

472. Carl Neuberg und Max Scheuer: Neue Art des Nachweises von Methyl-glyoxal bei der biochemischen Spaltung des Zuckers.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.]

(Eingegangen am 11. November 1930.)

Eine besondere Form der enzymatischen Zucker-Spaltung, die 5. Art der Vergärung, ist mit der Zerlegung von 1 Mol. Hexose in 2 Mol. Methyl-glyoxal ($C_6H_{12}O_8 = 2CH_3.CO.COH + 2H_2O$) aufgefunden. Zur Herbeiführung dieses Zerfalls, der zu fast 100% der theoretischen Möglichkeit erreicht werden kann, muß man — aus wiederholt¹⁾ 2) dargelegten Gründen — den Zucker in Gestalt seines Phosphorsäure-esters (des Fructose-diphosphats) anwenden. Die Methyl-glyoxal-Bildung offenbart sich als der Hauptvorgang des wirklichen dissimilatorischen Kohlenhydrat-Umsatzes; sie ist demgemäß in der ganzen belebten Natur (bei Pilzen, Bakterien, grünen Pflanzenzellen, normalen wie pathologischen tierischen Geweben) nachzuweisen. Methyl-glyoxal-Bildung ist der Ausdruck der eigentlichen anaeroben Glykolyse, an die sich als sekundäre Erscheinung die Entstehung von Milchsäure bzw. von Alkohol und Kohlendioxyd jeweils anschließt. Nach vielen Belegen, mit denen diese Erkenntnis gesichert ist, verläuft die Wandlung der Kohlenhydrate bei den wichtigsten natürlichen Prozessen über die Stufe des Methyl-glyoxals, auf der dann die Differenzierung gemäß dem Stoffwechsel-Typus der verschiedenen Zellarten erfolgt.

Diese Ansammlung des Methyl-glyoxals wird nicht mit Hilfe eines Abfangverfahrens bewirkt. Sie beruht vielmehr auf einer Fraktionierung des glykolytischen Enzym-Systems, in einer Behinderung des Coferments bei erhaltener Leistung der Apozymase. Im Hinblick auf die Bedeutung, die der von ihr vollbrachten Desmolysse der 6-Kohlenstoff-Kette zum Ketonaldehyd der 3-Kohlenstoff-Reihe unverkennbar zukommt, haben wir nach weiteren Methoden gesucht, um das Ergebnis zu bekräftigen.

Das bei diesem Prozeß auftretende Methyl-glyoxal quantitativ zu erfassen und zugleich einwandfrei durch Analyse zu identifizieren, war zuerst durch Ausfällung des Keton-aldehyds mit 2,4-Dinitro-phenylhydrazin-Chlorhydrat gelungen. Sodann haben wir ein anderes Verfahren mitgeteilt, das die Abscheidung des von der Apozymase hervorgebrachten Methyl-glyoxals als Dioxim gestattet³⁾. Durch Behandlung des Vergärungs-Endgutes mit Hydroxylamin-Sulfat erhält man Methyl-glyoxim, das sich ausäthern läßt und leicht krystallisiert. Es kann durch Schmelzpunkt, Analyse, sowie Darstellung seines innerkomplexen Nickelsalzes von besonders kennzeichnendem Verhalten charakterisiert werden.

Schon früher¹⁾ haben wir angedeutet, daß auch noch eine weitere Art der Isolierung möglich ist, nämlich die Überführung des entstandenen Methyl-glyoxals in ein Derivat des Chinoxalins (Benzo-pyrazins). Wir haben jetzt festgestellt, daß bei nachträglichem Zusammenbringen des

¹⁾ C. Neuberg u. M. Kobel, Biochem. Ztschr. **207**, 232 [1929].

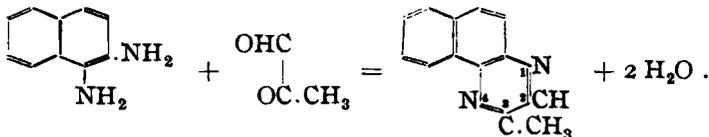
²⁾ C. Neuberg u. M. Kobel, Biochem. Ztschr. **210**, 466 [1929]; B. **63**, 1986 [1930].

³⁾ C. Neuberg u. M. Scheuer, Monatsh. Chem. (Wegscheider-Festschrift) **53/54**,

Gärguts, in dem Methyl-glyoxal sich angehäuft hat, mit einem geeigneten *ortho*-Diamin, dem α,β -Naphthylendiamin, die Bildung des Pyrazin-Abkömmlings leicht von statten geht.

Wie man sieht, kommen alle Methoden zur Isolierung des Methyl-glyoxals im Grunde auf ein Prinzip heraus. Es fußt auf der Verwendung von Reagenzien, die mit ev. unangegriffenem Kohlenhydrat-Material oder Zellleibessubstanzen unter den obwaltenden Verhältnissen sich nicht in einer der angegebenen Richtungen kondensieren. Natürlich muß jede unspezifische Umwandlung von Zucker in Methyl-glyoxal ausgeschlossen werden, was stets leicht durchzuführen ist.

Das 1.2-Naphthylendiamin, das wir als Chlorhydrat benutzten, reagiert mit dem biochemisch erzeugten Methyl-glyoxal in kürzester Zeit unter Ringschluß. Es entsteht dabei das 3-Methyl- α,β -naphthochinoxalin, oder genauer ausgedrückt, das angulare 3-Methyl-naphthopyrazin:



Diese Verbindung⁴⁾ wird als Oxalat ausgeäthert und bleibt beim Verdampfen des ätherischen Auszuges zurück. Sie krystallisiert manchmal direkt, sonst nach Entfärbung mit Tierkohle. Die weitere Reinigung geschieht durch Umkrystallisation, sowie Sublimation.

Die Aufstellung einer Bilanz, die wir schon in so vielen Fällen vorgenommen haben, erübrigte sich, da uns nur darum zu tun war, auf einem von den bisherigen Methoden unabhängigen Wege den Befund des Methyl-glyoxals erneut zu sichern.

Beschreibung der Versuche.

Das benötigte α,β -Naphthylendiamin ist nach den Angaben der Literatur zugänglich⁵⁾. Wir fanden es zweckmäßiger, die gesuchte Base aus dem zunächst zu bereitenden α -Benzol-azo- β -naphthylamin nicht durch Einwirkung von Zinkstaub und Essigsäure darzustellen, sondern den roten Azokörper mit Stannochlorid⁶⁾ reaktiv zu spalten. So erhält man unmittelbar das Dichlorhydrat. Dasselbe besitzt die erforderliche Löslichkeit in Wasser, während man bei der ersten Arbeitsweise über das fast ganz unlösliche Sulfat zunächst zur freien Base und von ihr aus zum salzsauren Salz gelangt.

Falls im Chlorhydrat mit H_2S noch Zinn nachzuweisen ist, wird seine 10-proz. Lösung in heißem Wasser mit Tierkohle gekocht und an der Saugpumpe schnell filtriert. Darauf wird die Verbindung mit dem halben Volumen rauchender HCl aus der Flüssigkeit wieder ausgefällt, mit salzsäurehaltigem Alkohol, dann mit Alkohol-Äther (1:3) und schließlich 2-mal mit trockenem Äther gewaschen. Farblose Prismen vom Schmp. 267° und von der Zusammensetzung $\text{C}_{10}\text{H}_8(\text{NH}_2)_2, 2\text{HCl}$. Der Salzsäure-Gehalt läßt sich in großer Verdünnung gegen Phenol-phthalein titrieren (0.1400 g Sbst. verbraucht 12.1 ccm $n/_{10}$ -NaOH; ber. 12.12 ccm); dabei muß man rasch arbeiten, da beim Stehen leicht Dunkelfärbung eintritt.

⁴⁾ Sie kann die Methylgruppe auch in Stellung 2 des Pyrazin-Ringes tragen.

⁵⁾ E. Bamberger u. W. J. Schieffelin, B. 22, 1374 [1889].

⁶⁾ T. A. Lawson, B. 18, 796 [1885].

Das freie Diamin, das man mit Lauge abscheidet, färbt sich in feuchtem Zustande leicht dunkel. Man kann es übrigens durch Sublimation im Vakuum (Ölbad 120°, 13 mm) unschwer in weißen, glänzenden Blättchen vom Schmp. 95° gewinnen.

Als Enzym-Material diente ein Alkohol-Äther-Trockenpräparat des *Bacterium lactis aerogenes*, das bereits vor 15 Monaten hergestellt worden war³⁾. Die Bakterien waren auf Fleischextrakt-Bouillon bzw. Fleischextrakt-Agar und Bierwürze gezüchtet und in üblicher Weise von Resten des Nährbodens befreit. Die abgeschleuderten Mikroben wurden sofort in mehreren Portionen, von welchen jede ca. 15—17 g Trockensubstanz entsprach, mit einem Gemenge von 600 ccm absol. Alkohol und 200 ccm absol. Äther 8 Min. verrührt, dann abgesaugt und mehrmals mit trockenem Äther nachgewaschen. Das Produkt wurde in einem Porzellanmörser verrieben und im Vakuum-Exsiccator über Phosphoroxyd nebst Paraffin getrocknet. Das Material entstammte Kulturen, die wenige Tage nacheinander angelegt waren, es wurde gemischt und seither in einer verschlossenen Glasstöpsel-Flasche aufbewahrt. Wie die Experimente lehren, ist das Methylglyoxal liefernde Agens, die „Glykolase“, von auffallend großer Beständigkeit, wie dies auch schon für das Enzym aus Tabakblättern bzw. Hefe beschrieben worden war⁷⁾.

Beispiel.

Hauptversuch: 1000 ccm 4-proz. Magnesium-hexose-diphosphat-Lösung, 10 g Trocken-Bakterien, 10 ccm Toluol. — Vergleichsversuch. 1000 ccm 4-proz. Magnesium-hexose-diphosphat-Lösung, 10 ccm Toluol.

Die Ansätze wurden 46 Stdn. im Brutschrank bei 37° belassen. Der Hauptansatz wurde dann unter Zugabe von etwas Fuller-Erde zentrifugiert und die abgeschleuderte Flüssigkeit noch filtriert. Zu 930 ccm klaren Filtrats wurde in einer Glasstöpsel-Flasche eine Lösung von 6 g α,β -Naphthylendiamin-Hydrochlorid in 60 ccm heißem Wasser gefügt, wobei ein Niederschlag auftrat (vermutlich von freiem und phosphorsaurem Naphthylendiamin). Das Gemisch wurde 2 Stdn. auf der Maschine geschüttelt und dann im Faust-Heimschen Verdunstungskasten bei Zimmer-Temperatur zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mehrmals mit warmem Alkohol gründlich verrieben, der Alkohol-Auszug filtriert und im Vakuum bei 37° eingedampft. Um ein alkalisches Medium zu meiden, solange noch Kohlenhydrat-Substrat zugegen sein konnte, wurde das beim Verjagen des Alkohols zurückgebliebene Chlorhydrat mit Natriumoxalat-Lösung und etwas freier Oxalsäure in das Oxalat verwandelt und dieses 4-mal, ohne zu filtrieren, ausgeäthert⁸⁾. Die vereinigten Äther-Auszüge, die dann ev. vom äther-unlöslichen Diamin-Oxalat getrennt werden müssen, werden zur Entfernung der Oxalsäure mit Sodalösung durchgeschüttelt, was unbedenklich geschehen darf, da jetzt ja kein Zucker mehr anwesend sein kann. Die sofort abgehobene Äther-Schicht wurde mit Natriumsulfat getrocknet, über Tierkohle filtriert und schließlich vom Äther befreit. Gewicht des trocknen Rückstandes im Hauptversuch 2 g (im Vergleichsversuch 0.02 g, die Verunreinigungen sind). Das ziemlich dunkle Rohprodukt wurde darauf mit kalter 20-proz. Schwefelsäure behandelt, worin das 3(2)-Methyl-naphthopyrazin leicht löslich ist, während etwa noch vorhandenes überschüssiges Diamin als unlösliches Sulfat zurückbleibt. Aus dem Hauptversuch war überhaupt nur wenig Unlösliches abgeschieden. Die schwefelsaure Flüssigkeit wurde mit viel Tier-

⁷⁾ M. Kobel u. M. Scheuer, *Biochem. Ztschr.* **216**, 223 [1929]; vergl. auch C. Neuberg u. A. Gottschalk, *Biochem. Ztschr.* **161**, 244 [1925].

⁸⁾ Eine weitere Extraktion aus alkalischer Lösung hinterließ kein wägbares Residuum.

kohle digeriert und abgesaugt; die Kohle wurde mit 20-proz. Schwefelsäure nachgewaschen. Das Filtrat wies eine für Naphthopyrazine charakteristische intensive Gelbfärbung auf, die bei Alkali-Zugabe sofort verschwand. Die Lösung wurde langsam unter Umrühren und Kühlung in ca. 8-proz. Natronlauge eingegossen; dabei schied sich die freie Chinoxalin-Base anfangs als eine Emulsion ab, die sich aber bald in Flocken verwandelte. Diese wurden nach einigem Stehen abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und im Vakuum getrocknet. Erhalten wurden so 1.4 g Substanz vom Schmp. 75–80°.

Im Vergleichsversuch, der natürlich nicht zentrifugiert zu werden brauchte, aber ebenso mit salzsaurem Naphthylendiamin behandelt wurde, lösten sich von dem geringen Äther-Rückstand in der Schwefelsäure lediglich Spuren mit dunkler Farbe. Die mit Tierkohle geklärte Flüssigkeit war jedoch vollkommen farblos und gab mit Natronlauge keine Trübung. Aus dem Hexose-phosphat allein war kein Methyl-naphthopyrazin hervorgegangen, wie es zu erwarten stand.

Zur weiteren Reinigung wurde die im Hauptansatz isolierte Verbindung aus Ligroin unter Anwendung von Tierkohle umkrystallisiert. Da das Methyl-naphthopyrazin in Ligroin ziemlich löslich ist, war es nötig, das klare Filtrat bis auf 2–3 ccm einzuengen und den beim Abkühlen entstehenden Krystallbrei, von dem sich keine Flüssigkeit mehr abtrennen ließ, direkt auf Ton abzapressen. Man erhielt so 0.85 g schwach gelbliche Krystalle vom Schmp. 88°; 0.7 g davon wurden aus wäßrigem, ca. 25-proz. Alkohol umkrystallisiert und ergaben 0.4 g farblose Substanz vom Schmp. 95°.

Für die Analyse wurde der so gereinigte Körper noch im Vakuum sublimiert (Ölbad ca. 120°, 12 mm), wodurch jedoch der Schmelzpunkt nicht mehr anstieg.

4.980 mg Stbst.: 14.630 mg CO₂, 2.360 mg H₂O. — 2.505 mg Stbst.: 0.322 ccm N (28°, 759 mm, 50-proz. KOH).

C₁₃H₁₀N₂ (194). Ber. C 80.41, H 5.15, N 14.43. Gef. C 80.14, H 5.26, N 14.56.

Zum Vergleich wurde das *angulare* Methyl-naphthopyrazin noch aus synthetisch bereitetem Methyl-glyoxal hergestellt: Zu einer Auflösung von 4.6 g α,β -Naphthylendiamin-Dichlorhydrat in 100 ccm heißem Wasser wurden 67 ccm 2.15-proz. Methyl-glyoxal⁹⁾ gefügt. Die Reaktion setzte unter Gelbfärbung sofort ein und wurde durch 1-stdg. Erwärmen auf dem Wasserbade beendet. Durch die mit Natronlauge alkalisch gemachte Flüssigkeit wurde Wasserdampf geleitet. Aus dem unter Eiskühlung aufgefundenen Destillat krystallisierte sogleich das Methyl-naphthopyrazin. Etwas mit übergehendes unverbrauchtes Diamin bleibt zunächst in Lösung; erst bei längerem Stehen bilden sich Zersetzungsprodukte desselben, die als dunkle Flocken ausfallen. Die ausgeschiedene Pyrazin-Base wurde deshalb bald abgesaugt. Die Verbindung ist bereits ziemlich rein, jedoch sind für ihre vollständige Übertreibung beträchtliche Wasserdampf-Mengen nötig, und in dem Destillat bleibt das Methyl-naphthopyrazin teilweise gelöst. Für quantitative Zwecke empfiehlt es sich daher, die Reaktionsflüssigkeit alkalisch auszuäthern und den Äther-Auszug dann über das Oxalat aufzuarbeiten, wie es für den biochemischen Ansatz beschrieben ist. Die Rohsubstanz wurde einmal aus wäßrigem Alkohol und dann aus Ligroin umkrystallisiert; Schmp. 95°.

⁹⁾ Bereitet nach der Vorschrift von C. Neuberger, E. Färber, A. Levite u. E. Schwenk, Biochem. Ztschr. 83, 264 [1917].

Für die Analyse wurde die Substanz noch aus dem Ölbad (120°, 13 mm Druck) sublimiert.

4.912 mg Sbst.: 14.475 mg CO₂, 2.220 mg H₂O. — 2.982 mg Sbst.: 0.373 ccm N (19°, 751 mm, 50-proz. KOH).

C₁₃H₁₀N₂ (194). Ber. C 80.41, H 5.15, N 14.43. Gef. C 80.39, H 5.06, N 14.45.

Das Methyl-naphthopyrazin löst sich leicht in 20-proz. H₂SO₄ mit intensiv gelber Farbe; in konz. H₂SO₄ geht es mit grenadinroter Nuance über, die bei Verdünnen mit H₂O in gelb umschlägt.

Der Misch-Schmelzpunkt der Methyl-naphthopyrazine aus synthetischem und biochemisch entstandenem Methyl-glyoxal blieb unverändert.

473. W. Ipatiew, B. Dolgow und J. Wolnow: Über ein neues Verfahren zur Darstellung von Mesitylen.

(Eingegangen am 17. September 1930.)

Die Kondensation von Aceton unter dem Einfluß von wasserentziehenden Mitteln und Katalysatoren bei verschiedenen Temperaturen ist bereits in einer Reihe von Arbeiten¹⁾ ausführlich beleuchtet worden. Freer und Lachman²⁾ sättigten das Aceton mit trockenem Chlorwasserstoff und beobachteten hierbei die Bildung niederer sauerstoffhaltiger Kondensationsprodukte, z. B. des Phorons und des Mesityloxyds. Kane¹⁾ erhielt beim Steigern der Temperatur Produkte tiefergehender Kondensation, darunter auch das Mesitylen. Küster und Stallberg³⁾, sowie später Noyes⁴⁾ arbeiteten für das Mesitylen ein Darstellungs-Verfahren aus, bei welchem sie Schwefelsäure auf Aceton einwirken ließen und eine 13.5—17.2-proz. Ausbeute erzielten.

In einer Reihe von Arbeiten ist von Ipatiew und Petrow die Kondensation des Acetons unter der Einwirkung von Aluminiumhydroxyd und Zinkchlorid bei hohen Temperaturen und Drucken ausführlich besprochen worden⁵⁾. Es konnte unter den beschriebenen Bedingungen die Bildung einer ganzen Reihe von Kondensationsprodukten, beginnend bei den niedersten und bei Verbindungen vom Sesquiterpen-Typus endend, beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit interessierte uns hauptsächlich der Mechanismus der Kondensations-Reaktion, die das Aceton in Mesitylen umwandelt. Veranlassung zu dieser Untersuchung gaben die von W. Ipatiew jun. bei seinen Versuchen über die Verdrängung der Metalle der 5. Gruppe aus ihren Chloriden (SbCl₃, BiCl₃) durch Wasserstoff in Aceton-Lösung unter Druck gemachten Beobachtungen. Bei diesen Versuchen wurde unter anderem eine tiefgehende Kondensation des Lösungsmittels, ohne Beziehung zu den verwendeten Salzen, beobachtet; hierzu sei als hochinteressant bemerkt, daß die Kondensation sogar bei Verdünnung der Lösungen mit Wasser stattfindet. Dieser letztere Umstand legt die Annahme nahe, daß die Reaktion

¹⁾ Kane, Ann. Physik 44, 475 [1838]; Descudé, Ann. Chim. Phys. [7] 29, 493 [1903]; Mannich, B. 41, 574 [1908]; Hoffman, Journ. Amer. chem. Soc. 31, 723 [1909]; Fittig, A. 110, 32 [1859]; Baeyer, A. 140, 297, 301 [1866]; Heintz, A. 187, 250 [1877].

²⁾ Amer. chem. Journ. 19, 887 [1897].

³⁾ A. 278, 210 [1893].

⁴⁾ Amer. chem. Journ. 20, 807 [1898].

⁵⁾ B. 60, 1956 [1927].