

P. somniferum L. var. 'Váhovecký' plants specified¹¹ as II₃ (the phase of developed leaves). The acetone powder prepared in the usual way¹² was dissolved in a buffer solution (TRIS-HCl, pH 7.05); a 2.4% preparation resulted, which was set free from endogenous amino acids by dialysis at 0°C against the same buffer solution. The transformation of tyrosine in $7.8 \cdot 10^{-3} M$ concentration was followed in the reaction mixture (incubation at 30°C, 20, 40, and 60 min respectively) by photometric determination of the disappearance of this amino acid (9.0, 20.0, and 31.0% respectively) at given conditions (after paper chromatographic separation using the method described¹³). At the same time the formation of 3,4-dihydroxyphenylalanine was analysed by ascending and descending paper chromatography in different solvent systems (*n*-butanol-CH₃COOH-H₂O [4:1:5 or 78:5:17] and *n*-propanol-H₂O [3:1]); detection with ninhydrin solution¹³ or a mixture composed of equal parts of a 15% (w/v) solution of FeCl₃ and 1% (w/v) solution of K₃Fe(CN)₆¹⁴. As the presence of L-ascorbic acid stimulates the oxidative metabolism of tyrosine¹⁵, we also studied the formation of 3,4-dihydroxyphenylalanine after addition of this substance in $1.8 \cdot 10^{-2}$ and $3.6 \cdot 10^{-2} M$ concentration. The identification of 3,4-dihydroxyphenylalanine was confirmed by rechromatographing the eluted substance with a standard preparation of 3,4-dihydroxyphenylalanine (Calbiochem Inc.)¹⁶. Other ninhydrin-positive substances were detected, especially in experiments with increased amounts of L-ascorbic acid. These substances could not be identified; nevertheless, some of them probably correspond to previous data¹⁶.

We succeeded in demonstrating the enzymic transformation of tyrosine to 3,4-dihydroxyphenylalanine, both in presence and in absence of L-ascorbic acid. The process is of enzymic character, since heat-denaturated preparations were absolutely ineffective: the amounts of exogenous tyrosine did not decrease and the presence of 3,4-dihydroxyphenylalanine was not detected.

Zusammenfassung. In Wurzelpräparaten von *Papaver somniferum* L. wurde die enzymatische Umwandlung von Tyrosin in Dioxyphenylalanin bei Anwesenheit oder Abwesenheit von L-Ascorbinsäure nachgewiesen.

P. KOVÁCS and A. JINDRA

Department of Biochemistry and Microbiology,
Faculty of Pharmacy, Bratislava (Czechoslovakia),
June 9, 1964.

¹¹ S. SÁRKÁNY and B. DÁNOS, Acta bot. Acad. Sci. hung. 3, 293 (1957).

¹² P. KOVÁCS and Z. NAGYOVÁ, Čsl. Farmácia 12, 32 (1963).

¹³ I. M. HAIS and K. MACEK, Handbuch der Papierchromatographie, Band I (G. Fischer Verlag, Jena 1958).

¹⁴ F. JAMINET, Contribution à l'étude de l'analyse, du métabolisme et de la biogénèse des alcaloïdes et des amines pyrocatéchniques du genêt à Balais (Editions Arscia SA, Bruxelles 1963).

¹⁵ S. LISSITZKY and M. ROLLAND, Nature 193, 881 (1962); Biochem. biophys. Acta 68, 83 (1962).

¹⁶ We are indebted to Prof. Dr. H. OELSCHLÄGER (Frankfurt-Main) for giving us this substance.

Kinetik des Malondialdehydes im Organismus

Malondialdehyd (MDA), ein Produkt der oxydativen Degradation der Polyenfettsäuren, entsteht aus Dimethinmethanradikalen, als Enolform von β -Hydroxyakrolein. Dieser Bestandteil aus der Lipoxydationsspaltung wurde bisher praktisch nur analytisch ausgenutzt, da MDA mit Hilfe kolorimetrischer Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure (Methinfarbstoff) günstig festgestellt werden kann¹. Die Reaktion kam bei technologischen Fettanalysen wiederholt zur Anwendung², ebenfalls bei Lipoperoxydationsuntersuchungen an biologischem Material³. Aldehyde sind zur Oxydation MDA auch in künstlichen Systemen im Organismus leicht oxydierbar, z.B. MDA + Fe²⁺ + Cystein⁴.

Die Oxydationsprodukte des MDA – nicht aber Malonsemialdehyd und Malonsäure – geben keine Thiobarbitursäurereaktion, was bei Untersuchungen der Lipoperoxydationsintensität zu negativen Ergebnissen führen kann. Ausserdem kommt man zur Annahme, dass MDA als leicht reagierende Substanz eine gewisse Rolle im Stoffwechsel spielt: Bildung des Malonylcoenzyms A, welches in der Synthese der Fettsäuren einen wichtigen Platz einnimmt⁵.

Darum verfolgten wir, nach Verabreichung von MDA in bestimmten Zeitabschnitten, die Konzentration des MDA in verschiedenen Organen, im Blutserum und ebenso seine Ausscheidung im Harn. Folgende Fragen sollten geklärt werden: (1) Wird MDA metabolisiert? Wenn ja, mit welcher Intensität in vivo? (2) Beeinflusst die Oxyda-

tion des MDA die Ergebnisse der Lipoperoxydation im Organismus?

MDA wurde mit vorsichtiger Hydrolyse aus 1,1,3,3-Tetraäthoxypropan gewonnen. Die Versuche wurden an 48 erwachsenen männlichen Albinoratten von 200–220 g Gewicht vorgenommen. Es wurden 6 mg MDA in 2 ml physiologischer Lösung i.p. verabreicht. MDA wurde im Homogenat der Organe oder direkt im Serum und Harn nach Enteicweissung (0,5 ml Serum, Harn oder Homogenat (25%) + 4,5 ml Phosphat-Puffer pH 5,9 + 2,0 ml 7% Perchlorsäure, vom Filtrat 4,0 ml + 2,0 ml Thiobarbitursäure 0,8%; 100°, 10 min photometrisch bei 530 m μ) gemessen. Die Kontrolltiere (6 Ratten) erhielten 6 mg in 2 ml i.p. Antipyrin/1-Phenyl-2,3-dimethylpyrazolon (Bestimmung siehe⁶); eine Substanz, die im Körper praktisch nicht metabolisiert wird.

¹ H. SCHMIDT, Fette, Seifen, Anstrichmittel 61, 881 (1959). – K. TÄUFEL und R. ZIMMERMANN, Fette, Seifen, Anstrichmittel 63, 226 (1961).

² S. PATTON und G. KURZ, J. Dairy Sci. 34, 669 (1951). – W. DUNKLEY, Food Technology 5, 342 (1951), und andere.

³ H. KOHN und M. LIVERSEGE, J. Pharmac. exp. Therap. 82, 292 (1944), und andere.

⁴ Z. PLACER, A. VESELOVÁ und M. VIDLÁKOVÁ, noch nicht publiziert.

⁵ Z. PLACER, B. SEDLÁČEK, Z. ROUBAL, Z. SLABOCHOVÁ und V. HRONÁKOVÁ, Čs. Gastroent. 16, 171 (1962).

⁶ Z. PLACER, R. RATH, und Z. SLABOCHOVÁ, Čs. Gastroent. 18, 103 (1964).

Die Versuchsergebnisse (siehe Tabelle) ergeben: (1) MDA wird intensiv metabolisiert. (2) Beim Vergleich mit Antipyrin ist die MDA-Ausscheidung im Harn praktisch

Kinetik des MDA in verschiedenen Organen, im Serum und Harn

	γ MDA in 1 g bzw. 1 ml in x min nach Verabreichung ^a			
	60	120	180	
Leber	3,65 ^d	3,29 ^e	2,82 ^e (20,4)	
Herz	6,34 ^c	6,16	3,97 ^d (18,8)	
Nieren	15,16 ^d	11,23	7,08 ^d (20,0)	
Testes	1,06	0,77	0,52 (20,7)	
Fett	4,42	4,51	3,63 ^e	
Serum	6,78 ^c (26,0)	1,26 ^e (26,0)	0,61 ^e (26,0)	

MDA in x min ausgeschieden				
Harn	60	120	180	420
γ	66,61	132,89	160,17	243,68
% ^b	1,1	2,2	2,8 (2,0)	4,0

^a Die Angaben in Klammern bedeuten die Konzentration bzw. Menge des Antipyrins. ^b 100% = verabreichte Menge des MDA bzw. Antipyrins. Statistische Auswertung: in Spalte 60 min sind Werte von 60 und 180 min verglichen; in Spalte 120 min sind Werte von 60 und 120 min verglichen; in Spalte 180 min sind Werte von 120 und 180 min verglichen. ^c $P < 0,001$. ^d $P < 0,01$. ^e $P < 0,05$.

gleich, während MDA jedoch rasch aus dem Serum schwindet. (3) In den Organen werden unterschiedliche Konzentrationen gefunden, was durch verschiedene schnelle Oxydation des MDA erklärt werden kann. (Auch Variationen in der Schnelligkeit des Verschwindens der Substanz aus den einzelnen Organen wurden gefunden.) (4) Eine niedrige Konzentration in den Testes fällt auf.

Die Konzentration in den Organen, im Serum und Harn ist vor der Verabreichung von MDA Null. Trotzdem wir minimale Mengen von MDA bestimmen können (bis 10^{-5} mg in 1 ml) ist es uns unter anderen Versuchsbedingungen, z.B. bei Leberschädigung, niemals gelungen, diesen Metaboliten festzustellen. Somit zeigt sich, dass das eventuell im Organismus entstandene MDA sehr schnell ausgenutzt wird. Daraus folgt, dass die Auswertung der Lipoperoxydation, mittels der Konzentration des MDA im Organismus gemessen, durch den intensiven MDA-Stoffwechsel beeinflusst sein kann.

Bei der verwendeten Menge an MDA konnten keine toxischen Reaktionen beobachtet werden.

Summary. We followed the kinetics of malonyldialdehyde in vivo and we found that it is very quickly metabolized. This may result in inaccuracy in the estimation of lipoperoxidation in the organism (reaction with 2-thio-barbituric acid).

Z. PLACER, A. VESELKOVÁ
und R. RATH

*Institut für Ernährungsforschung, Prag (Tschechoslowakei),
23. Juli 1964.*

Polypeptides and Leuchs' Anhydrides from Carbamic Acid Derivatives of C-Activated Amino Acids

We wish to report a new reaction of carbamic acid derivatives of amino acids, namely the formation of polypeptides and Leuchs' anhydrides. This reaction may have significance in being related to biological processes¹.

It was reported previously from this laboratory that the catalytic hydrogenation product of N-carbobenzoxyl-L-glutamic-1,5-anhydride rearranged to Leuchs' anhydride². In this communication evidence is presented that this is a general reaction of carbamic acid derivatives of C-activated amino acids as indicated by formulae $I \rightarrow II \rightarrow III$.

C-activated N-carbobenzoxyl amino acids (I) gave, on catalytic hydrogenation via the intermediate carbamic acid derivative II, the corresponding Leuchs' anhydrides III, which in certain cases polymerized immediately to polypeptides. The reaction can be followed by IR-spectro-

¹ Leuchs' anhydride was suggested to be an intermediate in the urea cycle by E. M. KOSOWER (*Molecular Biochemistry*, McGraw-Hill Book Co. Inc., New York 1962, p. 34); biotin gives a carbamic acid derivative in the 'activation' of carbon dioxide (S. H. G. ALLEN, R. STJERNHOLM, and H. G. WOOD, *J. biol. Chem.* **238**, PC2889 (1963)).

² J. KOVACS, H. NAGY KOVACS, and R. BALLINA, *J. Am. chem. Soc.* **85**, 1839 (1963).

