

## 47. August Wilhelm Sohn: Über Reduktinsäure als Bestandteil der sauren Hydrolysate des Holzes.

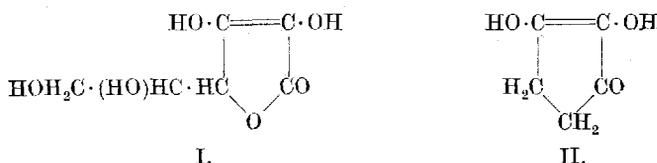
[Aus dem Forschungslaboratorium der Zellstoff-Fabrik Waldhof, Mannheim.]

(Eingegangen am 20. Januar 1949.)

Bei Versuchen, in sauren Holzhydrolysaten Ascorbinsäure nachzuweisen, wurde die Reduktinsäure gefunden. Bei Vergleichen zwischen dem Pentosan- bzw. Uronsäuregehalt verschiedener Holz- und Pflanzenmaterialien und der aus ihnen gewinnbaren Reduktinsäuremenge wird kein genügender Zusammenhang gefunden.

Wenn man Holz mit Wasser unter Druck erhitzt, werden bestimmte Anteile herausgelöst bzw. hydrolytisch abgespalten, deren Menge von den Bedingungen der Druckkochung abhängig ist. Es handelt sich neben geringen Mengen aromatischer Stoffe, Essigsäure und Furfurol in der Hauptsache um Kohlenhydrate. Davon liegen wiederum gewisse Anteile als monomere Zucker, andere als Polyosen oder auch als Zucker-Lignin-Verbindungen vor<sup>1)</sup>.

Wir beobachteten nun, daß frische Extrakte, die durch Behandeln mit Wasser bei Temperaturen von 100 bis 150° unter Druck aus Holz erhalten waren, eine stärkere Reduktionswirkung zeigten, als nach Anwesenheit der normal reduzierenden Zucker zu erwarten war. 2,6-Dichlor-phenol-indophenol (Tillmans-Reagens, im folgenden bezeichnet mit TR) wurde in geringer Menge entfärbt. Schon nach 24 Stdn. war jedoch die Reaktion meist ganz verschwunden. Auch Jod wird in saurer Lösung reduziert. Solches Verhalten zeigen Endiol-Verbindungen wie z. B. die *l*-Ascorbinsäure. Da wir in wäßrigen Kiefernhydrolysaten eine Zuckercarbonsäure nachgewiesen hatten, der wir die Konstitution einer 2-Keto-hexonsäure als wahrscheinlich zuschreiben konnten<sup>2)</sup>, war es denkbar, daß in den Holzextrakten auch deren Umwandlungsprodukt, also eine Ascorbinsäure (I), enthalten war<sup>2)</sup>. Andererseits mußten wir auch mit der Anwesenheit von Reduktinsäure (II) rechnen; denn Holzsubstanz enthält in geringer Menge Uronsäuren, und aus uronsäurehaltigen Naturstoffen, wie z. B. Pektin, wurde Reduktinsäure gewonnen<sup>3)</sup>. T. Reichstein und R. Oppenauer haben auch die Bildung von Reduktinsäure aus Xylose in geringer Ausbeute nachgewiesen. Unsere Aufgabe war zu entscheiden, um welche stark reduzierende Substanz es sich hier handelte.



### I.) Die analytische Erfassung der Stoffe im Holzhydrolysat.

Erhitzt man den frischen wäßrigen Holzextrakt mit etwas Mineral- oder Oxalsäure, um noch vorhandene Oligosaccharide zu hydrolysieren (Nachhydro-

<sup>1)</sup> A. W. Sohn u. P. O. Lenel, „Über die Reaktionsprodukte einer schonenden partiellen Holzhydrolyse“, Das Papier, im Druck; vergl. a. W. Overbeck u. H. F. Müller, B. 75, 547 [1942]. <sup>2)</sup> T. Reichstein u. A. Grübner, Helv. chim. Acta 17, 311 [1934].

<sup>3)</sup> T. Reichstein u. R. Oppenauer, Helv. chim. Acta 16, 988 [1933].

lyse), so steigt nicht nur der Reduktionswert der Lösung durch Zerfall der polymeren Zucker im ganzen, sondern auch die Reduktionskraft gegenüber TR nimmt um ein Vielfaches zu (Tafel 1).

Tafel 1. Zuckergehalt und TR-Werte eines wäßrigen Fichtenextraktes in Abhängigkeit von der Dauer der Nachhydrolyse mit Oxalsäure.

Stdn.	Reduktionswert g/l Glucose	ccm TR für 10 ccm Extrakt
0	10.6	0.8
1	14.4	1.4
2	20.1	2.3
3	26.8	2.9
4	28.8	3.7
5	28.8	4.3
6	28.8	5.3
7	28.8	5.9
8	28.8	6.0
9	28.8	6.3
nach 15 Stdn. nochmals 6 Stdn. weitergekocht*)		
desgl.	28.8	7.3
desgl.	28.8	8.5
desgl.	28.8	11.2

\*) Nach dem Stehen über Nacht war zunächst immer ein gewisser Rückgang der TR-Werte zu beobachten (s. u.).

Weiterhin fällten wir aus dem bei 40° i. Vak. eingeeigneten Extrakt mittels Alkohols den polymeren Anteil der gelösten Stoffe aus, lösten ihn wieder in Wasser und untersuchten mit TR; die Reaktion war negativ. Auch die mit Oxalsäure nachhydrolysierte Lösung dieser Fällung ergab keine positive TR-Reaktion.

Wir erkennen aus diesen Versuchen, daß es sich hier um kein einfaches Herauslösen eines in den extrahierten polymeren Holzbestandteilen vorhandenen Stoffes handelte, sondern um eine Neubildung und zwar aus Stoffen, die im Extrakt bereits monomer gelöst vorlagen. Die Grundverbindung muß zu den am leichtesten hydrolysierbaren Holzbestandteilen gehören. Durch Säurebehandlung in der Hitze tritt die Umwandlung zum Endiol ein. Auch Mineralsäuren sind hier wirksam, jedoch mit geringerer Ausbeute, was wir auf nebenhergehende Zuckerzersetzung zurückführen. Wir nehmen also zwei Stufen der Reaktion an: 1.) das Herauslösen der Grundverbindung aus dem Holz durch Hydrolyse und 2.) die Enolisierung im Hydrolysat. Dabei können die Grundverbindung und die Ketoform des reduzierenden Stoffes identisch sein.

Weitere Beobachtungen zeigten die Ähnlichkeit unserer reduzierenden Verbindung mit der Ascorbinsäure: ein frisch hydrolysiertes Extrakt hatte nach 24 Stdn.  $\frac{1}{6}$  seiner Reduktionskraft gegenüber TR verloren. Reine wäßrige Ascorbinsäure-Lösung verliert ihre Wirksamkeit noch erheblich rascher (Tafel 2).

Es ist bekannt<sup>4)</sup>, daß sich das Vitamin C in verschiedenen Pflanzensäften mit verschiedener Geschwindigkeit oxydiert und damit unwirksam wird.

<sup>4)</sup> J. Tillmans u. Mitarb.; Ztschr. Untersuch. Lebensmittel **56**, 272 [1928]; **54**, 33 [1927].

Kenny<sup>5)</sup> spricht von oxydationshemmenden Antikatalysatoren in der Pflanze. Nach den Ergebnissen der Tafel 2 scheinen im Extrakt oxydationshemmende

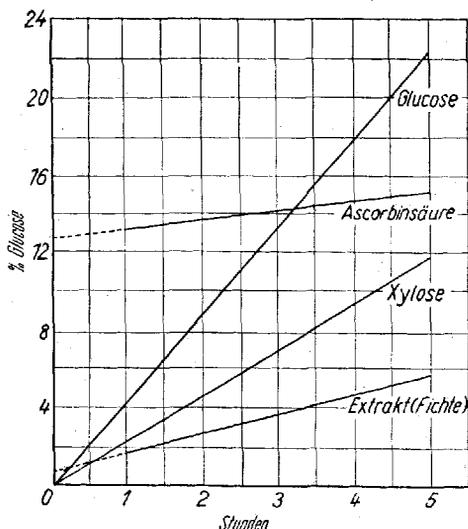
Tafel 2. Abnahme der Reduktionskraft gegen TR beim Stehen des Extraktes im Vergleich zu einer reinen 0.02-proz. Ascorbinsäure-Lösung.

nach Tagen	Extrakt ccm TR/10 ccm	Ascorbinsäure-Lösung ccm TR/10 ccm
0	6.5	10.1
1	5.4	2.5
3	3.4	0
4	3.0	
7	1.2	
9	0.8	
10	0.7	
13	0.5	

Stoffe vorhanden zu sein, während die reine wäßrige Vitamin-Lösung einer ungehinderten Oxydation unterliegt; das gleiche gilt für Reduktinsäure.

Daß es sich um eine Oxydation durch Luftsauerstoff handelt, zeigt ein weiterer Versuch: ein frisch hydrolysiertes Extrakt mit einem TR-Wert von 6.5 ccm wurde unter Stickstoff aufgekocht, unter Einleiten von Stickstoff in eine Druckflasche gefüllt, darin auf 0° abgekühlt und die Flasche verschlossen. Der Extrakt zeigte nach 6 Tagen den unveränderten TR-Wert.

Macht man reine Ascorbinsäure-Lösung mit Natriumcarbonat alkalisch und säuert nach einer gewissen Zeit wieder an, so ist die Reduktionswirkung gegenüber TR negativ. Ebenso verhält sich der Holzextrakt, wobei es gleichgültig ist, ob er nachhydrolysiert ist oder nicht. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Endiol-Gruppe der Ascorbinsäure im alkalischen Medium einer beschleunigten Oxydation unterliegt<sup>6)</sup>.



Abbild. 1. Fehling-Reaktion als Funktion der Zeit bei Hydrolysenextrakt (Fichte), Glucose, Xylose und *l*-Ascorbinsäure für gleiche Zuckerkonzentration (als Glucosewert in % des Gesamtglucosewertes angegeben), bei 20°.

Endiolverbindungen reagieren mit Fehlingscher Lösung bereits in der Kälte. Um diese Reaktion bei der geringen Konzentration an Endiol in den Extrakten deutlich zu machen, untersuchten wir die Reduktion der ammoniakalischen Kupfer-Lösung durch unseren Extrakt als Funktion der Zeit bei 20° und verglichen die erhaltenen Werte mit denen gleichkonzentrierter Lösungen von reiner Glucose, Xylose und *l*-Ascorbinsäure (Abbild. 1).

Es werden Geraden erhalten, von denen 2 (Glucose und Xylose), wenn man sie nach der Zeit extrapoliert, durch den 0-Punkt der Ordinate gehen, während die beiden anderen (Ascorbinsäure und Extrakt) nicht durch den Nullpunkt verlaufen. Der Anstieg der Geraden ist, abgesehen von der Konzentration, abhängig von der Art der

<sup>5)</sup> Vergl. hierzu G. Kleins Handb. d. Pflanzenanalyse, Bd. IV/2, III, S. 1081.

<sup>6)</sup> A. Szent-Györgyi, Biochem. Journ. 27, 279 [1933].

Verbindung bzw. des Zuckergemisches im Extrakt. Die Reduktionswerte der normal reduzierenden Zucker-Lösungen steigen von der Zeit 0 an stetig an, die endiolhaltigen Lösungen innerhalb der ersten Stunde stärker als im weiteren Verlauf. Die gestrichelten Verlängerungen der Kurve nach dem Zeitwert 0 sind also für die Ascorbinsäure-Lösung und den Extrakt nicht real.

Der Extrakt müßte nun, wenn man ihn, wie oben geschildert, etwa durch Natriumcarbonat alkalisch macht und seine Endiolverbindung durch Einleiten von Luft oxydiert, ein normales Verhalten gegen Fehlingsche Lösung zeigen. Dies ist der Fall; das Ergebnis einer solchen Oxydation zeigt die Abbild. 2.

Wir erhielten zwei parallele Geraden, deren obere bei der Extrapolation auf den Zeitwert 0 einen gewissen Anteil an Endiol zeigt, deren untere dagegen entsprechend ihrer negativen Reaktion durch den 0-Punkt der Ordinate verläuft. In diesem Falle enthält also der Extrakt nur normal reduzierende Zucker; die Endiolwirkung ist aufgehoben. Die Differenz der Parallelen, die hier 1.4% des Gesamt-Glucosewertes ausmacht, entspricht der Reduktionsstärke der vorhandenen Endiolverbindung gegenüber Fehlingscher Lösung bei 20°.

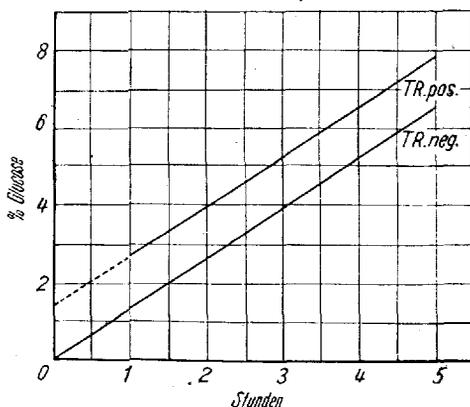
Der Reduktionswert der beiden Lösungen (Fehling, normal bei 100°) ist derselbe. Der durch das Endiol bedingte Unterschied der Reduktionskraft tritt hier durch den Unterschied der Reduktionsgeschwindigkeit in Erscheinung.

## II.) Anreicherung der Substanz im Buchenextrakt, ihre Isolierung und Identifizierung.

Die Tatsache, daß der Extrakt unter den Bedingungen der Nachhydrolyse, vornehmlich mit Oxalsäure, eine Anreicherung der TR-wirksamen Substanz erfährt, legte es nahe, die Extraktion des Holzes selbst statt mit Wasser mit Oxalsäure-Lösung durchzuführen.

Der durch Druckkochung bei 120° gewonnene oxalsaure Buchenextrakt wurde durch A-Kohle gereinigt. Der Endiolgehalt wurde durch Jod-Titration in schwefelsaurer Lösung kontrolliert. Luftsauerstoff wurde beim Arbeiten möglichst ausgeschlossen. Zur Isolierung der Verbindung wurde die Eigenschaft der Endiole benutzt, Salze zu bilden. Das Bleisalz konnte als Fällung aus der neutralisierten Lösung gewonnen werden. Es wurde dann durch Schwefelwasserstoff zerlegt.

Wir erhielten es aus 3 l Buchenextrakt 380 mg eines kristallisierten farblosen Stoffes, der sich nach Schmelzpunkt, Jodäquivalent und Elementaranalyse als Reduktinsäure,  $C_5H_6O_3$ , erwies. Die Kristalle zeigen sämtliche Endiolreaktionen wie das Vitamin C. Der Geschmack ist ebenfalls der gleiche und erinnert an Citronensäure. Die Oxydationsempfindlichkeit in reiner wäßriger Lösung ist ebenso groß wie bei reiner Ascorbinsäure-Lösung (vergl. Tafel 2). Nach erfolgter Oxydation des Endiols tritt Verfärbung der Lösung in Braunrot ein.



Abbild. 2. Fehling-Reaktion bei 20° von Buchenextrakt vor und nach der Oxydation (Glucosewerte wie oben).

Der Verlust bei der Isolierung der Substanz war sehr hoch. In 3 l Extrakt waren titrimetrisch 3.6 g Reduktinsäure festgestellt worden. Die Bleisalz-fällung enthielt noch 2.75 g. Bei einer Ausbeute von 0.38 g reiner Krystalle waren somit etwa  $\frac{9}{10}$  der Säure verloren gegangen, was jedoch in den Grenzen der Ergebnisse anderer Autoren liegt<sup>7)</sup>.

### III.) Vergleichender Nachweis der Reduktinsäure in Hölzern und verschiedenem Pflanzenmaterial und die Frage der Entstehung der Reduktinsäure.

Die Tafel 3 zeigt den Reduktinsäurenachweis in Extrakten, die in gleicher Weise aus Buchen-, Fichten- und Kiefernholz hergestellt worden waren.

Tafel 3. Reduktinsäurenachweis und Pentosangehalt bei verschiedenen Hölzern.

Holzart	Pentosan- gehalt d. Holzes in %	Durch Hydrolyse gelöster		Reduktinsäure	
		Holzanteil in %	Pentosan- anteil in %	mg %	Verhältnis zu ge- löstem Pentosan
Buche	22.0	35.2	20.2	880	1 : 23.0
Fichte	7.5	26.1	5.3	640	1 : 8.3
Kiefer	6.2	26.0	4.0	560	1 : 7.1

Die Prozentangaben beziehen sich auf das Ausgangsholz. Von dem ursprünglich im Holz nachweisbaren Pentosan werden je nach der Holzart verschiedene Mengen im zurückgewonnenen Restholz nachgewiesen. So gehen bei Buche 92% und bei Fichte 71% in Lösung. Die angewandte Behandlung mit Oxalsäure ist dabei als schonende Partialhydrolyse zu bezeichnen, da sich die Hauptmenge der gelösten Saccharide unzersetzt im Hydrolysat findet.

Eine nochmalige Hydrolyse des Holzurückstandes ergibt nochmals geringe Mengen Reduktinsäure, die bei minimaler Löslichkeit der Holzsubstanz nur noch 10% des Wertes ausmachen.

Reichstein und Oppenauer<sup>3)</sup> hatten festgestellt, daß auch Xylose außer Hexuronsäuren beim Behandeln mit verdünnter Schwefelsäure unter Druck geringe Mengen an Reduktinsäure liefert. Wir mußten deshalb in Betracht ziehen, daß auch unsere Reduktinsäure aus der im Buchenholz vorhandenen Xylose bzw. dem Pentosan entsteht. Diese Annahme hätte vielleicht eine gewisse Berechtigung, da aus dem pentosanreicheren Buchenholz nach Tafel 3 mehr Reduktinsäure entsteht als aus Fichten- und Kiefernholz, wenn auch das Verhältnis zwischen der gebildeten Reduktinsäure und der Pentosanmenge nicht das gleiche ist.

Vergleichende Versuche mit reiner Xylose brachten aber andere Ergebnisse. Wir errechnen auf 1 g Xylose aus Buchenholz 38.3 mg Reduktinsäure, dagegen erhalten wir auf 1 g reine krystallisierte Xylose (Präparat der Bergin-Gesellschaft, aus Holz gewonnen) nur 2.1 mg. Aus 1 g Arabinose erhalten wir entsprechend ebenfalls nur 5 mg Reduktinsäure. Da auf den Pentosananteil des Buchenholzes 18mal soviel Reduktinsäure kommt wie auf die gleiche Menge isolierter reiner Xylose, so kann sie also nicht allein im Pentosan des Holzes ihren Ursprung haben, oder das Pentosan der Hölzer ist nicht einfach

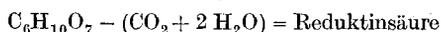
<sup>7)</sup> Vergl. die Darstellung von Vitamin C aus Früchten in G. Kleins Handb. d. Pflanzenanalyse, Bd. IV/2, III, S. 1088.

eine polymere Pentose, sondern im Sinne Hilperts ein in die Holzsubstanz eingebautes Kohlenhydrat, das je nach der Behandlungsart des Holzes in Teilreaktionen Furfurol oder „Lignin“, oder – in Erweiterung der Annahme – Reduktinsäure oder schließlich Xylose liefert<sup>8)</sup>.

Setzt man nach Reichstein und Oppenauer als Verhältnis für die Reaktion Hexuronsäure  $\rightarrow$  Reduktinsäure den Wert 10 : 1 ein<sup>3)</sup>, dann müßten im Buchenholz 8.8 % Uronsäure enthalten sein, ein Wert, der in dieser Höhe bisher nicht angegeben wurde<sup>9)</sup>.

Die Uronsäure-Bestimmung nach Tollens-Lefèvre ergab bei unserem Buchenholz 2.54 % (als Anhydrid ber.) und im Restholz noch 1.40 % (auf Ausgangsholz ber.), so daß 1.14 % gelöst wurden. Auf 1 g gelöste Uronsäure kommen also 770 mg nachweisbare Reduktinsäure; bei Fichtenholz errechnen sich auf 1 g Uronsäure 830 mg. Aus Glucose entsteht nach Reichstein und Oppenauer keine Reduktinsäure.

Die Annahme einer einfachen Reaktion



erscheint unbefriedigend; weil man doch die Pentose als Zwischenprodukt der Reaktion unbedingt annehmen müßte. Wie Reichstein und Oppenauer bereits feststellten, sinkt aber die Ausbeute nach vorheriger Abspaltung des Kohlendioxids auf ein Minimum herab.

Während die Furfurolbildung aus Hexuronsäuren eindeutig zu erklären ist, ist die Entstehungsreaktion der Reduktinsäure im einzelnen recht unklar. Die Bildung der C-C-Brücke z. B. ist schlecht verständlich, wenn auch eine ähnliche Reaktion an Polyoxymethylen beobachtet wurde<sup>10)</sup>. Die Abspaltung der zwei Moleküle Wasser kann nur eine summarische Erklärung der Reaktion bringen, die im einzelnen noch einer Aufklärung bedarf.

Die von uns untersuchte Xylose ergab nach Tollens-Lefèvre ebenfalls einen Uronsäurewert von fast 3% (Verunreinigung?; das Xylosepräparat war aus Buchenholz dargestellt), der wohl für die geringe Reduktinsäure-Bildung verantwortlich gemacht werden könnte. Die Uronsäurebestimmung nach Tollens-Lefèvre gestattet uns aber keine andere Aussage über den Bau des Zuckermoleküls als die, daß eine bestimmte Menge abspaltbarer Carboxygruppen vorhanden ist.

Auch Untersuchungen anderer Pflanzenmaterialien gaben keine befriedigenden Zusammenhänge zwischen Pentosan- bzw. Uronsäuregehalt und der Reduktinsäure-Ausbeute (Tafel 4).

Während eine Parallele zwischen dem Pentosangehalt des Pflanzenmaterials und seinem Reduktinsäure-Wert nicht zu finden ist, stellt man wohl fest, daß in manchen Fällen mit dem Ansteigen der Uronsäure-Werte auch der Reduktinsäure-Wert zunimmt. Trotzdem ist eine allgemeine Abhängigkeit nicht da, wie schon aus dem Vergleich von 1 und 3 oder 9 und 10 (Tafel 4) zu sehen ist. Es hat den Anschein, daß die Grundverbindung, aus der sich die Reduktinsäure bildet, keine „intakte“ Uronsäure darstellt und auch keine „normale“ Pentose, sondern daß es sich um einen ständigen, noch unbekanntem Begleitstoff dieser Verbindungen handelt, vielleicht sogar eine dem Endiol entsprechende Keto-Verbindung selbst. Dafür spricht die zu Beginn dargestellte Umwandlung im Holzextrakt durch Säuren, wie sie auch für die Enolisierung der 2-Keto-hexuronsäure zur Ascorbinsäure typisch ist. Die Reduktinsäure selbst als Bestandteil des Holzes und anderer pflanzlicher Stoffe anzunehmen, ist nicht abwegig; sie könnte beim Aufbau der Gerüstsubstanz die gleiche Rolle übernehmen, die in Blättern und Früchten die L-Ascorbinsäure bei Redox-Vorgängen spielt<sup>11)</sup>.

<sup>8)</sup> R. S. Hilpert u. H. Meybier, B. 71, 1972 [1938].

<sup>9)</sup> Vergl. K. Freudenberg, B. 80, 53 [1947] u. C. G. Schwalbe u. E. Becker, Ztschr. angew. Chem. 32, 229 [1919].

<sup>10)</sup> H. Staudinger, Die hochmolekularen organischen Verbindungen, Springer, Berlin 1932, S. 238; R. Signer, A. 474, 232 [1929].

<sup>11)</sup> Diskussionsbemerkung von G. Hesse anlässlich des Chem. Kolloquiums in Freiburg i. Br. am 7. 7. 1948.

Eine Ascorbinsäure wurde in den Holzextrakten nicht gefunden. Eine Bestätigung für die von uns gefundene nichtaldehydische Zuckercarbonsäure konnte also auf diese Weise nicht erbracht werden.

Tafel 4. Vergleich der Pentosan-, Uronsäure- und Reduktinsäurewerte.

Substanz	Pentosan %	Uronsäure %	durch Hydrolyse gelöster Anteil in %	mg % Reduktin- säure
1 Buchenholz	21	2.5	35.3	750
2 Fichtenholz	7.6	1.2	26.1	560
3 Weizenstroh	24	4.3	38.8	430
4 Espartogras	21.2	5.1	35.8	340
5 Donauschilf	nicht bestimmt	4.5	31.6	360
6 Haferschalen	33	4.6	51.3	320
7 Lupinenmark	12.4	27.4	40.5	5070
8 Hollundermark	13.5	8.4	21.0	1310
9 Apfelpektin	13.6	28.6	61.8	3460
10 Rübenpektin	39.8	30.1	39.8	6040
11 Gummiarabicum	nicht bestimmt	14.2	87.4	1750

Die %-Angaben beziehen sich immer auf das Ausgangsmaterial.

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß im Gegensatz zu Glucuronsäure und Xylose die Reduktinsäure durch die Wuchshefe *Torula utilis* zum biologischen Aufbau nicht verwertet wird. Erst nach erfolgter Oxydation tritt eine geringe Zellvermehrung ein, die wahrscheinlich auf die gebildete 2-Oxo-glutarsäure zurückzuführen ist.

### Beschreibung der Versuche.

#### 1.) Herstellung eines wäßrigen Extraktes und Nachhydrolyse.

1400 g Fichtenhackspäne (8% Wasser-Gehalt) wurden mit 6300 ccm Wasser 2 Stdn. (ohne Ankochzeit) bei 150° im verbleiten Autoklaven erhitzt. 10 ccm des frischen Filtrates verbrauchten 3.4 ccm TR.

Zur Nachhydrolyse wurde der 8 Tage alte Extrakt mit einem TR-Wert von 0.8 verwendet. Die Nachhydrolyse wurde mit 0.75 n Oxalsäure bei 100° unter Rückfluß durchgeführt. Nach der Neutralisation mit Natriumcarbonat erfolgte die Zucker-Bestimmung nach Fehling-Bertrand unter Zugrundelegung einer Eichkurve für Glucose. Die Reduktionswerte sind als Glucose angegeben (Tafel 1).

Die TR-Lösung wurde nach Kleins, Handbuch der Pflanzenanalyse<sup>12)</sup>, hergestellt. Die Titration stärker gefärbter Extrakte erfolgte nach Zusatz von etwas Bleiacetat-Lösung; der weiße Bleioxalat-Niederschlag erleichtert als Kontrast die Erkennung des Farbumschlags. Bei rein wäßr. oder schwefelsauren Extrakten war die Zugabe von etwas Oxalsäure und Fällung als Bleisalz von Vorteil.

#### 2.) Vergleich einer Nachhydrolyse mit Schwefelsäure und Oxalsäure.

Der Fichtenextrakt mit dem TR-Wert 3.4 wurde mit

a) 0.75 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>      b) 0.75 n C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

16 Stdn. unter Rückfluß gekocht, mit Natriumcarbonat auf pH 4 gebracht und auf 2000 ccm aufgefüllt. Der TR-Wert stieg dabei

a) auf 4.4 ccm      b) auf 7.6 ccm.

<sup>12)</sup> Bd. IV/2, III, S. 1082.

### 3.) Trennung der polymeren von den monomeren Kohlenhydraten im Extrakt.

Diese erfolgte durch Zugabe der 9fachen Menge Äthanol, nachdem der Extrakt bei 40° i. Vak. auf  $\frac{1}{10}$  seines Volumens eingedampft war. Dann wurde zentrifugiert, mit Alkohol ausgewaschen und getrocknet. Auf 1 l Extrakt erhielten wir 10,5 g eines grauweißen, wasserlöslichen Pulvers, d. s. 36,5% der gesamten reduzierenden Substanz (28,8 g). Die Fällung kann mit gewisser Annäherung als der polymere Kohlenhydratanteil, das Nichtfällbare dagegen als monomer angesprochen werden.

### 4.) Fehling-Reaktion bei 20°.

Zunächst wurde der Reduktionswert des Extraktes nach Fehling-Bertrand in üblicher Weise bei Siedetemperatur bestimmt; er betrug 13,8 g/l (als Glucose). Die reinen Zucker-Lösungen und die *l*-Ascorbinsäure-Lösungen wurden auf den gleichen Glucosewert eingestellt. Diese Lösungen und der Extrakt wurden ebenso wie auch die Reagenzien auf genau 20,0° gebracht. Zur Bestimmung wurden zu 30 ccm Lösung je 30 ccm Fehling'scher Lösung I und II gegeben und die entsprechenden Zeiten bei 20° stehengelassen. Die Filtration erfolgte rasch durch Glasfilter G 3, die mit einer Schicht Asbestwolle belegt waren. Nach Aufnahme in Eisen(II)-sulfat-Schwefelsäure wurde mit  $\frac{1}{10} n$  KMnO<sub>4</sub> titriert. Der so gefundene Teil-Reduktionswert ist in % des Gesamtglucosewertes der Lösung bzw. des Extraktes angegeben (Abbild. 1)<sup>13)</sup>.

### 5.) Behandlung von Buchenholzextrakt mit Oxalsäure unter den Bedingungen der Nachhydrolyse.

714,3 g atro Buchenholz (Hackschnitzel) wurden mit 5 l dest. Wasser unter Einleiten von Stickstoff aufgekocht und unter Stickstoff in den Autoklaven gefüllt. Dann wurden 250 g kryst. Oxalsäure zugegeben und geschlossen. Die Kochzeit betrug (einschließlich einer Ankochzeit von 2 Stdn.) 12 Stdn. bei 120°. Der Druck im Autoklaven stieg infolge der teilweisen Zersetzung der Oxalsäure unter Bildung von Kohlendioxyd auf über 9 atü; es mußte dreimal abgelassen werden, um den Druck von 9 atü zu halten. Gewonnen wurden 3,9 l eines dunkelbraunen, etwas nach Furfurol riechenden Extraktes. Der Holzrückstand war dunkelbraun und stark angegriffen.

Der Extrakt zeigte eine starke TR-Aktivität; 2 ccm entfärbten 22 ccm TR-Lösung. Für 2 ccm Extrakt wurden 4,2 ccm  $n/100$  Jod verbraucht.

3 l des Extraktes wurden mit 150 g A-Kohle, die vorher mit einer 1-proz. Oxalsäure-Lösung ausgekocht war, unter Einleiten von Stickstoff aufgekocht. Das Filtrat des Extraktes war danach fast farblos. Der TR-Verbrauch hatte gegenüber vorher etwas abgenommen.

2 ccm dieses gereinigten Extraktes verbrauchten 3,6 ccm  $n/100$  Jod.

Bei der nun folgenden Isolierung bedienen wir uns der Verfahren zur Gewinnung von Ascorbinsäure aus Orangen- und Paprikaextrakten von Szent-Györgyi und Mitarb.<sup>14)</sup>. Der Extrakt wurde erneut unter Einleiten von Stickstoff aufgekocht und soviel Bariumacetat-Lösung zugegeben, daß kein Oxalat mehr ausfiel. Nach Abfiltrieren des Bariumoxalats ließen wir unter Stickstoff abkühlen; die TR-Aktivität hatte wieder etwas abgenommen. Nun wurde kaltgesättigte Bleiacetat-Lösung zugegeben und die Lösung mit Ammoniak vorsichtig auf pH 7,5 gebracht. Der von der Fällung abgenutzte Extrakt zeigte keine TR-Aktivität mehr an. Der Niederschlag wurde zuerst mit wenig Wasser, dann mit Aceton gewaschen und möglichst vom Wasser befreit. Im Vak.-Exsiccator wurde er darauf über Schwefelsäure getrocknet und im Achatmörser fein gepulvert. Eine Probe von 100 mg wurde in Wasser aufgeschlämmt und mit einem Überschuß an Oxalsäure-Lösung eine Zeitlang geschüttelt. Es entsteht so weißes Bleioxalat, während das freie Endiol mit Jod titriert werden kann. Die 100 mg des Niederschlages verbrauchten 27,7 ccm  $n/100$  Jod. Es ist aber nicht sicher, ob alles Bleisalz des Endiols umgesetzt war.

Der gesamte gepulverte Niederschlag wurde nun in wasserfreiem Aceton aufgeschlämmt und mit Schwefelwasserstoff begast. Die Mischung blieb über Nacht mit Schwefelwasserstoff gesättigt stehen, damit sich das Bleisalz, das ja nicht einheitlich ist, umsetzen konnte. Das Bleisulfid wurde daraufhin abfiltriert und die klare Acetonlösung i. Vak. ohne Erwärmen eingedampft. Es blieb im Kolben eine dünne Kruste schön ausgebildeter Krystalle zurück. Zur Reinigung wurden sie mit Schwefelkohlenstoff ausgewaschen, nach dem

<sup>13)</sup> Die hier gezeigte Fehling-Reaktion bei 20° könnte vielleicht in manchen Fällen, etwa bei gefärbten Vitamin-C-haltigen Pflanzenauszügen, in denen die TR-Titration Schwierigkeiten macht, von Interesse sein.

<sup>14)</sup> Biochem. Journ. 27, 279 [1933]; 26, 865 [1932].

Filtern mit etwas Aceton aufgenommen, erneut in einer Krystallisierschale eingedampft und zweimal aus Methanol-Dioxan-Gemisch (3:2) umkrystallisiert. Ausb. 0.34 g weiße Krystalle; Schmp. 210° (Zers.). Misch-Schmp. mit reiner *l*-Ascorbinsäure (188°) 164°; Schmp. der Reduktinsäure nach Reichstein und Oppenauer<sup>3)</sup> 213° (korr., Zers.). Jodäquiv.: Ber. 57.0 Gef. 57.6.

$C_5H_6O_3$  (114.1) Ber. C 52.6 H 5.26 Gef. C 52.3 H 5.58.

#### 6.) Reduktinsäure-Nachweis unter optimalen Bedingungen.

2 g des zu untersuchenden Materials (Holzmehl oder zerschnittenes Stroh oder Pektin in Lösung) werden in einer 100 ccm fassenden Bleiflasche mit 30 ccm Wasser und 1.5 g kryst. Oxalsäure zusammengegeben und die Flasche durch einen mit Draht befestigten Gummistopfen verschlossen. Mehrere solcher Flaschen werden in einen zur Wärmeübertragung mit Wasser gefüllten Autoklaven gestellt; dieser wird dann 8 Stdn. (ohne Ankochzeit) auf 125° erhitzt. Vor dem Öffnen muß abgekühlt werden. Nach dem Filtern werden 10 ccm der kalten Lösung mit verd. Schwefelsäure angesäuert und mit *n*/100 Jod titriert; 1 ccm *n*/100 Jod entspricht 0.57 mg Reduktinsäure.

Dieses Verfahren kann bezüglich der Hydrolysenbedingungen als annähernd optimal für die Reduktinsäure-Bildung angesehen werden. Beim Ersatz der Oxalsäure durch andere Säuren (Schwefelsäure, Phosphorsäure, Essigsäure,  $\alpha$ -Oxy-propionsäure) liegen die Werte niedriger.

#### a.) Zuckergehalt nach Fehling im Hydrolysat, ber. als Glucose.

Buche ..... 25.7 %, ber. auf Holz  
Fichte ..... 26.2 %, " " "

#### b.) Ligningehalt im Restholz bei Behandlung mit 72-proz. Schwefelsäure.

Buche ..... 33.8 % = 21.8 %, ber. auf Holz  
Fichte ..... 38.4 % = 28.4 % " " "

#### c.) Pentosangehalt im Restholz.

Buche ..... 1.8 % = 6 % des Gesamtpentosans  
Fichte ..... 3.4 % = 33 % " "

#### d.) Uronsäuregehalt im Restholz nach Tollens-Lefèvre.

Buche ..... 2.16 % = 55 % der Gesamturonsäure  
Fichte ..... 0.62 % = 38 % " "

Nochmalige Behandlung des Hydrolysenrückstandes (Tafel 3) unter gleichen Bedingungen ergab folgende Werte:

	Gelöster Holzanteil in %	mg % Reduktinsäure
Buche .....	0.3	60
Fichte .....	2.2	60

7.) Die Furfurol-(Pentosan-)Bestimmung wurde nach Tollens mit 13-proz. Salzsäure durchgeführt. Das übergegangene Furfurol wurde nach Kullgren und Tyden mit Bromid-Bromat-Lösung titriert<sup>15)</sup>.

8.) Die Uronsäure-Bestimmung wird nach Tollens-Lefèvre durchgeführt<sup>16)</sup>.

9.) Verhefungsversuch mit *Torula utilis*<sup>17)</sup>. Nährlösung: Anorganische Nährsalze + 50 mg Glucose/5 ccm bzw. + 63.5 mg Reduktinsäure/5 ccm je 2 Röhrchen. Temperatur: 37°; Lüftung: keine; Hefe: *Torula* 0195.

Verbindung	Versuchsdauer Tage	Millionen Hefezellen pro 5 ccm
Glucose	0	29.6
	1	51.5
	3	246.0
	5	535.0
	11	—
	Reduktinsäure	0
1		31.0
3		32.5
5		39.6
11		42.0

<sup>15)</sup> Vergl. hierzu R. Sieber, Chem.-techn. Unters.-Methoden d. Zellstoff- und Papierindustrie, Verlag Springer, 1943, S. 64.

<sup>16)</sup> Vergl. hierzu R. Sieber, Fußn. <sup>15)</sup>, S. 79. <sup>17)</sup> Ausgeführt von H. Kirchhoff.

Im Vergleich zu reiner Glucose ist die Vermehrung in Reduktinsäure sehr gering. Es wurde beobachtet, daß eine Vermehrung der Hefe erst dann einsetzte, wenn die Reduktinsäure-Nährlösung sich mehr oder weniger tief braunrot färbte.

Bei den Versuchen wurde ich von Hrn. H. Geier und Frln. B. Goerz unterstützt.

#### 48. Roland Scholl †, Karl Holdermann und Christian Seer: Versuche zur Darstellung von Harnsäure durch Oxydation nichtcyclischer Aminosäureamide\*).

(Unter Mitwirkung von Paul Walenta.)

[Aus den Chemischen Instituten der Techn. Hochschule Karlsruhe, der Universität Graz und der Techn. Hochschule Dresden.]

(Eingegangen aus Heidelberg am 15. August 1947.)

Durch Einwirkung von Brom und Wasser und von Brom und Kalilauge auf Polycarbonsäureamide wurden Verbindungen von den Formeln  $C_5H_5O_3N_3$  und  $C_5H_3O_3N_3$  erhalten; sie stehen der Harnsäuregruppe nahe, die Säure  $C_5H_3O_3N_3$  gibt die Murexid-Reaktion. In Überlegungen über die Konstitution dieser Verbindungen werden einige Möglichkeiten auf Grund von Versuchen abgelehnt; für die Konstitution beider Verbindungen wird eine wahrscheinliche Erklärung gegeben.

Wir können uns bei Überlegungen über den Ursprung der Harnsäure bei gewissen ungeklärten Teilvorgängen natürlicher organischer Prozesse – man denke an die Bildung von Harnsäure bei Vögeln und Schlangen – die Frage vorlegen, ob Harnsäure durch Oxydation nichtcyclischer Amide von Aminosäuren, einer im Organismus ja reichlich als Bausteine vorkommenden Klasse von Verbindungen, entstehen kann. Die Harnsäure (I) enthält zwei cyclisch gebundene Harnstoffkomplexe. Die Bildung von Harnstoff und substituierten Harnstoffen durch Oxydation von Säureamiden ist durch zahlreiche Beispiele bekannt: Oxamid kann durch Quecksilberoxyd in Harnstoff verwandelt werden. Aus zwei Molekülen Acetamid entsteht unter geeigneten Bedingungen durch Einwirkung von 1 Mol. Hypobromit Methyl-acetyl-harnstoff (Gleichung 1), indem 1 Mol. Acetamid zu Isoocyanat oxydiert wird, durch 2 Moll. Hypobromit

\* Die Anfänge dieser Arbeit gehen bis auf das Jahr 1903 zurück (Dissertat. K. Holdermann, Karlsruhe 1904). Sie wurde am Chemischen Institut der Universität Graz fortgesetzt (Dissertat. P. Walenta „Über das Anthraflavon und das Asparagindicarbonsäure-tetramid“; Graz 1915) und an der Techn. Hochschule Dresden von meinem langjährigen Mitarbeiter Ch. Seer bis zum heutigen Stand weitergeführt. Die experimentellen Unterlagen von Seer und Walenta sind bei der Zerstörung der Stadt Dresden in der Nacht vom 13./14. Februar 1945 verbrannt. Vorliegende Abhandlung wurde daher im wesentlichen aus der Erinnerung niedergeschrieben; die Angaben sind nichtsdestoweniger zuverlässig. Eine Wiederholung der Versuche ist mir nicht mehr möglich. R. Scholl.

Herr Prof. Scholl hat diese Arbeit im Flüchtlingslager Mörtitz an der Mulde kurz vor seinem am 22. August 1945 erfolgten Tod diktiert. Gern erfülle ich den Wunsch von Frau Prof. Scholl, die Abhandlung als letzte Veröffentlichung meines verehrten Lehrers in Druck zu geben. Sie hat ihn noch bis zuletzt beschäftigt und lag ihm sehr am Herzen. Sie behandelt ein von den sonstigen Arbeiten Scholls etwas abliegendes, aber von seinem kühnen Gedankenflug zeugendes Thema. Die (ungedruckte) Dissertation Walenta war leider nicht mehr erhältlich. K. Holdermann.