

Cyclohexan-1.2-diacetoxy-1.2-dicarbonsäure selber, Schmp. 200° (aus Äther) (II) und eine chlorhaltige Säure von unscharfem, um 160° liegendem Schmelzpunkt, vielleicht die Cyclohexan-1-chlor-2-acetoxy-1.2-dicarbonsäure (III). Die beiden erstgenannten Verbindungen entstehen auch aus den beiden stereoisomeren Dioxy-säuren mit Acetylchlorid oder Essigsäure-anhydrid, das Anhydrid I auch aus II mit Acetylchlorid. Bei der Hydrolyse mit Natronlauge entsteht aus dem Anhydrid die *cis*-Cyclohexan-1.2-dioxy-1.2-dicarbonsäure vom Schmp. 184°.

3.692 mg Anhydrid, Schmp. 174° (I): 7.23 mg CO<sub>2</sub>, 1.75 mg H<sub>2</sub>O. — 3.764 mg Sbst.: 7.36 mg CO<sub>2</sub>, 1.80 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>17</sub>. Ber. C 53.33, H 5.20. Gef. C 53.41, 53.33, H 5.30, 5.35.

3.580 mg Diacetyl-säure, Schmp. 200° (II): 6.51 mg CO<sub>2</sub>, 1.89 mg H<sub>2</sub>O. — 102.8 mg Säure verbraucht. 7.1 ccm *n*/<sub>10</sub>-KOH.

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>. Ber. C 50.00, H 5.60, Mol.-Gew. 270.

Gef. „ 49.59, „ 5.91, „ 287.

2.924 mg Chlor-acetyl-säure?, Schmp. unscharf 152° (III): 4.85 mg CO<sub>2</sub>, 1.49 mg H<sub>2</sub>O. — 11.35 mg Sbst., nach Volhard titriert: 4.3 ccm *n*/<sub>10</sub>-AgNO<sub>3</sub>, entspr. 15.2 mg Cl.

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>6</sub>Cl. Ber. C 45.36, H 4.95, Cl 13.40.

Gef. „ 45.24, „ 5.70, „ 13.45.

### 358. Georg Hahn und Otto Schales: Selbstkondensationen des Methyl-glyoxals, I. Mittel.: Huminsäuren aus Drei-Kohlenstoff-Systemen.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Frankfurt a. M.]

(Eingegangen am 15. Oktober 1934.)

Die naheliegende Annahme, daß die im Pflanzen- und Tierreich weit verbreiteten Cyclite durch Ringschluß aus aliphatischen Polyoxyverbindungen hervorgegangen seien, hat unseres Wissens *in vitro* bis jetzt keine experimentelle Stütze gefunden. *In vivo* dagegen hat Needham<sup>1)</sup> zeigen können, daß Zufuhr von Glucose zu bebrüteten Hühner-Eiern eine Vermehrung ihres Gehaltes an *i*-Inosit hervorruft, und daß sich auf gleiche Weise die Menge Scyllit im Ei des Hunde-Haifisches während der Entwicklung wesentlich erhöhen läßt<sup>2)</sup>. Danach scheint die genetische Beziehung zwischen den beiden Stoffklassen keinem Zweifel zu unterliegen.

Während alle bisherigen Bearbeiter zur experimentellen Klärung dieser Frage von Cellulose, Monosacchariden oder Zucker-alkoholen ausgingen, und durch mehr oder weniger weitgehende Umwandlungen auf rein chemischem Wege Ringschlüsse bewerkstelligten<sup>3)</sup>, veranlaßte uns gerade die Bildungsweise *in vivo*, auch die Zwischenglieder des physiologischen Zucker-Abbaues in den Kreis der Untersuchungen einzubeziehen.

Wie man heute annimmt, ist neben Dioxy-aceton-phosphorsäure (I), die von Meyerhof und Lohmann<sup>4)</sup> isoliert und von W. Kissling<sup>5)</sup> syntheti-

<sup>1)</sup> Needham, Biochem. Journ. **18**, 1371 [1924].

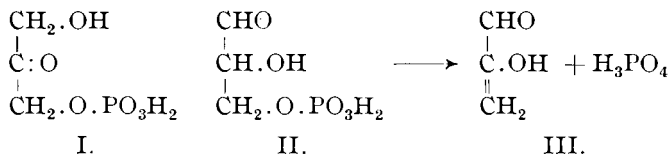
<sup>2)</sup> Needham, Biochem. Journ. **23**, 319 [1929].

<sup>3)</sup> vgl. z. B. Micheel, A. **496**, 77 [1932] u. a.

<sup>4)</sup> Meyerhof u. Lohmann, Naturwiss. **22**, 134 [1934].

<sup>5)</sup> Kissling, B. **67**, 869 [1934].

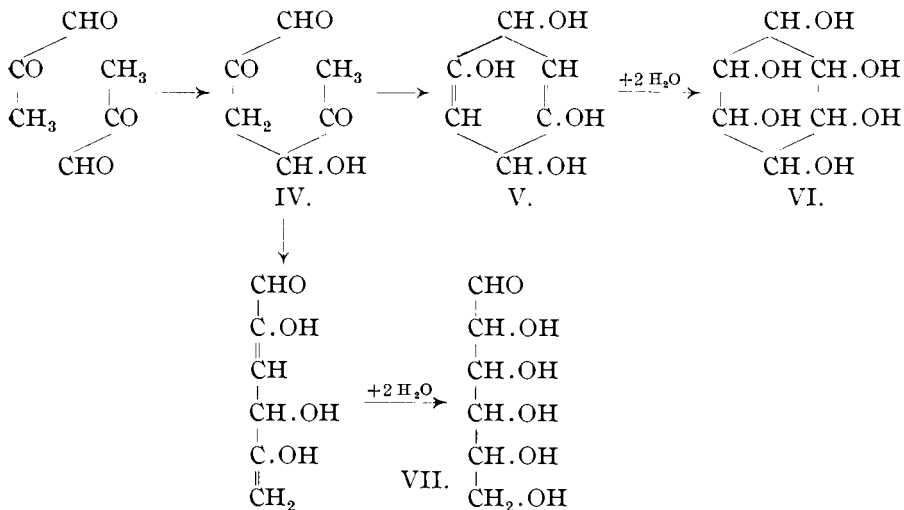
sirt worden ist, ihr Isomeres, die Glycerinaldehyd-phosphorsäure (II), als primäres Spaltstück des Zucker-Abbaues in der Zelle anzusehen:



Das Methyl-glyoxal (III) dem man bisher diese Rolle zuschrieb, entsteht dagegen wahrscheinlich erst sekundär, durch die äußerst leicht verlaufende Spaltung von II, die schon spontan eintreten vermag. Damit ist einerseits das von Neuberg und Kobel<sup>6)</sup> nachgewiesene Auftreten von Methyl-glyoxal in allen Zellen erklärbar, während andererseits seine Nicht-vergärbbarkeit verständlich wird.

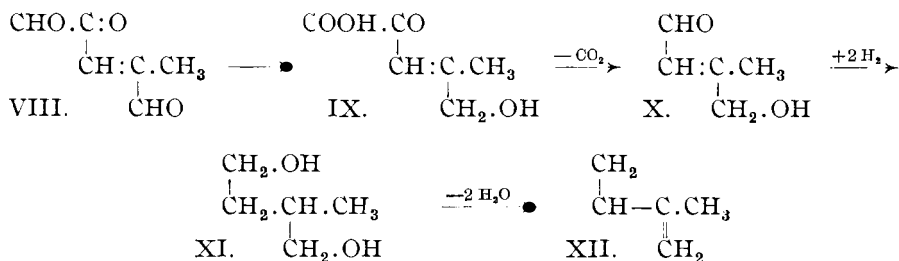
Trotzdem also Methyl-glyoxal nicht direkt am Zucker-Abbau beteiligt ist, haben wir es wegen seiner großen und vielseitigen Reaktionsfähigkeit und weil es verhältnismäßig leicht zugänglich ist, auf sein Verhalten gegenüber Kondensations-Reagenzien untersucht.

Von den theoretisch möglichen Kondensationen ist im Hinblick auf die Bildung von Inosit besonders die Reaktion zwischen der Aldehydgruppe und den aktiven Wasserstoffatomen der  $\text{CH}_3$ -Gruppe wichtig. Die aldol-artige Verkettung beider würde zunächst zu IV führen. Von hier aus kann durch Ringschluß V erhalten werden, das in seiner Dienol-Form durch 2-malige Wasser-Anlagerung Inosit liefern könnte. Hydratisiert sich dagegen die Dienol-Form von IV, dann käme man zur Hexose VII zurück — ein Reaktionsverlauf, der bei der Re-synthese von Glucose bzw. Glykogen, aus den Produkten der Glykolyse während der Atmung, vielleicht Bedeutung besitzt:



<sup>6)</sup> Neuberg u. Kobel, Biochem. Ztschr. **207**, 232 [1929].

Aber auch die Bildung von Isopren und damit aller Isoprenyl-Homologen, der Terpene einschließlich des Kautschuks, kann in durchaus physiologischen Umsetzungen aus Methyl-glyoxal gedacht werden. Kondensiert sich nämlich die Ketongruppe des einen mit der Methylgruppe des anderen Moleküls, so entsteht VIII, das sich durch intramolekulare Dismutation in IX umwandelt. Diese  $\alpha$ -Keton-säure würde zu X decarboxyliert, das, als Wasserstoff-Acceptor wirkend, in XI überginge. Schließlich könnte durch 2-malige Wasser-Abspaltung daraus Isopren (XII) entstehen:



Die Darstellung des benötigten Methyl-glyoxals erfolgte nach dem uns am günstigsten erscheinenden Verfahren von Riley und Morley<sup>7)</sup> durch Oxydation von Aceton mittels Selendioxyds. Das dabei gewonnene Selen wurde in zweckmäßiger Apparatur — wie im Versuchs-Teil näher beschrieben wird — wieder in Dioxyd übergeführt und so stets von neuem verwendbar gemacht. Bei der Destillation des Methyl-glyoxals erhielten wir, außer der bekannten trimeren, glycerin-konsistenten Form, auch das intensiv gelbgrüne, dimolekulare, leicht flüchtige Methyl-glyoxal. Diese kurzlebige Modifikation zeigt die Tendenz, wie auch schon H. O. L. Fischer und Taube schreiben<sup>8)</sup>, sich rasch zu einer glasigen, amorphen Masse zu polymerisieren, ein Vorgang, der nach unseren Beobachtungen besonders schnell in der Kälte verläuft. Während die genannten Autoren eine Molekulargewichts-Bestimmung der polymeren Substanz wegen deren kolloiden Löslichkeit in Bromoform nicht vornehmen konnten, ergaben unsere Bestimmungen in Eisessig Werte von 650–730. In Übereinstimmung mit dem Befund der Analysen sind wir der Ansicht, daß es sich um einen Stoff der Formel  $8\text{CH}_3\text{.CO.CH}_3 + 4\text{H}_2\text{O}$  handelt. Die Substanz ist nicht identisch mit der von Harries und Türk<sup>9)</sup> gewonnenen, 4-fach molekularen, festen Form des Methyl-glyoxals, da sie die charakteristische Eigenschaft dieses Stoffes, außerordentlich stark hygroskopisch zu sein, nicht besitzt. Während wir feststellen mußten, daß trimeres Methyl-glyoxal bei 3 Monate langem Aufbewahren in verschlossenem Gefäß zu 24 % in Brenztraubensäure übergegangen war, erwies sich das feste Methyl-glyoxal auch noch nach längerem Stehen an der Luft als gänzlich unverändert. Der Keto-aldehyd ist also in dieser festen Form durchaus lagerfähig. Sie depolymerisiert sich leicht beim Erhitzen mit Wasser oder durch Vakuumdestillation, wie im Versuchs-Teil näher beschrieben wird.

<sup>7)</sup> Riley u. Morley, Journ. chem. Soc. London **1932**, 1875; vergl. a. Henze u. Müller, Ztschr. physiol. Chem. **214**, 281 [1933].

<sup>8)</sup> H. O. L. Fischer u. Taube, B. **57**, 1502 [1924].

<sup>9)</sup> Harries u. Türk, B. **38**, 1632 [1905].

Da Methyl-glyoxal in alkalischem Medium ziemlich rasch zu Milchsäure dismutiert wird, brachten wir in unseren Kondensations-Versuchen Säuren der verschiedensten Konzentration zur Anwendung. Während in der Kälte mit 2-n. Säure nur sehr langsam Veränderung eintritt, sind beim Erwärmen recht bald Umwandlungen zu beobachten. Es ergibt sich stets das gleiche Bild, daß sich die Lösungen erst gelb, dann rot färben, wobei sich eine dunkelbraune Substanz ausscheidet. Aus der Mutterlauge konnten durch Eindampfen nur ganz geringe Mengen — im günstigsten Fall 2.5 % des angewandten Methyl-glyoxals — einer farblosen, aus Wasser in Nadelbüscheln krystallisierenden Säure vom Zers.-Pkt.  $248^{\circ}$  erhalten werden. Sie gibt ein Dinitrophenyl-hydrason vom Schmp.  $320^{\circ}$ ; Molekulargewicht und Analyse deuten auf eine Summenformel  $C_{14}H_{14}O_8$ , Mol.-Gew. 310 hin; sie müßte also aus mindestens 5 Mol. Methyl-glyoxal entstanden sein.

Die braune Substanz erwies sich als Säure; sie schmilzt bei  $220^{\circ}$  unt. Zers., ist löslich in Alkohol, Aceton, Chloroform und Dioxan, ohne in dessen daraus krystallisierbar zu sein. Sie zeigt im übrigen das Verhalten einer Huminsäure. Ihre Analysen-Werte stimmen mit denen der von Eller<sup>10)</sup> aus Glucose erhaltenen Huminsäure überein. Daß die beiden Stoffe jedoch nicht identisch sind, zeigt sich sowohl im Schmelzpunkt als auch in den Löslichkeits-Verhältnissen. Im Gegensatz zur Methyl-glyoxal-Huminsäure ist die Glucose-Huminsäure nicht schmelzbar und in Alkohol nur sehr schwer löslich. Die C-H-Bestimmung allein ist somit kein zuverlässiges Charakterisierungsmittel bei diesen Substanzen.

Es wurde nun zunächst die Wasserstoff-ionen-Konzentration variiert. Dadurch bildeten sich zwar keine anderen Produkte, es zeigte sich aber, daß die Bildungs-Geschwindigkeit beider Stoffe stark vom  $p_H$  der Lösung abhängig ist. Wie aus der Tabelle im praktischen Teil ersichtlich ist, legt ein ausgeprägtes Bildungs-Maximum für Huminsäure aus Methyl-glyoxal (42 %) bei  $p_H = 5.9$ ; die Ausbeute überwiegt hier bei weitem diejenigen, die bei der Gewinnung von Huminsäuren aus Kohlehydraten erzielt wurden, wenn man von dem aus Xylose erhaltenen, allerdings alkali-unlöslichen, Produkt ab-sieht<sup>11)</sup>.

Die bevorzugte Bildung von Huminsäure in physiologischem  $p_H$ -Bereich hat uns veranlaßt, die Huminsäure-Bildungsgeschwindigkeiten aus Hexosen unter gleichen Bedingungen zu untersuchen. Es zeigte sich dabei (s. Tabelle 2 im prakt. Teil), daß keine der natürlichen Hexosen bei  $p_H = 6$  nennenswerte Mengen Huminsäure zu bilden vermag. Die höchste Ausbeute wird aus Fructose erhalten — 2.4 % —, aber auch da erst nach 120-stdg. Kochen. In gleichen Zeiten wird also aus Methyl-glyoxal rund das 60-fache an Huminsäure gebildet. Dioxy-aceton dagegen wandelt sich etwa mit der gleichen Geschwindigkeit wie Methyl-glyoxal um, was nicht verwunderlich ist, da nach Pinkus<sup>12)</sup> unter den gewählten Bedingungen Dioxy-aceton in Methyl-glyoxal übergeht. Wenn man nun den gleichen Geschwindigkeits-Unterschied auch für gewöhnliche Temperatur annimmt, dann erscheint es sehr unwahrscheinlich, daß die Huminsäuren der Natur aus Hexosen gebildet werden. Vielmehr glauben wir folgern zu dürfen, daß die Huminsäure-Bildung von Drei-Kohlenstoff-Systemen ausgeht. Durch

<sup>10)</sup> Eller, A. **431**, 180 [1923].

<sup>11)</sup> vergl. Hilpert, B. **67**, 1555 [1934].

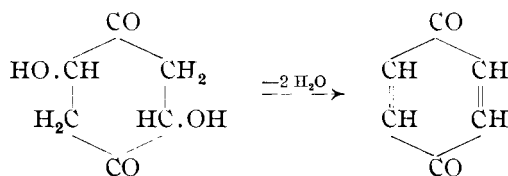
<sup>12)</sup> Pinkus, B. **31**, 31 [1898]

bakterielle Zersetzung der Kohlehydrate würden also in erster Phase Triosen entstehen, die sich dann — wie wir fanden, am besten in physiologischem  $p_n$ -Bereich — in Huminsäuren umwandeln.

Dieser Schluß ist insofern von allgemeiner Bedeutung, als man bekanntlich die Huminsäuren als Zwischenglieder des natürlichen Inkohlungsprozesses ansieht. Dieser nimmt seinen Anfang bei den Kohlehydraten und endet beim Graphit. Der Mechanismus dieses Prozesses, sowie die dabei durchlaufenen Zwischenglieder sind bisher fast völlig ungeklärt geblieben. Wir glauben nun, daß durch die Erkennung des Methyl-glyoxals als Anfangsglied etwas mehr Licht in diese Vorgänge gebracht werden kann. Erstens können die deutlichen — wenn auch geringen — Unterschiede, der aus verschiedenen Zuckern erhaltenen Huminsäuren erklärt werden. Zweitens wird aber auch die deutlich vorhandene Ähnlichkeit der Kohlehydrat-Huminsäuren mit den — aus so gänzlich anderem Material durch Oxydation gebildeten — Phenol-Huminsäuren verständlich.

Der Unterschied der Glucose-Huminsäure von der Methyl-glyoxal-Huminsäure beruht z. B. wahrscheinlich darauf, daß die Methyl-glyoxal-Huminsäure aus einheitlichen Bausteinen aufgebaut ist, während die Glucose bei dem primären Spaltprozeß neben Zwei- und Drei-Kohlenstoff-Systemen bekanntlich auch Lävulinsäure zu liefern vermag, wobei die Möglichkeit, daß evtl. alle drei Spaltprodukte gemischt Einbau in das Huminsäure-Kondensat erleiden können, durchaus vorhanden ist. Während trotzdem in diesem Falle die C-H-Werte übereinstimmen — was wir als Zufall ansehen —, unterscheiden sich die Glucose- und Fructose-Huminsäuren in den Analysen-Werten deutlich, was auf ihren verschiedenartigen Zerfall beim Kochen mit Säuren zurückzuführen sein wird.

Die Verwandtschaft der Kohlehydrat-Huminsäuren mit den Phenol-Huminsäuren wird verständlich, wenn man sich die Ketoform von V dehydratisiert denkt:



Es entsteht dann Chinon, über das nachgewiesenermaßen auch die Huminsäure-Bildung bei der Oxydation der Phenole verläuft.

Schließlich bietet die vielseitige Reaktionsfähigkeit des Methyl-glyoxals eher Möglichkeiten als die Betrachtung der Hexosen, das Zustandekommen der hochkondensierten aromatischen Systeme zu verstehen, als welche z. B. Fuchs<sup>13)</sup> die Huminsäuren und Fr. Fischer<sup>14)</sup> die Kohle ansehen. Die von uns gefaßte, noch mit einem Schmelzpunkt versehene und in organischen Lösungsmitteln lösliche Methyl-glyoxal-Huminsäure, sowie die als wahrscheinliche Vorstufe dazu anzuschende krystallisierte Säure  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_8$ , gewinnen deshalb auch in diesem Zusammenhang erhöhtes Interesse.

<sup>13)</sup> Fuchs, *Angew. Chem.* **44**, 111 [1931].

<sup>14)</sup> Fr. Fischer, *Ges. Abhandll. Kenntn. Kohle* **5** [1920] u. weitere Arbeiten in „Brennstoff-Chemie“.

### Beschreibung der Versuche.

#### 1) Darstellung von Methyl-glyoxal.

2300 ccm Aceton werden mit 490 g Selendioxyd versetzt und 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird von dem ausgeschiedenen Selen abgesaugt, dann das überschüssige Aceton unter Verwendung eines hohen Fraktionier-aufsatzes abdestilliert (für weitere Ansätze kann dieses etwas methylglyoxal-haltige Aceton wieder benutzt werden). Der Rückstand, aus dem sich bei mehrtägigem Stehen noch beachtliche Mengen Selen ausscheiden, wird der Vakuum-Destillation unterworfen, wobei, nach geringem Vorlauf, 160 g Hauptprodukt zwischen 48° und 54° bei 12 mm übergehen. Es hinterbleibt ein zäh-fester, schwarzbrauner Rückstand von widerlichem Geruch, der aus Selen, vermutlich im Gemisch mit organischen Selenverbindungen, besteht. Wenn man diesen Rückstand mit Äther aufnimmt und einige Tage über Natriumsulfat stehen läßt, dann vom Trockenmittel und dem erneut ausgeschiedenen Selen abfiltriert, das Lösungsmittel abdampft und den Rückstand im Vakuum destilliert, erfolgt beim Erwärmen unter Zersetzungs-Erscheinungen weitere Selen-Ausscheidung, ohne daß noch nennenswerte Mengen Methyl-glyoxal zu erhalten wären.

Das Hauptprodukt wird durch Destillation weiter gereinigt. Es gehen bei 50–52°/12 mm 130 g klare, gelblich gefärbte Flüssigkeit über von glycerin-ähnlicher Konsistenz. Eine Lichtbrechungs-Bestimmung ergibt die in der Tabelle unter Messung 1 zusammengestellten Werte und zeigt den Übergang von einer teilweise polymerisierten Form zum Endzustand des trimeren Methyl-glyoxals. Die Substanz wird nochmals destilliert, wobei 3 hintereinander-geschaltete, in Eis-Kochsalz-Mischung gekühlte Saugflaschen als Vorlage dienen. Man erhält:

in Vorlage Nr. 1: 52.5 g Destillat, glycerin-konsistent, schwach gelb gefärbt,

in Vorlage Nr. 2: 15.0 g Destillat mit den gleichen Eigenschaften,

in Vorlage Nr. 3: 25.5 g Destillat, äußerst leicht beweglich, von intensiv stechendem Geruch und tief gelbgrüner Farbe.

Wie die Lichtbrechungs-Messung zeigt (Tabelle, Messung 2), handelt es sich bei der in der 3. Vorlage kondensierten Substanz um dimeres Methyl-glyoxal, wie es auch von H. O. L. Fischer und Taube durch Destillation von Phosphorpentoxyd-Dioxy-aceton-Gemisch erhalten wurde<sup>8)</sup>. Das dimeres Methyl-glyoxal ist besonders leicht flüchtig und kann, wenn es nicht durch gute Kühlung der Vorlage zurückgehalten wird, durch die Wasserstrahl-Pumpe abgesogen werden und so die Ursache von Verlusten bei öfterem Destillieren von Methyl-glyoxal bilden. Bei weiterem Destillieren der Substanz aus Vorlage Nr. 1 (trimeres Methyl-glyoxal) erhält man wiederum einen Teil des Destillats (etwa 25 %) in der dimeren Form. Entsprechend den Angaben der Literatur<sup>15) 16)</sup> lieferte das gewonnene Methyl-glyoxal ein schwach gelb gefärbtes Disemicarbazon vom Schmp. 254°, ein in citronengelben Prismen krystallisierendes Phenyl-hydraxon vom Schmp. 148°, sowie ein Dinitrophenyl-hydraxon vom Schmp. 298°.

<sup>15)</sup> Wohl u. Lange, B. **41**, 3612 [1908].

<sup>16)</sup> Neuberg, Biochem. Ztschr. **232**, 482 [1931].

Tabelle der Lichtbrechungs-Messungen:

Zeit nach der Destillation	Messung 1	Messung 2	Literatur-Angaben <sup>17) 8)</sup>	
	$n_d$ (20°)	$n_d$ (16°)	$n_d$ (17.5°)	$n_d$ (23°)
0 Min.	1.4572	1.3988	1.4002	1.3951
2 „	—	—	—	1.4020
4 „	—	—	—	1.4125
25 „	1.4587	1.4383	—	—
33 „	1.4594	1.4420	—	1.4618
40 „	—	1.4453	—	—
44 „	—	1.4477	—	—
50 „	—	1.4504	—	—
1 Stde.	1.4611	1.4544	—	—
2 Stdn.	1.4679	1.4640	—	1.4733
10 „	—	1.4683 konst.	1.4702 konst.	konstant

## 2) Bildung von festem Methyl-glyoxal.

Das dimere Methyl-glyoxal zeigt Neigung, sich weiter als bis zur glycerin-konsistenten trimeren Form zu polymerisieren. Beim Versuch, dimeres Methyl-glyoxal, das  $\frac{1}{2}$  Stde. in Kältemischung gestanden hatte, auszugießen, erstarrte es augenblicklich zu einer völlig harten, glasigen Masse, die in der Reibschale gepulvert werden konnte. Bei Zimmer-Temperatur dauerte der Vorgang der Polymerisation länger, bis zu 12 Stdn. Im Gegensatz zu der von Harries und Türk<sup>9)</sup> gewonnenen polymeren Form, die aus 4 Mol. besteht, zeigte die von uns gewonnene Substanz auch bei wochenlangem Liegen an der Luft keinerlei hygroskopische Eigenschaften. Molekulargewichts-Bestimmungen ergaben Werte von 650—730, woraus auf etwa 8—10-fache Molekülgröße gegenüber monomerem Methyl-glyoxal zu schließen ist. Auch von Fischer und Taube<sup>8)</sup> ist beobachtet worden, daß die nur kurzlebige Form des dünnflüssigen Methyl-glyoxals sich rasch zu einer glasigen, amorphen Masse polymerisiert; sie können jedoch keine Molekülgröße dieser Substanz angeben, da ihr Produkt in dem zur Molekulargewichts-Bestimmung benutzten Bromoform kolloid löslich war.

Molekulargewichts-Bestimmung: 0.2688, 0.2144 g Sbst. in 17.91, 19.09 g Eisessig:  $\Delta = 0.09^0$ ,  $0.06^0$ . Mol.-Gew. ber. 648, gef. 651, 730.

33.5 mg Sbst.: 55.0 mg CO<sub>2</sub>, 18.1 mg H<sub>2</sub>O.

Ber. für (2 Methyl-glyoxal + 1 H<sub>2</sub>O) C 44.44, H 6.17. Gef. C 44.78, H 6.05.

Nach dem Befund der Analysen scheint also in dem polymeren Produkt ein wasser-ärmeres Methyl-glyoxal-Hydrat vorzuliegen. Eine Gehalts-Bestimmung an CH<sub>3</sub>.CO.CHO mit Dinitrophenyl-hydrazin ergab aus 78.8 mg Substanz 407.2 mg Hydrazon, d. s. 97% der Menge, die aus dem Stoff der oben angenommenen Formel (die zu vervierfachen ist) zu erwarten wäre.

Das feste Methyl-glyoxal ist leicht löslich in Eisessig und in Ameisensäure, in Wasser erst nach einigem Kochen. Beim Erhitzen der in einem evakuierten U-Rohr eingeschlossenen festen Substanz (Paraffin-Bad) tritt Schmelzen und Verflüssigung zur Glycerin-Konsistenz ein, und bei etwa 100° erfolgt Depolymerisation. In den durch Eiswasser gekühlten zweiten Schenkel des U-Rohres destilliert langsam das intensiv gelbgrün gefärbte, dimere Methyl-glyoxal über und wandelt sich im Verlauf einiger Stunden

<sup>17)</sup> H. O. L. Fischer u. Taube, B. 59, 857 [1926].

wieder in die feste Form um. Das Spiel der Depolymerisation kann beliebig oft wiederholt werden.

### 3) Darstellung von Selendioxyd.

Der hohe Preis von Selendioxyd läßt es ratsam erscheinen, das bei der Methyl-glyoxal-Darstellung abfallende Selen wieder zu oxydieren. Es wird zunächst gepulvert, mehrmals mit Wasser gewaschen und im Trockenschrank bei etwa 100° getrocknet, dann mittels Sauerstoffs, dem etwas nitrose Gase beigemischt werden, bei etwa 450° oxydiert.

Es bereitete zunächst Schwierigkeiten, eine Apparatur zu finden, die bei größter Tages-Leistung genügend Wärme-Unempfindlichkeit zeigte, um längere Zeit hindurch den praktischen Anforderungen gerecht zu werden. Schliff-Apparaturen erwiesen sich als wenig geeignet. Beste Erfolge hatten wir mit folgender Anordnung: Eine Retorte aus Jena-Glas von 1000 ccm Inhalt wurde zur Hälfte mit trockenem Selen beschickt. Die Sauerstoff-Zuführung erfolgte durch ein eingeschmolzenes Rohr, das bis zur Mitte des Retorten-Bauches reichte. Der Retorten-Hals wurde kurz abgeschnitten und mit der Kugel eines 750-ccm-Jena-Kurzhal-Rundkolbens verschmolzen. Dieser Kolben diente als Vorlage zur Aufnahme des entstehenden Dioxyds. Er konnte durch den Hals, der während der Reaktion durch einen mit Ableitungsrohr versehenen Kork verschlossen wurde, bequem entleert werden. Die Retorte wurde vollständig mit einer Asbest-Schicht überzogen und in einem Asbest-Luftbad vorsichtig angeheizt, der Rundkolben war der Zimmer-Temperatur ausgesetzt. Der Sauerstoff wurde der Bombe entnommen, dann beim Durchleiten durch eine Saugflasche, in der Schwefelsäure auf Natriumnitrit tropfte, mit nitrosen Gasen gemischt, mittels zweier Phosphorpenoxyd-Türme getrocknet und mit mäßiger Geschwindigkeit auf das Selen geleitet, das zunächst bei etwa 300° gehalten wurde. Nach 2 Stdn. wurde die Temperatur auf 450° erhöht. Das Selendioxyd sublimiert dann aus der Retorte heraus und schlägt sich in glänzenden, weißen Nadeln an der Wandung der Vorlage nieder. Innerhalb von 6 Stdn. ließen sich 130—170 g Selendioxyd gewinnen. Für jeden Ansatz wurde die Retorte mit 400 g Selen beschickt, aus dem insgesamt 520 g Dioxyd gewonnen wurden, d. s. 92 % d. Th. Die in brauner Schliff-Flasche aufbewahrte Substanz zeigte auch Monate nach ihrer Darstellung keinerlei Veränderung.

### 4) Untersuchung der Haltbarkeit von Methyl-glyoxal.

Frisch dargestelltes trimeres Methyl-glyoxal gibt, wenn man es in absolut-alkohol. Lösung mit Natriumäthylat versetzt, keinen Niederschlag. Verwendet man dagegen zu dem Versuch Methyl-glyoxal, das 3 Monate in verschlossenem Gefäß aufbewahrt wurde, so erhält man eine weiße, gut krystallisierte Fällung von brenztraubensaurem Natrium. Seine wäßrige Lösung gibt mit Phenyl-hydrazin das nadelförmig krystallisierende Phenyl-hydrazon der Brenztraubensäure vom Schmp. 192°; mit Dinitrophenyl-hydrazin erhält man das prachtvoll citronengelbe Brenztraubensäure-Dinitrophenyl-hydrazon vom Schmp. 216°, das in Soda mit roter Farbe löslich ist. Aus 2 g Methyl-glyoxal erhielten wir 0.6 g brenztraubensaures Natrium, woraus hervorgeht, daß innerhalb von 3 Monaten das Methyl-glyoxal zu 24 % in Brenztraubensäure übergegangen ist. Fällt man von vornherein das gelagerte Methyl-glyoxal mit Dinitrophenyl-hydrazin und trennt dann den gemeinsamen Niederschlag von Methyl-glyoxal-Dinitrophenyl-hydrazon und Brenztraubensäure-Dinitrophenyl-hydrazon durch die Löslichkeit des letzteren in Soda nach Neuberg<sup>16)</sup>, so kommt man zu dem gleichen prozentualen Verhältnis.



Im Gegensatz zu dem trimeren Produkt, zeigt das feste Methyl-glyoxal nach mehrmonatigem Aufbewahren keinen Übergang in Brenztraubensäure. Sein Gehalt an Methyl-glyoxal bleibt konstant, es handelt sich also bei dieser festen Form um ein haltbares Produkt.

5) Bildung von Huminsäure aus Methyl-glyoxal beim Erhitzen wäßriger Lösungen in Abhängigkeit von der Wasserstoff-ionen-Konzentration.

Es werden jeweils 5 g Methyl-glyoxal bzw. Methyl-glyoxal-diäthylacetal in einem kleinen Schliffkölbchen mit 25 ccm Säure versetzt und unter Rückfluß gekocht. Die Lösung färbt sich beim Kochen über gelb und rot nach dunkelbraun, gleichzeitig wird eine feste, dunkelbraun gefärbte Substanz abgeschieden, deren mengenmäßige Bildung in der Zeit-Einheit mit dem Verdünnungsgrad der angewandten Säure ansteigt und ein Maximum bei  $p_h = 5.9$  erreicht. Das beim Isolieren der Huminsäure — als solche erweist sich die braune Substanz — verbleibende Filtrat wird auf dem Wasserbade eingedampft, wobei Krystall-Ausscheidung beobachtet werden kann. Auch diese krystallisierte, farblose Substanz wird durch Absaugen isoliert. Tabelle 1c gibt Aufschluß über ihre mengenmäßige Bildung.

Tabelle 1.

## a) Huminsäure-Bildung aus Methyl-glyoxal.

Vers. Nr.	Säure u. Konzentrat.	Erhalten an Huminsäure in % d. angew. Methyl-glyoxals				
		nach 4	34	55	84	120 Stdn.
7	2-n. Schwefelsäure .....	—	—	1%	—	4%
8	1-n. Schwefelsäure .....	—	1%	—	4%	6%
9	$n/5$ -Schwefelsäure .....	—	—	5%	7%	9%
6	$n/20$ -Schwefelsäure .....	—	—	13%	—	17%
15	$n/20$ -Salzsäure .....	—	—	11%	13%	16%
27	$n/1000$ -Salzsäure .....	2%	—	12%	—	16%
31	$p_h = 5.9$ (Phosphat-Puffer) .....	—	42%	—	—	—
33	$p_h = 6.4$ (Phosphat-Puffer) .....	—	26%	—	—	—

b) Huminsäure-Bildung aus Methyl-glyoxal-diäthylacetal<sup>18)</sup>:

Vers. Nr.	Säure u. Konzentrat.	Erhalten an Huminsäure in % d. angew. Methyl-glyoxals			
		nach 55	84	120 Stdn.	
1	$n/10$ -Schwefelsäure .....	16%	20%	25%	
3	$n/20$ -Schwefelsäure .....	20%	25%	32%	
4	$n/20$ -Salzsäure .....	20%	24%	28%	

## c) Bildung der farblosen krystallisierten Substanz aus Methyl-glyoxal.

Vers. Nr.	Säure u. Konzentrat.	Entstanden an Substanz nach 55-stdg. Kochen in % des angew. Methyl-glyoxals	
6	$n/20$ -Schwefelsäure .....		2.5%
15	$n/20$ -Salzsäure .....		2%
27	$n/1000$ -Salzsäure .....		2%

<sup>18)</sup> Dargestellt nach Dakin u. Dudley, Journ. chem. Soc. London **105**, 2456 [1914].

Beschreibung der Huminsäure: Die dunkelbraune, amorphe Substanz ist löslich in Alkohol, Aceton, Chloroform und Dioxan. Ihrer Säure-Natur entsprechend, löst sie sich leicht in Soda, Natronlauge und Ammoniak und kann aus diesen Lösungen durch Ansäuern in Form brauner Flocken wieder ausgefällt werden. In Wasser und Äther ist die Huminsäure unlöslich. Sie schmilzt bei  $220^{\circ}$  unt. Zers., gibt mit Benzoylchlorid keine Verbindung und reduziert ammoniakalische Silbersalz-Lösung nicht. Ihre Metallsalze sowohl als auch ihr Ammoniumsalz sind schlecht krystallisierte Stoffe und eignen sich nicht zur Reinigung der Säure; ebensowenig gelingt es, die Substanz durch Veresterung oder durch Umkrystallisieren rein zu erhalten. Beim Versuch, die Säure im Hochvakuum zu sublimieren oder zu destillieren, tritt Zersetzung ein.

Zur Analyse wurde die staubfein gepulverte Substanz mit heißem Wasser gründlich gewaschen, dann in der Vakuum-Trockenpistole über Phosphorpentoxyd bei  $60^{\circ}$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

4.768 mg Stbst.: 10.78 mg  $\text{CO}_2$ , 2.33 mg  $\text{H}_2\text{O}$ . — Gef. C 61.66, H 5.47; gef. von Eller, l. c., für Huminsäure aus Glucose: C 61.25, H 4.99.

Beschreibung der farblosen krystallisierten Substanz: Die Substanz krystallisiert aus Wasser, in dem sie schwer löslich ist, in Form farbloser Nadelbüschel vom Schmp.  $248^{\circ}$ . Sie ist leicht löslich in Alkohol, Essigester, Äther, Aceton und Dioxan; nicht löslich in Benzol, Petroläther und Ligroin; schwer löslich in Wasser und Chloroform. Mit Dinitrophenylhydrazin wird ein Hydrazon vom Schmp.  $320^{\circ}$  erhalten; ammoniakalische Silbersalz-Lösung wird von der Substanz nicht reduziert. In der Trockenpistole über Phosphorpentoxyd tritt kein Gewichtsverlust ein, es ist also kein Krystallwasser vorhanden. Die Säure-Natur der Substanz geht aus ihrem Verhalten gegenüber Sodalösung hervor. Sie ist darin mit gelber Farbe löslich und fällt beim Ansäuern wieder aus.

6.2, 7.7 mg Stbst. in 60.0, 85.7 mg Campher:  $\Delta = 14^{\circ}, 13^{\circ}$ . — Gef. Mol.-Gew. 295, 277.

2.445, 3.755 mg Stbst.: 4.890, 7.490 mg  $\text{CO}_2$ , 0.980, 1.420 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_8$  (310). Ber. C 54.20, H 4.52.

Gef. „ 54.55, 54.40, „ 4.49, 4.23.

#### 6) Bildung von Huminsäure aus Dioxy-aceton und aus Hexosen beim Erhitzen wäßriger Lösungen in Abhängigkeit von der Wasserstoff-ionen-Konzentration.

Es werden jeweils 5 g Substanz in einem kleinen Schliffkölbchen mit 25 ccm Säure versetzt und unter Rückfluß gekocht. Es tritt mehr oder weniger schnell Verfärbung der Lösungen ein über gelb nach dunkelbraun; entsprechend schnell oder langsam ist dann auch Huminsäure-Ausscheidung zu beobachten. Nach bestimmten Zeiten (s. Tabelle 2) wird unterbrochen, die gebildete Huminsäure durch Absaugen entfernt und das Filtrat weiter gekocht, wobei erneute Substanz-Ausscheidung zu beobachten ist. Im Gegensatz zu den Drei-Kohlenstoff-Systemen gehen die Hexosen in physiologischem  $\text{pH}$ -Bereich nur in sehr mäßigem Umfange (in gleichen Zeiten) in Huminsäuren über.

Tabelle 2.

Säure u. Konzentrat.	Dioxy-aceton		Glucose		Fructose		Galaktose	
	24	120	24	120	48	120	48	120
	Std.	Std.	Std.	Std.	Std.	Std.	Std.	Std.
$n/1$ -Schwefelsäure .....	18%	26%	—	12%	24%	25%	2.8%	9%
$n/10$ -Schwefelsäure .....	10%	23%	—	1.1%	15%	27%	—	0.6%
$n/20$ -Schwefelsäure .....	10%	26%	—	0.5%	13%	30%	—	0.4%
$p_h = 3.8$ (Acetat-Puffer) .....	9%	20%	—	1.7%	1.1%	7%	—	1.2%
$p_h = 6$ (Phosphat-Puffer) .....	11%	30%	—	0.4%	—	2.4%	—	0.1%

## 7) „Lignin-Bestimmung“ mit Methyl-glyoxal.

Von Hilpert<sup>11)</sup> ist darauf hingewiesen worden, daß bei der üblichen Lignin-Bestimmung dadurch Fehler entstehen können, daß unter den hierbei gebräuchlichen Bedingungen der im allgemeinen als Lignin angesehene Rückstand außerdem auch Huminsäuren enthält, wenn das Ausgangsmaterial nicht frei von Hexosen oder Pentosen war. Bei Vornahme einer Lignin-Bestimmung mit reiner Glucose erhielt er 0.9% Huminsäure. Wir führten deshalb auch mit Methyl-glyoxal eine „Lignin-Bestimmung“ durch, um zu sehen, ob auch Drei-Kohlenstoff-Systeme, wenn sie in einer Substanz vorhanden sind, deren Lignin-Gehalt durch Huminsäure-Bildung höher vertauschen, als er tatsächlich ist. Es wurden hierzu 3 g festes, gepulvertes Methyl-glyoxal mit 150 ccm 72-proz. Schwefelsäure versetzt und in einer Stöpselflasche 48 Stdn. bei 15–20° aufbewahrt. Dann wurde mit 1500 ccm Wasser verdünnt, kurz aufgeköcht und filtriert. Es konnten 120 mg Huminsäure (d. s. 4% d. Th.) isoliert werden, womit sich die eingangs ausgesprochene Vermutung bestätigt.

### 359. Richard Kuhn und Hermann Rudy: 6.7-Dimethyl- und 1.3.6.7-Tetramethyl-alloxazin.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]  
(Eingegangen am 1. Oktober 1934.)

Seit 1 Jahr sind in unserem Institut verschiedene Umwandlungen des Lacto-flavins beobachtet worden, bei denen Verbindungen auftreten, die offenbar der Alloxazin-Reihe angehören. Ihre nähere Untersuchung wurde zunächst zurückgestellt, da es vorerst diejenigen Abbauprodukte aufzuklären galt, die spektroskopisch und in der Harnstoff-Bildung bei der alkalischen Hydrolyse<sup>1)</sup> mit dem Lacto-flavin übereinstimmen, die also noch Flavine darstellen. Nachdem dieses Ziel durch die Konstitutions-Aufklärung und Synthese des Lumi-lactoflavins erreicht ist<sup>2)</sup>, bietet die Aufklärung der anderen Wege des Abbaues keine sonderlichen Schwierigkeiten mehr. Die wichtigsten Umwandlungen des Lacto-flavins, bei denen alloxazin-artigen Verbindungen begegnet wurde, sind: 1) Die Abspaltung der zucker-ähnlichen Seitenkette mit Hilfe von Bleitetraacetat<sup>3)</sup> (Perjodsäure), 2) Die Spaltung

<sup>1)</sup> O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Ztschr. **258**, 496, **263**, 228 [1933]; R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1577 [1933].

<sup>2)</sup> R. Kuhn, K. Reinemund u. F. Weygand, B. **67**, 1460 [1934].

<sup>3)</sup> R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1950 [1933].