

Über die Bildung von Milchsäure aus Triosen durch Einwirkung von Säuren*, 2. Mitt.

Von

V. Prey, H. Berbalk und E. Steinbauer

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Wien

(Eingegangen am 14. Dezember 1961)

Der Mechanismus der Milchsäurebildung durch Säuren aus Triosen über Methylglyoxal als Zwischenprodukt wurde durch Deuterierungsversuche aufgeklärt.

Für die reversible gegenseitige Umlagerung von Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd im sauren Milieu und deren irreversible Umwandlung in Methylglyoxal wurden zwei Reaktionsschemen zur Diskussion gestellt.

Wir haben schon früher¹ über die Umwandlung von Triosen in Milchsäure durch Einwirkung von Salzsäure berichtet und zunächst für den Übergang von Methylglyoxal in Milchsäure ein vorläufiges Reaktionsschema aufgestellt. Danach sollte das H-Atom der Aldehydgruppe als Anion an eine Elektronenlücke des benachbarten C-Atomes wandern, während ein OH-Ion des vorhandenen Wassers sich an die dadurch freierwerdende Stelle am C 1 anlagert und so zur Milchsäure führt. Die Durchführung dieser Reaktion müßte deshalb in D₂O ohne Deuterierung an einem C-Atom verlaufen.

Die nun von uns unternommenen Versuche lieferten jedoch überraschenderweise eine Milchsäure, die IR-spektroskopisch eine C—D-Bande zeigte. Zur Aufklärung der Lage dieser C—D-Bindung im Molekül (entweder am C 2 oder C 3) wurde die deuterierte Milchsäure vorsichtig zu Brenztraubensäure oxydiert², deren IR-Spektrum wieder eine C—D-Bande aufwies. Es steht daher mit größter Sicherheit fest, daß sich das

* Herrn Prof. O. Kratky zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ V. Prey, H. Berbalk und E. Steinbauer, Mh. Chem. **91**, 1196 (1960).

² F. Beilstein und E. Wiegand, Ber. dtsch. chem. Ges. **17**, 840 (1884).

Deuterium auch in der Milchsäure am C3 befindet. Eine Wanderung vom C2 zum C3 während der Oxydation der sekundären OH-Gruppe zur Carbonylgruppe ist nicht sehr wahrscheinlich. Man wird aber annehmen dürfen, daß bei der Umlagerung von Methylglyoxal in Milchsäure die Methylgruppe nicht unmittelbar beteiligt ist, so daß eine eventuelle Deuterierung nur am C2 erwartet werden darf. Das Ergebnis unserer Untersuchungen steht daher nicht im Widerspruch zu unserem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus, sondern kann vielmehr als Beweis hierfür angesehen werden.

Interessant war es nun festzustellen, auf welche Weise Deuterium in die Methylgruppe der Milchsäure eingetreten war. Dafür gibt es grundsätzlich drei Möglichkeiten:

1. die bereits gebildete Milchsäure tauscht ein H der Methylgruppe gegen D,
2. der H—D-Tausch findet in einem Zwischenzustand während der Umlagerung statt,
3. der H—D-Tausch findet schon im Methylglyoxal und unabhängig von der Umlagerung statt.

Um diese Fragen zu klären, haben wir zunächst Milchsäure mit 6 n DCl (bzw. HCl in D₂O) behandelt. Die aus dieser Reaktion wiedergewonnene Säure zeigte im IR-Spektrum keine C—D-Bande. Damit scheidet die unter 1. genannte Möglichkeit einer Deuterierung aus.

Die Behandlung von Methylglyoxal mit 1 n HCl liefert, wie papierchromatographisch nachgewiesen werden konnte, keine nennenswerten Mengen Milchsäure. Führt man die Reaktion in D₂O unter sonst gleichen Bedingungen durch, so erhält man deuteriertes Methylglyoxal, wie der Vergleich der IR-Spektren der beiden jeweils isolierten Bis-m-nitrobenzhydrazone zeigt. Damit dürfte bewiesen sein, daß die Deuterierung nicht im Zusammenhang mit der Umlagerung steht, sondern schon am Methylglyoxal selbst erfolgt, das dann erst deuterierte Milchsäure liefert.

Ein H—D-Tausch unter den gewählten Bedingungen setzt voraus, daß das zu tauschende H als Proton ablösbar ist, was für eine O—H-Bindung stets, für eine C—H-Bindung jedoch nur unter ganz bestimmten Voraussetzungen zutrifft. Im Methylglyoxal ist nun eine Methylgruppe einer Carbonylgruppe unmittelbar benachbart, deren C—O-Doppelbindung mit der der Aldehydgruppe in Konjugation steht. Zieht man den Überkonjugationseffekt der Methylgruppe mit in Betracht, so ergibt sich ein gekreuzt-konjugiertes System, welches die leichte Ablösbarkeit eines Protons aus der Methylgruppe verständlich macht. Nimmt man weiter an, daß ein Proton aus der sauren Lösung an den Sauerstoff der Keto-Gruppe angelagert wird, so erhält man damit am C3 eine Elektronenlücke (IX b) und damit eine positive Ladung.

Durch Ablösung eines Protons aus der Methylgruppe und Ausbildung einer negativen Ladung am C3-Atom (VIIIb) erfolgt Stabilisierung zu VIIIa.

Die Abspaltung eines Protons vom C3 wird jedoch von der Anzahl der in der Lösung vorhandenen Protonen abhängig sein, vergleichbar etwa der Dissoziation einer schwachen Säure bei Gegenwart einer wechselnden Menge einer stärkeren. Diese Überlegung ist formal durch das Gleichgewicht zwischen IXb und VIIIa über den polaren Zwischenzustand VIIIb wiedergegeben. Liegen in der Lösung neben Protonen auch Deuteronen vor, so ist die Bildung von deuteriertem Methylglyoxal durch dieses Gleichgewicht verständlich.

Bei steigendem Protonengehalt in der Lösung (Übergang von 1 n HCl zu 6 n HCl) wird dieses Gleichgewicht zugunsten der Form IXb verschoben. Damit ist jedoch die positive Ladung am C2 lokalisiert, weil ein Ausgleich mit C3 unterdrückt wird. Dies führt dazu, daß die Wanderung eines H-Anions vom C1 in die Elektronenlücke am C2 stärker in den Vordergrund tritt und damit die Umlagerung von Methylglyoxal in Milchsäure in verstärktem Umfang stattfindet. Diese Überlegung steht in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß bei der Einwirkung von 1 n HCl auf wäßrige Methylglyoxallösungen nur wenig Milchsäure nachgewiesen werden kann, bei 6 n HCl jedoch schon in kurzer Zeit das Methylglyoxal verbraucht und nur mehr Milchsäure vorhanden ist.

Die Reaktionsweise des Methylglyoxals (X) (Reaktionsschema 1) läßt sich daher für stark saure Lösungen ausgehend von IXa (mesomer mit IXb) über die durch XI angedeutete H-Anionenwanderung nach XII wiedergeben. An XII wird H₂O angelagert und unter Austritt eines Protons schließlich Milchsäure XIII gebildet. In allen Formeln wurde nicht berücksichtigt, daß sehr wahrscheinlich ein Gleichgewicht zwischen freier Aldehyd- und Aldehydhydrat-Form vorliegt.

Es bleibt noch zu klären, wieweit die Bildung von Milchsäure aus den Triosen¹ mit diesem Reaktionsschema in Verbindung gebracht werden kann.

Die Überführbarkeit von Dihydroxyaceton bzw. Glycerinaldehyd in Methylglyoxal durch Behandeln mit Säuren ist schon seit langer Zeit bekannt (vgl. z. B. ³⁻⁶). Auch die Gleichheit mancher Farbreaktionen der beiden Triosen und des Methylglyoxals⁷ spricht dafür, daß letzteres aus

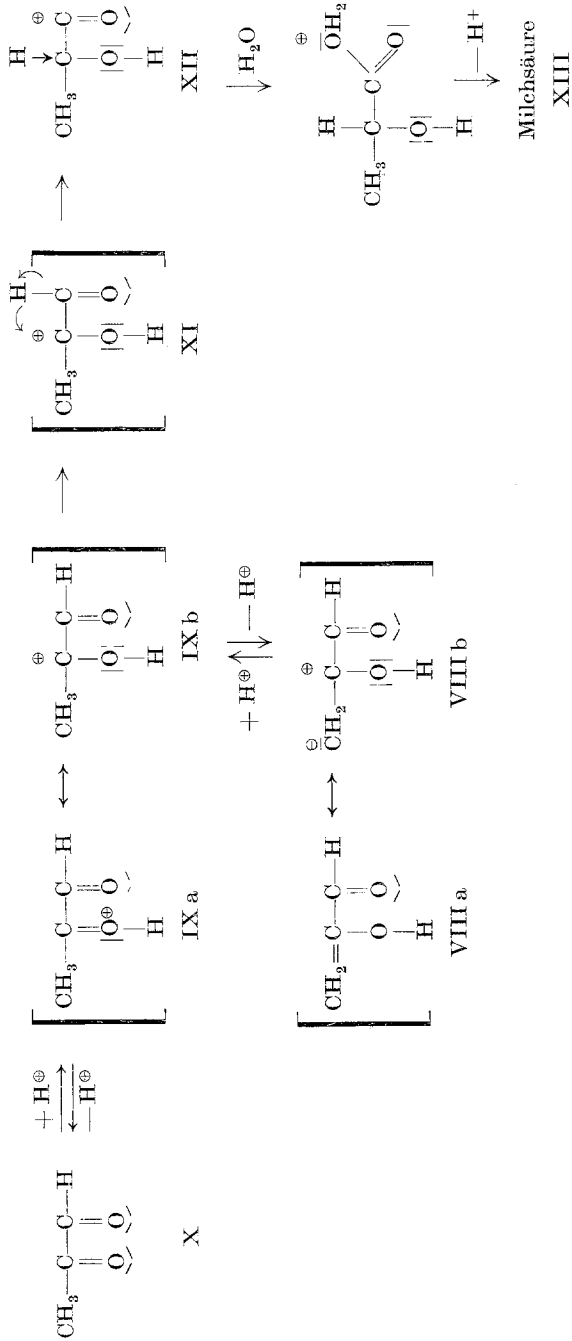
³ G. Pinkus, Ber. dtsch. chem. Ges. **31**, 36 (1898).

⁴ C. Neuberg und E. Färber, Biochem. Z. **83**, 262 (1917); C. Neuberg und E. Kinsky, Biochem. Z. **20**, 460 (1909).

⁵ Z. Dische und S. S. Robbins, Biochem. Z. **274**, 43 (1934); R. Nodzu und Mitarb., Chem. Zbl. **1938**, II, 692.

⁶ O. Mayerhof und K. Lohmann, Biochem. Z. **271**, 90, 92 (1934).

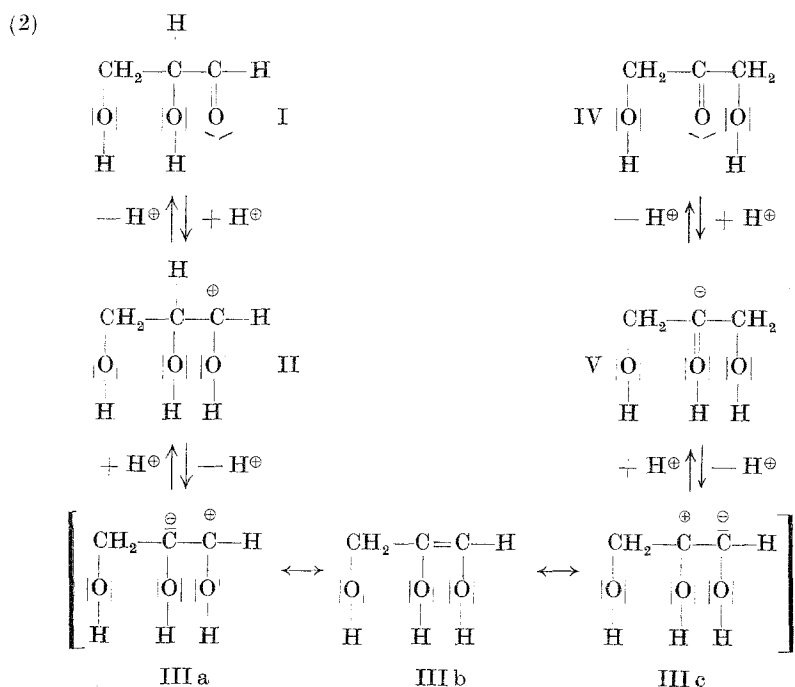
⁷ Z. Dische, Biochem. Z. **204**, 431 (1929).



(1)

beiden gebildet wird. Es ergibt sich aber die Frage, ob das Methylglyoxal aus jeder der beiden Triosen auf unabhängigen Wegen gebildet wird oder aber ob dies über eine gemeinsame Zwischenstufe verläuft. In diesem Fall könnte, ähnlich wie im schwach alkalischen Bereich⁸, ein Gleichgewicht zwischen den beiden Triosen bestehen. Eine dünnschichtchromatographische Überprüfung dieser Vermutung läßt ein derartiges Gleichgewicht sehr wahrscheinlich erscheinen, obwohl die Trennung der beiden Triosen erhebliche Schwierigkeiten bereitet.

Wir würden für dieses Gleichgewicht der Triosen im sauren Bereiche das folgende Reaktionsschema 2 vorschlagen:

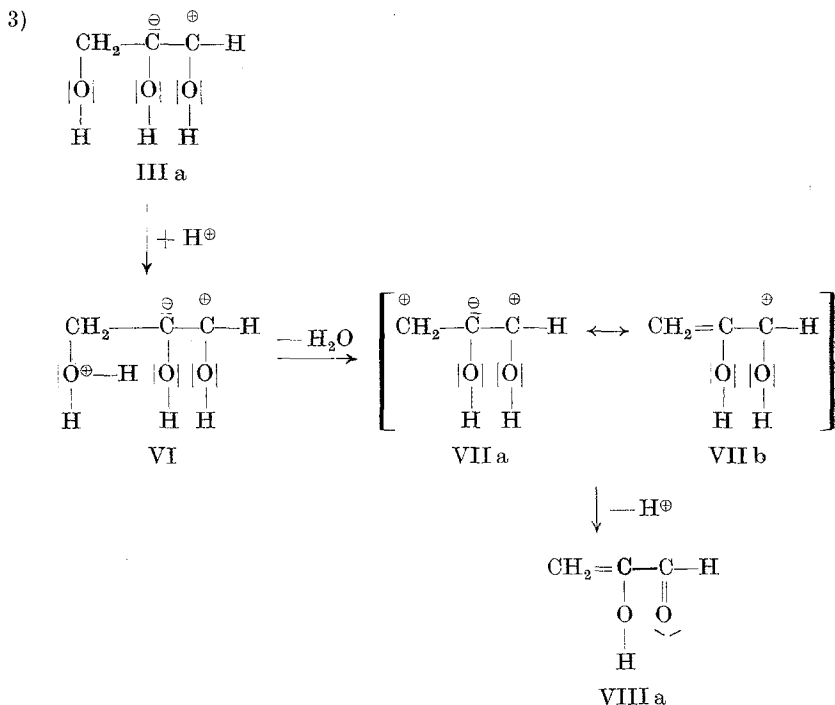


Die Anlagerung eines Protons an die beiden Triosen I und IV erfolgt jeweils an dem Carbonylwasserstoff und führt zu den beiden Kationen II und V. Diese stabilisieren sich unter Protonenabgabe zu III a und III c, die mesomere Grenzformen von III b sind. Das gesamte Mesomerie-system III stellt daher die gemeinsame Zwischenstufe für die Umwandlung der Triosen dar.

⁸ V. Prey, E. Waldmann, H. Berbalk und F. Ludwig, Mh. Chem. 84, 551 (1953); V. Prey, E. Waldmann, H. Berbalk und F. Sommer, Mh. Chem. 85, 1186 (1954).

Der weitere Übergang der Triosen in Methylglyoxal ist nicht mehr reversibel, da wir aus Methylglyoxal unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine der beiden Triosen erhalten konnten. Für diesen weiteren Schritt möchten wir das Reaktionsschema 3 zur Diskussion stellen:

Zuerst wird an die polare Grenzstruktur IIIa der gemeinsamen Zwischenstufe III ein Proton unter Bildung von VI angelagert. Nun er-



folgt in nicht umkehrbarer Reaktion die Abspaltung von Wasser zu VIIa, welches mesomer mit VIIb ist. Die Stabilisierung des gebildeten Kations VIIb erfolgt nun unter Protonenabgabe zu VIIIa. VIIIa ist aber nichts anderes als die Enolform des Methylglyoxals im Reaktionsschema 1.

Die bisherigen experimentellen Ergebnisse und die obigen Ausführungen lassen es als ziemlich sicher erscheinen, daß die beiden Triosen über einen gemeinsamen Zwischenzustand auch im sauren Bereich miteinander im Gleichgewicht stehen und über diesen Zustand in Methylglyoxal übergehen, welches somit das erste faßbare Zwischenprodukt auf dem Wege zur Milchsäure darstellt. Dieser Schritt und der Übergang von Methylglyoxal in Milchsäure ist hierbei irreversibel.

Über die Ergebnisse weiterer Untersuchungen werden wir demnächst berichten.

Experimenteller Teil

1. Herstellung der deuterierten Salzsäure

In eine bestimmte Menge D_2O wurde HCl -Gas eingeleitet und hierbei eine etwa 12—13fache Normalität erreicht. Die benötigten DCl -Lösungen geringerer Konzentration wurden durch Verdünnen mit D_2O erhalten.

2. Darstellung von deuterierter Milchsäure aus Methylglyoxal bzw. Dihydroxyaceton

1,25 g 80proz. Methylglyoxal (entsprechend 1,0 g reinem Methylglyoxal) wurden mit 5 ccm 6n DCl/HCl 30 Min. auf dem siedenden Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Schon nach 2—3 Min. trat Gelbfärbung ein, gegen Ende der Reaktionszeit erfolgte die Abscheidung dunkel gefärbter Harze. Der abgekühlte Kolbeninhalt wurde nach Zusatz von A-Kohle filtriert, das dunkelbraun gefärbte Filtrat zunächst so weit als möglich eingedampft und nun mehrmals mit Wasser versetzt und immer wieder eingedampft, um die vorhandenen OD-Gruppen in OH-Gruppen zurückzuverwandeln. Von dem schließlich zurückgebliebenen Sirup wurde ein IR-Spektrum angefertigt.

Analog wurde auch aus 1 g Dihydroxyaceton deuterierte Milchsäure als brauner Sirup erhalten und hievon das IR-Spektrum hergestellt. In beiden Fällen erfolgte der Vergleich mit dem Spektrum einer Milchsäure, die durch Einwirkung von HCl erhalten worden war.

3. Oxydation der Milchsäure zu Brenztraubensäure

1,80 g deuterierte Milchsäure, 90 ccm Wasser und 1,12 g CaO wurden innerhalb von 60 Min. bei Raumtemp. mit 30 ccm einer 4proz. $KMnO_4$ -Lösung versetzt. Nach dem Abfiltrieren des MnO_2 wurde mit HCl angesäuert und die entstandene Brenztraubensäure mit einer 0,25proz. Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2n HCl gefällt. Der gelbe, feinkristalline Niederschlag wurde abgesaugt, gewaschen, getrocknet und davon in Form eines KBr -Preßlings ein IR-Spektrum aufgenommen, im Vergleich mit Brenztraubensäure-2,4-dinitrophenylhydrazon, das analog aus nichtdeuterierter Milchsäure hergestellt worden war.

4. Bildung von Methylglyoxal aus Dihydroxyaceton

1 g Dihydroxyaceton wurde mit 5 ccm 1n HCl 30 Min. unter Rückfluß auf dem Wasserbad erhitzt und nach dem Abkühlen das Bis-(m-Nitrobenzhydrazon) mit einer 2proz. Lösung von m-Nitrobenzhydrazid (m-NBH) in 10proz. Essigsäure ausgefällt. Das gewaschene und getrocknete Produkt wurde als KBr -Preßling IR-spektrographisch aufgenommen.

Entsprechend wurde Dihydroxyaceton mit 1n DCl/HCl in Methylglyoxal übergeführt und untersucht.

Auch von einem aus Methylglyoxal selbst hergestellten Bis-(m-nitrobenzhydrazon) wurde das IR-Spektrum aufgenommen.

5. Deuterierung von Methylglyoxal

1,25 g 80proz. Methylglyoxal wurden 30 Min. mit 5 ccm 1n DCl/HCl unter Rückfluß auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und nach dem Ab-

kühlen das Bis-(*m*-nitrobenzhydrazon) gefällt. Die IR-Aufnahme erfolgte ebenfalls in einem KBr-Preßling.

6. Versuch einer Deuterierung von Milchsäure

1 g Milchsäure (DAB VI) wurde mit 5 ccm 6n DCl/HCl 1 Stde. auf dem siedenden Wasserbad unter Rückfluß erhitzt und hierauf zur Sirupkonsistenz eingedampft. Von dem nunmehr salzsäurefreien Produkt wurde ein IR-Spektrum aufgenommen und mit dem der Ausgangsmilchsäure verglichen.

In der Lösung nach der Behandlung mit $n/10$ HCl vorhandene Substanzen

Eingesetzte Substanz	Methylglyoxal Fleckenfarbe gelb	Dihydroxy- aceton; Flecken- farbe braungelb	Glycerinaldehyd Fleckenfarbe blaugrau
Methylglyoxal	+	—	—
Dihydroxyaceton	+	+	+
Glycerinaldehyd	+	+	+

Tabelle der charakteristischen Wellenzahlen aus den IR-Spektren, aufgenommen mit einem Beckman-Spektrofotometer IR 4

Substanz	Herkunft	Wellenzahl cm^{-1}	
		CH_3-	$\text{CH}_2\text{D}-$
Milchsäure	DAB VI	2970	—
Milchsäure	Dihydroxyaceton + 6n HCl	2950	—
Milchsäure	Methylglyoxal + 6n HCl	2980	—
$\text{CH}_2\text{DCH}-\text{COOH}$	Dihydroxyaceton + 6n DCl/HCl	—	2230
$\begin{array}{c} \\ \text{OH} \end{array}$			
$\text{CH}_2\text{DCH}-\text{COOH}$	Methylglyoxal + 6n DCl/HCl	—	2230
$\begin{array}{c} \\ \text{OH} \end{array}$			
Methylglyoxal-bis-(<i>m</i> -nitrobenzhydrazon)	Methylglyoxal + <i>m</i> -NBH	2930	—
Methylglyoxal-bis-(<i>m</i> -nitrobenzhydrazon)	Dihydroxyaceton + 1n HCl; + <i>m</i> -NBH	2925	—
CH_2DCOCHO -bis-(<i>m</i> -nitrobenzhydrazon)	Methylglyoxal + 1n DCl/HCl; + <i>m</i> -NBH	—	2250
CH_2DCOCHO -bis-(<i>m</i> -nitrobenzhydrazon)	Dihydroxyaceton + 1n DCl/HCl; + <i>m</i> -NBH	—	2250
CH_3COCOOH -2,4-Dinitrophenylhydrazon	Milchsäure + KMnO_4	2980	—
$\text{CH}_2\text{DCOCOOH}$ -2,4-Dinitrophenylhydrazon	$\text{CH}_2\text{DCHCOOH}$ + KMnO_4 $\begin{array}{c} \\ \text{OH} \end{array}$	—	2200
Milchsäure	Milchsäure DAB VI + 6n DCl	3000	—

7. *Das Verhalten von Glycerinaldehyd, Dihydroxyaceton und Methylglyoxal in n/10 HCl bei Wasserbadtemperatur*

Je 1 g Glycerinaldehyd, Dihydroxyaceton und Methylglyoxal wurden jedes für sich mit 5 ccm n/10 HCl am siedenden Wasserbad erhitzt, nach 15 bzw. 30 Min. Proben gezogen und dünnschichtchromatographiert.

Träger: Kieselgel G mit 0,1 n Borsäure gepuffert.

Laufmittel: n-Butanol/H₂O (9:1).

Sprühmittel: m-Phenylendiaminchlorhydrat in gesätt. alkohol. Lösung.

Entwicklung: 10 Min. auf 105° C erhitzt.

Vergleichssubstanzen: Glycerinaldehyd, Dihydroxyaceton, Methylglyoxal.