

## 127. A. K u s i n: Über die katalytische Wirkung von Monosen auf die Formaldehyd-Kondensation.

[Aus d. Laborat. für organ. Chemie am I. Moskauer Medizin. Institut.].

(Eingegangen am 15. Februar 1935.)

H. Schmalfuß<sup>1)</sup>, der die Zucker-Synthese aus Formaldehyd unter der Einwirkung von Magnesiumoxyd bei 120° untersucht hat, beobachtete, daß die Reaktion beim Zusatz von Glucose oder Fructose eine merkliche Beschleunigung erfährt.

Die Annahme, daß Monosen eine analoge Rolle bei der Zucker-Synthese aus Formaldehyd in den grünen Blättern der Pflanzen<sup>2)</sup> spielen, veranlaßte mich, die katalytische Wirkung der Zucker auf die Formaldehyd-Kondensation in Gegenwart von Alkalien näher zu untersuchen. Da sich Alkalien mit den Zuckern leicht unter Saccharat-Bildung vereinigen, lag die Annahme nahe, daß es gerade die Saccharate sind, die in der erwähnten Reaktion den katalytischen Einfluß ausüben. Zur Bestätigung dieser Anschauung bereitete ich reines krystallinisches Calcium-fructosat und untersuchte seine Wirkung auf die Kondensation des Formaldehyds. Die Versuche ergaben, daß eine 4-proz. Formaldehyd-Lösung bei der Temperatur der biochemischen Reaktionen (35—40°) in Gegenwart von Calcium-fructosat in 1—3 Stdn. völlig kondensiert wird, während eine äquivalente Menge Calciumhydroxyd unter denselben Bedingungen in 5 Stdn. keine merkliche Kondensation hervorruft. Eine analoge Beschleunigung wurde beobachtet, wenn Fructose und Calciumhydroxyd oder Bleihydroxyd hinzugefügt wurden.

Im weiteren Verlauf meiner Arbeit versuchte ich klarzulegen, welche Fructose-Gruppierungen auf die Formaldehyd-Kondensation beschleunigend wirken. Theoretisch kommen folgende Gruppierungen in Betracht: 1) die eines mehratomigen Alkohols, 2) die der cyclischen Form mit Halb-acetal-Hydroxyl, 3) die der Enol-Form, 4) der Keto-Gruppe und 5) der in alkalischem Milieu sich bildenden Aldehyd-Gruppe. Die Einwirkung der Hydrat-Form ist nicht anzunehmen, da der Formaldehyd in verdünnten Lösungen selbst in Hydrat-Form enthalten ist.

Zur experimentellen Prüfung der ausgesprochenen Möglichkeiten habe ich die Wirkung folgender Substanzen auf die Formaldehyd-Kondensation untersucht: Mannit, Glycerin, Saccharose, Glykolaldehyd, Glucose, Maltose, Aceton, Acetessigester, Pentaacetyl-fructose.

Das Fehlen einer katalytischen Wirkung beim Glycerin und Mannit<sup>3)</sup> spricht dagegen, daß die Gruppierung eines mehratomigen Alkohols die Reaktion bewirkt. Das Fehlen einer Reaktions-Beschleunigung beim Zusatz von Saccharose, sowie die katalytische Aktivität des Glykolaldehyds schließen die Möglichkeit aus, daß cyclische Formen (Amylen- und Butylen-oxyde) oder ein Halbacetal-Hydroxyl an der Reaktion teilhaben. Die nahezu gleich-

<sup>1)</sup> Biochem. Ztschr. **185**, 70 [1927].

<sup>2)</sup> A. Bauer, B. **3**, 67 [1870]; Willstätter u. Stoll, Untersuchungen über Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918; Sabalitschka, Biochem. Ztschr. **144**, 545 [1924], **145**, 373 [1924], **148**, 370 [1924].

<sup>3)</sup> Die erhaltenen Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zu den Arbeiten von G. Gorr u. Wagner (Biochem. Ztschr. **262**, 351 [1933]), da sich die von diesen Autoren beobachtete Beschleunigung auf das Arbeiten in Glycerin als Lösungsmittel bezog, während ich die Wirkung geringer Mengen (1%) untersuchte.

starke katalytische Aktivität der Fructose, Glucose, Maltose und des Glykolaldehyds berechtigt uns nicht, die Aktivität der freien Aldehyd- oder Keto-Gruppe zuzuschreiben, macht aber die Annahme, daß die ihnen allen gemeinsame Enol-Gruppierung mit zwei Hydroxylen die katalytische Aktivität besitzt, sehr wahrscheinlich. In den Fällen, wo die Bildung der Enol-Gruppierung erschwert ist (Pentaacetyl-fructose, Saccharose), wird keine katalytische Wirkung beobachtet.

Die Enolisierung der Fructose oder Glucose wird durch eine bestimmte Hydroxyl-Ionen-Konzentration, sowie durch die Saccharat-Bildung begünstigt, hierauf beschränkt sich anscheinend die Wirkung der Hydroxyde zweiwertiger Metalle. Die von mir durchgeführten Versuche über die Formaldehyd-Kondensation in Gegenwart von Fructose bei verschiedenem  $P_H$  (Gemische von  $K_2HPO_4$  und KOH) zeigten, daß bei Abwesenheit zweiwertiger Metalle nur bei  $P_H < 12$  keine Kondensation stattfindet. Bei  $P_H = 12$  verlief die Reaktion langsam; bei  $P_H = 12.6$  war die Beschleunigung analog der beim Arbeiten mit  $Pb(OH)_2$  ( $P_{H[Pb(OH)_2]} = 9.7$ ), bei  $P_H = 14.9$  analog der beim Arbeiten mit Calciumhydroxyd ( $P_{H[Ca(OH)_2]} = 13.9$ ) beobachteten.

Die Beobachtungen bezüglich der katalytischen Wirkung von Calcium-fructosat lassen vermuten, daß aus Calcium-fructosat und Formaldehyd unbeständige intermediäre Verbindungen gebildet werden, wofür folgende Tatsache spricht: Calcium-fructosat, das bei 0° in 50-proz. Methylalkohol schwer löslich ist, geht auf Zusatz von Formaldehyd in Lösung (um der Annahme entgegenzutreten, daß dabei dem Calcium-fructosat  $Ca(OH)_2$  entzogen wird und salzartige Calcium-Formaldehyd-Verbindungen entstehen, wodurch die Lösung zustandekommt, wurde der Formaldehyd schon vor dem Zusatz mit Calciumhydroxyd gesättigt). Bei Zusatz von 16-proz. Formaldehyd waren ungefähr 12 Gramm-Moleküle Formaldehyd nötig, um 1 Mol Calcium-fructosat in Lösung zu bringen, während bei Verwendung von 2.5-proz. Formaldehyd schon 6 genügten; diese Tatsache deutet darauf hin, daß die in verdünnter Lösung vorwiegend enthaltene monomere Form des Aldehyds mit dem Calcium-fructosat eine Verbindung bildet. Um die Bildung intermediärer Verbindungen zu beweisen, bestimmte ich die Gefrierpunkts-Erniedrigung von Formaldehyd- und Calcium-fructosat-Lösungen, sowie von Lösungen, die beide Substanzen enthielten. Wird eine Verbindung gebildet, so darf die Depression der letzteren nicht additiv vergrößert werden, was der Versuch bestätigte.

Auf Grund der vorliegenden Arbeit kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß auch in den grünen Blättern der Pflanzen der den Übergang des Formaldehyds in Zucker beschleunigende Katalysator eine Monose in ihrer aktiven Enol-Form ist; während aber der Übergang in die Enol-Form in vitro durch die Vereinigung der Monose mit den Hydroxyden zweiwertiger Metalle beschleunigt wird, kommt die Enolisierung in vivo anscheinend auf anderen Wegen zustande.

### Beschreibung der Versuche.

I. Untersuchung der katalytischen Wirkung verschiedener Zucker auf die Geschwindigkeit der Formaldehyd-Kondensation. Die Versuche wurden mit 4-proz. Lösungen von Formaldehyd in Wasser

oder in 40-proz. Methylalkohol<sup>4)</sup> ausgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde durch Bestimmung der Abnahme des Formaldehyds verfolgt, wozu 5 ccm des Reaktionsgemisches mit  $n/_{10}$ -Salzsäure<sup>5)</sup> unter Benutzung von Methylorange neutralisiert wurden. Die neutrale Lösung wurde dann mit 10 ccm 0.4-n. Ammoniak-Lösung versetzt und das überschüssige Ammoniak nach 10 Min. mit Säure zurücktitriert. Die Versuchs-Ergebnisse sind aus der Tabelle zu ersehen.

Versuchs-Nr.	Temperatur	Katalysator	Seine Menge in %	Metallhydroxyd	Seine Menge in %	Menge Formaldehyd in % nach						
						0	0.5	1	2	3	4	5 Stdn.
1	40°	Calciumfructosat (frisch bereitet)	2	—	—	100	60	0	—	—	—	—
	40°	Fructose	1	Ca(OH) <sub>2</sub>	1	100	55	0	—	—	—	—
2	35°	Fructose	0.5	„	0.5	100	—	60	10	0	—	—
	35°	Saccharose	0.5	„	0.5	100	—	100	100	100	95	90
	35°	Maltose	0.5	„	0.5	100	—	87	48	0	—	—
	35°	Mannit	0.5	„	0.5	100	100	100	100	95	80	71
	35°	Glycerin	0.5	„	0.5	100	—	100	100	95	90	86
	35°	Glucose	0.5	„	0.5	100	—	85	12	0	—	—
3	50°	—	—	Pb(OH) <sub>2</sub>	3.0	100	—	—	100	—	100	100
	50°	Glucose	2	„	3.0	100	—	—	92	—	70	10
	50°	Fructose	2	„	3.0	100	—	—	76	—	60	10
4	60°	—	—	„	1 g	100	—	100	100	100	100	100
	60°	Glucose	2	„	1 g	100	—	100	100	94	88	36
	60°	Fructose	2	„	1 g	100	—	100	100	67	40	0
	60°	Mannit	2	„	1 g	100	—	100	100	100	100	94
	60°	Saccharose	2	„	1 g	100	—	100	100	100	100	94
5	60°	Fructose	2 g	„	2 g	100	—	80	52	18	0	—
	60°	Aceton	5 g	„	2 g	100	—	100	100	80	64	85
	60°	Glykonaldehyd	2 g	„	2 g	100	—	100	82	52	30	0
6	60°	—	—	„	2 g	100	100	100	100	100	100	100
	60°	Aceton	2	„	2 g	85	85	80	85	95	100	100
	60°	Acetessigester	2	„	2 g	85	70	65	70	80	95	100
	60°	Fructose	1	„	2 g	100	80	75	55	15	0	—
7	35°	Calciumfructosat	0.5	—	—	100	100	95	18	0	—	—
	35°	Pentaacetylfructose	0.5	Ca(OH) <sub>2</sub>	0.5	100	85	90	100	100	—	—
8	35°	Mannit in Stickstoff-Atm.	0.5	„	0.5	100	100	100	100	100	90	80

Um die entstandenen Zucker zu isolieren, wurde ein Versuch im großen angestellt: 100 ccm Wasser, das 2 g Fructose und 5 g Calciumoxyd enthielt,

<sup>4)</sup> 40-proz. Methylalkohol wurde beim Arbeiten mit Ca(OH)<sub>2</sub> verwendet, wobei eine Dismutations-Reaktion kaum stattfand; vergl. G. Gorr u. J. Wagner, Biochem. Ztschr. **262**, 351 [1933].

<sup>5)</sup> Wie die Titration mit Säure zeigte, findet unter den Versuchs-Bedingungen kaum eine Dismutation des Formaldehyds statt.

und 100 ccm Methylalkohol wurden bei 37° unter energischem Rühren während 4 Stdn. mit 400 ccm Formaldehyd-Lösung (80 g Formaldehyd, gelöst in 50-proz. Methylalkohol) versetzt. Nachdem die ganze angegebene Menge der Formaldehyd-Lösung zugefügt worden war, wurde mit Oxalsäure neutralisiert und filtriert. Die klare Lösung wurde im Vakuum im Kohlendioxyd-Strom konzentriert, wobei 65 g einer durchsichtigen, süß schmeckenden, caramel-artigen Masse zurückblieben. Die Untersuchung des erhaltenen Zuckers wird fortgesetzt.

II. Untersuchung der katalytischen Aktivität des zugefügten Zuckers. Die Versuchs-Bedingungen waren die gleichen, wie in der ersten Versuchs-Serie; variiert wurde die Menge des zugesetzten Zuckers in Gegenwart von  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Temperatur	Menge der zugefügten Fructose	Zeit des Verschwindens von Formaldehyd
60°	7.2	10 Min.
	3.6	10 „
	1.0	10 „
	0.2	13 „
	0.02	22 „
	0.001	26 „
50°	7.2	23 „
	1.0	27 „
	0.02	33 „
	0.002	38 „
	0.0002	90 „
60°	keine (Kontrollversuch)	196 „
50°	keine (Kontrollversuch)	Nach 5 Stdn. war immer noch Formaldehyd vorhanden

III. Untersuchung der Formaldehyd-Kondensation bei verschiedenem  $\text{P}_H$ . Die Versuche wurden analog denen der ersten Serie ange stellt, nur wurde das Hydroxyd eines bivalenten Metalls durch Puffergemische ersetzt, die verschiedene Mengen einer 10-proz.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , einer 10-proz.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und einer 10-proz.  $\text{KOH}$ -Lösung enthielten.

Die Wasserstoff-Ionen-Konzentration in dem Reaktions-Milieu wurde elektrometrisch mittels einer Wasserstoff-Elektrode bestimmt. Die Reaktion wurde bei 50° in Gegenwart von 1% Fructose durchgeführt. Ohne Fructose-Zusatz fand keine Kondensation statt (Kontrollversuche) (s. Tabelle auf S. 623).

IV. Bestimmung der Löslichkeit von Calcium-fructosat in Gegenwart von Formaldehyd. Das Calcium-fructosat wurde dargestellt durch Versetzen einer Lösung reiner Fructose mit der äquivalenten Menge einer Calciumhydroxyd-Suspension (chem. rein), wobei das Calciumhydroxyd in Lösung ging. Es wurde rasch filtriert und abgekühlt; das krystallinisch abgesetzte Calcium-fructosat wurde abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen, im Vakuum-Exsiccator getrocknet und kurz vor den Versuchen gepulvert.

$\frac{p. \text{KH}_2\text{PO}_4}{p. \text{K}_2\text{HPO}_4}$	pH	Menge Formaldehyd (in %), der im Laufe von 4 Stdn. dismutiert wird	Vorhandene Menge Formaldehyd (in %) nach Stdn.				Qualitativer Nachweis durch Reduktion von Fehling'scher Lösung bei 20° 6)
			1	2	3	4	
$\frac{2}{18}$	7.8	0	100	100	100	100	keine Reduktion
$\frac{1}{19}$							
$\frac{0}{20}$							
$\frac{20}{18}$	8.0	3	100	100	100	96	„ „
$\frac{1}{19}$							
$\frac{0}{20}$							
$\frac{20}{18}$	9.2	5	100	100	100	93	„ „
$\frac{1}{19}$							
$\frac{0}{20}$							
$\frac{p. \text{K}_2\text{HPO}_4}{p. \text{KOH}}$							
$\frac{18}{2}$	12.1	13	100	98	90	80	schwache „
$\frac{16}{4}$							
$\frac{14}{6}$							
$\frac{12}{8}$	13.1	20	75	20	0	—	intensive „
$\frac{10}{10}$							
$\frac{8}{10}$							
$\frac{10}{10}$	14.4	25	50	0	—	—	„ „
$\frac{10}{10}$							
$\frac{8}{10}$							
$\frac{10}{10}$	14.8	26	35	0	—	—	„ „
$\frac{10}{10}$							
$\frac{8}{10}$							
$\frac{10}{10}$	15.0	28	0	—	—	—	„ „
$\frac{10}{10}$							
$\frac{8}{10}$							

starke Bräunung

In eine Reihe im Thermostaten bei 10° stehender Kölbchen mit je 10 ccm 50-proz. Methylalkohol wurden gleiche Mengen (je 3 g) Calcium-fructosat eingetragen und nach 10 Min. langem Schütteln mit je 10 ccm mit Calciumhydroxyd gesättigten Formaldehyd-Lösungen verschiedener Konzentration versetzt. Der Formaldehyd-Gehalt wurde jodometrisch bestimmt. Im Kontrollversuch wurde die gleiche Menge Wasser hinzugefügt. Nach 30 Min. langem Schütteln wurden alle Proben filtriert (die Menge Calcium-fructosat war so bemessen, daß nirgends völlige Lösung eintrat), und im Filtrat die Calcium-Menge bestimmt. Durch Subtraktion von der im Kontrollversuch gefundenen Menge wurden Werte erhalten, die die Löslichkeit des Calcium-fructosats in Gegenwart von Formaldehyd charakterisieren.

I. Versuch. Zusatz von 16-proz. Formaldehyd-Lösung.

0.0220 Mol Formaldehyd lösen 0.0017 Mol Fructosat  
 0.0275 „ „ „ 0.0023 „ „

Die Umrechnung auf 1 Mol Calcium-fructosat ergibt bei der ersten Bestimmung 12, bei der zweiten 11 Mole Formaldehyd.

6) Fructose, wie auch Fructose + Formaldehyd, geben bei 20° erst nach 20—30 Min. eine merkliche Reduktion. Dagegen reduzieren die entstehenden Kondensationsprodukte (Glykolaldehyd, Triosen) bereits nach wenigen Sekunden. Hier wird der nach 2 Min. vorliegende Effekt verzeichnet.

## II. Versuch. Zusatz von 2.5-proz. Formaldehyd-Lösung.

0.0021 Mol Formaldehyd lösen	0.00032 Mol Fructosat
0.0042 „ „ „	0.00059 „ „
0.0063 „ „ „	0.00091 „ „

Die Umrechnung auf 1 Mol Calcium-fructosat ergibt bei den drei Bestimmungen 6.5, 7.0, 6.9 Mole Formaldehyd.

V. Bestimmung der Gefrierpunkts-Erniedrigung von Calcium-fructosat- und Formaldehyd-Lösungen. Unter Benutzung eines gewöhnlichen Apparates für kryoskopische Bestimmungen und eines Beckmannschen Thermometers wurden die Gefriertemperaturen bestimmt für: 1) reines Wasser, 2) formaldehyd-haltiges Wasser (0.4 -mol. Lösung), 3) mit Calcium-fructosat gesättigtes Wasser, 4) Wasser, das Formaldehyd (0.4 Mol) und Calcium-fructosat enthielt.

Die Menge des in Lösung gegangenen Calcium-fructosats ergab sich aus dem Calcium-Gehalt der Lösung.

Versuchs-Nr.	Volumen der Lösung	Menge Formaldehyd in Mol	Menge Calcium-fructosat in Mol	t°	$\Delta$	
1	20	0	0	3.485	0.340	
	20	0.00364	0	3.145		
	20	0	0.00027	3.423		
				Summe		0.402
	20	0.00364	0.00043	3.145		0.340
2	50	0	0	3.503	0.768	
	50	0.020	0	2.735		
	50	0	0.0029	3.230		
				Summe		1.041
	50	0.020	0.0048	2.725		0.778

Zum Schluß fühle ich mich verpflichtet, Hrn. Professor A. W. Stepanow, in dessen Laboratorium die vorliegende Arbeit ausgeführt worden ist, für seine aufmerksame und innige Anteilnahme an der Arbeit, für zahlreiche wertvolle Ratschläge und für seine ständige Bereitwilligkeit, seine Erfahrung und sein reiches Wissen zur Verfügung zu stellen, meine tiefe Anerkennung und meinen Dank auszusprechen.

Moskau, 2. Februar 1935.