

1 Tropfen Methanol versetzt und noch 3 Std. stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 20 mg neutrales Rohprodukt. Aus Aceton-Äther und Methanol-Äther 12 mg blassgelbe Nadeln, Smp. 214–216°. Zur Drehung wurde 24 Std. bei 20° und 0,01 Torr im Dunkeln getrocknet; $[\alpha]_D^{21} = +73,5^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,5174$ in Methanol).

Authentisches Sarmutogenon^{d)} sowie die Mischprobe schmolzen gleich. Färbung mit NaOH in wässrigem Methanol¹⁾: hellgelb (0'), orange (10'–16 Std.).

D-Diginose aus I. Der trockene Zuckersirup (19,8 mg) gab aus wenig abs. Äther nach Impfen mit D-Cymarose keine Kristalle, mit D-Diginose aber rasch farblose, zu Drusen vereinigte Nadeln, die mit Äther-Pentan und reinem Pentan gewaschen und 3 Std. bei 12 Torr und 20° über CaCl₂ getrocknet wurden. 16 mg, Smp. 89–90°, $[\alpha]_D^{22} = +66,2^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,8305$, Endwert in Wasser nach 15 Std.). Authentische D-Diginose und die Mischprobe schmolzen gleich. Die Mischprobe mit D-Cymarose schmolz bei 78–86°. Die Laufstrecke im Papierchromatogramm (System n-Butanol-Pyridin-Wasser (3:2:1,5)²⁾ auf Whatman-Papier Nr. 1) war genau gleich wie bei authentischer D-Diginose ($R_F = 0,798$)³⁾.

Die Mikroanalyse wurde im Mikrolabor unseres Instituts (Leitung E. Thommen) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Ambosid gab bei milder saurer Hydrolyse D-Diginose und Sarmutogenin. Aus dem Vergleich der molekularen Drehungen folgt, dass Ambosid das β-D-Diginosid des Sarmutogenins darstellt.

Organisch-Chemische Anstalt der Universität Basel.

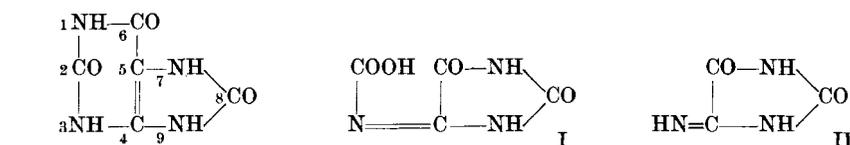
258. 2,4-Dioxy-s-triazine aus Harnsäure und Allantoin.

Isotopenversuche über den Harnsäure-Abbau, 3. Mitteilung³⁾)

von Hans Brandenberger und Roberta H. Brandenberger.

(13. X. 54.)

Einer von uns⁵⁾ hat kürzlich gezeigt, dass die alkalische Oxydation der Harnsäure mit Wasserstoffperoxyd nicht den in der Literatur beschriebenen Verlauf nimmt⁶⁾, und dass unter Umständen auch die bisherigen Ansichten über die Struktur der beiden Reaktionsprodukte Oxonsäure (Allantoxansäure) (I) und Allantoxaidin (II) revidiert werden müssen.



1) H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein, Helv. **36**, 357 (1953).

2) A. Jeanes, C. S. Wise & R. J. Dimmler, Anal. Chem. **23**, 415 (1951).

3) Vorgetragen am 25. September in der Sitzung der Schweiz. Chemischen Gesellschaft (Altdorf), vgl. Chim. **8**, 262 (1954).

4) 2. Mitt.: H. Brandenberger, Biochem. Biophys. Acta **15**, 108 (1954).

5) H. Brandenberger, Helv. **37**, 641 (1954).

6) Für zusammenfassende Übersicht mit Zitierung der Originalliteratur siehe H. Biltz & H. Schauder, J. pr. **106**, 108 (1923).

Eine genaue Abklärung der Verhältnisse war nun nicht nur von chemischem Interesse, sondern auch eine biochemische Notwendigkeit. Diese Oxydation gestattet nämlich eine schrittweise Abspaltung von C-Atomen aus der Kohlenstoff-Kette 4–5–6 der Harnsäure und stellt daher beim Studium der Biosynthese der Purine aus C-markierten Vorläufern einen einfachen Weg dar, um zu bestimmen, in welche der drei Positionen das markierte Atom eingebaut worden ist. Auch bei der Berechnung der totalen C- und N-Isotopen-Verteilung in markierten Harnsäuren ist die alkalische Peroxyd-Oxydation von grossem Nutzen¹⁾. Endlich wurde in neuester Zeit gezeigt, dass Oxonsäure und Allantoxaidin neben Allantoin auch enzymatische Abbauprodukte der Harnsäure sein können²⁾. Auf Grund der vorläufig vorliegenden spektrophotometrischen Daten³⁾ erscheinen uns Parallelen zwischen dem chemischen und dem biochemischen Abbau nicht ausgeschlossen.

Aus den in unserer 1. Mitteilung beschriebenen Versuchen⁴⁾ ergab sich, dass bei der H_2O_2 -Oxydation wie erwartet das Harnsäure-Kohlenstoffatom 6 als CO_2 abgespalten wird. In der Oxonsäure wird die Carboxylgruppe gebildet durch das frühere C-Atom 5 und nicht etwa durch 2, wie es bei einem direkten Abbau unter Erhaltung des Imidazolringes zu erwarten wäre⁵⁾, oder durch 2 und 8 zusammen, wie es sich bei einem Abbau über ein symmetrisches Zwischenprodukt (z. B. Verb. XI, Schema II)⁶⁾ ergeben würde. Die Ringkohlenstoff-Atome der Oxonsäure und ihres Decarboxylierungsproduktes, des Allantoxaidins, sind gebildet aus den früheren Harnsäure-Positionen 2, 4 und 8; von den Harnsäure-Stickstoff-Atomen sind 3 und 9 zu 100%, 1 und 7 jedoch nur zu 50% in den zwei Abbauprodukten erhalten. Diese Resultate ergaben sich durch Versuche mit einer in 2, einer in 4, einer in 6 und einer in 8 mit ^{14}C , sowie einer in 7 mit ^{15}N markierten Harnsäure. Das einzige C-Atom, welches wir nie markierten, war dasjenige in Stellung 5, dessen Weg sich jedoch als Differenz bestimmen liess.

Nun haben uns Prof. *P. P. Cohen* und Dr. *E. S. Canellakis* von Madison, Wis., U.S.A.⁷⁾, in sehr zuvorkommender Weise 50 mg einer in 5 markierten ^{14}C -Harnsäure überlassen⁸⁾, so dass wir die Möglichkeit erhielten, auch den Abbauweg des C-Atomes 5 direkt zu ver-

¹⁾ *H. Brandenberger*, Biochem. Biophys. Acta **15**, 108 (1954).

²⁾ *E. S. Canellakis & P. P. Cohen*, Fed. Proc. **13**, 189 (1954).

³⁾ *K. G. Paul & Y. Avi-Dor*, Acta Chem. Scand. **8**, 637 (1954).

⁴⁾ *H. Brandenberger*, Helv. **37**, 641 (1954).

⁵⁾ *C. S. Venable*, Am. Soc. **40**, 1099 (1918); *F. J. Moore & R. Thomas*, Am. Soc. **40**, 1120 (1918).

⁶⁾ *H. Biltz & H. Schauder*, J. pr. **106**, 108 (1923).

⁷⁾ Department of Physiological Chemistry, University of Wisconsin.

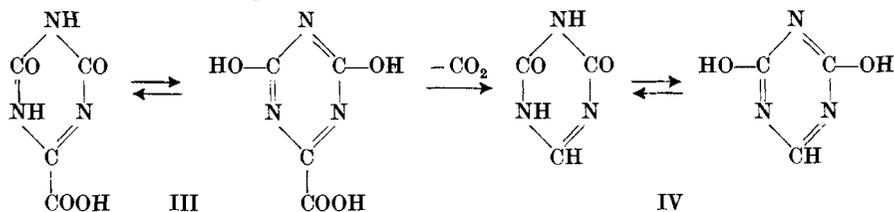
⁸⁾ Wir möchten den beiden Herren auch an dieser Stelle unseren herzlichsten Dank ausdrücken.

folgen. Die Resultate dieser Oxydation sind in der Tab. I zusammengefasst. Die bei der Oxydation mit dem CO₂ abgespaltene Radioaktivität (unter 4%) ist durch Nebenreaktionen freigesetzt (z. B. durch oxydative Decarboxylierung der entstehenden Oxonsäure); bei intensiveren Oxydationsbedingungen (Verlängerung der Reaktionsdauer, höhere H₂O₂-Konz.) fällt dieser Wert etwas höher aus (s. Exp. Teil). Die Oxonsäure besitzt – im Rahmen unserer Messgenauigkeit – die gleiche spezifische Aktivität wie das Ausgangsprodukt, und zwar sitzt die gesamte Markierung im Carboxyl, denn sie ist nach der Decarboxylierung im abgespaltenen CO₂ wiederzufinden. Das Resultat dieses Abbaues bestätigt den aus der Differenz der früheren Bestimmungen sich ergebenden Abbauweg des C-Atomes 5 und ergibt somit einen erneuten Beweis für die früher hervorgehobenen genetischen Beziehungen zwischen der Harnsäure und den hier untersuchten Oxydationsprodukten¹⁾.

Tabelle I.
Oxydation von Harnsäure-5-¹⁴C mit H₂O₂.

Verbindung	Impulse pro mMol und Minute
Harnsäure	29700
CO ₂ aus Oxydation . .	945
Oxonsäure	29400
CO ₂ aus Decarboxylierung	29300

Auf Grund der mikroanalytischen und spektrophotometrischen Daten kommen für Oxonsäure und Allantoxaidin nur Ringstrukturen in Frage. Wir haben schon früher darauf hingewiesen¹⁾, dass die Resultate der Isotopenversuche es viel wahrscheinlicher machen, dass diese zwei Verbindungen als s-Triazine (1,3,5-Triazine, Formel III und IV) vorliegen, denn als Imidazolidin-Derivate I und II.



Imidazolidone wie Hydantoin oder Allantoin besitzen im Infraroten um 1770 cm⁻¹ (5,65 μ) eine scharfe, stark ausgeprägte Absorptionsbande (Fünfring-Lactam-Struktur, Fig. I, Spektrum 1 und 2), die bei sechsgliedrigen Ringen entweder vollständig fehlt, oder dann, wie z. B. im Falle der Cyanursäure (Fig. I, Spektrum 3)²⁾, nur ganz

¹⁾ H. Brandenberger, *Helv.* **37**, 641 (1954); *Biochem. Biophys. Acta* **15**, 108 (1954).

²⁾ Siehe auch: A. Roosens, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **59**, 377 (1950); R. Newman & R. M. Badger, *Am. Soc.* **74**, 3545 (1952).

schwach ausgebildet ist. Da die Oxonsäure bei der Freisetzung aus ihren Salzen zerfällt, die Ionisierung aber das Infrarot-Bild stört, haben wir sie zum stabilen Dihydro-Derivat, der Hydroxonsäure, reduziert. Nach den bisherigen Vorstellungen wäre diese als die dem Amid Allantoin zugehörige Säure V aufzufassen. Das vollständige Fehlen der Bande bei 1770 cm^{-1} zeigt jedoch, dass kein Fünfring vorhanden, der Hydroxonsäure daher die Sechsring-Struktur VI zuzuordnen ist (Fig. I, Spektrum 4)¹⁾.

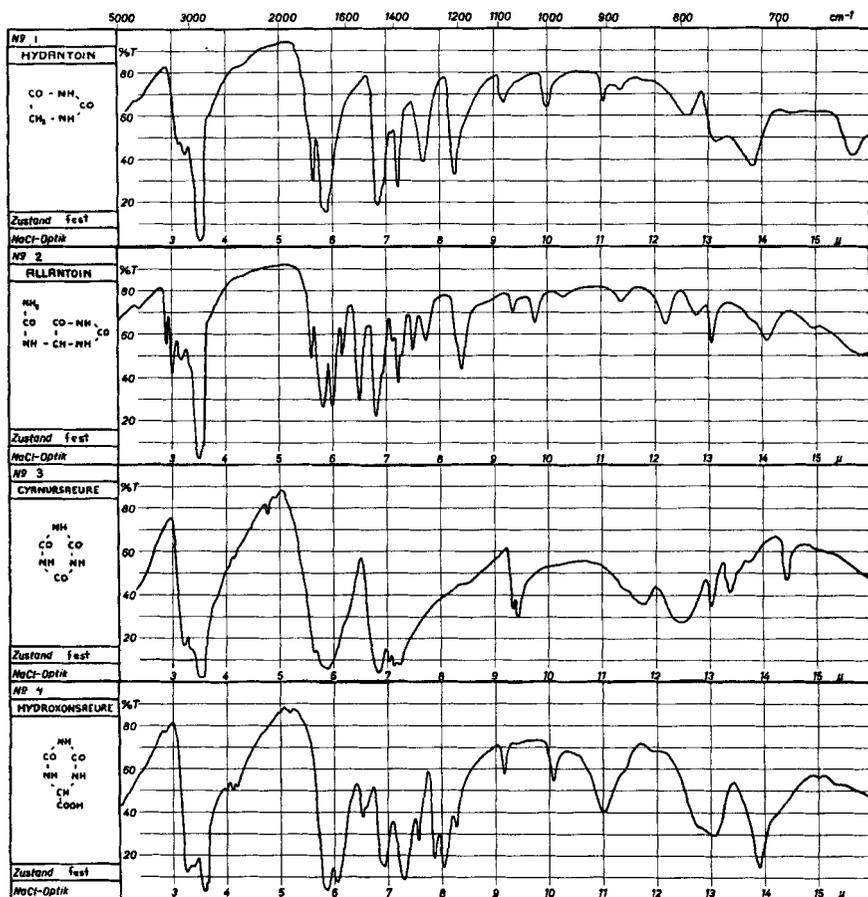


Fig. I.

Infrarot-Spektren von Hydantoin, Allantoin, Cyanursäure und Hydroxonsäure. Aufnahmen in Nujol; dessen Banden bei 2900 , 1460 , 1380 und 725 cm^{-1} sind nicht auskompensiert.

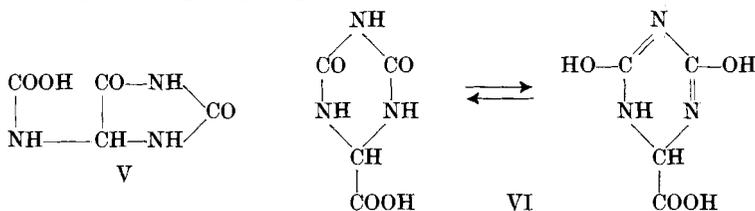
Die Ultraviolett-Spektren von Oxonsäure (Fig. II) und Allantoxidin (Fig. III) ergeben eine weitere Bestätigung unserer An-

¹⁾ Für die Hilfe bei der Interpretation dieser Spektren sind wir Herrn Professor H. H. Günthard, Organisch-chemisches Laboratorium der ETH., Zürich, zu Dank verpflichtet.

sichten. Sie sind wie erwartet stark pH-abhängig; λ_{\max} liegt bei beiden Verbindungen in alkalischem Gebiete um ca. 20 $m\mu$ langwelliger als in saurem Medium. Interessant ist die abnorm hohe Extinktion in schwach alkalischer Lösung. Tabelle II zeigt, dass die alkalisch aufgenommenen Spektren für ähnlich gebaute s-Triazine ziemlich typisch sind¹⁾. Bei Imidazolidonen und deren Imino-Derivaten liegen die Maxima bedeutend tiefer, beim Kreatinin z. B. in Alkali um 232 $m\mu$, in saurem Gebiet unter 215 $m\mu$. Reduktion der Oxonsäure zum Dihydro-Derivat VI verschiebt das in Alkali aufgenommene Maximum um 20 $m\mu$ nach kürzeren Wellen; es kommt dann gleich zu liegen wie bei ähnlich gebauten 2,4-Dioxy-5,6-dihydro-pyrimidinen²⁾³⁾.

Tabelle II.
Ultraviolett-Spektren von s-Triazinen.

1,3,5-Triazin-Derivat	Lösungsmittel	Maximum		Minimum	
		$m\mu$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	$m\mu$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
2,4-Diamino- ⁴⁾	Äthanol	251	2,9	242	2,8
2,4-Diamino-6-methyl- ⁵⁾ . . .	Wasser	254	3,2	238	2,4
2,4-Diamino-6-äthyl- ⁶⁾	—	255,5	2,9	239	—
2,4-Diamino-6-phenyl- ⁴⁾	Äthanol	249	25,0 ⁹⁾	—	—
2,4-Diamino-6-phenyl- ⁷⁾	0,01 n. NaOH	247	19,2 ⁹⁾	228	16,5
2-Amino-4,6-diphenyl- ⁴⁾	Äthanol	256	30,0 ⁹⁾	—	—
2,4,6-Trimethyl- ⁸⁾	Äthanol	256	0,79	—	—
2,4,6-Triäthyl- ⁸⁾	Äthanol	259	0,68	—	—
2,4-Dioxy-	pH = 9 ¹⁰⁾	253	7,8	220	1,0
(Allantoxaidin)	pH = 12 ¹⁰⁾	249	4,0	229	1,9
2,4-Dioxy-6-carboxy-	pH = 9 ¹⁰⁾	255	6,8	224	2,2
(Oxonsäure)	pH = 12 ¹⁰⁾	252	4,6	228	2,3



¹⁾ Weitere Beispiele enthalten die in der Tabelle II erwähnten Literaturangaben.

²⁾ *R. D. Blatt et al., Am. Soc. 76, 3663 (1954).*

³⁾ In beiden Fällen leidet eine genaue Bestimmung unter der Unbeständigkeit dieser Verbindungen in Alkali.

⁴⁾ *P. B. Russel et al., Am. Soc. 74, 5403 (1952).*

⁵⁾ *C. G. Overberger & S. L. Shapiro, Am. Soc. 76, 1855 (1954).*

⁶⁾ *W. Logemann et al., B. 87, 1175 (1954).*

⁷⁾ *F. C. Nachod & E. A. Steck, Am. Soc. 70, 2819 (1948).*

⁸⁾ *T. L. Cairns et al., Am. Soc. 74, 5633 (1952).*

⁹⁾ Die Einführung einer Phenylgruppe verändert die Lage des Maximums nicht, bewirkt aber eine starke Erhöhung der Extinktion.

¹⁰⁾ Siehe Legende zu Fig. II und III.

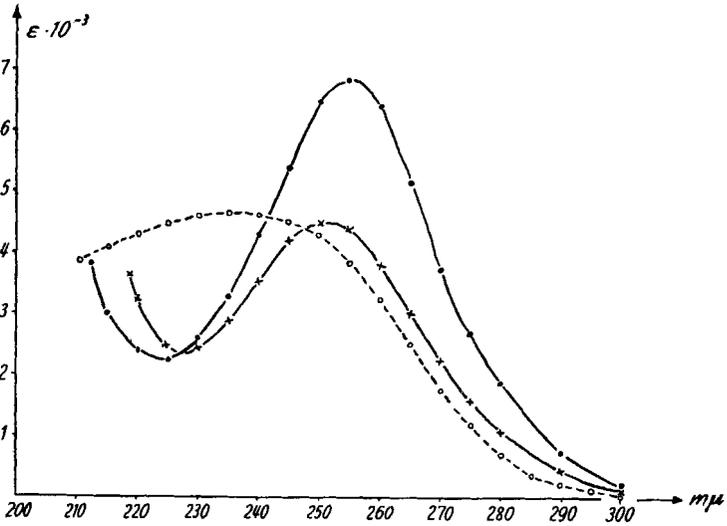


Fig. II.

UV.-Spektren von Oxonsäure (K-Salz), aufgenommen in

- { Wasser, pH = 5,85
- { 0,09-m. prim. Na-Phosphat, pH = 4,22
- { 0,09-m. sek. Na-Phosphat, pH = 8,95
- x— { 0,09-m. KOH, pH = 12,62

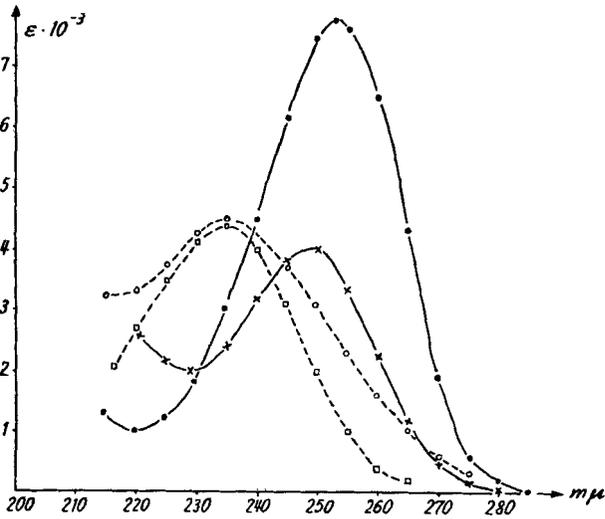


Fig. III.

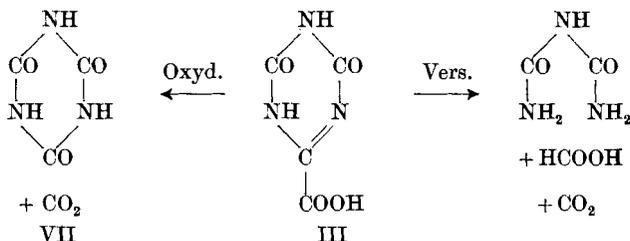
UV.-Spektren von Allantoxaidin, aufgenommen in:

- Wasser, pH = 6,64
- 0,09-m. HCl, pH = 1,10
- 0,09-m. sek. Na-Phosphat, pH = 8,96
- x— 0,09-m. KOH, pH = 12,58

Auf Grund der Isotopenversuche und der spektrophotometrischen Vergleiche können die s-Triazin-Formeln für Oxonsäure und Allantoxaidin als gesichert gelten. Dies um so mehr, als auch das chemische Verhalten der zwei Verbindungen mit dieser Ansicht harmoniert. Beide lassen sich leicht zu Cyanursäure (VII) oxydieren¹⁾; längeres Erwärmen mit Wasser oder Säuren liefert Biuret und Ameisensäure²⁾ (Schema I). Allantoxaidin ist das 2,4-Dioxy-1,3,5-triazin (IV), Oxonsäure dessen 6-Carboxy-Derivat III. Die Hydroxonsäure muss als 2,4-Dioxy-5,6-dihydro-6-carboxy-1,3,5-triazin (VI) formuliert werden. Der Triazinring bildet sich sekundär aus einem offenkettigen System, welches die Harnsäure-Positionen 1-2-3-4-9-8-7 in der erwähnten Reihenfolge enthält, wobei als Substituent in 4 das vormalige C-Atom 5 in Form einer Carboxylgruppe steht. Als offenkettige Zwischenprodukte kommen in Frage die Allantoinsäure (VIII) und deren bis heute noch unbekanntes Oxydationsprodukte IX (Oxy-allantoinsäure) und/oder X (Dehydro-allantoinsäure). Aus X könnte durch NH₃-Abspaltung zwischen den vormaligen Harnsäure-Stickstoff-Atomen 1 und 7 direkt III entstehen.

Schema I.

Chemische Umsetzungen der Oxonsäure.



Es ist nun möglich, Oxonsäure und Allantoxaidin statt durch Oxydation von Harnsäure mit Wasserstoffsperoxyd auch durch Oxydation mit Kaliumpermanganat herzustellen. Auf dem ersten Wege erhält man die Oxonsäure direkt, auf dem zweiten über Allantoin (Formel XIII und/oder XIV, siehe Schema II) als Zwischenprodukt, das man isolieren und einer weiteren Permanganat-Oxydation unterwerfen muss³⁾. Man hat allgemein angenommen, dass die beiden Oxydationsmittel die Harnsäure nicht auf dem gleichen Weg abbauen⁴⁾. Es war daher durchaus möglich, dass Oxonsäure durch

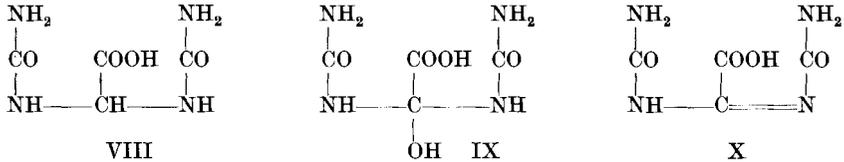
¹⁾ Von Biltz wurde diese Oxydation als sogenannte Oxydations-Umlagerung des Fünfringes I zum Sechsring VII gedeutet. Vgl. *H. Biltz & R. Robl*, B. **53**, 1967 (1920); B. **54**, 2441 (1921).

²⁾ *J. Ponomarew*, B. **11**, 2156 (1878); *H. Biltz & R. Robl*, B. **54**, 2441 (1921).

³⁾ *E. Mulder*, B. **8**, 1292 (1875); *J. Ponomarew*, B. **11**, 2156 (1878); *H. Biltz & E. Giesler*, B. **46**, 3410 (1913).

⁴⁾ Siehe z. B. *H. Biltz & H. Schauder*, J. pr. **106**, 108 (1923), oder *C. S. Venable*, Am. Soc. **40**, 1099 (1918), Zusammenfassung, Pkt. V.

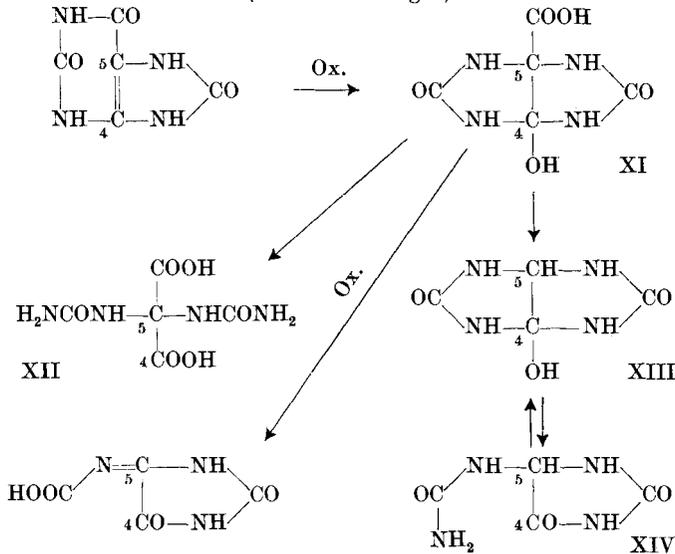
Permanganat-Oxydation von Oxonsäure durch Peroxyd-Oxydation genetisch verschieden sein könnte. Es ist nämlich nicht selbstverständlich, dass das sogenannte *Behrend'sche* Zwischenprodukt, die Oxy-acetylen-diureido-carbonsäure (Formel XI, Schema II)¹⁾, beim weiteren Abbau an der früheren Harnsäure-Position 5 aufspaltet.



Für den Übergang in die Uroxansäure (XII) z. B. ist – die hier verwendete klassische Formulierung als richtig vorausgesetzt²⁾ – eine Aufspaltung in 4 notwendig. Bisher wurde auch für die Verwandlung in Oxonsäure (im Schema II mit der alten Formulierung I wiedergegeben) eine Aufspaltung in 4 verantwortlich gemacht, was wir nun allerdings widerlegt haben. Was das Allantoin betrifft, so weisen hier die Arbeiten von *Fischer & Ach*³⁾ über die Oxydation von methylierten Harnsäuren, ergänzt durch die Untersuchung von *Siemonsen*⁴⁾

Schema II.

Aufspaltung des *Behrend'schen* Zwischenproduktes
(alte Anschauungen).



¹⁾ R. Behrend, A. 333, 141 (1904); W. Schuler & W. Reindel, Z. physiol. Chem. 208, 248 (1932).

²⁾ R. Behrend, A. 333, 141 (1904); R. Behrend & R. Schultz, A. 365, 21 (1909); H. Biltz & R. Robl, B. 53, 1951 (1920).

³⁾ E. Fischer & F. Ach, B. 32, 2745 (1899).

⁴⁾ L. Siemonsen, A. 333, 101 (1904).

über die Struktur der Methyl-allantoine, auf eine Ringöffnung bei 5 hin. Doch ist auch hier in vielen Lehrbüchern¹⁾ die entgegengesetzte Formulierung zu finden (wie im Schema II festgehalten durch Formeln XIII und XIV), vielleicht, weil die erwähnten Arbeiten nicht die Harnsäure selbst betreffen, sondern methylierte Produkte.

Wir haben nun verschiedene ¹⁴C-markierte Harnsäuren auch der Permanganat-Oxydation unterworfen und das isolierte Allantoin jeweils zu Oxonsäure weiteroxydiert, diese dann decarboxyliert. Die Resultate sind in der Tabelle III zusammengestellt. Die Versuche mit dem Gemisch von in 2 und 8 markierter Harnsäure sowie mit Harnsäure-4-¹⁴C zeigen, dass diese 3 Positionen weder bei der Oxydation, noch bei der Decarboxylierung der Oxonsäure abgespalten werden. Sie bilden demnach die Ring-C-Atome der entstehenden Triazine. Die ehemalige Harnsäure-Position 5 stellt wiederum die Carboxylgruppe in der Oxonsäure, denn sie wird bei der Decarboxylierung quantitativ als CO₂ frei. Die beiden 2,4-Dioxy-s-triazine, die man aus Harnsäure durch Permanganat-Oxydation über Allantoin erhalten kann, sind demnach genetisch identisch mit den direkt durch Peroxyd-Abbau entstehenden Produkten. Damit ist nun auch am Beispiel der Harnsäure selbst gezeigt, dass bei der Allantoin-Bildung die Atomkette 1-2-3-4(-5)-9-8-7 intakt erhalten bleibt, dass – wiederum das *Behrend'sche* Zwischenprodukt XI als existierend vorausgesetzt – eine Aufspaltung der Imidazolidon-Ringe in 5 stattfinden muss (Schema III). Bei der Weiteroxydation des Allantoins (XIV) öffnet sich der Fünfring ebenfalls beim vormaligen C-Atom 5, wobei als Zwischenprodukte für die Bildung von Oxonsäure wiederum die vorerwähnten offenkettigen Verbindungen VIII (Allantoinsäure), IX und/oder X in Frage kommen.

Tabelle III.

Oxydation von ¹⁴C-Harnsäuren mit KMnO₄.

Harnsäure	- 2,8- ¹⁴ C	- 4- ¹⁴ C	- 5- ¹⁴ C
Verbindung	Impulse pro mMol und Minute		
Harnsäure	ca. 150000	20400	29700
CO ₂ aus Oxydation	830	35	0
Allantoin	–	19800	–
Oxonsäure	–	–	29100
CO ₂ aus Decarboxylierung . .	60	155	31000

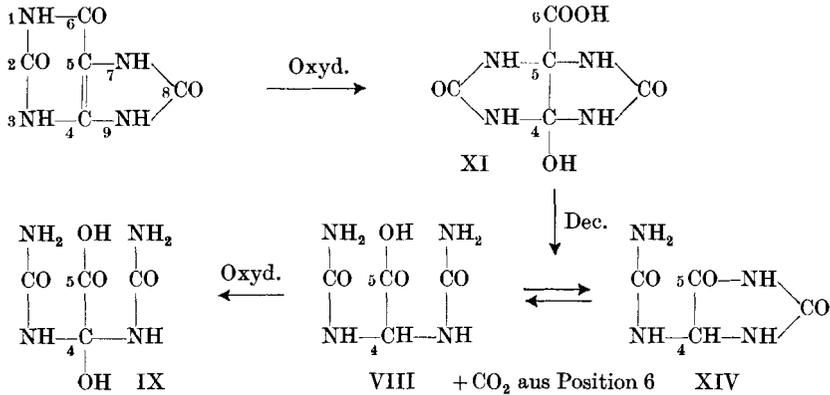
Die Permanganat-Oxydation ist von der Peroxyd-Oxydation nicht grundsätzlich verschieden. Die Unterschiede beruhen lediglich darauf, dass das Permanganat besser dosiert werden kann, die

¹⁾ Vgl. z. B. *W. W. Hartman* et al. in *Org. Syntheses*, Sammelband II, 21 (1948), oder *R. H. Wiley* in *H. Gilman*, *Organic Chemistry*, Band IV, 879 (1953).

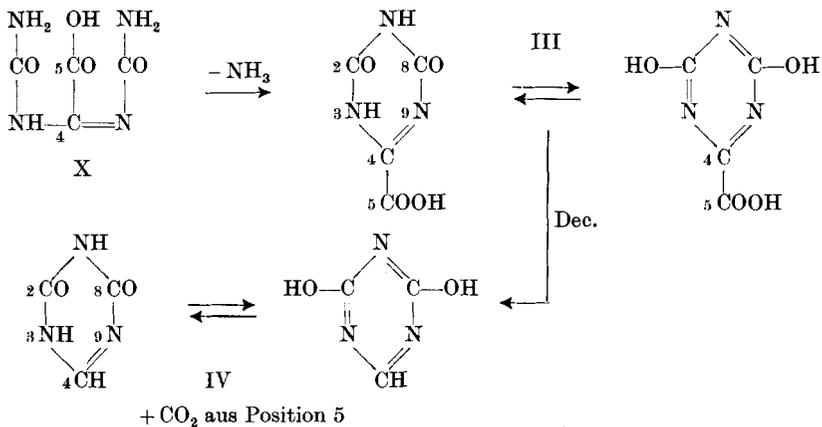
Reaktion daher stufenweise verläuft, wobei sich als Sekundärbildung eines erststufigen Reaktionsproduktes leicht Allantoin (XIV) isolieren lässt.

Schema III.

Oxydation von Harnsäure mit KMnO_4 .



und/oder



Festes Allantoin besitzt im Infraroten 2 mittelstarke, scharf getrennte Adsorptionsbanden bei 3400 und 3250 cm^{-1} ¹⁾. Dies ist charakteristisch für das Vorhandensein einer primären Amidgruppe. Die bicyclische Formulierung XIII (siehe Schema II) fällt daher für den festen Zustand nicht in Betracht. Der durch unsere Isotopenversuche nachgewiesene Mechanismus der Bildung und Spaltung von Allantoin macht es auch unwahrscheinlich, dass XIII in Lösung im Gleichgewicht mit XIV auftritt²⁾.

¹⁾ Siehe Fig. I, Spektrum 2.

²⁾ Vgl. z. B. *W. W. Hartman et al. in Org. Syntheses, Sammelband II, 21 (1948)*; oder *R. H. Wiley in H. Gilman, Organic Chemistry, Band IV, 879 (1953)*.

Experimenteller Teil.

a) Darstellung von nicht markierten Verbindungen.

1. Oxonsäure (III) wurde hergestellt: α) Wie früher beschrieben¹⁾ durch Oxydation von Harnsäure mit alkalischem H_2O_2 nach *Venable*²⁾ und *Moore & Thomas*³⁾. Durch Zusatz von Aktivkohle⁴⁾ lässt sich die Reaktionszeit von 48 Std. auf 10 bis 20 Min. verkürzen, die Ausbeute wird dabei jedoch schlechter, das Produkt weniger rein, so dass es in diesem Falle mehrmals umkristallisiert werden musste.

β) Durch Oxydation von Allantoin (XIV) mit alkalischem $KMnO_4$ nach *Biltz & Giesler*⁵⁾.

Die Isolierung erfolgte in allen Fällen als Mono-K-Salz. Die verschieden hergestellten Präparate waren in bezug auf Kristallform, Löslichkeit, UV.-Spektrum und chemisches Verhalten vollkommen identisch.

2. Allantoxaidin (IV) erhielten wir mit den besten Ausbeuten nach der Methode von *Biltz & Giesler*⁵⁾ durch Zerlegung von K-Oxonat mit weniger als der berechneten Menge verdünnter Schwefelsäure, Eindampfen im Vakuum und Extraktion des getrockneten Reaktionsproduktes mit absolutem Alkohol. Die beim Abkühlen der alkoholischen Lösung sich bildenden Kristalle wurden aus Wasser/Alkohol umkristallisiert. Trotz 20stündigem Trocknen des Präparates am Hochvakuum bei Zimmertemperatur hielt es 25% seines Gewichtes an Kristallalkohol und -wasser zurück (ca. 1 Mol, auf Grund einer C,H-Best. vorwiegend Alkohol⁶⁾), welches erst bei 110° entfernt werden konnte (Hochvakuum, 10 Std., P_2O_5). Smp. $272^\circ \pm 2^\circ$ unter Zers., Verfärbung ab 255° ⁷⁾.

$C_3H_3O_2N_3$	Ber. C 31,86	H 2,67	N 37,16%
(113,08)	Gef. „ 31,99	„ 2,68	„ 37,37%

Die anderen Verfahren zur Darstellung von Allantoxaidin ergaben in unseren Händen schlechtere Resultate⁸⁾.

3. Hydroxonsäure (VI) stellten wir her durch Reduktion von K-Oxonat mit Natriumamalgam in Wasser nach *Biltz & Giesler*⁵⁾. Geht man von reinem K-Salz aus, so erhält man die Hydroxonsäure direkt analysenrein, andernfalls muss man sie umkristallisieren⁵⁾. Eine Reinigung über den Ester⁵⁾ war nicht notwendig.

$C_4H_5O_4N_3$	Ber. C 30,19	H 3,17	N 26,41%
(159,10)	Gef. „ 30,16	„ 3,19	„ 26,63%

b) Die Darstellung der radioaktiven Harnsäuren haben wir früher eingehend beschrieben¹⁾.

c) Abbau der mit ^{14}C markierten Verbindungen.

1. Oxydation von Harnsäure-5- ^{14}C mit H_2O_2 zu Oxonsäure wurde durchgeführt mit 17 mg Substanz unter Auffangen des freigesetzten CO_2 mit Hilfe der früher beschriebenen Versuchsanordnung¹⁾⁹⁾. Die Höhe der geringen mitabgespaltenen Radio-

1) *H. Brandenberger*, *Biochem. Biophys. Acta* **15**, 108 (1954).

2) *C. S. Venable*, *Am. Soc.* **40**, 1099 (1918).

3) *F. J. Moore & R. Thomas*, *Am. Soc.* **40**, 1120 (1918).

4) *M. Frèrejaque*, *C. r.* **191**, 949 (1930).

5) *H. Biltz & E. Giesler*, *B.* **46**, 3410 (1913).

6) *H. Biltz & E. Giesler* (*B.* **46**, 3410 (1913)) kristallisierten aus H_2O um und erhielten 1 Mol Kristallwasser, welches schon bei Zimmertemperatur entweichen soll.

7) Unkorrigiert, in verschlossener Kapillare. Korrigierter Wert nach *Biltz & Giesler* (*loc. cit.*) 282°.

8) *J. Ponomarew*, *B.* **11**, 2156 (1878) (Behandlung von Pb-Oxonat mit H_2S); *F. J. Moore & R. Thomas*, *Am. Soc.* **40**, 1120 (1918) (Behandlung von Ba-Oxonat mit H_2SO_4 oder Erhitzen von NH_4 -Oxonat auf 100–150°).

9) Statt des Luftstroms verwendeten wir gereinigtes N_2 .

aktivität (Verunreinigung des CO_2 aus Position 6 durch CO_2 aus Stellung 5) ist abhängig von der Intensität der Oxydation, wie die folgenden zwei Versuche zeigen:

α) H_2O_2 -Konz. 3%, Reaktionsdauer 30 Std., spez. Aktivität des BaCO_3 auf Platte 1 (2,65 mg, 12,6 Imp./Min.) 1010, auf Platte 2 (3,70 mg, 14,6 Imp./Min.) 880. Mittelwert 945¹⁾, siehe Tab. 1.

β) H_2O_2 -Konz. 4%, Reaktionsdauer 40 Std., spez. Aktivität des BaCO_3 auf Platte 1 (2,85 mg, 20,5 Imp./Min.) 1540, auf Platte 2 (3,25 mg, 21,9 Imp./Min.) 1480. Mittelwert 1510¹⁾.

Das K-Oxonat wurde unter Zusatz von einigen Tropfen Alkohol²⁾ einmal umkristallisiert und direkt ausgezählt.

2. Oxydation von Radio-Harnsäuren mit KMnO_4 zu Allantoin geschah nach *Sundwik*³⁾ mit je 34–50 mg Harnsäure; das abgespaltene CO_2 wurde mit Hilfe der gleichen Versuchsanordnung wie bei der H_2O_2 -Oxydation gesammelt⁴⁾5). Es wurden Versuche durchgeführt mit 5-markierter, 4-markierter und, um Substanz zu sparen, mit einem Gemisch von je 17 mg 2- und 8-markierter Verbindung. Wir beschreiben hier lediglich den ersterwähnten Versuch, die Mengenverhältnisse für die anderen Ansätze waren die gleichen. 50 mg Harnsäure-5-¹⁴C wurden in einem Reagensglas mit kleinem Magnetrührerchen mit 2 ml H_2O und 0,5 ml 2-n. KOH versetzt. Nachdem sich alles gelöst hatte, haben wir 25 mg festes KMnO_4 zugesetzt und 10 Min. weitergerührt. Dann wurde filtriert und mit wenig Wasser nachgewaschen. Das Filtrat haben wir in der mit N_2 gut durchspülten CO_2 -Auffang-Apparatur⁴⁾ mit 5 Tropfen Eisessig angesäuert, das freigesetzte CO_2 durch einen langsamen, 4stündigen Strom von N_2 in die unter Toluol befindliche $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung übergeführt. Auswaschen des gefällten BaCO_3 wie früher beschrieben⁴⁾. Die essigsäure Lösung wurde kurz aufgekocht, im Vakuum auf 1 ml eingeeengt und 24 Std. bei 20° stehengelassen \rightarrow 32 mg Allantoin, das nicht weiter gereinigt wurde.

3. Oxydation von Radio-Allantoin mit KMnO_4 zu Oxonsäure erfolgte nach *Biltz & Giesler*⁶⁾. Alle drei aus den verschiedenen Harnsäuren erhaltenen Radio-Allantoine wurden weiteroxydiert; wir beschränken uns jedoch auf die Beschreibung eines Ansatzes. 32 mg Allantoin aus Harnsäure-5-¹⁴C wurden in 0,15 ml 2-n. KOH gelöst, auf 0° gekühlt und 0,2 ml Oxydationslösung (32 g KMnO_4 in 500 ml 0,7-n. KOH) zugetropft. Nach 5stündigem Stehen bei 0° wurde filtriert und mit wenig Wasser nachgewaschen. Das Filtrat haben wir mit 10 Tropfen Eisessig angesäuert und über Nacht bei 20° stehengelassen \rightarrow 18 mg K-Oxonat. Dieses wurde einmal unter Zusatz von Alkohol umkristallisiert.

4. Decarboxylierung der Radio-Oxonsäuren geschah wie früher beschrieben unter Auffangen des abgespaltenen CO_2 ⁴⁾.

d) Bestimmung der Radioaktivität.

Die Proben wurden aufgeschlämmt, BaCO_3 in Aceton, Harnsäure, Allantoin und K-Oxonat in Äther, die Suspensionen auf tarierten Messingplättchen unter einer Lampe eingedunstet. Nach Bestimmung des neuen Plättchen-Gewichtes wurden die Impulse mit einem *Geiger-Müller*-Zähler mit Glimmerfenster über 120 Min. ausgezählt. Die Impulse pro Min. haben wir auf Schichtdicke 0 korrigiert, wobei wir für die BaCO_3 -Proben eine mit BaCO_3 hergestellte, für die organischen Verbindungen eine mit Glykokoll bestimmte Korrektionskurve verwendeten. Von den meisten Proben wurden 2 Plättchen hergestellt; diese enthielten zwischen 2 und 4 mg Substanz auf einer Fläche von 3,14 cm²

1) Aktivität korrigiert auf Schichtdicke 0.

2) Alkoholzusatz bewirkt Bildung von kleinen Kristallen, was die Herstellung von gleichmässig ebenen Plättchen erleichtert.

3) *E. E. Sundwik*, Z. physiol. Chem. **41**, 343 (1904); *W. W. Hartman* et al., Org. Syntheses, Sammelband II, 21 (1948).

4) *H. Brandenberger*, Biochem. Acta **15**, 108 (1954).

5) Statt des Luftstroms verwendeten wir gereinigten N_2 .

6) *H. Biltz & E. Giesler*, B. **46**, 3410 (1913).

(2 cm Platten-Durchmesser). Bei stärkerer Beladung werden die durch die Korrekturen bedingten Fehler zu gross, sofern man nicht alle Substanzen zu CO_2 verbrennt und als BaCO_3 ausmisst, was in unserem Falle nicht möglich war.

Die ausgemessenen organischen Präparate wurden für weitere Abbauprüfungen verwendet. Von den im Verlauf der Permanganat-Oxydation isolierten Substanzen mit gleichem C-Atom-Gehalt, Allantoin und Oxonsäure, wurde jeweilen nur eine ausgemessen. Im Falle des Gemisches von 2- und 8-markierter Harnsäure war die Aktivität für eine genaue Bestimmung etwas hoch, so dass wir auf eine Ausmessung sowohl beim Allantoin wie auch beim K-Oxonat verzichteten.

e) Die Ultraviolett-Spektren wurden mit einem *Beckman*-Spektrophotometer, Modell DU, bestimmt.

f) Die Infrarot-Spektren wurden von Herrn *A. Hübscher*, Organisches Laboratorium der ETH, Zürich, aufgenommen¹⁾. Die Messung erfolgte mit einem *Baird*-Double-Beam-Spektrophotometer mit NaCl-Optik in Nujol. Die durch das Nujol verursachten Banden sind nicht auskompensiert.

g) Die Mikroanalysen hat Herr *H. Frohofer*, Chemisches Institut der Universität Zürich, ausgeführt²⁾.

Ein Teil dieser Untersuchung wurde ausgeführt, während einer der Autoren (*H.B.*) an einem durch den *Schweizerischen Nationalfonds* finanzierten und von *R. Signer*, *H. Nitschmann* und *R. Hässig* geleiteten Proteinforschungsprojekt tätig war. Wir danken den erwähnten Herren für das Interesse, Herrn PD. Dr. *R. Schwyzer*³⁾ für manch wertvolle Diskussion.

SUMMARY.

The mechanisms of the alkaline oxidations of uric acid with H_2O_2 and KMnO_4 have been investigated using isotopically labeled uric acids. The structures of the oxidation products have been examined by means of the isotope experiments and ultraviolet and infrared spectra. The following conclusions can be drawn:

1. Oxonic acid (allantoxanic acid) (III), allantoxidine (IV) and their derivatives are 2,4-dihydroxy-1,3,5-triazines, not imidazolidones (I and II).

2. The s-triazine rings contain uric acid carbon atoms 2, 4 and 8 and nitrogen atoms 3 and 9. The third nitrogen of the ring is derived 50–50 from the former positions 1 and 7, the additional carboxyl group of oxonic acid from the uric acid carbon 5.

3. It has been shown for the first time in the case of uric acid itself that, during formation of allantoin, the imidazolidone rings of hydroxy-acetylene-diureido-carboxylic acid (XI) split at the former uric acid position 5 and not at 4. On further degradation of allantoin, cleavage of the five-membered ring occurs again at the former uric acid carbon 5.

4. Solid allantoin contains a primary amide group; therefore it does not have the bicyclic structure XIII. Also the established oxidation mechanism does not favor the possibility that the bicyclic structure is in equilibrium with the amide form XIV in solution.

1) Wir möchten Herrn *Hübscher* auch an dieser Stelle bestens danken.

2) Auch Herrn *Frohofer* sind wir für diese Gefälligkeit zu grossem Dank verpflichtet.

3) Chemisches Institut der Universität Zürich und *CIBA AG.*, Basel.

5. The formations of oxonic acid from uric acid and from allantoin proceed over one or more open chain intermediates containing the uric acid positions 1-2-3-4(-5)-9-8-7 in this order. Such compounds could be allantoic acid (VIII) and the so far unknown hydroxy-allantoic acid (IX) and/or dehydro-allantoic acid (X).

6. The mechanisms of the peroxide and permanganate oxidations are similar. The latter degradation, however, can be carried out stepwise, whereby allantoin may be isolated as a secondary formation of a first step oxidation product.

Theodor Kocher-Institut der Universität Bern.

259. Über das Verhalten von komplexen Ionen bei der Papierchromatographie I

von B. Erdem und H. Erlenmeyer.

(13. X. 54.)

Bei der anorganischen Papierchromatographie wurde gelegentlich beobachtet, dass, wenn auch nur ein Salz bzw. von diesem nur ein Ion zur Chromatographie gelangt, das Chromatogramm bei der Entwicklung mehrere Flecken erkennen lässt. So beobachteten *H. v. Hahn, E. Sorkin & H. Erlenmeyer*¹⁾ bei der Chromatographie von Co^{++} mit Butanol/Eisessig/Acetessigester/Wasser, dass die Co^{++} -Ionen drei dicht untereinander liegende, aber deutlich abgesetzte Farbflecken bilden. Als mögliche Deutung wurde angegeben, dass die drei Flecken durch drei verschiedenartig koordinierte Ionen des Co^{++} verursacht sein könnten.

Über ein besonders gut untersuchtes Beispiel für das Auftreten solcher „Multi-spots“ berichtet *A. S. Curry*²⁾, der beobachtete, dass Kalium- oder Natrium-mono- oder -dihydrogenphosphat bei der absteigenden Chromatographie in Pyridin/Essigester/Wasser oder auch in Butanol/Wasser zwei getrennte Flecken ergeben, während Ammoniumphosphat und freie Orthophosphorsäure diesen Effekt nicht zeigen. Weiter wurde festgestellt, dass Anzahl und Rf-Werte der entstehenden Flecken vom pH der angewandten Phosphatlösung abhängt.

Auf Grund dieser sowie einiger weiterer Versuche spricht *Curry* die Vermutung aus, dass der am schnellsten wandernde Fleck dem Ion $\text{H}_2\text{PO}_4'$ zukommt, der mittlere dem Ion HPO_4'' und der langsame dem Ion PO_4''' .

¹⁾ Exper. 7, 258 (1951).

²⁾ Nature 171, 1026 (1953).