

# Über die Oxydation der Acetessigsäure.

Von

**N. O. Engfeldt.**

Mit 4 Kurvenzeichnungen.

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der tierärztlichen Hochschule zu Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. Dezember 1920.)

---

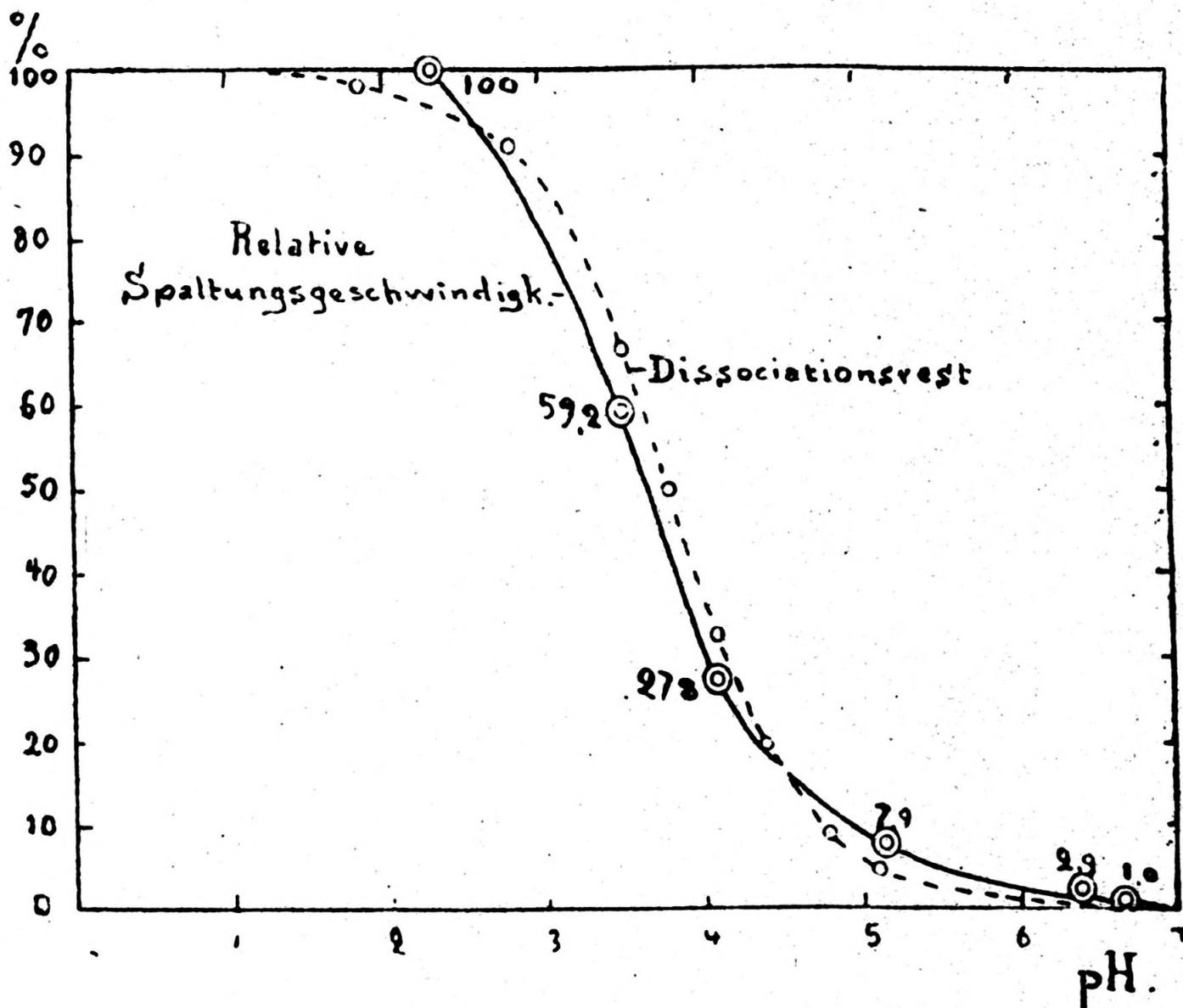
Die Acetessigsäure kann, wie bekannt, sowohl einer Aceton- wie einer Essigsäurespaltung unterliegen. Erstere Art der Spaltung verläuft quantitativ sowohl in saurer, neutraler wie in schwach alkalischer Lösung. In saurer Lösung geht der Zerfall jedoch mit wesentlich größerer Geschwindigkeit vor sich als in neutraler-schwach alkalischer Lösung. Die Spaltungskonstante <sup>1)</sup> bei Körpertemperatur beträgt in saurer Lösung 0,117 (Brigg. Log.); in neutraler-schwach alkalischer dagegen 0,0018. Im ersteren Falle haben wir folglich einen Zerfall von über 50 % in 3 Stunden, im letzteren jedoch von nur 10 % in 24 Stunden. Die relative Spaltungsgeschwindigkeit hat sich als proportional zur Größe des Dissoziationsrestes erwiesen. Wie aus Kurve I ersichtlich, ist die optimale Bedingung für die Spaltung in Wasserlösung schon bei einem  $p_{\text{H}}$  von ungefähr 2 erreicht.

Schließlich ist ein wesentlicher Unterschied im Hinblick auf die Stabilität zwischen der Enol- und der Ketoform des Acetacetates zu verzeichnen. In Wasserlösung befinden sich die Alkali- und Ammoniumsalze der Acetessigsäure zu einem bedeutenden Teile im Enolzustand und haben in dieser Form

---

<sup>1)</sup> Engfeldt, Beiträge zur Kenntnis der Biochemie der Acetonkörper. Dissertation, Stockholm 1920.

eine ziemlich große Haltbarkeit bei Körpertemperatur. Eiweißstoffe und ihre Hydrolysenprodukte — Peptone und Aminosäuren — wirken aber ketisierend auf vorhandene Acetacetate. In dieser Form hat das Acetacetat eine wesentlich geringere Stabilität und zerfällt bei Körpertemperatur mit einer bemerkenswerten Geschwindigkeit. (Kurve II und III.)



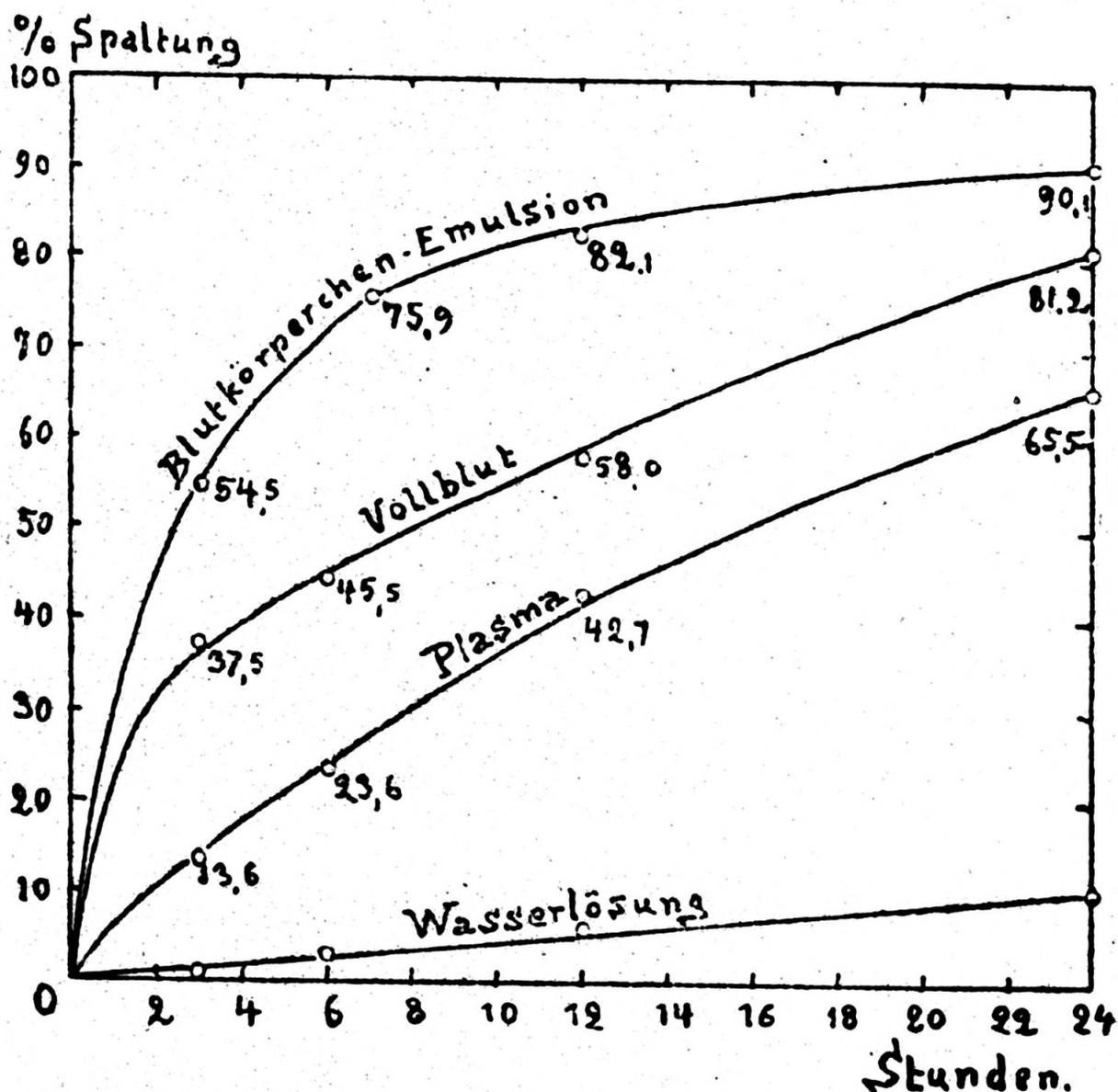
Kurve I. Die relative Spaltungsgeschwindigkeit und die Größe des Dissoziationsrestes bei verschiedenen pH, 37° C.

Und endlich ist, damit die Acetessigsäure einer Essigsäurespaltung unterliegen soll, die Gegenwart von großen Mengen Alkali erforderlich. (Kurve IV.)

Die freie Acetessigsäure zerfällt bei Siedetemperatur augenblicklich, die Alkalisalze nach kurzer Zeit in Aceton und Kohlendioxyd resp. Karbonat. Lenk<sup>1)</sup> hat jedoch gezeigt, daß diese Reaktion vollkommen ausbleibt, wenn man die Acetessigsäure bei Gegenwart von Permanganat und von kleinen

<sup>1)</sup> Lenk, Biochem. Zeitschr. Bd. 78, S. 224 (1916).

Mengen Essigsäure bis zum Kochen erhitzt. Lenk meint, daß die in kleinen Mengen gegenwärtige Essigsäure in erster Reihe acetylierend auf die Acetessigsäure wirkt, von der er annimmt, daß sie in der Enolform vorkommt ( $\beta$ -Oxykrotonsäure). Das Acetat der  $\beta$ -Oxykrotonsäure gibt nach Lenk nicht mehr die gewöhnlichen Acetessigsäurereaktionen, spaltet



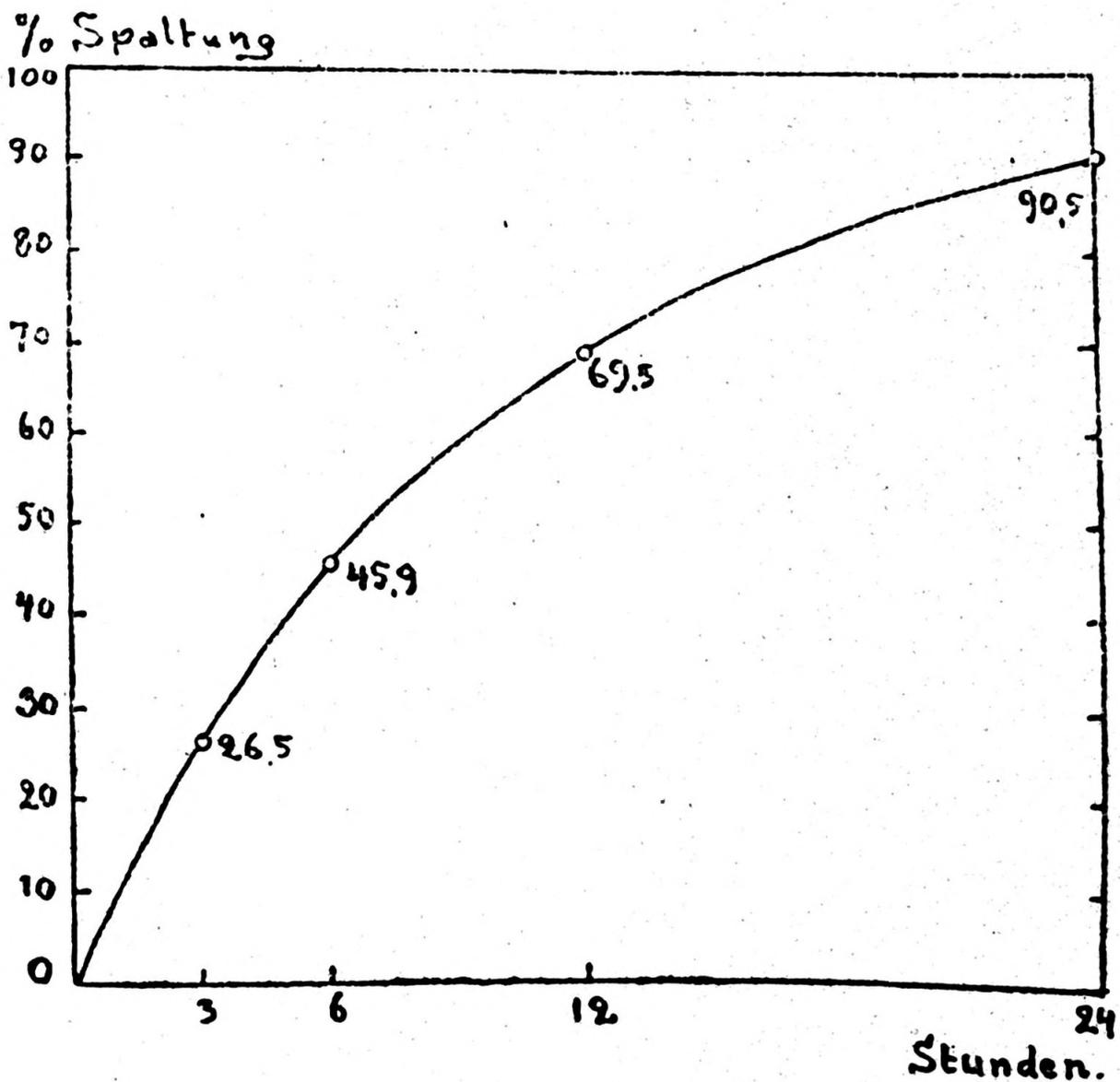
Kurve II. Die Spaltung des Acetacetats bei Gegenwart von Blutkörperchen, Vollblut, Plasma oder in Wasserlösung, 37° C.

sich aber bei Gegenwart von Permanganat höchstwahrscheinlich an der Stelle der Doppelbindung auf. Ich selbst<sup>1)</sup> habe gezeigt, daß man der in kleinen Mengen gegenwärtigen Essigsäure nicht die von Lenk angegebene Wirkung zuschreiben kann, und zwar deshalb, weil sie entweder vollständig ausgeschlossen oder gegen andere Säuren (Schwefel- und Phosphorsäure) vertauscht werden kann, ohne daß das Resultat sichtbar ein anderes wird, d. h. die Acetessigsäure wird auch unter

<sup>1)</sup> Engfeldt, Diese Zeitschr. Bd. 100, S. 93 (1917).

den zuletzt angeführten Bedingungen ohne Acetonbildung durch das Permanganat zersetzt.

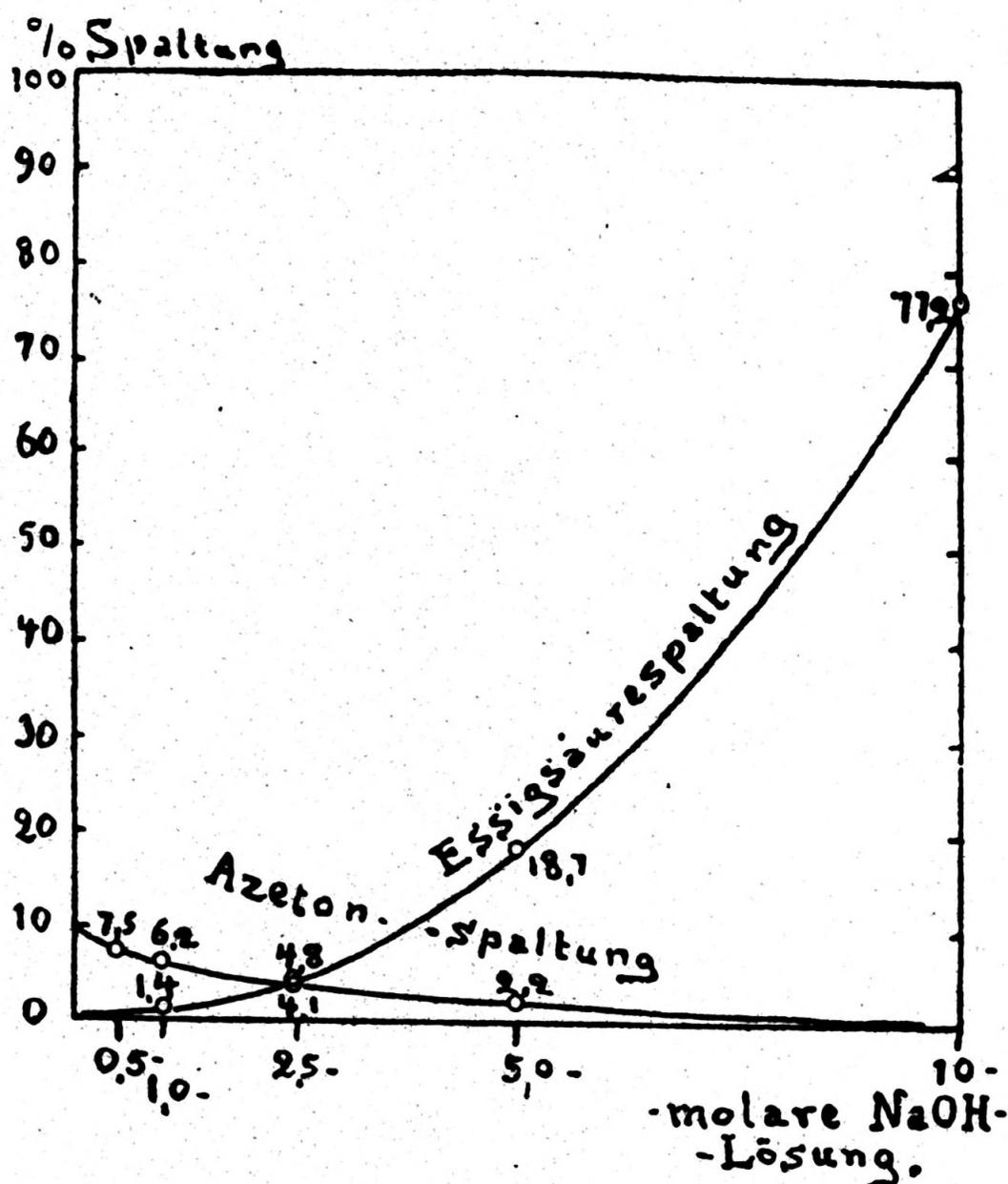
In derselben Arbeit habe ich auch gezeigt, daß  $\beta$ -Oxybuttersäure bei Zusatz von Permanganat und von kleinen Mengen Essigsäure und darauf folgender Destillation nicht in Aceton zerfällt, ein Umstand, der sehr bemerkenswert ist, da



Kurve III. Die Spaltung des Acetacetats bei Gegenwart von 0,5 % Glykokoll, 37° C.

letztgenannte Säure bei Destillation mit anderen Oxydationsmitteln (Chromat, Wasserstoffsperoxyd, Persulfat, ja sogar Permanganat) in stark schwefelsaurer Lösung zu einem bedeutenden Teil in Aceton zerfällt. Bei diesen Reaktionen bildet sich Acetessigsäure als Zwischenprodukt. Unter den letztgenannten Versuchsbedingungen unterliegt die gebildete Säure hauptsächlich einer Acetonspaltung, während Permanganat in schwach saurer, alkalischer Lösung auf die Acetessigsäure auf andere Weise einwirkt, wie diese Untersuchung klarlegen soll.

Versetzt man eine Lösung von Na-Acetat mit Permanganat, so tritt schon bei Zimmertemperatur eine ziemlich rasch verlaufende Reaktion ein. Die Mischung wird trübe infolge der Bildung von Mangansuperoxydhydrat. Fällt man das Permanganat vollständig durch vorsichtiges Zusetzen von Wasserstoffsuperoxyd aus und filtriert man die Mischung, so



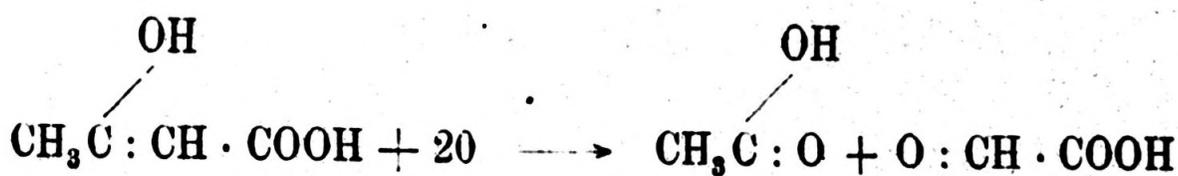
Kurve IV. Die Spaltung des Acetats, 37° C, bei Gegenwart von Lauge, 15 St.

erhält man ein mangan- und wasserstoffsuperoxydfreies Filtrat, das außer Essigsäure auch bedeutende Mengen Oxalsäure enthält. Bei vorsichtiger Arbeit mit einer schwachen Permanganatlösung kann, mit Hilfe von konz. Schwefelsäure und Pepton- oder Eiweißlösungen, auch Glyoxylsäure im Filtrat nachgewiesen werden; man erhält eine deutliche Violettfärbung (Tryptophanreaktion). Daß die diese Reaktion bedingende Glyoxylsäure sich nicht präformiert in der bei den Versuchen

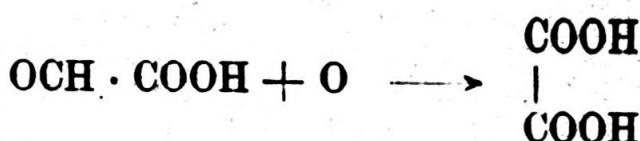
angewendeten Acetacetalösung vorgefunden hat, habe ich durch direkte Prüfung festgestellt, ebenso konnte ich mich durch Oxydationsversuche mit Na-Acetat davon überzeugen, daß die Glyoxylsäure nicht ihren Ursprung von der bei der Spaltung der Acetessigsäure gebildeten Essigsäure herleiten kann. Der Reaktionsmechanismus bei der Oxydation der Acetessigsäure mit Permanganat, oder zumindest ein beachtenswerter Teil desselben, scheint mir mit Hinsicht auf die unten angeführten Analysenresultate ziemlich klar zu liegen.

Ich erinnere hierbei vor allem an den Umstand, daß das Acetacetal in Wasserlösung zu einem bedeutenden Teil im Enolzustand vorkommt. Wir haben es folglich mit einer ungesättigten Verbindung zu tun. Eine allbekannte Tatsache ist es weiter, daß das Permanganat in neutraler oder alkalischer Lösung besonders leicht mit ungesättigten Verbindungen reagiert und daß gerade der Platz für die Doppelbindung als Angriffspunkt dient. Geteilte Meinungen herrschen wohl allerdings betreffs gewisser Details in dieser Reaktion, ich werde jedoch auf keine anderen Spekulationen eingehen als auf solche, die die Experimente in vorliegendem Falle vorschreiben.

In einem gewissen Stadium der Oxydation kann das Acetessigsäuremolekül als gesprengt betrachtet werden, infolge Aufnahme von 2 Atomen Sauerstoff.



Dabei bildet sich ein Molekül Essigsäure und ein Molekül Glyoxylsäure. Die letztere, die äußerst reaktionsfähig ist, reagiert mit einem neuen Atom Sauerstoff unter Bildung von Oxalsäure.



Ein Molekül Acetessigsäure sollte folglich ein Molekül Essigsäure und ein Molekül Oxalsäure geben, ein Verhältnis, das durch die unten angeführten quantitativen Versuche bestätigt wird.

Was die  $\beta$ -Oxybuttersäure betrifft, so erfährt sie bei Zimmertemperatur nur eine träge Einwirkung von Seiten des Permanganats und ist überhaupt, im Vergleich zur Acetessigsäure, eine ziemlich stabile Verbindung. Bei Siedetemperatur jedoch wird sie in stark saurer Lösung allmählich zu Acetessigsäure oxydiert, die unmittelbar zu einem beachtenswerten Teile in Aceton und Kohlendioxyd zerfällt. Bei Erhitzung mit Permanganat in schwach saurer-alkalischer Lösung bleibt, wie bereits früher erwähnt, die Acetonbildung ganz und gar aus. Das Resultat wird jedoch auch hier eine bedeutende Oxalsäurebildung.

In neutraler-alkalischer Lösung werden Oxalate bei Zimmertemperatur nicht in nennenswertem Grade von Permanganat angegriffen, was jedoch bei Siedetemperatur der Fall zu sein scheint. Allerdings verläuft die Reaktion ziemlich träge. Bei gewissen unten angeführten Versuchsbedingungen dürfte der Verlust an Oxalsäure bei Siedetemperatur sich auf 25—30% beschränken. Zieht man diesen Verlust mit in Rechnung, so erscheint es höchst wahrscheinlich, daß die  $\beta$ -Oxybuttersäure bei Erhitzung mit Permanganat in neutraler-schwach alkalischer Lösung quantitativ in Essigsäure und Oxalsäure zerfällt, da die letztgenannte dann auch vom vorhandenen Permanganat angegriffen wird. Daß als Zwischenprodukt bei der Oxydation der  $\beta$ -Oxybuttersäure in erster Linie Acetessigsäure gebildet wird, liegt klar zutage.

Die  $\beta$ -Oxybuttersäure wurde früher im allgemeinen als die Muttersubstanz der Acetonkörper betrachtet, in neuerer Zeit gemachte Beobachtungen sprechen aber dafür, daß dies nicht mit Notwendigkeit der Fall zu sein braucht. Es ist zwar mit voller Sicherheit bewiesen, daß die  $\beta$ -Oxybuttersäure im Organismus zu Acetessigsäure resp. Aceton aufoxydiert werden kann, die quantitative Bedeutung dieser Oxydation ist jedoch ohne Zweifel überschätzt worden. In den Resultaten übereinstimmende Untersuchungen — Injektions-, Perfusions- und Digestionsversuche — von Blum<sup>1)</sup>, Friedmann und

<sup>1)</sup> Blum, Münch. med. Wochenschr. Bd. 57, S. 683 (1910).

Maase<sup>1)</sup>, Dakin<sup>2)</sup>, Wakeman und Dakin<sup>3)</sup>, Marriott<sup>4)</sup> und Wilder<sup>5)</sup> machen es im höchsten Grade wahrscheinlich, daß die entgegengesetzte Reaktion, und zwar eine Reduktion der Acetessigsäure zu  $\beta$ -Oxybuttersäure, die quantitativ bedeutungsvollste ist. In hohem Grade reaktionsfähig, ist die Acetessigsäure teils infolge der ketisierenden Wirkung der Proteinsubstanzen einem sehr schnellen Zerfall in Aceton und teils einer asymmetrischen Reduktion zu  $\beta$ -Oxybuttersäure unterworfen. Parallel mit dieser Reduktion läßt sich nach der bekannten Cannizzaroschen Reaktion auch eine Oxydation denken. Die Möglichkeit einer Oxalsäurebildung innerhalb des Organismus als Resultat dieser Reaktion scheint mir im Hinblick auf die angeführten Permanganatversuche nicht ausgeschlossen. Mit Hinsicht auf die Unverbrennbarkeit oder mindestens Schwerverbrennbarkeit der Oxalsäure im tierischen Organismus sollten wir uns eine Erhöhung der endogenen Oxalsäurebildung bei diabetischer Acidose über das Normale hinaus erwarten. Eine solche Erhöhung scheint jedoch nur in Ausnahmefällen nachgewiesen zu sein. Eine systematische Untersuchung der Absonderung der endogen gebildeten Oxalsäure bei schwereren Diabetesfällen hat mir von Interesse geschienen und ist in Angriff genommen.

### Beleganalysen.

Die bei diesen Versuchen verwendete Na-Acetacetalösung wurde durch kalte Verseifung von chemisch reinem Äthylester und darauffolgende Vakuumbehandlung der mit Salzsäure neutralisierten Lösung bereitet.

---

<sup>1)</sup> Friedmann und C. Maase, Bioch. Zeitschr. Bd. 27, S. 474 (1910).

<sup>2)</sup> Dakin, Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 98 (1910—11).

<sup>3)</sup> Wakeman und Dakin, Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 105 (1910—11).

<sup>4)</sup> Marriott, Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 241 (1914).

<sup>5)</sup> Wilder, Journ. of biol. chem. Bd. 31, S. 59 (1917).

### Qualitative Proben.

1. 25 ccm Na-Acetat (3,4%ige Säure) + 100 ccm 5%ige  $\text{KMnO}_4$  wurden bei Zimmertemperatur 24 Stunden lang stehen gelassen, der Überschuß an Permanganat durch vorsichtigen Zusatz von Wasserstoffsperoxyd ausgefällt und die Mischung hierauf filtriert.

#### Filtrat:

Mangan	= O ( $\text{H}_2\text{S}$ ),
$\text{H}_2\text{O}_2$	= O ( $\text{CrO}_3$ ),
Acetessigsäure	= O ( $\text{FeCl}_3$ ),
Oxalsäure	= + ( $\text{CaCl}_2 + \text{CH}_3\text{COOH}$ ),
Essigsäure	= + ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{H}_2\text{SO}_4$ ),
Glyoxylsäure	= O ( $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Pepton}$ ).

2. 25 ccm Na-Acetat + 100 ccm 2%ige  $\text{KMnO}_4$  wurden bei Zimmertemperatur 2,5 Stunden stehen gelassen. Das Filtrat wich, was seine Eigenschaften betrifft, nur darin von Probe Nr. 1 ab, daß es eine schwache positive Reaktion für ungespaltenes Acetat gab, und daß auch die Glyoxylsäureprobe positiv ausfiel, wenn auch nur schwach.

3. 25 ccm Na-Acetat + 100 ccm n/10  $\text{KMnO}_4$  wurden bei Zimmertemperatur 20 Minuten stehen gelassen. Das Filtrat gab eine deutliche Acetatreaktion, eine schwache Reaktion auf Oxalsäure, doch eine kräftige auf Glyoxylsäure.

Bei direkter Untersuchung des Na-Acetates auf Glyoxylsäure fiel das Resultat negativ aus. Dasselbe war der Fall mit 0,5 g Na-Acetat, das nach Probe Nr. 3 mit Permanganat behandelt wurde.

### Quantitative Proben.

#### Versuch mit Oxalat.

1. 0,25 g Ammoniumoxalat [ $\text{C}_2\text{O}_4(\text{NH}_4)_2 + \text{H}_2\text{O}$ ] + 100 ccm 1,25%ige  $\text{KMnO}_4$  wurden 15 Minuten lang bis zum Sieden erhitzt, abgekühlt, mit 10 ccm 25%iger NaOH versetzt, durch Einleitung von  $\text{SO}_2$  entfärbt und mit Essigsäure angesäuert, worauf dann das  $\text{SO}_2$  durch Kochen entfernt wurde. Die Lösung wurde schließlich mit  $\text{CaCl}_2$  gefällt und die Fällung

nach 24 Stunden aufgesammelt, mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Permanganat in schwefelsaurer Lösung titriert:

27,5 ccm n/10  $\text{KMnO}_4$  [ $1 \text{ ccm n/10 KMnO}_4 = 0,0071 \text{ g C}_2\text{O}_4(\text{NH}_4)_2 + \text{H}_2\text{O}$ ]  
 $= 0,195 \text{ g Oxalat} = 78\%$  Ausbeute.

2. Wie vorstehend:

27,1 ccm n/10  $\text{KMnO}_4 = 0,192 \text{ g} = 76,8\%$  Ausbeute.

3. 0,25 g Ammoniumoxalat + 100 ccm 1,25%ige  $\text{KMnO}_4$  bei Zimmertemperatur 3 Tage usw.:

33 ccm n/10  $\text{KMnO}_4 = 0,234 \text{ g} = 94\%$  Ausbeute.

4. Wie vorstehend:

33,4 ccm n/10  $\text{KMnO}_4 = 0,27 \text{ g} = 94,8\%$  Ausbeute.

5. 0,25 g Ammoniumoxalat + 25 ccm 5%ige  $\text{KMnO}_4$  bei Zimmertemperatur 2 Stunden usw.:

33,6 ccm n/10  $\text{KMnO}_4 = 0,239 \text{ g} = 95,6\%$  Ausbeute.

#### Versuche mit Acetacetat.

5 ccm Na-Acetacetat: Blasen nach Folin<sup>1)</sup>:

9,2 ccm n/10 J (freies Aceton).

Destillation:

105,5 ccm n/10 J (Na-Acetacetat als Säure  $105,5 - 9,2 = 96,3 \cdot 0,0017$   
 $= 0,1637 = 3,27\%$ ).

5 ccm Na-Acetacetat + 12,5 ccm 5%ige  $\text{KMnO}_4$  unmittelbar 30 Minuten nach Folin geblasen:

9,2 ccm n/10 J.

Dieser Wert für das in der Lösung befindliche freie Aceton stimmt folglich mit dem ursprünglichen überein. Die vorhandene Acetessigsäure wird daher während dieser Zeit nicht vom Permanganat unter Acetonbildung beeinflusst. Daß das Verhältnis auch bei Siedetemperatur dasselbe ist, habe ich in einer früheren Arbeit gezeigt<sup>2)</sup>.

1. 10 ccm Na-Acetacetat (0,327 g Säure) + 100 ccm 1,25%ige  $\text{KMnO}_4$  wurden 15 Minuten lang gekocht und auf

<sup>1)</sup> Folin, Journ. of biol. chem. Bd. 3, S. 177 (1907).

<sup>2)</sup> Engfeldt, Diese Zeitschr. Bd. 100, S. 93 (1917).

die oben bei den Versuchen mit Oxalat beschriebene Weise behandelt:

28,5 ccm n/10  $\text{KMnO}_4$  (1 ccm n/10  $\text{KMnO}_4 = 0,0051$  g Acetessigsäure) = 0,247 g = 75,6% Ausbeute.

2. 10 ccm Na-Acetacetat + 25 ccm 5%ige  $\text{KMnO}_4$  bei Zimmertemperatur 2 Stunden:

60 ccm n/10  $\text{KMnO}_4 = 0,306$  g = 93,5% Ausbeute.

3. Wie vorstehend:

61,7 ccm n/10  $\text{KMnO}_4 = 0,315$  g = 96,3% Ausbeute.

#### Versuch mit $\beta$ -Oxybutyrat.

1. 0,30 g Ca-Zn- $\beta$ -Oxybutyrat (0,24 g Säure) + 100 ccm 2%ige  $\text{KMnO}_4$  wurden 30 Minuten lang bis zum Sieden erhitzt, abgekühlt und wie oben behandelt:

35 ccm n/10  $\text{KMnO}_4$  (1 ccm n/10  $\text{KMnO}_4 = 0,0052$  g  $\beta$ -Oxybutter-säure) = 0,182 g = 76% Ausbeute.

2. 0,25 g Ca-Zn- $\beta$ -Oxybutyrat (0,20 g Säure) + 100 ccm 2%ige  $\text{KMnO}_4$  wurden 30 Minuten lang bis zum Sieden erhitzt, abgekühlt und wie oben behandelt:

29 ccm n/10  $\text{KMnO}_4 = 0,151$  g = 75,5% Ausbeute.

---