

Zur Kenntnis des alkalischen Zuckerabbaues.

Von

E. Waldmann und V. Prey.

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Wien.

(Eingelangt am 21. Juli 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 11. Okt. 1951.)

Über den Zerfall von Zuckern unter der Einwirkung von Alkalien wurde schon in einer großen Anzahl von Arbeiten berichtet¹. Dabei spielt das Methylglyoxal als Zwischenprodukt bei der Milchsäurebildung, welche als eine der letzten Stufen des alkalischen Abbaues auftritt, eine große Rolle. Es war daher das Ziel der meisten Arbeiten, das äußerst reaktionsfähige Methylglyoxal abzufangen und eindeutig nachzuweisen.

Dies wurde auf verschiedenen Wegen versucht, teils durch Abdestillieren der Reaktionsprodukte, teils durch Zugabe von Benzhydrazid² oder Phenylhydrazin³ zum Reaktionsgemisch und Bestimmung des Methylglyoxals als Osazon.

¹ A. Emmerling und G. Loges, Ber. dtsh. chem. Ges. **6**, 23 (1873); **16**, 837 (1883). — G. Pinkus, Ber. dtsh. chem. Ges. **31**, 31 (1898). — C. Neuberg und B. Rewald, Biochem. Z. **71**, 145 (1915). — C. Neuberg und W. Örtel, Biochem. Z. **55**, 496 (1913). — W. D. Dakin und H. W. Dudley, J. biol. Chemistry **15**, 135 (1913). — I. U. Nef, Liebigs Ann. Chem. **357**, 214 (1907); **376**, 1 (1910); **403**, 204 (1914). — F. Fischler und Mitarbeiter, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **157**, 1 (1926); **165**, 53 (1927); **175**, 237 (1928); **177**, 264 (1928). — K. Bernhauer und Mitarbeiter, Biochem. Z. **212**, 443, 452 (1929). — C. Enders und Mitarbeiter, Biochem. Z. **312**, 349 (1942); **313**, 265 (1942); Naturwiss. **29**, 46 (1941); **31**, 92 (1943); **32**, 82 (1944). — R. Nodzu und Mitarbeiter, Bull. chem. Soc. Japan **10**, 122, 467 (1935); **15**, 209 (1940); Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ., Ser. A **20**, 197 (1937). — R. Goto, Bull. chem. Soc. Japan **15**, 103 (1940). — Z. Dische und S. S. Robbins, Biochem. Z. **274**, 42 (1934). — W. L. Evans und Mitarbeiter, J. Amer. chem. Soc. **47**, 3085, 3098, 3102 (1925); **48**, 2665 (1926); **52**, 3680 (1930); **53**, 4384 (1931). — F. Wessely, M. Pantlitschko und J. Wratil, Wien. klin. Wschr. **60**, 25 (1949).

² G. Pinkus, Ber. dtsh. chem. Ges. **31**, 31 (1898).

³ C. Neuberg und Mitarbeiter, siehe unter Anm. 1. — W. L. Evans und Mitarbeiter, siehe unter Anm. 1.

Verschiedentlich wurde darauf hingewiesen, daß die Bildung von Methylglyoxalosazon kein eindeutiger Beweis für das Vorhandensein von Methylglyoxal beim alkalischen Abbau des Zuckers ist, da auch Acetol, Glycerinaldehyd und Dioxyaceton Methylglyoxalosazon geben⁴.

Durch die Arbeiten von *H. A. Spoehr* und *H. H. Strain*⁵ wurde dann mit der Auffindung des m-Nitrobenzhydrazids als besonders geeignetes Fällungsmittel für Methylglyoxal die Möglichkeit gegeben, dieses exakt zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, festzustellen, ob sich beim alkalischen Glucoseabbau Methylglyoxal oder Acetol in analytisch faßbaren Mengen bildet. Der Nachweis und die quantitative Erfassung des Methylglyoxals erfolgte mit m-Nitrobenzhydrazid, Acetol wurde mit Hilfe der quantitativen Methode nach *F. Fischler* und *R. Boettner*⁶ und der Reaktion nach *Baudisch*⁷ bestimmt.

Zuerst wurde die Arbeit von *W. L. Evans* und Mitarbeiter¹ überprüft; dabei wurde, wie angegeben, Glucose jeweils in $n/2$, $n/1$ und $2n$ wäßriger KOH-Lösung unter Zusatz von Phenylhydrazin in Alkohol bei 25° in einem Thermostaten 48 Std. stehen gelassen und nachher das gebildete Methylglyoxalosazon abfiltriert und identifiziert (Schmp. und Mischschmp.), die Ausbeuten durch die Auswaage des Methylglyoxalosazons bestimmt. Dabei konnten im wesentlichen die Angaben von *Evans* bestätigt werden. Als Maximum an Methylglyoxalosazon ergab sich bei $n/1$ KOH und 25° zirka 16% der theor. Menge (bez. auf einges. Glucose) (Tabelle 1).

Dieselben Versuche, bei 36° wiederholt, ergaben bei Anwendung von $n/1$ KOH-Lösung 23,2% Methylglyoxalosazon als Maximum (Tabelle 2). *Evans* gibt als Maximum die Ausbeuten bei 25° an, während er weitere Versuche nur noch bei 50° durchgeführt hat, wobei er wesentlich schlechtere Ausbeuten erhielt.

Setzt man unter genau denselben Versuchsbedingungen an Stelle von Glucose Methylglyoxal ein, so kann man je nach der Reihenfolge des Zusammengebens der Komponenten entweder theor. oder gar keine Ausbeuten an Methylglyoxal erhalten. Wird eine wäßrige Methylglyoxallösung mit der alkohol. Phenylhydrazinlösung versetzt und dann $n/2$, $n/1$ bzw. $2n$ wäßrige KOH-Lösung zugegeben, so wurde die theor. Menge Methylglyoxalosazon erhalten; im umgekehrten Falle, also durch Ver-

⁴ *G. Pinkus*, siehe unter Anm. 2. — *H. A. Spoehr* und *H. H. Strain*, J. biol. Chemistry **89**, 503 (1930). — *C. L. Bessier* und *W. L. Evans*, J. Amer. chem. Soc. **60**, 1384 (1938). — *W. L. Evans* und Mitarbeiter, J. Amer. chem. Soc. **50**, 486 (1928); **48**, 2703 (1926).

⁵ Siehe unter Anm. 4.

⁶ Z. analyt. Chem. **74**, 28 (1928); siehe auch unter Anm. 5.

⁷ Biochem. Z. **89**, 279 (1918).

mischen von Methylglyoxallösung mit $n/2$, $n/1$ oder $2n$ KOH-Lösung und nachheriger Zugabe von alkohol. Phenylhydrazinlösung wurde auch nicht eine Spur Osazon erhalten, weil das Methylglyoxal schon vor dem Zusatz des Phenylhydrazins von der Lauge völlig umgeformt worden war.

Wenn man eine Zuckerlösung in Anwesenheit von Phenylhydrazin abbaut, so besteht die Befürchtung, daß dadurch dieser Abbau zum Teil in anderer Richtung erfolgt und qualitative und quantitative Verschiebungen bei den Spaltstücken eintreten. So kann z. B. die Glucose schon vor ihrer Spaltung wenigstens teilweise mit dem Phenylhydrazin reagieren und diese Kondensationsprodukte müssen nicht unbedingt bei ihrem Abbau zu den gleichen Stoffen führen wie jener Glucoseanteil, bei dem die erst daraus gebildeten Spaltstücke mit dem Phenylhydrazin reagieren.

Um nun den Chemismus beim Zuckerabbau nicht zu verfälschen, haben wir wäßrige Kalilauge (vorläufig $n/1$ KOH) in einem Extraktor auf Glucose einwirken lassen und dieses Reaktionsgemisch ständig mit Äther extrahiert, wobei sich automatisch eine Temperatur von 36° einstellte.

Vorläufig lag uns daran, festzustellen, ob unter den angegebenen Bedingungen im Schoß des Reaktionsgemisches selbst Methylglyoxal und Acetol — (beide sind ätherlöslich) — entstehen.

Das Reaktionsgemisch war im Extraktionsgefäß eines Heißperforators eingesetzt (siehe exper. Teil). Zur Fixierung des extrahierten Methylglyoxals war im Siedekolben *m*-Nitrobenzhydrazid unter Zuhilfenahme von etwas Alkohol in Äther gelöst, eingebracht worden. In einem Vorversuch wurde eine wäßrige Methylglyoxallösung (0,063 g in 100 ccm H_2O) 8 Stdn. mit Äther in derselben Weise bei 36° perforiert, wobei 95% des Methylglyoxals im Ätherextrakt als *m*-Nitrobenzosazon nachgewiesen werden konnte. Wurden alkalische Glucoselösungen in derselben Weise mit Äther bei 36° perforiert, so konnte in keinem Falle auch nur eine Spur von Methylglyoxal nachgewiesen werden. Wurden unter denselben Bedingungen 0,063 g Methylglyoxal in 100 ccm H_2O gelöst, innerhalb von 5 Stdn. (also in 1 Min. 0,21 mg) zu 50 ccm H_2O , bzw. $n/1$ KOH-Lösung oder 2 g Glucose in 50 ccm $n/1$ KOH-Lösung, die sich jeweils im Extraktionsgefäß befanden, zugetropft, so konnte in jedem Falle Methylglyoxal im Extrakt einwandfrei nachgewiesen werden.

Es ist daher als sicher anzunehmen, daß beim alkalischen Glucoseabbau unter den gewählten Bedingungen kein Methylglyoxal entsteht oder nur intermediär in kurzlebigster Form.

Parallelversuche wurden ohne Vorlage von *m*-Nitrobenzhydrazid durchgeführt und im Ätherextrakt das Acetol nach *R. Nodzu*¹ jodometrisch quantitativ bestimmt; außerdem wurde eine *Bardisch*-Reaktion auf Acetol durchgeführt. Es konnte auch bei diesen Versuchen nicht eine Spur Acetol gefunden werden, auch eine *Fehlingsche* Reaktion war

negativ und eine polarographische Untersuchung zeigte völlige Leere des Ätherextraktes. Im Gegensatz dazu wurden bei Destillationsversuchen (100°) viel schwächer alkalischer Glucoselösungen ($m/50 \text{ Na}_2\text{CO}_3$, $m/25 \text{ Na}_2\text{CO}_3$, $m/50 \text{ KOH}$) unter Volumskonstanz von mehreren Autoren im Destillate das Auftreten jodoformbildender Substanzen festgestellt⁸.

Läßt man wieder unter denselben Bedingungen wie beim Methylglyoxal 0,204 g Acetol in 100 ccm H_2O innerhalb 5 Stdn. (0,68 mg in der Min.) jeweils zu H_2O bzw. $n/1 \text{ KOH}$ -Lösung oder Glucose in $n/1 \text{ KOH}$ -Lösung zutropfen, so konnte das Acetol in allen Fällen zu einem Teil wiedergefunden werden (Tabelle 3).

Es ist daher ebenso wie im Falle des Methylglyoxals anzunehmen, daß beim alkalischen Glucoseabbau unter den gewählten Bedingungen kein Acetol entsteht oder nur intermediär in kurzlebigster Form.

Versuche zum Studium des alkalischen Abbaues verschiedener Zucker bei gleichzeitiger Extraktion der gebildeten Spaltstücke unter verschiedenen Reaktionsbedingungen werden fortgesetzt.

Experimenteller Teil.

Es wurden jeweils 2 g Glucose in 25 ccm Lauge gelöst, 5 ccm Phenylhydrazin in 17,5 ccm Alkohol zugefügt und in einem verschlossenen Gefäß im Thermostaten 48 Stdn. stehen gelassen. Dann wurde abfiltriert, das Osazon mit verd. Alkohol gewaschen und gewogen. Nach Bestimmung des Schmp. wurde noch einmal aus verd. Alkohol umkristallisiert*.

Zu je 1,25 g Methylglyoxal wurden 5 ccm Phenylhydrazin in 17,5 ccm Alkohol zugegeben, $\frac{1}{4}$ Std. stehen gelassen und dann jeweils 25 ccm Lauge zugegeben, so daß eine Normalität der Lösung von $n/2$, $n/1$ oder $2n$ gegeben war. Das entstandene Osazon

zeigte in allen drei Fällen einen Schmp. von 141° , die Ausbeute war theoretisch.

Zu je 1,25 g Methylglyoxal wurden zuerst jeweils 25 ccm $n/2$, $n/1$ und $2n \text{ KOH}$ zugefügt, $\frac{1}{4}$ Std. stehen gelassen und anschließend 5 ccm Phenylhydrazin in 17,5 ccm Alkohol zugesetzt. Es entstand in keinem Falle ein Osazon.

Tabelle 1.
Versuche bei 25°C .

Nr.	Konz. KOH	Auswaage Osazon in g (%)	% der Literatur ⁹	Schm.* $^\circ \text{C}$
1	$n/2$	0,4 (7,1)	9,5	143,5
2	$n/1$	0,9 (16,7)	16,0	142,0
3	$2n$	0,4 (7,1)	8,5	143,0

Tabelle 2.
Versuche bei 36°C .

Nr.	Konz. KOH	Auswaage Osazon in g (%)	% der Literatur	Schmp.* $^\circ \text{C}$
1	$n/2$	1,2 (21,4)	—	142,0
2	$n/1$	1,3 (23,2)	—	142,0
3	$2n$	1,0 (17,8)	—	140,0

⁸ F. Fischler und Mitarbeiter; R. Nodzu und Mitarbeiter; F. Wessely und Mitarbeiter, siehe unter Anm. 1.

⁹ W. L. Evans und Mitarbeiter, J. Amer. chem. Soc. 48, 2665 (1926).

Extraktionsversuche.

Verwendet wurde ein Heißperforator mit einem Fassungsraum des Extraktionsgefäßes von zirka 200 ccm. In dieses wurden jeweils 50 ccm Wasser bzw. 50 ccm n/1 wäßr. KOH-Lösung oder 2 g Glucose in 50 ccm n/1 wäßr. KOH-Lösung gefüllt und mit Äther 8 Stdn. bei 36° perforiert. In manchen Fällen wurde Methylglyoxal bzw. Acetol zugetropft und nach 8 Stdn. der Äther auf seinen Gehalt an Methylglyoxal bzw. Acetol quantitativ analysiert.

Methylglyoxal mit Hilfe von 1 g m-Nitrobenzhydrazid, das im Äther mit Hilfe von etwas Alkohol gelöst war. Der ätherische Extrakt wurde eingedampft, mit H₂O versetzt und der Rückstand durch einen gewogenen Sintertiegel filtriert, mit 10%iger Essigsäure und H₂O heiß gewaschen und das gebildete m-Nitrobenzosazon des Methylglyoxals gewogen.

Acetol wurde maßanalytisch als Jodoform bestimmt.

Tabelle 3.

Nr.	Im Reaktions- gefäß	Zugetropft	Zeit (Stdn.)	% Methyl- glyoxal	% Acetol* (in H ₂ O)	Feh- ling	Ban- dich	Jodo- formk.
1	4 g Glucose in 100 ccm n/1 KOH	—	—	0	0	0	0	0
2	wie oben	—	—	0	0	0	0	0
3	wie oben	—	—	0	0	0	0	0
4	wie oben	—	—	0	0	0	0	0
5	wie oben	—	—	0	0	0	0	0
6	50 ccm H ₂ O	0,204 g Acetol in 100 ccm H ₂ O	5	0	32 (60)	+	+	+
7	50 ccm n/1 KOH	wie oben	5	0	37 (43)	+	+	+
8	wie oben	wie oben	5	0	30 (40)	+	+	+
9	2 g Glucose in 50 ccm n/1 KOH	wie oben	5	0	29,2	+	+	+
10	wie oben	wie oben	5	0	25	+	+	+
11	50 ccm H ₂ O	0,063 g Methyl- glyoxal in 100 ccm H ₂ O	5	95	0	0	0	0
12	50 ccm n/1 KOH	wie oben	5	6,6	0	0	0	+
13	wie oben	wie oben	5	6,6	0	0	0	+
14	2 g Glucose in 50 ccm n/1 KOH	wie oben	5	3,9	0	0	0	+
15	wie oben	wie oben	5	3,9	0	0	0	+

* Das Acetol, das im Wasser bestimmt worden war, ist jene Menge, die auch nach 8stündiger Perforation mit Äther im Extraktionsgefäß zurückblieb.