

11. *Adolf Lieber*: 1. Der Aa-bach. 2. Untersuchung des Seewassers und des Abwassers von Pfäffikon (Zürich). Eidg. Techn. Hochschule 1935.
12. *Giacomo Mosca*: Über die Aromastoffe der Kirschmäische. Eidg. Techn. Hochschule 1937.
13. *Ernst Robert Burkard*: Untersuchungen des Sihlsees und der Sihl 1938. Eidg. Techn. Hochschule 1940.

Aus dem Laboratorium des Kantonschemikers.

1. *H. Mohler* und *R. Widmer*: Zur kolorimetrischen Zinkbestimmung mit Resorcin. Mitt. **22**, 130 (1931).
2. *H. Mohler* und *H. Büeler*: Zur Eierkonservierung mit Wasserglas. Mitt. **22**, 375 (1931).
3. *H. Walder*: Ermittlung des Wasser-Zusatzes aus Gefrierpunkts-Erniedrigung und Refraktion des Chlorcalciumserums bei konservierter Milch. Mitt. **24**, 183 (1933).
4. *G. Blöchliger* und *W. Husmann*: Beitrag zur Kenntnis der Wachstumsbedingungen von Abwasserpilzen in fliessenden Gewässern. Z. Hydrologie **8**, 55 (1939).

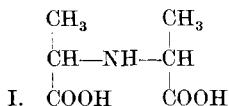
95. Weitere Mitteilung über das Verhalten von α, α' -Imino-dicarbonsäuren und ihren Derivaten zu Fermenten

von **P. Karrer, H. Koenig und R. Legler**.

(21. VI. 41.)

In einer früheren Mitteilung¹⁾ war das Verhalten des Octopins gegen die Aminosäure-dehydrasen untersucht worden. Es hatte sich dabei gezeigt, dass Nierenextrakte, welche *d*-Aminosäure-dehydrase enthalten, Octopin praktisch nicht angreifen, dass dagegen Leberbrei Octopin in gleicher Weise wie die natürlichen *l*-Aminosäuren oxydativ desaminiert. Dieses Verhalten des Octopins war als Stütze für die Anschauung aufgefasst worden, dass sowohl die Alanin- wie die Arginin-Komponente des Octopins *l*-Konfiguration besitzen. — Im weiteren war seiner Zeit die Vermutung geäussert worden, dass eine Form der Umaminierung von Aminosäuren im Organismus über Imino-dicarbonsäuren führen könnte.

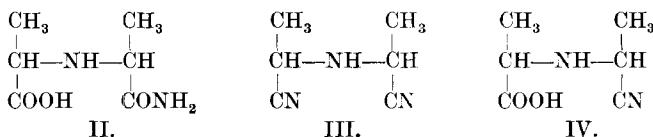
Wir haben jetzt als weitere Imino-dicarbonsäure die α, α' -Imino-dipropionsäure (I) und einige ihrer Derivate auf ihr Verhalten gegen Aminosäure-dehydrasen geprüft. Von der α, α' -Imino-dipropionsäure sind zwei optisch inaktive Formen vorauszusehen,



das Racemat und die Mesoverbindung. In der Literatur ist eine einzige Form beschrieben, über deren Konfiguration nichts Näheres

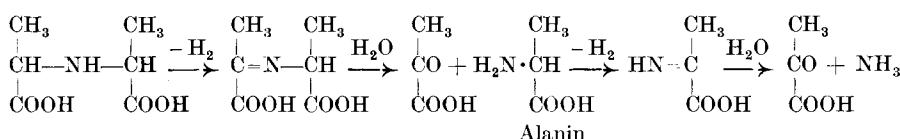
¹⁾ *P. Karrer, H. Koenig, R. Legler*, Helv. **24**, 127 (1941).

bekannt ist. Man erhält die Verbindung¹⁾ vom Smp. 233° aus dem zugehörigen Dinitril durch saure Verseifung und letzteres aus Acetaldehyd, Blausäure und Ammoniak. Die von *Ciamician* und *Silber*²⁾ empfohlene Verseifung des Nitrils mit Barytwasser ist nach unseren Erfahrungen wenig geeignet, da sich dabei infolge Hydrolyse hauptsächlich Alanin bildet. — Als Derivate der α, α' -Imino-dipropionsäure wurden außerdem ein nach *Ciamician* und *Silber*²⁾ hergestelltes Halbamid dieser Verbindung (II), das α, α' -Imino-dipropionitril (III), sowie das erstmals hergestellte Halbnitril der α, α' -Imino-dipropionsäure (IV) auf ihr Verhalten gegen die Fermente geprüft.



α, α' -Imino-dipropionsäure vom Smp. 233° wird durch die wässrigen Auszüge aus Schweine- und Hammelnieren, welche *d*-Aminosäure-dehydrase enthalten³⁾, oxydativ desaminiert. Abbauprodukte sind Brenztraubensäure, die als krystallisiertes Dinitrophenylhydra-zon isoliert wurde, sowie Ammoniak. Die Abbaugeschwindigkeit ist etwas geringer als diejenige des *d*-Alanins.

Quantitative Bestimmungen ergaben, dass auf 1 Mol entstandene Brenztraubensäure etwas weniger als $\frac{1}{2}$ Mol Ammoniak gebildet worden war. Das kann so gedeutet werden, dass die oxydative Desaminierung der α, α' -Imino-dipropionsäure vom Smp. 233° durch *d*-Aminosäure-dehydrasen bis zur Bildung von 2 Mol Brenztraubensäure verläuft:



Da nur *d*-Alanin durch *d*-Aminosäure-dehydrasen angegriffen wird, darf daraus gefolgert werden, dass dieses als Zwischenprodukt des Abbaus auftritt. In den von der *d*-Aminosäure-dehydrase oxydierten α, α' -Imino-dipropionsäuremolekülen müssen daher beide asymmetrischen C-Atome *d*-Konfiguration besitzen, d. h. die verwendete inaktive Form der α, α' -Imino-dipropionsäure stellt das Racemat dar.

Im Gegensatz zur α, α' -Imino-dipropionsäure vom Smp. 233° erwies sich das α, α' -Imino-dipropionsäure-monoamid vom Smp. 215° von *Ciamician* und *Silber* gegen die Fermente des Nierenextraktes praktisch beständig; auch bei längerer Ausdehnung des Versuches

¹⁾ *J. V. Dubsky, B. 49*, 1045 (1916).

²⁾ B. 39, 3952 (1906).

³⁾ Krebs, Bioch. J. **29**, 1620 (1935).

war die Sauerstoffaufnahme unbedeutend. Ebenso gering war der Abbau des Imino-dipropionitrils (III) durch *d*-Aminosäure-oxydase.

Viel weniger spezifisch wirken die Fermente, die im frischen Leberbrei vorkommen; es ist bekannt, dass eines dieser Enzyme die *l*-Aminosäuren oxydativ angreift und daher als *l*-Aminosäure-dehydrase bezeichnet wird. Unsere früheren Versuche zeigten, dass Octopin durch Leberbrei einen analogen Abbau erleidet. Ähnlich verhalten sich nun auch (optisch inaktive) α, α' -Imino-dipropionsäure vom Smp. 233°, das α, α' -Imino-dipropionsäure-monoamid vom Smp. 215°, α, α' -Imino-dipropionitril und das Halbnitrit der Imino-dipropionsäure (IV); sie absorbieren alle drei bei Gegenwart von Leberbrei Sauerstoff und diese Oxydationsvorgänge verlaufen nicht wesentlich langsamer als die Dehydrierung des *l*-Alanins. Die beim Abbau auftretenden Reaktionsprodukte wurden bisher noch nicht untersucht.

Die vorstehend geschilderte Dehydrierung der α, α' -Imino-dipropionsäure durch *d*-Amino-säure-dehydrase, die über eine *Schiff*'sche Base zu Brenztraubensäure und Alanin und schliesslich zu einer zweiten Molekel Brenztraubensäure und Ammoniak führt, zeigt, dass die Voraussetzungen für den früher von uns diskutierten Umaminierungsvorgang über α, α' -Imino-dicarbonsäuren in den Zellen bestehen. Wenn Imino-dicarbonsäuren im Stoffwechsel gebildet werden — und die Auffindung des Octopins beweist, dass solche in Zellen entstehen können —, dann verfügt die Zelle auch über die notwendigen Fermente, solche Imino-dicarbonsäuren über die *Schiff*'schen Basen zu Aminosäuren abzubauen.

Experimenteller Teil.

I. Versuche mit *d*-Aminosäure-dehydrase.

Als Fermentlösung wurde ein nach *H. A. Krebs*¹⁾ hergestellter Extrakt aus Schweinsnieren verwendet. Von dem getrockneten Schweinenierenpulver haben wir jeweils 5 g, fein pulverisiert, während 30 Minuten mit 50 cm³ 0,067-m. Phosphatpuffer, pH = 7,6, geschüttelt und anschliessend den Niederschlag abzentrifugiert. Die überstehende klare Lösung diente zu den Abbauversuchen.

Versuchsanordnung (Warburg-Apparatur).

- a) Im Reaktionsgefäß:
10—15 mg Substanz in 2,0 cm³ 0,067-m. Phosphatpuffer, pH = 7,6, 2,0 cm³ Fermentlösung und einige Körnchen Thymol.
- b) Im Seitenansatz: 6 Tropfen Kalilauge.
- c) Im Gasraum: Sauerstoff,
Temperatur des Thermostaten 39,0°
Versuchsdauer 90 Minuten.

¹⁾ Bioch. J. 29, 1620 (1935).

Fermentative Dehydrierungen mit Nierenextrakt gemessen durch O₂-Absorption.

Zeit in Minuten	15 mg <i>d,l</i> -Alanin 2,0 cm ³ Fermentlösung	15 mg <i>d,l</i> -Alanin 2,0 cm ³ Fermentlösung	2,0 cm ³ Fermentlösung	2,0 cm ³ Fermentlösung
0	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³
15	15 „	13 „	0 „	0 „
30	34 „	32 „	0 „	0 „
60	70 „	68 „	1 „	1 „
90	102 „	100 „	2 „	2 „
Zeit in Minuten	15 mg Imino-dipropionsäure 2 cm ³ Fermentlösung	15 mg Imino-dipropionsäure 2 cm ³ Fermentlösung	10 mg Imino-dipropionsäure-monoamid, 2 cm ³ Fermentlösung	10 mg Imino-dipropionsäure-monoamid, 2 cm ³ Fermentlösung
0	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³
15	1 „	1 „	0 „	0 „
30	8 „	8 „	1 „	1 „
60	21 „	21 „	4 „	4 „
90	34 „	33 „	6 „	7 „
Zeit in Minuten	10 mg Imino-dipropionitril 2,0 cm ³ Fermentlösung	10 mg Imino-dipropionitril 2,0 cm ³ Fermentlösung	7,5 mg Octopin 2,0 cm ³ Fermentlösung	7,5 mg Octopin 2,0 cm ³ Fermentlösung
0	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³
15	0 „	0 „	0 „	0 „
30	2 „	2 „	0 „	0 „
60	4 „	4 „	2 „	2 „
90	7 „	8 „	4 „	4 „
Zeit in Minuten	2,0 cm ³ Fermentlösung	2,0 cm ³ Fermentlösung		
0	0 mm ³	0 mm ³		
15	0 „	0 „		
30	0 „	0 „		
60	1 „	1 „		
90	2 „	2 „		

Analysen der verwendeten Präparate:

Imino-dipropionsäure, Smp. 233⁰:

C₆H₁₁O₄N Ber. C 44,69 H 6,87 N 8,69%
 Gef. „ 44,65 „ 6,73 „ 8,45%
 Ninhydrinreaktion negativ.

Imino-dipropionsäure-monoamid, Smp. 210—215⁰:

C₆H₁₂O₃N₂ Ber. C 44,98 H 7,56 N 17,50%
 Gef. „ 45,27 „ 7,49 „ 17,29%

Imino-dipropionsäure-dinitril, Smp. 69—70°:

$C_6H_9N_3$ Ber. C 58,51 H 7,37%

Gef. „, 58,48 „, 7,30%

Octopin (hergestellt nach *Akasi*¹⁾), Smp. 279°:

$C_9H_{18}O_4N_4$ Ber. N 22,75 Gef. N 22,2%

Pikrat, Smp. 272°. Ber. N 20,63 Gef. N 20,31%

Isolierung der Reaktionsprodukte beim Abbau von α , α' -Imino-dipropionsäure durch *d*-Aminosäure-dehydrase. 402 mg α , α' -Imino-dipropionsäure wurden mit 50 cm³ frischem Schweinenierenextrakt²⁾ (in 0,067-m. Phosphatpuffer vom p_H = 7,6) in einem 250 cm³ Schliffkolben mit Sauerstoff durchströmt. Nach Zusatz von etwas Thymol blieb der gut verschlossene Kolben 14 Stunden im Brutschrank bei 39,0° stehen.

Ein gleichzeitig angesetzter Blindversuch enthielt nur 50 cm³ mit Thymol steril gehaltenen Schweinenierenextrakt.

Nach dem Abkühlen der Lösungen haben wir diese mit je 9 cm³ 30-proz. Trichloressigsäurelösung von Eiweiss befreit und den Niederschlag abgenutscht. Nach dem Waschen mit Wasser betrugten die Volumina: 70 cm³ Imino-dipropionsäurefiltrat und 69 cm³ aus dem Blindversuch.

Je zwei Drittel der beiden Lösungen wurden mit je 14 cm³ einer bei Zimmertemperatur gesättigten Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2-n. Salzsäure versetzt. Der Blindversuch lieferte kein Dinitrophenylhydrazon. Aus der Lösung des Abbauproduktes der α , α' -Imino-dipropionsäure schied sich Brenztraubensäure-2,4-dinitrophenylhydrazon aus. Ausbeute 59,5 mg, bezogen auf 402 mg angewandte α , α' -Imino-dipropionsäure. Schmelzpunkt nach dem Umkristallisieren aus Essigester 215°.

Die restlichen Drittel der enteiweissten Filtrate haben wir mit Boratpuffer alkalisch gemacht, hierauf je 20 cm³ im Vakuum mit Wasserdampf abdestilliert und in den Destillaten das gebildete Ammoniak kolorimetrisch (mit *Nessler*-Reagens) bestimmt. Nach Abzug des Blindwertes ergaben sich 1,18 mg NH₃ als Abbauprodukt aus 402 mg α , α' -Imino-dipropionsäure.

Zum Vergleich führen wir an, dass 501 mg *d,l*-Alanin mit derselben Fermentlösung und unter den gleichen Reaktionsbedingungen 91,9 mg Brenztraubensäure-2,4-dinitrophenylhydrazon und 2,0 mg NH₃ lieferten.

II. Versuche mit *l*-Aminosäure-dehydrase.

Versuchsanordnung (*Warburg*-Apparatur):

a) Im Reaktionsgefäß:

5,0 mg Substanz in 2,0 cm³ 0,067-m. Phosphatpuffer (p_H = 7,6) gelöst.

¹⁾ J. Biochemistry **25**, 281, 291 (1937).

²⁾ Biochem. J. **29**, 1620 (1935).

0,5 g frischer Schweinsleberbrei in 2,0 cm³ 0,067-m. Phosphatpuffer (p_{H} = 7,6) aufgeschlämmt;

b) im Seitenansatz: 6 Tropfen 30-proz. Kalilauge;

c) im Gasraum: Sauerstoff.

Temperatur des Thermostaten 39,0°.

Versuchsdauer 90 Minuten.

Fermentative Dehydrierungen mit Leberbrei als Fermentquelle, gemessen durch O_2 -Absorption.

Zeit in Minuten	0,5 g Leberbrei	0,5 g Leberbrei	5,0 mg <i>l</i> -Alanin 0,5 g Leberbrei	5,0 mg <i>l</i> -Alanin 0,5 g Leberbrei
0	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³
15	4 „	4 „	23 „	23 „
30	10 „	11 „	45 „	45 „
60	22 „	23 „	73 „	73 „
90	36 „	37 „	118 „	118 „
Zeit in Minuten	5,0 mg Imino-dipropionsäure 0,5 g Leberbrei	5,0 mg Imino-dipropionsäure 0,5 g Leberbrei	5,0 mg Imino-dipropionsäure-monoamid 0,5 g Leberbrei	5,0 mg Imino-dipropionsäure-monoamid 0,5 g Leberbrei
0	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³
15	11 „	17 „	18 „	17 „
30	25 „	30 „	34 „	32 „
60	54 „	58 „	58 „	60 „
90	76 „	81 „	79 „	81 „
Zeit in Minuten	5,0 mg Imino-dipropionsäure-mononitril 0,5 g Leberbrei	5,0 mg Imino-dipropionsäure-mononitril 0,5 g Leberbrei	5,0 mg Imino-dipropionsäure-dinitril 0,5 g Leberbrei	5,0 mg Imino-dipropionsäure-dinitril 0,5 g Leberbrei
0	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³	0 mm ³
15	13 „	16 „	10 „	10 „
30	34 „	37 „	28 „	27 „
60	58 „	62 „	59 „	57 „
90	102 „	108 „	88 „	87 „
Zeit in Minuten	0,5 g Leberbrei	0,5 g Leberbrei		
0	0 mm ³	0 mm ³		
15	4 „	4 „		
30	10 „	11 „		
60	22 „	23 „		
90	36 „	37 „		

Präparatives.

Darstellung des α, α' -Imino-dipropionsäure-mononitrils
(Formel IV).

Diese Verbindung lässt sich aus α, α' -Imino-dipropionsäure-dinitril durch partielle Verseifung gewinnen; die Reaktion, die wir benutzten, führt über den betreffenden Iminoäther.

In eine Lösung von 1 g α, α' -Imino-dipropionitril in 20 cm³ absolutem Äthylalkohol wurde unter Wasserkühlung so lange trockener Chlorwasserstoff eingeleitet, bis sich der zuerst gebildete Niederschlag wieder vollständig gelöst hatte. Von diesem Zeitpunkt an setzte man das Einleiten von Chlorwasserstoff noch 15 Minuten lang fort, stellte die Flüssigkeit 8 Stunden in den Eisraum und tropfte sie hierauf durch ein Filter in 200 cm³ absoluten Äther. Der ausgefallene Niederschlag wurde beim längeren Verreiben mit dem Glasstab körnig. Man dekantierte den überstehenden Äther und ersetzte ihn 3 mal durch neue Mengen derselben Flüssigkeit. Schliesslich haben wir den sehr hygroskopischen Niederschlag, zweifellos das salzsaure Salz des gebildeten Iminoäthers, abgenutscht und im Exsikkator getrocknet.

Die Verbindung wurde hierauf in wenig Wasser gelöst, die wässrige Flüssigkeit mit Äther überschichtet und ein kleiner Überschuss calcinierte Soda zugefügt. Durch 15-maliges Ausschütteln mit Äther konnte das α, α' -Imino-dipropionsäure-mononitril der wässrigen Schicht entzogen werden. Die vereinigten und getrockneten Ätherextrakte wurden auf 5 cm³ eingeengt, worauf sich nach einigem Stehen die Verbindung in farblosen Krystallen ausschied. Smp. 180 bis 182°.

C ₆ H ₁₀ O ₂ N ₂	Ber. C 50,67	H 7,09	N 19,70%
	Gef. „ 50,65	„ 6,85	„ 19,42%

Das Imino-dipropionsäure-mononitril löst sich in Wasser leicht mit neutraler Reaktion. Beim Kochen der wässrigen Lösung mit Kupfer(II)-carbonat entsteht ein violettblaues Kupfersalz. In Äther löst sich die Substanz schwer; deshalb muss bei deren Isolierung aus der konzentrierten wässrigen Lösung durch Ausschütteln mit Äther eine grosse Menge dieses Lösungsmittels angewandt werden.

Darstellung der α, α' -Imino-dipropionsäure.

Diese Säure wurde aus dem zugehörigen Dinitril¹⁾ dargestellt. Wir verwendeten dabei die von *Dubsky*¹⁾ empfohlene Verseifung mit konzentrierter Salzsäure, isolierten jedoch die gebildete α, α' -Imino-dipropionsäure nicht wie *Dubsky* über das Kupfersalz oder Zinksalz, sondern über das Bleisalz, da wir nur im letzteren Fall befriedigende Resultate erzielten.

¹⁾ B. 49, 1049 (1916).

Die Herstellung der α, α' -Imino-dipropionsäure aus dem Dinitril gestaltete sich folgendermassen:

Das Dinitril wurde mit der 5fachen Menge konzentrierter Salzsäure über Nacht stehen gelassen, wobei eine Erwärmung über 30—35° zu vermeiden ist. Hierauf verdünnte man mit 150 cm³ Wasser und erhielt die Flüssigkeit 4 Stunden am Rückflusskühler zum Sieden. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum vollständig abdestilliert, der Rückstand sehr gut getrocknet und anschliessend mit absolutem Alkohol so häufig ausgekocht, bis der Rückstand keine organische Verbindung mehr enthielt.

Die alkoholischen Auszüge wurden jetzt im Vakuum zur Trockene eingedampft und der gut getrocknete Rückstand zwecks Extraktion vorhandener Oxysäure mit Äther mehrmals ausgezogen. Dieser Rückstand war nun hart und liess sich leicht zerkleinern. Wir lösten ihn in Wasser und versetzten diese Lösung mit einem Überschuss von Bleioxyd. Sie wurde nun zum Sieden erhitzt und heiss filtriert. Den Filter-Rückstand zog man noch mehrmals mit siedendem Wasser aus. Aus den vereinigten wässrigen Extrakten schied sich beim Abkühlen ein Krystallbrei ab, der zur Hauptsache aus dem Bleisalz der α, α' -Imino-dipropionsäure bestand. Er wurde abgenutscht, mit Wasser ausgewaschen, wiederum in heissem Wasser aufgelöst und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff das Bleion als Sulfid niedergeschlagen. Nach dem Abnutzen des ausgefallenen Bleisulfids und Vertreiben des gelösten Schwefelwasserstoffs haben wir die Flüssigkeit mit so viel Silbercarbonat versetzt, als zum Ausfällen aller Chlorionen notwendig war. Nun wurde der Niederschlag abfiltriert, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in das Filtrat vorhandenes Silberion als Silbersulfid gefällt, letzteres abgenutscht, das Filtrat durch etwas Tierkohle entfärbt und eingeengt. Diese Lösung, welche die freie α, α' -Imino-dipropionsäure enthielt, war schwach sauer (p_H 3). Zu dieser eingeengten Lösung wurde Alkohol zugesetzt, worauf nach kurzer Zeit die α, α' -Imino-dipropionsäure in Form langer, farbloser Nadeln auskrystallisierte. Nach dem Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol lag der Schmelzpunkt bei 233°.

Auch aus der von dem Bleisalz abfiltrierten wässrigen Lösung liess sich die darin noch als Bleisalz vorhandene, verhältnismässig geringe Menge α, α' -Imino-dipropionsäure in gleicher Weise gewinnen.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.