

105. Th. Bersin: Zur Kenntnis des Methyl-glyoxals.

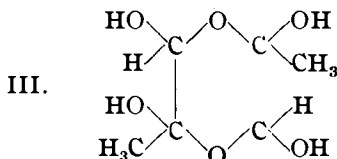
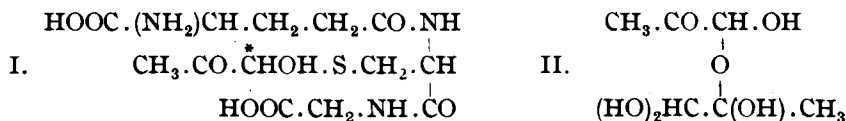
[Aus d. Chem. Institut d. Universität Marburg/Lahn.]

(Eingegangen am 4. Februar 1936.)

Eine kürzlich erfolgte Veröffentlichung von Schubert¹⁾ gibt Veranlassung, über nachfolgende Versuche zu berichten, die geeignet sind, einiges Licht auf die Umwandlung des aus Glucose entstehenden Methylglyoxals in Milchsäure unter dem Einfluß der Keton-aldehyd-Mutase zu werfen. Seit Lohmann²⁾ ist bekannt, daß diese vorzugsweise im Gehirn³⁾ verlaufende Dismutation an die Gegenwart von Glutathion (G.SH) gebunden ist, während die Milchsäure-Bildung im Muskel aus Glykogen über die Brenztraubensäure verläuft und des G.SH anscheinend nicht bedarf.

Es ist darauf aufmerksam gemacht worden⁴⁾, daß als Substrat des Enzyms Keton-aldehyd-Mutase ein Halbmercaptal aus je 1 Mol. Methylglyoxal und G.SH anzusehen ist. Von Schubert ist nun diese Substanz zum erstenmal isoliert worden. Im Hinblick auf die von Meerwein und Schmidt⁵⁾ geäußerte Hypothese der Aldehyd-Dismutation unter Zwischenbildung eines bimolekularen Additionsprodukts aus Aldehyd und Aldehyd-Hydrat interessierte die Molekulargröße des Schubertschen Halbmercaptals. Es erwies sich in wäßriger Lösung als monomolekular. Während nämlich eine Lösung des Methyl-glyoxals in Wasser auf Grund der Schmelzpunkts-Depression doppeltes Molekulargewicht zeigt, findet man nach Zusatz von äquimolekularen Mengen α -Thio-milchsäure bzw. G.SH eine Depression, die auf die Bildung eines monomeren Halbmercaptals $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{S} \cdot \text{R}$ hinweist. Das Substrat der Methyl-glyoxalase besitzt demnach die Konstitution eines racemischen Acetol-Derivats (I).

Gemeinsam mit Hrn cand. chem. H. Nafziger wurde nun gefunden, daß I unter dem Einfluß von Flavin-Enzym⁶⁾ eine Säure bildet, die allem Anschein nach Milchsäure ist. Die präparativen Versuche sind noch nicht abgeschlossen und sollen in anderem Zusammenhang mitgeteilt werden.



Die in wäßriger Lösung dimolekular auftretende Form des Methylglyoxals konnte in Substanz gefaßt werden. Sie erwies sich als ein Hydrat

1) Journ. biol. Chem. **111**, 671 [1935].2) Biochem. Ztschr. **254**, 332 [1932], **262**, 152 [1933].3) Biochem. Journ. **29**, 811 [1935].4) Bersin, *Ergebn. Enzym-Forsch.* **4**, 68 [1935].5) A. **444**, 230 [1925].

6) Für die Überlassung des kostbaren Präparates danke ich Hrn. Dr. Th. Wagner-Jauregg (Heidelberg).

von definiertem Siedepunkt. Auf Grund der Zerewitinoff-Bestimmung ergibt sich für diese Verbindung die Formel II oder III. In Eisessig zerfällt dieses farblose dimolekulare Methyl-glyoxal-Hydrat unter Gelbfärbung in seine Komponenten Wasser und Methyl-glyoxal. Auch bei der Destillation unter Atmosphärendruck findet eine reversible Dissoziation unter Gelbfärbung des Dampfes statt. Bei vermindertem Druck läßt sich die Verbindung unzersetzt destillieren.

Dem Marburger Universitätsbund und der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft sei auch an dieser Stelle für Unterstützung gedankt.

Beschreibung der Versuche.

Dimolekulares Methyl-glyoxal-Hydrat.

Das Umsetzungsprodukt von 2.51 Aceton mit 210 g SeO_2 ⁷⁾ lieferte bei der fraktionierten Destillation mit langer Kolonne (Raschig-Ringe) einen farblosen Vorlauf (3.50 g), Sdp.₁₄₋₁₇ 25—27°, der bei nochmaliger Fraktionierung bei Sdp. ₇₄₃ 104—105° überging. Das erhaltene Produkt reagierte sauer (vergl. die saure Natur des Chloral-Hydrats⁸⁾), reduzierte Fehlingsche Lösung und ammoniakalisches Silbernitrat schon in der Kälte und lieferte bei der Umsetzung mit Phenyl-hydrazin in Essigsäure und Natriumacetat das Osazon des Methyl-glyoxals. Schmp. 148^{0.9)}.

31.82 mg Stbst.: 6.28 ccm N (15°, 726 mm).

$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4$. Ber. N 22.23. Gef. N 22.35.

Bei der Zerewitinoff-Bestimmung (ausgeführt von Hrn. cand. chem. H. Rathjen) lieferten 0.1714 g Stbst. in Anisol 96.7 ccm CH_4 (15°, 739.5 mm), entspr. 2.09 Mol. ber. für $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_6$. Eine farblose Lösung des gelben polymeren Methyl-glyoxals (0.4341 g) in Wasser (20 g) zeigte $\Delta = 0.300^\circ$.

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4$. Ber. Mol.-Gew. 144. Gef. 131.

Demnach entsteht beim Auflösen des polymeren Keton-aldehyds in Wasser das dimolekulare Hydrat $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.

Eine Lösung von 0.3326 g des dimolekularen Methyl-glyoxal-Hydrats in 20 g Eisessig zeigte $\Delta = 2.125^\circ$.

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Mol.-Gew. Ber. 180, }
 $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$. „ „ 45, } gef. 31.

Der weitgehende Zerfall wird auch durch die für das monomere Methyl-glyoxal charakteristische Gelbfärbung der Lösung angezeigt. Eine wäßrige Lösung des dimolekularen Hydrats oder gar das Hydrat selbst muß übrigens schon Harries¹⁰⁾ in den Händen gehabt haben.

Halbmercaptale des Methyl-glyoxals.

Eine Lösung von 0.4341 g wasser-freiem Methyl-glyoxal und 0.6452 g α -Thio-milchsäure in 20 g Wasser zeigte $\Delta = 0.537^\circ$.

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{S}$. Mol.-Gew. Ber. 179, gef. 186.

Das Hydrat-Wasser ist demnach unter Aufspaltung durch das Thiol verdrängt worden. Die elektrolytische Dissoziation der Carboxylgruppe der Thio-milchsäure sollte eigentlich eine unter 179 liegende Zahl ergeben. Möglicherweise liegt hier doch noch ein Teil als dimeres Halbmercaptal im Gleichgewicht vor.

⁷⁾ G. Hahn u. O. Schales, B. **67**, 1821 [1934].

⁸⁾ Euler, B. **39**, 347 [1906].

⁹⁾ v. Pechmann, B. **20**, 2543 [1887].

¹⁰⁾ B. **38**, 1632 [1905].

Beim Halbmercaptal des Gluthathions ist das indes nicht der Fall. Eine Lösung von 0.3809 g kryst. Glutathion (Hoffmann-La Roche) und 0.0894 g Methyl-glyoxal in 20 g Wasser zeigte $\Delta = 0.147^{\circ}$.



Methyl-glyoxal-Glutathion und Flavin-Enzym.

Die Umwandlung des Halbmercaptals unter dem Einfluß von Flavin-Enzym wurde manometrisch bei 36° verfolgt. Als Puffer diente eine 0.2-molare Natriumbicarbonat-Lösung, die im Gleichgewicht mit einem Gasgemisch aus 95% N_2 und 5% CO_2 war. Die Säure-Stufe wurde mit Hilfe einer Glas-Elektrode zu $pH = 8.2$ bestimmt. Substrat, Puffer-Lösung und die übrigen Zusätze befanden sich im Hauptgefäß, das Enzym-Präparat im Anhang. Das Gesamtvolumen betrug 2.2 ccm. Zu diesem Versuch wurde das Methyl-glyoxal aus Dioxy-aceton durch Destillation mit Phosphorpentoxyd dargestellt.

Tabelle I.

Zeit in Min.	Ansatz: 0.5 ccm Puffer-Lösung + 2.0 mg Methyl-glyoxal + 0.4 mg Glutathion		
	Spontane Säure-Bildung	+ Flavin-Enzym	
		0.25 mg	0.50 mg
5	7	12	10
10	13	18	19
15	16	25	27
20	19	28	32
25	21	34	39
30	23	36	40 cmm CO_2

Tabelle II.

Gesamt-Vol.: 2.5 ccm, Temp.: 36° , $pH = 8.2$ Zeit in Min.	0.5 ccm 0.2-mol. Natriumbicarbonat-Lösung + 2.0 mg Methyl-glyoxal			
	—	+ 1.0 mg Glutathion		
		—	+ Flavin-Enzym	
		1.0 mg	2.0 mg	
5	42	44	46	49
10	53	52	58	65
15	—	—	68	77
20	57	61	76	86
30	—	—	92	105
40	60	70	105	121
50	—	—	119	132
60	63	75	127	142 cmm CO_2

Die Zahlen der Tabelle II entstammen 4 gleichlautenden Versuchs-Reihen. In diesen Ansätzen befanden sich Puffer, G.SH und Enzym-Lösung im Hauptgefäß, Methyl-glyoxal im Anhang.