist, mit der 3-fachen Menge Alkohol gefällt. Die Ausbeute ist etwas besser als beim Ca-Salz. Die Eigenschaften sind dieselben wie die des Ca-Salzes.

¹⁶⁾ Lohmann u. Jendrassik, Biochem. Ztschr. **178**, 419 [1926].

¹⁷⁾ Journ. biol. Chem. **77**, 359 [1928].

Ca-Salz der Bisulfitverbindung. 3.720 mg Sbst. (im Hochvakuum bei Zimmer-Temperatur getrockn.): 1.53 mg CO₂, 0.825 mg H₂O. — 3.353 mg Sbst.: 2.19 mg CaSO₄.

C₃H₅O₈PCa.HSO₃. 1/2 Ca (309.23). Ber. C 11.64, H 1.96, Ca 19.44, P₂O₅ 22.96.

Gef. „ 11.22, „ 2.42, „ 19.24, „ 22.40.

titriert mit Jod: 8.5 mg Substanz: 5.1 ccm n/100-Jod entspr. 7.89 mg Sbst. = 92.8 %.

Ba-Salz der freien Säure. 3.542 mg Sbst.: 2.522 mg BaSO₄, P₂O₅: 2.61 mg Sbst.

Ber. Ba 43.56, P₂O₅ 22.52. Gef. Ba 41.91, P₂O₅ 22.87.

Hrn. Prof. Dr. O. Meyerhof danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Unterstützung bei ihrer Ausführung.

167. H. Nienburg: Über die Oxime des 3-Benzoyl-6-phenyl-pyridins.

[Aus d. Biolog. Laborat. d. I.-G. Farbenindustrie A.-G., Werk Oppau.]

(Eingegangen am 27. März 1934.)

Zu pflanzen-physiologischen Studien wurden substituierte Nicotinsäuren benötigt. Unter anderem stellten wir die 6-Phenyl-pyridin-3-carbonsäure (IVb) nach den Angaben von E. Benary und H. Psille¹⁾ dar. Diese Autoren kondensierten ω-Formyl-acetophenon mit Ammoniumacetat zum 3-Benzoyl-6-phenyl-pyridin (I), bildeten daraus mit Hydroxylamin ein Ketoxim (IIb, von uns mit β bezeichnet), lagerten dieses nach Beckmann um und erhielten durch saure Hydrolyse des gebildeten Säure-amids (IIIb) die 6-Phenyl-pyridin-3-carbonsäure, deren Konstitution sie durch Abbau zum α-Phenyl-pyridin sicherstellten. Wir konnten die Literaturangaben nur z. T. bestätigen, bzw. fanden darüber hinausgehende Resultate. Während die genannten Autoren beim Umsatz des 3-Benzoyl-6-phenyl-pyridins mit Hydroxylamin auch bei variierten Versuchs-Bedingungen nur ein Ketoxim (IIb) mit Schmp. 183—184° fanden, entstand bei unseren Versuchen, auch wenn wir uns streng an die vorhandene Literatur hielten, stets ein Gemisch der beiden möglichen isomeren Ketoxime, aus dem wir durch Fraktionieren sowohl das bereits beschriebene Ketoxim mit Schmp. 183—184° als auch das bisher vergeblich gesuchte Isomere (IIa, α-Oxim) mit Schmp. 160°, Sintern 157° isolieren konnten. Die alleinige Bildung des höher schmelzenden Isomeren konnten wir, auch bei wechselnden Versuchs-Bedingungen, nie beobachten. Wir arbeiteten dabei sowohl in schwach saurem, als auch in alkalischem Medium. Es wurde lediglich festgestellt, daß bei Verwendung eines weniger reinen Hydroxylamin-Chlorhydrats (Raschig) mehr vom niedrig schmelzenden Isomeren erhalten wurde, als wenn wir das Reagens pro analysi (Merck) mit dem Keton zum Umsatz brachten. Es wäre an einen katalytischen Einfluß der verwendeten Reagenzien zu denken.

Die Überführung des höher schmelzenden Oxims in die 6-Phenyl-pyridin-3-carbonsäure konnten wir voll bestätigen. Die Umlagerung nach Beckmann führte zu dem bereits beschriebenen Anilid (IIIb)¹⁾ mit Schmp. 199°, dessen Einheitlichkeit sich durch seine saure Hydrolyse erwies: es bildeten sich nur die genannte Pyridin-carbonsäure (IVb), Schmp. 229°, und Anilin (nachge-

¹⁾ B. 57, 828 [1924]; vergl. auch Inaug.-Dissert., H. Psille, Berlin 1923.