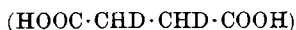


168. Chemische und biochemische Dehydrierung einer
Äthan- α -d, α' -d-dicarbonsäure

von H. Erlenmeyer, W. Schoenauer und H. Süllmann.

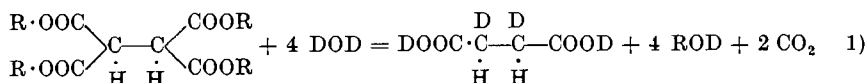
(2. XI. 36.)

Wir gewannen eine Bernsteinsäure mit zwei symmetrisch in α, α' -Stellung befindlichen Deuteriumatomen



auf zwei verschiedenen Wegen.

Äthan- $\alpha, \alpha', \beta, \beta'$ -tetracarbonsäure-tetraäthylester wurde als 33-proz. D_2O -Lösung im geschlossenen Rohr auf 150° erwärmt, wobei nach Gleichung 1)



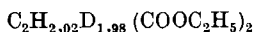
die gewünschte Säure in 90-proz. Ausbeute entsteht.

Als zweite Methode zur Darstellung wählten wir die direkte Deuterierung von Fumarsäurediäthylester, auf welchem Wege inzwischen auch von *M. T. Leffler* und *R. Adams*¹⁾ die gleiche Säure gewonnen wurde.

Die Isotopenanalyse des Äthan- α -d, α' -d-dicarbonsäure-diäthylesters ergab:

$$0,1262 \text{ g} \rightarrow 0,014186 \text{ g D}_2\text{O}; x = 1,98$$

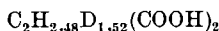
und entsprechend die Formel:



Die Isotopenanalyse der Äthan- α -d, α' -d-dicarbonsäure ergab:

$$0,0739 \text{ g} \rightarrow 0,009407 \text{ g D}_2\text{O}; x = 1,52$$

und entsprechend die Formel²⁾:



Im folgenden wollen wir über Dehydrierungsversuche mit dieser isotopen Bernsteinsäure berichten. Es wurde mit Selenioxyd und sodann mit Succinodehydrase eine Dehydrierung zu Fumarsäure vorgenommen. Des weiteren wurde das Verhalten dieser Säure im *Thunberg*-Versuch und beim Atmungsversuch nach *Warburg* untersucht.

¹⁾ Am. Soc. 58, 1551 (1936).

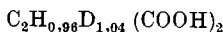
²⁾ Den geringeren Gehalt an D gegenüber dem Ester führen wir auf Austauschverluste bei der mit alkoholischer Kalilauge vorgenommenen Verseifung zurück.

1. *Dehydrierung des Äthan- α -d, α' -d-dicarbonsäure-diäthylesters mit Selendioxyd.*

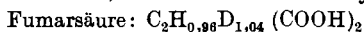
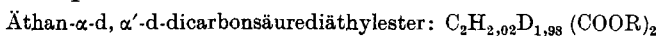
Die Dehydrierung wurde nach den Angaben von *S. Astin, A. C. C. Newman* und *H. L. Riley*¹⁾ mit Selendioxyd vorgenommen. 8,7 g Ester wurden mit 11,2 g Selendioxyd auf 170° erwärmt. Nach 11 Stunden wurde der Versuch unterbrochen und der Fumarsäure-diäthylester isoliert und durch Destillation gereinigt. Aus dem Verseifungsprodukt liess sich durch zweimalige Krystallisation aus Wasser eine reine Fumarsäure gewinnen. Die Isotopenanalyse ergab:

$$0,1198 \text{ g} \rightarrow 0,01066 \text{ g D}_2\text{O}; x = 1,04$$

entsprechend der Formel:



Fragt man, in welchem Verhältnis bei diesem Dehydrierungsversuch aus den D—C—H-Gruppen H und D abgespalten wurde, so lässt sich auf Grund der Isotopenformeln vom Ausgangsstoff und Endprodukt:



folgendes berechnen.

$$\text{Wasserstoff des Äthan-}\alpha\text{-d, }\alpha'\text{-d-dicarbonsäure-esters} = \frac{1}{4}(\text{H}_{2,02}\text{D}_{1,98}) = \text{H}_{0,505}\text{D}_{0,495}$$

$$\text{Dehydrierter Wasserstoff} = \frac{1}{2}(\text{H}_{2,02}\text{D}_{1,98} - \text{H}_{0,98}\text{D}_{1,04}) = \text{H}_{0,53}\text{D}_{0,47}$$

Das Ergebnis besagt, dass im ursprünglichen Äthan- α -d, α' -d-dicarbonsäure-ester in der Kohlenwasserstoffgruppe der Säure ein Atom Wasserstoff die Isotopenformel $\text{H}_{0,505}\text{D}_{0,495}$ hat. Der bei der Dehydrierung entfernte Wasserstoff hat für ein Atom die Formel $\text{H}_{0,53}\text{D}_{0,47}$. Aus der Gegenüberstellung der Werte geht hervor, dass bei der Dehydrierungsreaktion die H-Atome in einem nur wenig über die Versuchsgenauigkeit von $\pm 0,01$ hinausgehenden Betrag bevorzugt werden.

2. *Biochemische Dehydrierung der Äthan- α -d, α' -d-dicarbonsäure mit Methylenblau in Gegenwart von Succinodehydrase.*

Zur Gewinnung eines Succinodehydrase-Präparates wurden 400 g zerkleinerter und gewaschener Rindermuskel mit 600 cm³ einer 0,1-m. Na₂HPO₄-Lösung unter Toluolzusatz $\frac{1}{2}$ Stunde geschüttelt. Zu diesem Präparat gaben wir 5 g Äthan- α -d, α' -d-dicarbonsäure, als Kaliumsalz in Wasser gelöst. Daraufhin wurde der ganze Ansatz gut evakuiert. Durch einen Tropftrichter wird allmählich — entsprechend der Entfärbung — eine Lösung von Methylenblau zugeführt. Nach 6 Stunden wurde der Versuch unterbrochen. Die Aufarbeitung erfolgte in ähnlicher Weise, wie dies *F. G. Fischer*²⁾ angegeben hat. Die resultierenden Ätherauszüge wurden mit Tierkohle

¹⁾ Soc. 1933, 391.

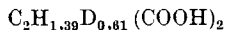
²⁾ B. 60, 2257 (1927).

gereinigt und im Rückstand durch Titration der Gehalt an Fumarsäure bestimmt. Die Isolierung der Fumarsäure aus dem Säuregemisch erfolgte in Anlehnung an Angaben von *A. Hahn* und *W. Haarmann*¹⁾. Die gewonnene reine Fumarsäure wurde nochmals aus Wasser umkrystallisiert.

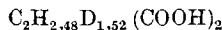
Isotopenanalyse:

$$0,0974 \text{ g geben } 0,005121 \text{ g D}_2\text{O}; x = 0,61$$

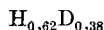
entsprechend der Formel:



In der ursprünglichen Äthan- α -d, α' -d-dicarbonsäure von der Formel



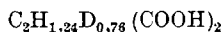
entspricht in der Kohlenwasserstoffgruppe einem Wasserstoffatom die Isotopenformel:



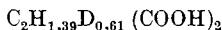
Der während des Dehydrierungsversuchs verlorene Wasserstoff lässt sich berechnen:

$$\frac{1}{2} (\text{H}_{2,48}\text{D}_{1,52} - \text{H}_{1,39}\text{D}_{0,61}) = \text{ein Wasserstoff} = \text{H}_{0,345}\text{D}_{0,455}$$

Bei symmetrischem Verlust von H und D würde von der Fumarsäure zu erwarten sein die Formel



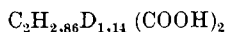
gegenüber der wirklich gefundenen Formel:



Es verschwinden also beim Übergang Bernsteinsäure \rightarrow Fumarsäure 20% mehr D-Atome und entsprechend 20% weniger H-Atome als dem symmetrischen Abbau entspricht. Dass diese Ungleichheit im Verlust von H und D nicht einfach einer spezifischen Dehydrierung entspricht, erfolgt aus der Zusammensetzung der nicht dehydrierten Bernsteinsäure, die nach der Dehydrierung mit der entstandenen Fumarsäure in der Lösung verblieben ist. Sie wurde gleichzeitig mit der Fumarsäure wie angegeben isoliert und durch dreimaliges Umkrystallisieren aus Wasser gereinigt²⁾. Die Isotopenanalyse ergab:

$$0,1212 \text{ g } \rightarrow 0,011628 \text{ g D}_2\text{O}; x = 1,14$$

entsprechend der Formel:



Das System Bernsteinsäure-Fumarsäure in Gegenwart von Succinodehydrase ist von grossem Interesse, da man annehmen muss, dass es ein von einem Enzym katalysiertes Redoxsystem darstellt. Bernsteinsäure ist an und für sich eine nicht leicht zu oxydierende

¹⁾ Z. Biologie **87**, 107 (1928).

²⁾ Da die ursprüngliche Säure zwei asymmetrische Kohlenstoffatome aufweist — siehe *Leffler* und *Adams*, loc. cit. —, konnte ein asymmetrischer enzymatischer Abbau vermutet werden. Die Restsäure erwies sich jedoch als optisch inaktiv.

Säure, wird aber von den verschiedensten Organismen sehr leicht oxydiert, eine Beobachtung, die zu der Entdeckung des sehr spezifisch auf dieses System eingestellten Enzyms geführt hat. Weitere Untersuchungen machten es wahrscheinlich, dass Bernsteinsäure und Fumarsäure in Gegenwart der Succinodehydrase ein echtes reversibles Redoxsystem darstellen. *J. Lehmann*¹⁾ konnte in Gegenwart von Metylenblau das Potential des Bernsteinsäure-Fumarsäure-Succinodehydrase-Redoxsystems elektrometrisch messen.

Unsere Messungen, die dartun, dass man ausgehend von einer Bernsteinsäure $C_2H_{2,48}D_{1,52}(COOH)_2$ in Gegenwart von Metylenblau und Succinodehydrase eine Fumarsäure erhält von der Formel $C_2H_{1,39}D_{0,61}(COOH)_2$, die im Gleichgewicht steht mit einer Bernsteinsäure der Formel $C_2H_{2,85}D_{1,14}(COOH)_2$, werden aufs beste durch die Annahme eines solchen echten reversiblen Redoxsystems gedeutet, dessen Besonderheit darin liegt, dass in dem Gleichgewicht:

$$\frac{[\text{Fumarat}] \times [\text{Leukometylenblau}]}{[\text{Succinat}] \times [\text{Metylenblau}]} = K$$

der Wasserstoff nach dem Übergang Bernsteinsäure \rightarrow Leukometylenblau im Leukometylenblau in einer austauschfähigen Bindung vorliegt. Es wird sich stets die Deuterium-Leukometylenblauverbindung mit dem in grossem Überschuss vorhandenen H_2O ins Gleichgewicht setzen, wobei Wasserstoff-Metylenblau entsteht, so dass bei der rückläufigen Hydrierung der Fumarsäure zu Bernsteinsäure fast ausschliesslich H-Atome angelagert werden und eine gegenüber dem Ausgangsprodukt „leichtere“ Bernsteinsäure entsteht. Bei sehr grosser Geschwindigkeit der Dehydrierungs- und Hydrierungs-Reaktion würden sehr bald die D-Atome auf das Redoxsystem und das Lösungswasser gleichmässig verteilt sein. Der gefundenen Fumarsäure $C_2H_{1,39}D_{0,61}(COOH)_2$ entspricht rechnerisch eine Bernsteinsäure $C_2H_{2,78}D_{1,22}(COOH)_2$, während wir in annähernder Übereinstimmung finden $C_2H_{2,85}D_{1,15}(COOH)_2$.

Die zweite mögliche Annahme, um die vorliegenden Tatsachen zu deuten, würde nach *H. Wieland* eine austauschfähige Enzym-Substrat- d. h. Succinodehydrase-Bernsteinsäureverbindung vermuten, wodurch ebenfalls eine „leichtere“ Bernsteinsäure und daraus eine entsprechend „leichtere“ Fumarsäure sich bilden würde. *R. Sonderhoff* und *H. Thomas*²⁾ diskutieren diese Möglichkeit bei der von ihnen untersuchten Dehydrierung der Tri-deuterio-essigsäure zu Bernsteinsäure. Erst weitere Untersuchungen werden über die Berechtigung einer solchen Annahme entscheiden³⁾.

¹⁾ Skandinav. Arch. Physiologie **58**, 173 (1930).

²⁾ Naturwiss. **24**, 570 (1936).

³⁾ Intermediär reversible Redoxsysteme können wohl bei den meisten enzymatischen Oxydationen angenommen werden, selbst wenn auch das endgültige Hydrierungsprodukt Wasser ist.

Aus den hier mitgeteilten Daten kann man jedoch schon die Tatsache entnehmen, dass bei einer symmetrischen Verteilung von der Formel $D-\dot{C}-H$ die biologischen Dehydrierungsenzyme kein spezifisches Unterscheidungsvermögen gegenüber der C—H- und der C—D-Bindung zeigen. Dass jedoch in bezug auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei biologischen Vorgängen zwischen der Bernsteinsäure und der Äthan- α -d, α' -d-dicarbonensäure Unterschiede bestehen, zeigen die beiden folgenden Versuche.

3. *Thunberg-Versuch.*

Wir haben in der *Thunberg'schen* Versuchsanordnung¹⁾ mit Methylenblau als Wasserstoffakzeptor die Äthan- α -d, α' -d-dicarbonensäure mit gewöhnlicher Bernsteinsäure verglichen. Wir finden im Mittel von je 6 Versuchen als Entfärbungszeit für:

Äthan- α -d, α' -d-dicarbonensäure	41 \pm 2 Minuten
Bernsteinsäure	29,5 \pm 2 Minuten

In den Kontrollversuchen ohne Substrat trat noch nach 150 Minuten keine Entfärbung auf.

4. *Atmungsversuch.*

Im Atmungsversuch mit Sauerstoff in der *Warburg'schen* Apparatur wurde für die beiden Säuren im Mittel aus je 2 Versuchen unter Berücksichtigung des Blindwertes nach 60 Minuten Versuchsdauer als Sauerstoffverbrauch gefunden:

Äthan- α -d, α' -d-dicarbonensäure	22,6 \pm 2 mm ³
Bernsteinsäure	36,5 \pm 2 mm ³

Es entspricht in diesem Atmungsversuch der geringere Sauerstoffverbrauch der längeren Entfärbungszeit in dem Versuch nach *Thunberg*.

Basel, Anstalt für anorganische Chemie und physiologische Anstalt.

¹⁾ Siehe *Bertho* und *Grassmann*, Biochemisches Praktikum (1936), Seite 144. Die Versuche 3 und 4 wurden mit einer reinen Säure $HOOC \cdot CHD \cdot CHD \cdot COOH$ vorgenommen, die aus Äthan- α , α' , β , β' -tetracarbonsäure-tetraäthylester gewonnen war.