

Resynthese von Adrenalin in der innervierten und durch Splanchnicotomie denervierten Nebenniere von Kaninchen nach Reserpin

Gruppe	Reserpin intravenös	Tage nach Versuchsbeginn		Adrenaliningehalt µg/kg Körpergewicht		Differenz %
			Tötung	re NN	li NN	
I	3 × 0,3 mg/kg in 24 h Abstand	Kontrollen	4	normal	normal	
		Kontrollen	4	4,5	5,4	
		Kontrollen	4	5,2	7,5	
II	3 × 0,3 mg/kg in 24 h Abstand			9,5	7,0	
		Scheinoperation (Laparatomie)	Mittel =	6,4	6,6	—
		4	7	19,2	19,5	
III	3 × 0,3 mg/kg in 24 h Abstand	4	7	18,0	16,2	
		Denervierung	Mittel =	18,6	17,9	—
		4	7	normal	denerviert	
IV	3 × 0,3 mg/kg in 24 h Abstand	4	7	29,8	18,5	
		4	7	37,1	18,0	
		4	7	20,7	15,3	
V	2 × 0,5 mg/kg in 24 h Abstand		Mittel =	29,2	17,3	41
		4	8	24,0	16,8	
		4	8	30,6	29,1	
VI	2 × 0,5 mg/kg in 24 h Abstand	4	8	37,4	29,5	
			Mittel =	30,6	25,1	18
		4	8	normal	denerviert	
		4	8	35,5	25,5	
		4	8	54,3	35,0	
		4	8	36,0	30,0	
			Mittel =	41,9	30,2	28
		4	10	36,5	29,9	
		4	10	40,3	32,4	
		4	10	27,0	23,8	
			Mittel =	34,6	28,7	17

Reserpin am 4. Tage die linke Nebenniere in leichter Pernoctonnarkose durch Splanchnicotomie denerviert. 3 Tage später (am 7. Versuchstag) betrug der Adrenaliningehalt in der rechten (normalen) Nebenniere im Mittel 29,2 µg/kg, in der linken (denervierten) nur 17,3 µg/kg, das heisst 41% weniger. Bei 3 anderen Tieren, die in der gleichen Weise vorbehandelt worden waren, fand sich am 8. Versuchstag (4 Tage nach der Denervation der linken Nebenniere) in der rechten (normalen) Nebenniere ein Adrenaliningehalt von 30,6 µg/kg im Mittel, in der linken (denervierten) Nebenniere 25,1 µg/kg Adrenalin, das heisst 18% weniger.

In einer zweiten Versuchsreihe erhielten Kaninchen 2mal je 0,5 mg/kg Reserpin intravenös im Abstand von 24 h. 2 Tage später, am 4. Versuchstag, wurde die linke Nebenniere wiederum denerviert und nach weiteren 4 bzw. 6 Tagen (am 8. bzw. 10. Versuchstag) der Adrenaliningehalt bestimmt. Er betrug für die rechte (normale) Nebenniere 41,9 bzw. 34,6 µg/kg, für die linke (denervierte) Nebenniere 30,2 bzw. 28,7 µg/kg, das heisst 28 bzw. 17% weniger. Noradrenalin liess sich in keinem Versuch nachweisen.

Aus den Versuchen ergibt sich somit, dass nach einer durch Reserpin verursachten gleich starken Adrenalinverarmung der Nebennieren die Resynthese des Adrenalins in der innervierten Nebenniere deutlich schneller erfolgt als in der denervierten.

G. KRONEBERG und H. J. SCHÜMANN

Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt,
31. Januar 1959.

Summary

In experiments on rabbits, the influence of the innervation on the synthesis of adrenaline in the suprarenals was investigated. After depleting the glands of adrenaline by repeated injections of reserpine, one splanchnic nerve was sectioned. It was found that in the denervated suprarenal gland, the resynthesis was slower than in the normal gland. This suggests that the innervation is of importance for the rate of synthesis of adrenaline.

PRO EXPERIMENTIS

Papier-Elektrochromatographie der Aminosäuren des Blutserums

Die besondere Domäne der papierelektrophoretischen Analyse bei niederen Spannungen ist die weit verbreitete und weitgehend ausgearbeitete Trennung der Serumproteine¹. Gute Erfahrungen mit der Trennung der makromolekularen Substanzen veranlassten verschiedene Autoren, die Elektrophorese für die Trennung von Substanzen mit kleinem bis mittlerem Molekulargewicht zu benutzen. Papierchromatographie in Verbindung mit gleichzeitiger Elektrophorese der Aminosäuren² führte trotz ihrer Einfachheit zu keinen günstigen Resultaten.

¹ W. GRASSMANN und K. HANNIG, Hoppe Seylers Z. 290, 838 (1954); Klin. Wschr. 32, 838 (1954).

² G. HAUGAARD und T. D. KRONER, J. Amer. chem. Soc. 70, 2135 (1948).

Die Mehrzahl der Autoren beschreibt die Methoden der elektrophoretischen Trennung von Aminosäuren und

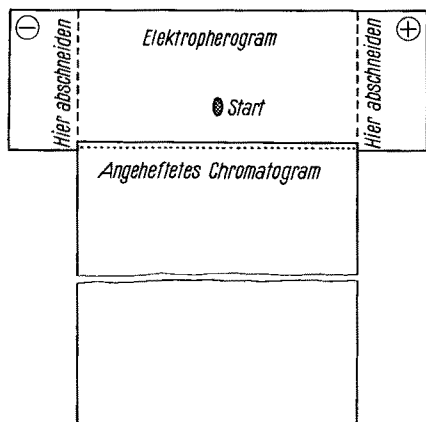


Abb. 1. In der 1. Richtung: Horizontale Elektrophorese in feuchter Kammer im System: Pyridin-Eisessigsäure (1:1:45, pH 4,7), 2 h; Stromspannung: 210 V; Intensität: 14 mA
In der 2. Richtung: Absteigende Chromatographie im System: *n*-Butanol-Eisessigsäure-Wasser (4:1:5)

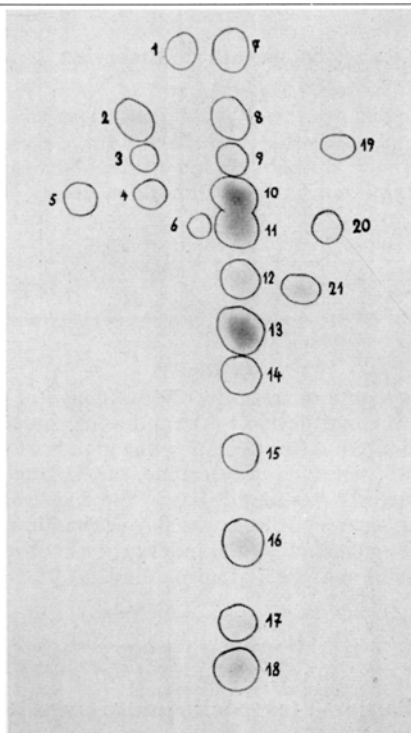


Abb. 2. Freie Aminosäuren des normalen Blutserums:

1. Peptid ?, 2. Lysin, 3. Histidin, 4. Arginin, 5. ?, 6. ?, 7. Cystin, 8. Peptid ?, 9. Taurin, 10. Serin, 11. Glycin, 12. Threonin, 13. Alanin, 14. Prolin, 15. α -Aminobuttersäure, 16. Methionin + Valin, 17. Phenylalanin, 18. Leucin + Iso-leucin, 19. Cysteinsäure, 20. Asparaginsäure, 21. Glutaminsäure

Peptiden³⁻¹², Zuckern¹³⁻¹⁶, Flavonoiden¹⁷, Phosphatiden^{18,19} sowie anorganischen Ionen^{20,21}, unter Benützung von höheren bis Hochspannungen zwischen 1000 bis

³ Th. WIELAND und E. FISCHER, *Naturwiss.* 35, 29 (1948).

⁴ M. LEDERER, *Research Lond.* 4, 4 (1951).

⁵ B. KICKHÖFEN und O. WESTPHAL, *Z. Naturforsch.* 7b, 659 (1954).

10000 V. Kühlung des elektrophoretischen Raumes ist dabei meist erforderlich.

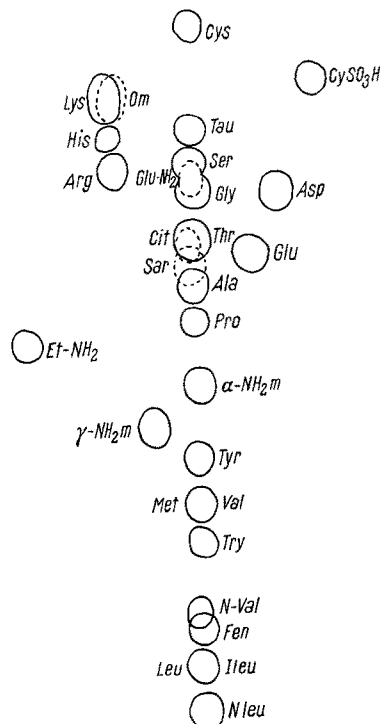


Abb. 3. Mappe von 30 Ninhydrin-positiven Substanzen:
Cys Cystin, Orn Ornithin, Lys Lysin, His Histidin, Arg Arginin, Tau Taurin, Ser Serin, Glu-NH₂ Glutamin, Gly Glycin, CySO₃H Cysteinsäure, Asp Asparaginsäure, Cit Citrulin, Thr Threonin, Sar Sarkosin, Glu Glutaminsäure, Ala Alanin, EtNH₂ Äthanolamin, Pro Prolin, α -NH₂m α -Aminobuttersäure, γ -NH₂m γ -Aminobuttersäure, Tyr Tyrosin, Met Methionin, Val Valin, Try Tryptophan, Fen Phenylalanin, Leu Leucin, Ileu Iso-leucin, Nleu Norleucin.

Wir verwendeten zur Trennung der freien Aminosäuren des Blutserums eine kombinierte Methode^{22,23} der horizontalen Elektrophorese (210 V bei etwa 14 mA) mit nachfolgender Chromatographie.

Methode

A. *Vorbereitung des Extraktes*: 1 ml Blutserum wird mit 9 ml Äthanol-Aceton (7:3 V/V) enteiweißt, zentrifugiert

⁶ L. HEILMEYER, R. CLOTTEN, A. STURM und A. LIPP, *Klin. Wschr.* 32, 831 (1954).

⁷ J. BLASS, O. LECOMTE und J. POLONOWSKI, *Bull. Soc. Chim. biol.* 36, 627 (1954).

⁸ D. GROSS, *Nature* 176, 72 (1955).

⁹ W. GRASSMANN, K. HANNIG und M. PLÖCKEL, *Hoppe Seylers Z.* 229, 258 (1955).

¹⁰ G. WERNER und O. WESTPHAL, *Angew. Chemie* 67, 251 (1955).

¹¹ A. ZANALDA, *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 33, 755 (1957).

¹² J. KOLOUŠEK, *Naturwiss.* 14, 398 (1957).

¹³ R. CONSDEN und W. M. STANIER, *Nature* 169, 783 (1952).

¹⁴ L. JAENICKE, *Naturwiss.* 39, 1 (1952).

¹⁵ F. MICHEEL und VAN DE KAMP, *Angew. Chem.* 64, 607 (1952).

¹⁶ D. GROSS, *Nature* 172, 908 (1953); 173, 487 (1954).

¹⁷ Y. HASHIMOTO, I. MORI und M. KIMURA, *Nature* 170, 975 (1952).

¹⁸ J. E. CARVIN, *Fed. Proc.* 15, 552 (1956).

¹⁹ H. ZIPPER und M. D. GLANTZ, *J. biol. Chem.* 230, 621 (1958).

²⁰ H. J. McDONALD, M. C. URBIN und M. B. WILLIAMSON, *Science* 112, 227 (1950).

²¹ M. LEDERER, *Nature* 167, 864 (1954).

²² E. L. DURRUM, *J. Amer. chem. Soc.* 72, 2943 (1950).

²³ C. G. HONEGGER, *Helv. chim. Acta* 39, 1671 (1956).

und das klare Supernatant in einer Porzellanschale im Wasserbad verdampft. Der Rückstand wird sofort 3mal (3 + 2 + 1 ml) mit 96%igem Äthanol eluiert und das Eluat in einer Epruvette verdampft. Der trockene Rückstand wird in 0,06 ml 70%igem Äthanol unter Erhitzen in siedendem Wasser aufgenommen und zentrifugiert.

B. *Elektrophorese*: 0,03 ml des klaren Extraktes (entspricht 0,5 ml Blutserum) werden in einem 1,5 cm langen Strich in die Mitte des Whatman-3-Papiers (12 × 37 cm) aufgetragen (Abb. 1). Das aufgetragene Muster wird nicht getrocknet.

Das Papier wird mit Puffer (Pyridin-Eisessigsäure-Wasser 10:10:450 ml – pH 4,7) befeuchtet (mit Ausnahme der Stelle mit dem aufgetragenen Muster, um eine überflüssige Zerstreuung des Musters zu vermeiden) und die horizontale Elektrophorese in feuchter Kammer während 2 h durchgeführt.

Auf diese Weise erfolgt die Trennung der Gruppen von Aminosäuren auf am Start bleibende neutrale und auf saure und basische, die zur Anode bzw. zur Kathode wandern. Gleichzeitig wird das biologische Material entsalzt.

²⁴ V. JIRGL, Clin. Chem. 3, 154 (1957).

²⁵ V. JIRGL, Vnitřní lékařství 10, 922 (1956).

C. *Chromatographie*: Nach dem Trocknen werden die Enden des Elektropherogramms auf eine Gesamtlänge von 24 cm abgeschnitten und ein 24 × 40 cm Whatman-3-Papier auf der Nähmaschine angeheftet (Abb. 1).

Zum Schlusse folgt die eindimensionale Entwicklung (senkrecht zur Richtung der Elektrophorese) im System: *n*-Butanol-Eisessigsäure-Wasser 4:1:5. Schon bei einbis zweifachem Entwickeln wird eine gute Auftrennung der Aminosäuren erzielt (Abb. 2 und 3).

V. JIRGL

Institut für Hämatologie und Bluttransfusion, Prag,
28. Juli 1958.

Summary

A simple method for paper-electrochromatography of free aminoacids of blood serum is given. In the first direction of the separation a normal apparatus for paper electrophoresis of serum proteins at low voltage is used. The aminoacids are separated into neutral, acid and basic components according to their mobility in the electric field, and are separated in the second direction by means of the descending technique on a chromatogram sewn to the electropherogram.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

COGITATIONES

Conformational Control of Bond Migration in the D-Homo Rearrangement of 17-Hydroxy-20-Keto Steroids¹

By N. L. WENDLER, D. TAUB, and R. FIRESTONE

Abstract.—The concept of conformational control of bond migration in the transition state to the D-homo-annulation of 17-hydroxy-20-keto steroids appears to provide a unified rationale for the observed phenomena.

The rearrangement of 17-hydroxy-20-keto steroids by Lewis acids as well as by alkali has been extensively investigated in recent years²; the structures of the D-homo products have been determined but a convincing explanation for the differences in bond migration invoked by reagent as well as by steroid configuration at C-17 has not yet appeared.

On the other hand, TURNER^{2c} has provided an excellent rationale for the hydroxyl configuration in the major isomer arising from these rearrangements, whereby the reagent controls the carbonyl orientation in the rearranging species. Thus, a Lewis acid, through oxygen coordination, brings the oxygen functionality (C=O vs. OH) relatively *cis* with respect to each other, whereas

alkali produces a *trans* alignment of these same functions in virtue of charge-dipole repulsion. The consequent reagent-imposed orientations, therefore, predetermine in their respective instances the α or β orientation of the hydroxyl function in the major product of rearrangement (see formulae below). This concept does not, however, give any clue as to the bond involved in the migratory process itself.

In the rearrangement proper it is to be observed that Lewis-acid catalysis induces 16,17-bond migration in the normal steroid series (17 α -OH) (A), whereas the 13,17-bond is involved in the *iso* series (17 β -OH) (B)³. Electronic considerations would lead to the prediction that the 13,17-bond should have migrated in both instances since, in the transition state of the migratory process, the more highly substituted C-13 position should be better able to participate in the delocalization of the charge deficiency created at C-20 (see structures (2) and (8))⁴.

In the alkaline catalyzed rearrangements, on the other hand, the 13,17-bond appears to migrate in both the normal as well as the *iso* series (see, however, later discussion); notwithstanding that on electronic grounds distribution stabilization of the charge surplus in the transition state of the migratory process should be better accommodated at the position (C-16) of lower group substitution.

It is proposed that the factor controlling the bond migration in the rearrangement of these systems is a conformational one. It will be noted that in any of the rearranging species, depending on which bond migrates, the

¹ Contribution from Merck & Co., Inc., Rahway, N. J., presented before the North Jersey Section of the American Chemical Society by N. L. WENDLER as part of a lecture entitled *Stereochemical Effects Attending D-Ring Rearrangements in Steroids*, February 3, 1959.

² For leading references see: (a) L. RUZICKA and H. MELDAHL, Helv. chim. Acta 23, 364 (1940). – (b) C. W. SHOPPEE and D. A. PRINS, Helv. chim. Acta 26, 201 (1943). – (c) R. B. TURNER, J. Amer. chem. Soc. 75, 3484 (1953). – (d) D. K. FUKUSHIMA, S. DOBRINER, M. S. HEFFLER, T. H. KRITCHEVSKY, F. HERLING, and G. ROBERTS, J. Amer. chem. Soc. 77, 6585 (1955). – (e) N. L. WENDLER, D. TAUB, S. DOBRINER, and D. K. FUKUSHIMA, J. Amer. chem. Soc. 78, 5027 (1956). – (f) R. B. TURNER, M. PERELMAN, and K. T. PARK, JR., J. Amer. chem. Soc. 79, 1108 (1957).

³ The bond migrations referred to are those involved in producing the *major* product of each reaction which in general corresponds to ca. 65% and 100% respectively of the isomer mixtures.

⁴ The possibility that steric factors present in the Lewis acid catalyzed rearrangement in the normal series (17 α -OH) but absent in the *iso* series (17 β -OH) may be responsible for the difference in bond migration in the two series (see FUKUSHIMA *et al.* 2d) is not convincing to us, nor is the inference that the alkaline catalyzed rearrangements conform to electronic expectations.