

unter Wasserstoff-Entwicklung reagierenden Rückstandes ($\text{MgH}_2 + \text{MgBr}_2$) erfolgte. Um festzustellen, um welche Kohlenwasserstoffe es sich handelte, wurde das abgegebene Gas durch zwei mit Bromwasser und Brom beschickte Waschflaschen geleitet, in denen es zum weitaus überwiegenden Teil absorbiert wurde. Die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes durch Entfernen des überschüss. Broms, Ausäthern der wäBr. Lösung, Trocknen und Abdampfen des Äthers und fraktionierte Destillation der zurückbleibenden Flüssigkeit lieferte eine bei 164–167° übergehende Verbindung (Sdp. von 1,2-Dibrom-butan: 166°; Sdp. von 2,3-Dibrom-butan: 158°). Hiernach bestand die Flüssigkeit zum größten Teil aus 1,2-Dibrom-butan und das bei der Pyrolyse entwickelte Gas dementsprechend aus Buten-(1).

Phenyl-magnesium-bromid: Eine aus 8 g (7.4 l) Magnesium³⁴) und 37.5 g (5.4 l) Brombenzol in üblicher Weise hergestellte äther. Lösung von Phenyl-magnesium-bromid wurde i. Vak. von Äther befreit und der feste Rückstand in einem mit zwei mit Eiskochsalz gekühlten Fallen verbundenen Schwertkolben im Ölpumpenvakuum thermisch zersetzt, wobei die Temperatur sehr langsam auf 300° gesteigert und dann 12 Stdn. auf dieser Höhe gehalten wurde. Während der ganzen Dauer des Erhitzens destillierte langsam Diphenyl ab³⁵). Die Fraktionierung des Destillats lieferte neben 2.4 g Benzol (Sdp. 78–82°; Benzol: 80°) 4.55 g Diphenyl (Schmp. 68°; Diphenyl: 69°), was 13 bzw. 25 % des eingesetzten Brombenzols entspricht. Der dunkelgraubraune Zersetzungsrückstand entwickelte auf Wasserzusatz hin explosionsartig heftig Wasserstoff.

104. Carl Martius und Dagobert Nitz-Litzow: Über den anaeroben Abbau der Citronensäure in tierischem Gewebe*)

[Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen]

(Eingegangen am 10. März 1952)

Citronensäure wurde unter Ausschluß von Sauerstoff mit Leberbrei bebrütet. Die gebildeten Abbauprodukte neben unveränderter Citronensäure wurden isoliert bzw. papierchromatographisch analysiert. Als Hauptprodukte des anaeroben Citratabbaus wurden α -Oxyglutarsäure bzw. Umwandlungsprodukte derselben festgestellt. Der Mechanismus dieses anaeroben Citratabbaus und seine physiologische Bedeutung werden diskutiert.

Wie schon A. Hahn¹⁾ beobachtet hatte, wird Citronensäure durch Muskel- oder Leberbrei auch unter streng anaeroben Bedingungen und ohne Zusatz von Wasserstoffacceptoren unter Kohlendioxyd-Abspaltung abgebaut. Als Ursache für diesen Abbau nahm Hahn seinerzeit zelleigene Wasserstoffacceptoren an, eine Ansicht, der sich der eine von uns zunächst anschloß²⁾, als man bei den Untersuchungen über den Abbaumechanismus der Citronensäure wiederum auf diesen beträchtlichen anaeroben Abbau aufmerksam wurde. Eine neue Bearbeitung dieses Problems ergab jedoch das Irrige dieser

³⁴) Es wurde mit einem größeren Magnesiumüberschuß gearbeitet, um das Magnesium möglichst quantitativ in Phenyl-magnesium-bromid zu verwandeln und die Bildung von Diphenyl zu vermeiden.

³⁵) Hieraus geht hervor, daß sich das Diphenyl in der Hauptmenge während des Erhitzens bildete und nicht bereits vorher bei der Bildung der Grignard-Verbindung infolge Nebenreaktion ($\text{Mg} + 2\text{C}_6\text{H}_5\text{Br} \rightarrow \text{MgBr}_2 + (\text{C}_6\text{H}_5)_2$) als Beimengung entstand.

*) Herrn Geheimrat H. Wieland in dankbarer Verehrung zum 75. Geburtstag gewidmet.

1) A. Hahn u. W. Harmann, Ztschr. Biol. 89, 563 [1929].

2) C. Martius, Ztschr. physiol. Chem. 257, 31 [1938].

Annahme und deckte einen hierbei ablaufenden gärungsähnlichen Oxydoreduktions-Mechanismus auf. Als Hauptprodukte des anaeroben Abbaus wurden neben etwas Bernsteinsäure α -Oxy-glutarsäure, ihr Lacton sowie Glutaconsäure aufgefunden. Bei der letztgenannten Säure dürfte es sich um ein Kunstprodukt handeln, das sich erst bei der Aufarbeitung aus α -Oxy-glutarsäure bildet. Der qualitative und quantitative Nachweis dieser Abbauprodukte geschah mit Hilfe einer für diesen Zweck verbesserten papierchromatographischen Methode.

Beschreibung der Versuche

Abbauversuch unter Stickstoff: 600 ccm 1-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurden in einem 3 l-Rundkolben durch Einleiten von Stickstoff von dem gelösten Sauerstoff befreit; unter weiterem Durchleiten von Stickstoff wurden 400 g Kalbsleberbrei (Latapiemühle!) und schließlich Natriumcitrat-Lösung (6 g Citronensäure mit Natriumhydroxyd neutralisiert und auf 200 ccm aufgefüllt) hinzugefügt. Die Mischung wurde darauf 2 Stdn. unter Stickstoff bei 37° im Thermostaten langsam gedreht und anschließend mit Metaphosphorsäure enteiweißt. In dem Filtrat der Eiweißfällung wurde die nicht umgesetzte Citronensäure colorimetrisch bestimmt. Das auf 200 ccm i. Vak. eingeeengte Filtrat wurde 3 Tage mit Äther extrahiert, der Abdampfrückstand des Ätherextraktes über Diphosphorpentoxyd getrocknet, gewogen und das Säuregemisch einer papierchromatographischen Analyse unterworfen.

Analoge Versuche wurden in evakuierten Gefäßen ausgeführt, wobei man die Citrat-Lösung in die durch längeres Evakuieren bereits luftfrei gemachte Gewebssuspension einsaugte. Im Versuch III (Tafel 2) wurde mit Quecksilber(II)-chlorid enteiweißt.

Papierchromatographische Trennung von Oxycarbonsäuren und Polycarbonsäuren: Die papierchromatographische Trennung von mehrbasischen Fettsäuren und Oxyfettsäuren ist zuerst von J. Lugg und B. Overell³⁾ beschrieben worden. Diese Autoren fügten dem Verteilungsmittel (Butanol oder Butanol/Chloroform) Essigsäure zu, um dadurch die Dissoziation der z. Tl. sehr starken organischen Säuren zurückzudrängen, die sich in einer Konzentrationsabhängigkeit der R_F -Werte und in unscharfen Flecken störend bemerkbar macht. Sehr viel wirksamer erwies sich uns für diesen Zweck Schweflige Säure, die sich bei genügend langem Trocknen ebenfalls vollständig verflüchtigte und, zu 40 % der Atmosphäre der Chromatographiekammer hinzugefügt, scharfe „spots“ und konzentrationsunabhängige R_F -Werte ergab. Die Papierstreifen (Whatman I.) wurden zunächst $\frac{1}{2}$ Stde. in dieser Atmosphäre belassen und dann in das Verteilungsmittel eingesenkt, als welches Butanol allein oder in Mischung mit Chloroform diente. Getrocknet wurde 1 Stde. bei 35° und eine weitere bei 80°, entwickelt durch Aufsprühen einer Lösung von Bromphenolblau (40 mg in 97 ccm Alkohol + 3 ccm n_{10} KOH). Zur quantitativen Bestimmung und Isolierung der Komponenten wurde die Lösung einer gewogenen Menge des Säuregemisches in einem Streifen am unteren Ende des breiten Filterpapierstreifens aufgetragen; nach der Entwicklung des Chromatogramms wurden die mit dem Indicator nur eben sichtbar gemachten Bänder ausgeschnitten, mit Wasser extrahiert, die Extrakte mit n_{100} NaOH titriert oder aus ihnen die Substanzen präparativ isoliert. Die Identifizierung gelang durch Vergleich mit parallel laufenden reinen Testsubstanzen. Die Tafel 1 zeigt die R_F -Werte verschiedener gesättigter und ungesättigter Fettsäuren und Oxyfettsäuren.

Die Tafel 2 enthält die Ergebnisse von drei verschiedenen anaeroben Citronensäure-Abbauversuchen. Die großen Verluste bei der Isolierung der nicht abgebauten Citronensäure bzw. ihrer Abbauprodukte besonders in Versuch I und II sind auf Adsorption an die reichlichen Mengen Eiweiß und unvollständige Extraktion zurückzuführen, nicht dagegen auf die chromatographische Bestimmungsmethode, die, wie Versuche mit reinen Substanzgemischen zeigten, 95 % und mehr der eingesetzten Mengen wieder erfassen läßt.

³⁾ Nature 160, 87 [1947].

Tafel 1. R_F -Werte in 40% SO_2 enthaltender Atmosphäre

	Butanol	10% But./Chlorof.	20% But./Chlorof.
<i>d</i> -Weinsäure	0.30	0.06	0
<i>allo</i> -Oxycitronensäure	0.42	0.23	0.073
Isocitronensäure	0.45	0.11	0.02
Citronensäure	0.47	0.18	0.032
Äpfelsäure	0.51	0.26	0.17
Oxycitronensäure	0.52	0.39	0.10
Oxyglutarsäure	0.62	0.46	0.28
Oxalsäure	0.63	0.41	0.32
Bernsteinsäure	0.73	0.69	0.68
<i>trans</i> -Aconitsäure	0.79	0.68	0.47
Glutarsäure	0.81	0.84	0.82
Fumarsäure	0.87	0.87	0.93
Oxyglutarsäurelacton	0.39	—	—
Glutaconsäure	0.83	—	—

Oxyglutarsäure wurde außer durch die papierchromatographische Trennung auch direkt aus dem Ätherextrakt isoliert, wobei zunächst durch eine 4stdg. Vorextraktion bei p_H 4 der Hauptteil der Bernsteinsäure entfernt wurde, da diese Säure die Abscheidung des Zink-Oxyglutarates stört. Die in wäßr.-alkohol. Lösung über die Barium- und Blei-Salze vorgereinigte Oxyglutarsäure wurde mit Zinkcarbonat in das sich langsam kristallin abscheidende Zink-Salz übergeführt.

Eingesetzte Citronensäure	in N_2 I.		in N_2 II.		i.Vak. III.	
	6 g	31.2 mMol	6 g	31.2 mMol	6 g	31.2 mMol
Abgebaute Citronensäure	2.76 g	14.4 mMol	2.8 g	14.6 mMol	3.58 g	19.2 mMol
		46 %		47 %		61.5 %
Extrahiert	1.268 g		1.108 g		3.119 g	
Chromatograph. gef.						
Oxyglutarsäurelacton	203 mg	1.56 mMol	150 mg	1.15 mMol	455 mg	3.5 mMol
Citronensäure	615 mg	3.2 mMol	475 mg	2.48 mMol	2060 mg	10.7 mMol
Oxyglutarsäure	103 mg	0.7 mMol	70 mg	0.47 mMol	215 mg	1.54 mMol
Bernsteinsäure	199 mg	1.68 mMol	145 mg	1.23 mMol	232 mg	1.97 mMol
Glutaconsäure	124 mg	0.95 mMol	81 mg	0.62 mMol	144 mg	1.11 mMol
Oxyglutarsäure gesamt		3.24 mMol		2.24 mMol		6.15 mMol

Diskussion

Trotz der in quantitativer Hinsicht unbefriedigenden Gesamtbilanz der Abbauver-
suche, die auf die angewandte Methodik der Isolierung zurückzuführen ist, dürfte der
Mechanismus des anaeroben Citratabbaus eindeutig sein. Die aus der Citronensäure zu-
nächst entstehende Isocitronensäure wird dehydriert und der dabei frei werdende Wasser-
stoff auf die durch Decarboxylierung der entstandenen Oxalbernsteinsäure gebildeten
 α -Keto-glutarsäure übertragen. Ein Teil der α -Keto-glutarsäure erleidet dabei eine Dis-
proportionierung in Bernsteinsäure und Oxyglutarsäure⁴).

- Isocitronensäure + Co II_{ox.} = Oxalbernsteinsäure + Co II_{red.}
- Oxalbernsteinsäure = Ketoglutarsäure + CO₂
- Ketoglutarsäure + Co II_{red.} = α -Oxy-glutarsäure + Co II_{ox.}

⁴) Vergl. H. Weil-Malherbe, Biochem. Journ. **31**, 2080, 2202 [1937].

Unklar in enzymchemischer Hinsicht bleibt dabei vorläufig der Mechanismus der Reduktion der α -Keto-glutarsäure durch die reduzierte Form der Codehydrase II, da nach Weil-Malherbe⁴⁾ die Oxyglutarsäuredehydrase, die die Reaktion c) katalysiert; weder Codehydrase I noch II für ihre Tätigkeit benötigen soll.

Wenn man die Frage nach der biologischen Bedeutung dieser anaeroben Abbaureaktion aufwirft, die eine gewisse Ähnlichkeit mit der Bildung von Alkohol bei der Gärung aufweist, so ist klar, daß ihr Sinn nicht etwa in der Gewinnung von Energie zu suchen sein kann, da keine der Einzelreaktionen zur Bildung energiereicher Phosphorsäurebindungen führt. Wir möchten vielmehr annehmen, daß hier eine Art „Entgiftungsreaktion“ vorliegt, durch welche die Anhäufung höherer Konzentrationen von Citronensäure unter allen Umständen verhindert werden soll. Citronensäure ist in Konzentrationen, die gar nicht so sehr viel über den normalen im Serum und in Geweben gefundenen Werten liegen, wegen der entionisierenden Wirkung auf Ca-Ionen giftig. Die Bildung der viel harmloseren Oxyglutarsäure wirkt einer bedrohlichen Erhöhung des Citratspiegels in den Geweben somit entgegen. Eine solche Erklärung würde auch der in tierischem Gewebe verbreitet vorkommenden Oxyglutarsäuredehydrase eine sinnvolle Rolle im Stoffwechselgeschehen zuweisen.

Es muß schließlich noch erwähnt werden, daß prinzipiell Citronensäure anaerob auch nach einem ganz anderen Schema abgebaut werden könnte. Wie von J. R. Stern, B. Shapiro, E. R. Stadtman und S. Ochoa⁵⁾ gefunden wurde, handelt es sich bei der Bildung der Citronensäure aus Acetyl-CoA und Oxalacetat um einen reversiblen Vorgang, d.h. Citronensäure kann unter der Wirkung des „condensing enzymes“ in Oxalacetat und Acetyl-CoA wieder zerfallen. Ein solcher Vorgang liegt offenbar dem von M. Deffner⁶⁾ studierten anaeroben Citratabbau durch Hefebakterien zugrunde, bei welchem pro Mol. verschwundener Citronensäure nahezu je 2 Moll. Essigsäure und Kohlendioxyd aufgefunden wurden. Die Frage, ob sich eine analoge Reaktion auch in tierischem Gewebe unter anaeroben Bedingungen abspielt, muß zunächst offen bleiben. In unseren Versuchen konnten wechselnde Mengen flüchtiger Säuren stets nachgewiesen werden. Gegen die Annahme des Ablaufes einer solchen Citronensäure-Zerfallsreaktion in tierischem Gewebe sprechen jedoch unsere Versuchsdaten, da keine Äpfelsäure bzw. Fumarsäure in den Ansätzen aufgefunden wurden, Oxallessigsäure in tierischem Gewebe jedoch unter anaeroben Bedingungen in diese Säure übergehen sollte.

105. Wilhelm Treibs und Oskar Holbe: Synthesen mit Dicarbonsäuren, II. Mitteil.: Chlorierung der Adipinsäure und einige Umsetzungen ihrer Mono- und Dichlorierungsprodukte*) **)

[Aus dem Institut für organische Chemie der Universität Leipzig]

(Eingegangen am 12. März 1952)

Durch Chlorieren der Adipinsäure wurden Mono- bzw. Dichloradipinsäure dargestellt, die sich in Mono- bzw. Dioxyadipinsäure sowie in die Dihydromuconsäure bzw. Muconsäure überführen ließen.

Adipinsäure steht heute durch oxydative Spaltung von Cyclohexanol und Cyclohexanon sowie von Cyclohexan in praktisch unbegrenzter Menge zur Verfügung.

⁵⁾ Journ. biol. Chem. **193**, 703 [1951]. ⁶⁾ A. **536**, 44 [1938].

*) Diese und die beiden folgenden Abhandlungen sind dem großen, vielseitigen und fruchtbaren Forscher, dem aufrechten und gütigen Menschen, Herrn Geheimrat Heinrich Wieland, zum 75. Geburtstag mit herzlichsten Wünschen gewidmet.

) O. Holbe, Diplomarbeit, Universität Leipzig; I. Mitteil.: W. Treibs u. G. Leich-Benring, B. **84, 52 [1951].