

## 162. Über die Bildung von Alanin aus Brenztraubensäure und Ammoniumchlorid durch homogenisierte Leber<sup>1)</sup>

von O. Wiss.

(7. V. 48.)

Die Tatsache, dass der tierische Organismus aus Ketosäuren und Ammoniumverbindungen Aminosäuren aufbauen kann, ist auf verschiedenen Wegen eindeutig bewiesen worden.

F. Knoop und Mitarbeiter<sup>2)</sup> haben nach Verfütterung von mit Phenyl substituierten Ketosäuren die entsprechende acetylierte Aminosäure aus dem Harn isoliert; sie haben auch in Modellversuchen die Synthese von Aminosäuren aus Ketosäuren und Ammoniak verwirklicht. Von R. Schoenheimer und Mitarbeitern<sup>3)</sup> konnte nachgewiesen werden, dass isotoper Stickstoff, der in Form von Ammoniumverbindungen dem Organismus zugeführt wurde, zum Aufbau der Aminosäuren des Körpereiweisses Verwendung findet. Auch überlebende Organe können so Aminosäuren synthetisieren. G. Embden und E. Schmitz<sup>4)</sup> haben im Leberdurchströmungsversuch aus den Ammoniumsalzen verschiedener  $\alpha$ -Ketosäuren die entsprechenden  $\alpha$ -Aminosäuren erhalten. M. Neber<sup>5)</sup> hat gezeigt, dass auch überlebende Schnitte Aminosäuren aufbauen können. Nach Inkubation mit Brenztraubensäure und einem Ammoniumsalz hat er eine Zunahme des  $\alpha$ -Aminostickstoffs festgestellt. Neuerdings hat M. Kritzmann<sup>6)</sup> bei Verwendung von Organextrakten eine Bildung von Alanin aus Brenztraubensäure und Ammoniumion beobachtet, jedoch nur nachdem organfremde Enzyme, nämlich Cozymase und Transaminase, zugesetzt worden waren.

Die Ansichten über den Reaktionsablauf dieser Aminosäurebildung sind verschieden. Nach du Vigneaud und Mitarbeitern<sup>7)</sup> wird die Ketosäure unter Bindung einer Molekel Ammoniak und gleichzeitiger Dehydrierung einer Molekel Brenztraubensäure zur acetylierten Aminosäure reduziert. Für den Fall der Glutaminsäurebildung aus Ketoglutarsäure und Ammoniak hat H. von Euler<sup>8)</sup> nachgewiesen, dass die Codehydrase die Hydrierung der entstandenen Iminoglutaräsäure übernimmt. Nach Adler, von Euler und Mitarbeitern<sup>9)</sup> dient die

<sup>1)</sup> Teilweise vorgetragen an der 30. Tagung des Schweizerischen Vereins der Physiologen und Pharmakologen (25. Januar 1947 in Fribourg).

<sup>2)</sup> F. Knoop, Z. physiol. Ch. **67**, 489 (1910); F. Knoop und E. Kertess, ibid. **71**, 252 (1911); F. Knoop und J. G. Blanco, ibid. **146**, 267 (1925); F. Knoop und H. Oesterlin, ibid. **148**, 294 (1925); **170**, 186 (1927); F. Knoop, ibid. **253**, 281, 284 (1938).

<sup>3)</sup> D. Rittenberg, R. Schoenheimer und A. S. Keston, J. Biol. Chem. **128**, 603 (1939).

<sup>4)</sup> G. Embden und E. Schmitz, Bioch. Z. **29**, 423 (1910); **38**, 393 (1912).

<sup>5)</sup> M. Neber, Z. physiol. Ch. **234**, 83 (1935).

<sup>6)</sup> M. G. Kritzmann, J. Biol. Chem. **167**, 77 (1947).

<sup>7)</sup> V. du Vigneaud und C. E. Meyer, J. Biol. Chem. **98**, 295 (1932); V. du Vigneaud, R. R. Sealock und C. Van Etter, ibid. **98**, 565 (1932); V. du Vigneaud und O. J. Irish, ibid. **109**, XCIV (1935); **122**, 349 (1937); V. du Vigneaud, J. L. Wood und O. J. Irish, ibid. **129**, 171 (1939); V. du Vigneaud, M. Cohn, G. B. Brown, O. J. Irish, R. Schoenheimer und D. Rittenberg, ibid. **31**, 273 (1939); F. Binkley, J. L. Wood und V. du Vigneaud, ibid. **153**, 495 (1944).

<sup>8)</sup> H. von Euler, E. Adler, G. Günther und N. B. Das, Z. physiol. Ch. **254**, 61 (1938).

<sup>9)</sup> E. Adler, H. von Euler, G. Günther und M. Plass, Biochem. J. **33**, 1028 (1939).

Isocitronensäure als Wasserstoffdonator, während *A. Krebs* und *P. Cohen*<sup>1)</sup> Versuche mitgeteilt haben, die zeigen, dass die Ketoglutar-säure selber Wasserstoff abgeben kann und durch Decarboxylierung in Bernsteinsäure übergeführt wird. Umstritten ist die Beteiligung der Umaminierungsreaktion. *Braunstein*<sup>2)</sup> ist geneigt, dieser Reaktion allgemeinere Bedeutung zuzumessen. So hat *Kritzmann* (*loc. cit.*) die von *Neber* und später *A. Krebs* gefundene Aminosäurebildung durch Leberschnitte nachgeprüft und kommt zum Schluss, dass die Bildung über die Umaminierung verläuft. Aus Brenztraubensäure und Kohlen-dioxyd soll Oxalessigsäure und aus Oxalessigsäure und Ammoniak durch Vermittlung eines unbekannten Wasserstoffdonators Asparaginsäure gebildet werden; durch Umaminierung könnte mit Hilfe der Asparaginsäureaminopherase aus Brenztraubensäure und Asparaginsäure Alanin entstehen. Nach *P. Cohen*<sup>3)</sup> ist jedoch die Umaminierung im wesentlichen auf die Reaktion zwischen Glutaminsäure und Oxal-essigsäure und zwischen Glutaminsäure und Brenztraubensäure be-schränkt. Auch *D. Green* und Mitarbeiter<sup>4)</sup> haben nur diese beiden Enzyme präparativ darstellen können. *D. E. O'Kane* und *I. C. Gunsalus*<sup>5)</sup> haben die Untersuchungen von *Kritzmann* nachgeprüft. Sie haben festgestellt, dass die zur Asparaginsäureaminopherase als Co-ferment zugesetzte Substanz Glutaminsäure enthält und vermuten deshalb, dass die von *Kritzmann* beschriebene Reaktion durch Zu-sammenwirken der Glutaminsäure-Alanin- und der Glutaminsäure-Asparaginsäure-Transaminase zustande kommt.

Eigene Untersuchungen über die Alaninbildung durch homogeni-siertes Lebergewebe (Ratte und Meerschweinchen) ergeben, dass sie von Oxydationsvorgängen abhängig ist. Es konnten keine Anhalts-punkte gefunden werden, die eine Beteiligung der Asparaginsäure oder Glutaminsäure wahrscheinlich machen.

## Experimenteller Teil.

### Methoden.

Mit Ausnahme der Grossansätze werden alle Versuche in *Warburg*-Gefässen von ca. 30 cm<sup>3</sup> Inhalt durchgeführt. So ist es möglich, den Verbrauch von Sauerstoff und die Bil-dung von Kohlensäure zu bestimmen. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen beträgt immer 3 cm<sup>3</sup>. Die Temperatur des Wasserbades ist 38°. Alle Substanzen werden in m/15 Phosphat-puffer ( $p_{\text{H}} = 8,0$ ) gelöst. Die in den Tabellen angegebenen Konzentrationen sind die End-konzentrationen des Gefäßinhaltes.

Bereitung von homogenisiertem Leberbrei. Die Ratten oder Meerschweinchen werden durch Kopfschlag getötet und entblutet. Die Leber wird sofort entnommen, im vorgekühlten Mörser mit gleichem Gewichtsteil feinem Quarzsand versetzt und rasch, d. h. innerhalb zweier Minuten, vollständig homogenisiert. Der Brei wird mit eiskaltem

<sup>1)</sup> *H. A. Krebs* und *P. P. Cohen*, *Biochem. J.* **33**, 1895 (1939).

<sup>2)</sup> *A. E. Braunstein*, *Adv. in Protein Chem.* III, 1 (1947).

<sup>3)</sup> *P. P. Cohen* und *G. L. Hekhuis*, *J. Biol. Chem.* **140**, 711 (1941).

<sup>4)</sup> *D. E. Green*, *L. F. Leloir* und *V. Nocito*, *J. Biol. Chem.* **161**, 559 (1945).

<sup>5)</sup> *D. E. O'Kane* und *I. C. Gunsalus*, *J. Biol. Chem.* **170**, 433 (1947).

Phosphatpuffer ( $p_H = 8,0$ ) kurze Zeit kräftig verröhrt. Nach kurzfristigem Zentrifugieren (10 Sekunden bei ca. 2000 U./Min.) wird die überstehende Flüssigkeit in die einzelnen *Warburg*-Gefäße verteilt. Vom Zeitpunkt des Tötens des Tieres bis zum Einhängen der Gefäße sollten nicht mehr als 20 Minuten verstreichen.

**Bereitung der Leberextrakte.** Wird die nach obiger Vorschrift hergestellte Suspension länger zentrifugiert, so sedimentiert je nach Tourenzahl und Zeitspanne des Zentrifugierens mehr oder weniger des suspendierten Materials. Es wurden Extrakte untersucht, die durch 15 Minuten dauerndes Zentrifugieren bei 3500 U./Min. gewonnen wurden.

#### Analytisches.

Ammoniak wird nach *Conway*<sup>1)</sup> bestimmt. Als Masslösung wird 0,01-n. Salzsäure verwendet. Das Volumen der Analyse beträgt höchstens 1 cm<sup>3</sup>. Es wird mit 1,5 cm<sup>3</sup> gesättigter Kaliumcarbonatlösung alkalisch gemacht. Die Ansätze werden bei Zimmertemperatur gehalten und nach 24 Stunden mit 0,01-n. Bariumhydroxydlösung titriert.

Zur Bestimmung der Brenztraubensäure<sup>2)</sup> wird 1 cm<sup>3</sup> der Reaktionsflüssigkeit dem *Warburg*-Gefäß entnommen und nach Zusatz von 7 cm<sup>3</sup> Wasser mit 2 cm<sup>3</sup> 8-proz. Trichloressigsäure enteiweisst. 0,5 cm<sup>3</sup> des Filtrates werden mit 0,5 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt, 1 cm<sup>3</sup> Kaliumhydroxydlösung und 0,5 cm<sup>3</sup> einer 2-proz. alkoholischen Lösung von Salicylaldehyd zugegeben. Die Ansätze werden 10 Minuten bei 38° gehalten und die Farbintensität spektrophotometrisch bestimmt (Filter S 47, 10 mm Küvette).

Der Aminostickstoff wird nach *Folin*<sup>3)</sup> ermittelt. 1—2 cm<sup>3</sup> der enteiweissten Analyse (vgl. Brenztraubensäurebestimmung) werden im Schüttelzyylinder mit Wasser auf 25 cm<sup>3</sup> ergänzt und zur Entfernung des Ammoniaks mit 400 mg Permutit während 5 Minuten geschwenkt. 10 cm<sup>3</sup> der so behandelten Lösung werden im 25er Messkölbchen mit 1 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Salzsäure, 1 cm<sup>3</sup> 1-proz. Natriumcarbonatlösung und 5 cm<sup>3</sup> 0,5-proz. β-Naphthochinonsulfosäurelösung versetzt. (Die Herstellung des β-naphthochinonsulfosäuren Natriums erfolgte nach *Folin*<sup>4)</sup>. (Der Ansatz wird über Nacht vor Licht geschützt stehen gelassen. Nachher werden 1 cm<sup>3</sup> Essigsäure-Acetatgemisch (100 cm<sup>3</sup> Eisessig + 10 cm<sup>3</sup> Wasser + 200 cm<sup>3</sup> 5-proz. CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na kryst.) und 5 cm<sup>3</sup> 4-proz. Natriumthiosulfatlösung zugegeben und mit Wasser auf 25 cm<sup>3</sup> ergänzt. Spektrophotometrische Messung der Farbintensität mit Filter S 47 bei 10 mm Schichtdicke.

Zur Bestimmung des Alanins werden 0,2 cm<sup>3</sup> des Gefäßcheninhaltes mit Wasser auf 1 cm<sup>3</sup> ergänzt, mit 5 cm<sup>3</sup> 1-proz. Pikrinsäurelösung versetzt und durch Zentrifugieren vom Niederschlag abgetrennt. Im Filtrat (5,5 cm<sup>3</sup>) wird das Alanin nach der früher angegebenen Methode bestimmt<sup>5)</sup>. Es hat sich gezeigt, dass die dort angegebene Eichkurve nicht vollständig gerade weiter verläuft. Für die Extinktionswerte 0,3—2,5 ist  $\gamma$  Alanin/E = 400.

Asparaginsäure und Glutaminsäure werden mikrobiologisch bestimmt<sup>6)</sup>.

#### Alaninbildung aus Brenztraubensäure und Ammoniumchlorid durch homogenisiertes Lebergewebe.

*Neber* hat nachgewiesen, dass Leber- und Nierenschnitte mit Brenztraubensäure und Ammoniumcarbonat inkubiert eine Zunahme von Aminostickstoff verursachen. Da bei Verwendung von Leberextrakten keine Zunahme festgestellt wurde, schloss er daraus, dass die Aminosäurebildung strukturgebunden sei. *Kritzmann* hat auch in homogenisierter Leber und in Extrakten aus Acetontrockenpulver eine Aminosäurebildung festgestellt, allerdings nur wenn Enzyme, die aus anderen Organen hergestellt waren, zugesetzt waren.

<sup>1)</sup> *E. J. Conway* und *A. Byrne*, Biochem. J. **27**, 418 (1933).

<sup>2)</sup> *F. B. Straub*, Z. physiol. Ch. **244**, 117 (1936).

<sup>3)</sup> *O. Folin*, J. Biol. Chem. **51**, 393 (1922).

<sup>4)</sup> *O. Folin*, J. Biol. Chem. **51**, 386 (1922).

<sup>5)</sup> *O. Wiss*, Helv. **31**, 22 (1948).

<sup>6)</sup> *L. R. Hac*, *E. E. Snell* und *R. J. Williams*, J. Biol. Chem. **159**, 273 (1945); *L. R. Hac* und *E. E. Snell*, ibid. **159**, 291 (1945).

Es lässt sich in homogenisierter Leber eine sehr intensive Aminosäurebildung nachweisen, wenn die Leber sehr schnell verarbeitet wird und wenn der Brei in hoher Konzentration zur Untersuchung gelangt. Der wesentliche Anteil der Aminostickstoffzunahme ist durch Alaninbildung bedingt.

Tabelle 1.

Homogenisierte Meerschweinchenleber in  $1\frac{1}{3}$ -facher Puffermenge suspendiert, 10 Sekunden zentrifugiert,  $2 \text{ cm}^3$  pro Ansatz.

| Versuchsreihe  | Zusatz   | $O_2$ -<br>Verbrauch<br>$\text{mm}^3$ | $\text{NH}_3$ | Amino-N-<br>Leerwert | Brenztraub.-<br>Leerwert |
|--|--|---------------------------------------|---------------|----------------------|--------------------------|
| Versuch a<br>Resultate<br>nach<br>$1\frac{1}{2}$ Stunden | Brenztraubens. m/25                                  | 2250                                  | m/3700        | m/113                | m/76                     |
|  | $\text{NH}_4\text{Cl}$ m/25                          | 1575                                  | m/21          | m/147                | —                        |
|  | Brenztraubens. m/25<br>+ $\text{NH}_4\text{Cl}$ m/25 | 1430                                  | m/52          | m/34                 | m/688                    |
|  | —  | 1570                                  | m/162         | —                    | —                        |
| Versuch b<br>Resultate<br>nach<br>2 Stunden              | Brenztraubens. m/25                                  | 3245                                  | m/260         | m/177                | m/134                    |
|  | $\text{NH}_4\text{Cl}$ m/25                          | 2070                                  | m/22          | m/103                | —                        |
|  | Brenztraubens. m/25<br>+ $\text{NH}_4\text{Cl}$ m/25 | 1985                                  | m/39          | m/37                 | m/343                    |
|  | —  | 2110                                  | m/127         | —                    | —                        |
| Versuch c<br>Resultate<br>nach<br>$6\frac{1}{2}$ Stunden | Brenztraubens. m/25                                  | 3855                                  | m/430         | m/65                 | —                        |
|  | $\text{NH}_4\text{Cl}$ m/25                          | 2055                                  | m/21,5        | m/116                | —                        |
|  | Brenztraubens. m/25<br>+ $\text{NH}_4\text{Cl}$ m/25 | 2615                                  | m/42          | m/21                 | —                        |
|  | —  | 1850                                  | m/120         | —                    | —                        |

Aus den Versuchen, die in Tabelle 1 wiedergegeben sind, geht hervor, dass Brenztraubensäure und Ammoniumchlorid, homogenisierter Leber zugesetzt, eine intensive Zunahme des  $\alpha$ -Aminostickstoffs verursachen. In Übereinstimmung dazu ist eine Abnahme des Ammoniakgehaltes nachweisbar.

| Versuch | $\text{NH}_3$ -Abnahme | Amino-N-Zunahme |
|---------|------------------------|-----------------|
| a       | m/35                   | m/45            |
| b       | m/50                   | m/59            |
| c       | m/44                   | m/27            |

Die zugesetzte Brenztraubensäure wird teilweise abgebaut. Sie wird aber auch für den Aufbau der Aminosäure verwendet, denn in Gegenwart von Ammoniumchlorid ist die Abnahme viel größer, obschon der oxydative Abbau der Brenztraubensäure geringer ist, was aus dem Sauerstoffverbrauch ersichtlich ist.

Tabelle 2 zeigt, dass die Zunahme des Aminostickstoffs durch Alaninbildung bedingt ist. Es geht weiterhin daraus hervor, dass die Reaktionsgeschwindigkeit gross ist, so dass der Maximalwert für Alanin unter Umständen schon nach 30 Minuten erreicht ist.

Tabelle 2.

Homogenisierte Leber in gleicher Puffermenge suspendiert, 10 Sekunden zentrifugiert, 2 cm<sup>3</sup> pro Ansatz.

| Tierart              | Zusatz  | Resultate                      |         |         |             |         |         |
|----------------------|---|--------------------------------|---------|---------|-------------|---------|---------|
|                      |   | O <sub>2</sub> -Verbrauch nach |         |         | Alanin nach |         |         |
|                      |   | 10 Min.                        | 30 Min. | 60 Min. | 10 Min.     | 30 Min. | 60 Min. |
| Meerschweinchenleber | —   | 421                            | 1022    | 1770    | m/890       | m/570   | m/620   |
|                      | Brenztraubens. m/25                           | 298                            | 915     | 1600    | m/175       | m/135   | m/102   |
|                      | NH <sub>4</sub> Cl m/50                       | 258                            | 702     | 1250    | m/570       | m/430   | m/289   |
|                      | Brenztraubens. m/25 + NH <sub>4</sub> Cl m/50 | 181                            | 632     | 1092    | m/105       | m/74    | m/43    |
| Rattenleber          | —   | —                              | 542     | 685     | m/200       | m/183   | m/178   |
|                      | Brenztraubens. m/25                           | —                              | 1588    | 1755    | m/110       | m/87    | m/92    |
|                      | NH <sub>4</sub> Cl m/50                       | —                              | 641     | 1615    | m/200       | m/200   | m/94    |
|                      | Brenztraubens. m/25 + NH <sub>4</sub> Cl m/50 | —                              | 1272    | 1910    | m/46        | m/31    | m/33    |

### Alaninbildung von Oxydationsvorgängen abhängig.

Die von *M. Neber* (loc. cit.) beschriebene Aminosäurebildung verläuft auch unter anaeroben Bedingungen. Der von *Krittmann* (loc. cit.) postulierte Reaktionsmechanismus benötigt keinen Sauerstoff. In homogenisierter Leber ist jedoch die Alaninbildung von gleichzeitig verlaufenden Oxydationsvorgängen abhängig. Sie ist in Stickstoffatmosphäre viel geringer als in Gegenwart von Sauerstoff. Enzympräparate, die nur geringe Atmungsgrösse aufweisen, bilden weniger Alanin als stark atmende Enzympräparate.

Tabelle 3.

Homogenisierte Meerschweinchenleber in gleicher Puffermenge suspendiert, 10 Sekunden zentrifugiert, 1,8 cm<sup>3</sup> pro Ansatz.

| Zusatz  | Resultate nach 6 Stunden                  |    |                 |       |                  |       |                      |      |
|---|---|----|-----------------|-------|------------------|-------|----------------------|------|
|   | O <sub>2</sub> -Verbrauch mm <sup>3</sup> |    | NH <sub>3</sub> |       | Amino-N-Leerwert |       | Brenztraub.-Leerwert |      |
|   | a*  | b* | a*              | b*    | a*               | b*    | a*                   | b*   |
| —   | 1870                                      | —  | m/110           | m/150 | —                | —     | —                    | —    |
| Brenztraubens. m/25                           | 3635                                      | —  | m/380           | m/250 | m/101            | m/483 | m/143                | m/45 |
| NH <sub>4</sub> Cl m/25                       | 1910                                      | —  | m/21            | m/20  | m/212            | m/483 | —                    | —    |
| Brenztraubens. m/25 + NH <sub>4</sub> Cl m/25 | 2435                                      | —  | m/37            | m/22  | m/29             | m/241 | m/242                | m/54 |

a\* = Sauerstoffatmosphäre    b\* = Stickstoffatmosphäre

In Tabelle 3 sind Resultate aus Versuchen in Sauerstoff- und Stickstoffatmosphäre einander gegenübergestellt. Der Vergleich zeigt, dass die Aminostickstoffbildung in Stickstoffatmosphäre nur einen Bruchteil derjenigen in Sauerstoffatmosphäre ausmacht. In Übereinstimmung damit ist die Abnahme von Ammoniak und Brenztraubensäure viel geringer.

|  | Amino-N-Zunahme |                | Ammoniak-Abnahme |                |
|--|-----------------|----------------|------------------|----------------|
|  | O <sub>2</sub>  | N <sub>2</sub> | O <sub>2</sub>   | N <sub>2</sub> |
| Aus Tabelle 3<br>Andere Versuchs-<br>reihe | m/41            | m/480          | m/41             | m/220          |
|  | m/80            | m/310          | m/70             | m/220          |

Tabelle 4.

Homogenisierte Meerschweinchenleber in  $1\frac{1}{3}$ -facher Puffermenge suspendiert, 15 Minuten zentrifugiert, 2 cm<sup>3</sup> pro Ansatz.

| Zusatz   | Resultate nach 2 Stunden                     |    |                 |        |                      |        |                             |      |
|--|--|----|-----------------|--------|----------------------|--------|-----------------------------|------|
|  | O <sub>2</sub> -Verbrauch<br>mm <sup>3</sup> |    | NH <sub>3</sub> |        | Amino-N-<br>Leerwert |        | Brenztraubens.-<br>Leerwert |      |
|  | a*   | b* | a*              | b*     | a*                   | b*     | a*                          | b*   |
| —  | 1136   | —  | m/185           | m/216  | —                    | —      | —                           | —    |
| Brenztraubens. m/25                              | 1080   | —  | m/570           | m/345  | 0                    | 0      | m/59                        | m/46 |
| NH <sub>4</sub> Cl m/25                          | 655  | —  | m/23            | m/22   | 0                    | m/1270 | —                           | —    |
| Brenztraubens. m/25<br>+ NH <sub>4</sub> Cl m/25 | 528  | —  | m/24            | m/22,5 | m/1270               | m/1270 | m/46                        | m/46 |

a\* = Sauerstoffatmosphäre      b\* = Stickstoffatmosphäre

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, verliert das homogenisierte Material weitgehend die Fähigkeit der Aminierung, wenn durch längeres Zentrifugieren die strukturierten Anteile entfernt worden sind. Die Aminostickstoffzunahme und das Verschwinden des Ammoniaks sind gering. Zwischen den Ansätzen in Stickstoff- und Sauerstoffatmosphäre ist kein wesentlicher Unterschied.

Alaninbildung durch HCN und As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hemmbar.

Die Alaninbildung durch homogenisierte Leber ist durch HCN und As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hemmbar. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass die Alaninbildung nur unter acroben Bedingungen erfolgt.

Tabelle 5.

Homogenisierte Meerschweinchenleber in gleicher Puffermenge suspendiert, 10 Sekunden zentrifugiert, 2 cm<sup>3</sup> pro Ansatz.

| Zusatz   | Resultate nach 1 1/2 Stunden                 |     |                 |       |                      |       |                             |      |
|--|--|-----|-----------------|-------|----------------------|-------|-----------------------------|------|
|  | O <sub>2</sub> -Verbrauch<br>mm <sup>3</sup> |     | NH <sub>3</sub> |       | Amino-N-<br>Leerwert |       | Brenztraubens.-<br>Leerwert |      |
|  | a*   | b*  | a*              | b*    | a*                   | b*    | a*                          | b*   |
| —  | 1570   | 251 | m/164           | m/246 | —                    | —     | —                           | —    |
| Brenztraubens. m/25                              | 2250   | 635 | m/3700          | m/224 | m/113                | m/226 | m/76                        | m/46 |
| NH <sub>4</sub> Cl m/25                          | 1575   | 221 | m/21            | m/24  | m/147                | m/924 | —                           | —    |
| Brenztraubens. m/25<br>+ NH <sub>4</sub> Cl m/25 | 1430   | 348 | m/52            | m/28  | m/34                 | m/87  | m/688                       | m/56 |

a\* = ohne Zusatz      b\* = in m/1000 KCN

Tabelle 6.

Homogenisierte Rattenleber in gleicher Puffermenge suspendiert, 10 Sekunden zentrifugiert,  
1 cm<sup>3</sup> pro Ansatz.

| Zusatz  | Resultate nach 1 Stunde                   |     |    |          |       |       |
|---|---|-----|----|----------|-------|-------|
|   | O <sub>2</sub> -Verbrauch mm <sup>3</sup> |     |    | Ammoniak |       |       |
|   | a*  | b*  | c* | a*       | b*    | c*    |
| —   | 279                                       | 138 | —  | m/158    | m/255 | m/255 |
| Brenztraubens. m/50                               | 250                                       | 120 | —  | m/226    | m/271 | m/245 |
| NH <sub>4</sub> Cl m/200                          | 253                                       | 135 | —  | m/79     | m/107 | m/104 |
| Brenztraubens. m/50<br>+ NH <sub>4</sub> Cl m/200 | 298                                       | 122 | —  | m/244    | m/108 | m/107 |

a\* = Sauerstoffatmosphäre      b\* = in m/1000 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
c\* = Stickstoffatmosphäre

Aus Tabellen 5 und 6 geht hervor, dass durch m/1000 KCN und m/1000 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> die Aminostickstoffbildung stark herabgesetzt wird und dementsprechend nur geringe Mengen Ammoniak gebunden werden. Im Versuch, der in Tabelle 5 wiedergegeben ist, wird die Zunahme der Aminostickstoffbildung von m/44 durch KCN auf m/98, die Abnahme des Ammoniaks von m/35 auf m/168 herabgesetzt.

### Zur Frage des Reaktionsmechanismus der Alaninbildung.

Kritzmann (loc. cit.) ist der Auffassung, dass das Alanin in der Leber mit Hilfe der Aminodicarbonsäure und der Umaminierungsreaktion gebildet wird. Die Brenztraubensäure soll auf Grund der Wood-Werkman-Reaktion mit Kohlendioxyd Oxalessigsäure bilden; die Oxalessigsäure soll mit Ammoniak durch einen unbekannten Wasserstoffdonator zu Asparaginsäure reduziert werden; diese soll schliesslich durch Umaminierung mit Brenztraubensäure Alanin bilden. Die wesentlichen Stützen dieser Hypothese sind die folgenden Beobachtungen: Die Alaninbildung aus Ammoniumion und Brenztraubensäure durch Leberschnitte erfolgt nur in Gegenwart von Kohlendioxyd (Hydrogencarbonatpuffer). Wenn an Stelle von Brenztraubensäure Oxalessigsäure zugesetzt wird, ist Kohlendioxyd zur Alaninbildung nicht nötig. Als Zwischenprodukt lässt sich Asparaginsäure nachweisen.

Es konnten keine Anhaltspunkte gefunden werden, dass die Alaninbildung in homogenisierter Leber nach diesem Schema verläuft. Schon die Tatsache, dass dazu Sauerstoff benötigt wird, steht im Widerspruch dazu. Es wurde zudem der Einfluss von Kohlendioxyd auf die Alaninbildung geprüft, ohne dass sich eine fördernde Wirkung feststellen liess. Die Absorption des CO<sub>2</sub> hat keinen Einfluss auf die Alaninbildung. In CO<sub>2</sub>-Atmosphäre erfolgt keine Alaninbildung aus Brenztraubensäure und Ammoniak.

Tabelle 7.

Homogenisierte Meerschweinchenleber in gleicher Puffermenge suspendiert, 10 Sekunden zentrifugiert,  $2 \text{ cm}^3$  pro Ansatz.

| Zusatz   | Resultate nach $2\frac{1}{2}$ Stunden |       |       |                 |       |       |
|--|---------------------------------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
|  | Ammoniak                              |       |       | Alanin-Leerwert |       |       |
|  | a*                                    | b*    | c*    | a*              | b*    | c*    |
| —  | m/104                                 | m/115 | m/146 | —               | —     | —     |
| Brenztraubens. m/25                              | m/330                                 | m/330 | m/290 | m/130           | m/157 | m/107 |
| NH <sub>4</sub> Cl m/50                          | m/36                                  | m/37  | m/39  | 0               | 0     | 0     |
| Brenztraubens. m/25<br>+ NH <sub>4</sub> Cl m/50 | m/100                                 | m/70  | m/48  | m/62            | m/73  | m/95  |

a\* = in Sauerstoffatmosphäre mit Absorption von CO<sub>2</sub> (Lauge im Einsatz)  
 b\* = in Sauerstoffatmosphäre ohne Absorption von CO<sub>2</sub> (keine Lauge im Einsatz)  
 c\* = in Kohlendioxydatmosphäre

Es ist auch nicht gelungen, Asparaginsäure oder Glutaminsäure als Zwischenprodukte nachzuweisen.

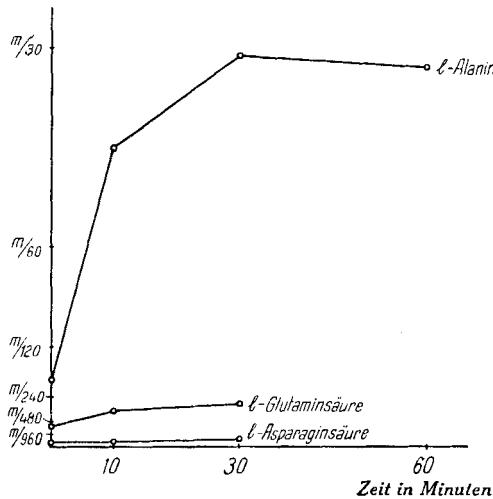


Fig. 1.

Homogenisierte Rattenleber in gleicher Puffermenge suspendiert,  
10 Sekunden zentrifugiert,  $2 \text{ cm}^3$  pro Ansatz.

#### Isolierung des gebildeten Alanins.

Ca. 300 g homogenisierte Kaninchenleber werden mit 300  $\text{cm}^3$  Phosphatpuffer  $\text{pH} = 8,0$  extrahiert und kurz (10 Sekunden) zentrifugiert. 370  $\text{cm}^3$  der überstehenden Flüssigkeit werden in 6 Erlenmeyer-Kolben von 200  $\text{cm}^3$  Volumen verteilt. Pro Ansatz werden je 1  $\text{cm}^3$  m. Ammoniumchloridlösung und 2  $\text{cm}^3$  m. neutralisierte Brenztraubensäurelösung zugegeben. Die Erlenmeyer-Kolben werden mit Gummistopfen verschlossen, mit Sauerstoff durchströmt und im Thermostaten bei 38° geschüttelt. Nach Ablauf von 2 Stunden werden nochmals 1  $\text{cm}^3$  m. Ammoniumchloridlösung und 2  $\text{cm}^3$  m. Brenztraubensäurelösung zugegeben. Nach 6-stündiger Versuchsdauer wird die gesamte Reaktionsflüssigkeit

zum Kochen erhitzt und durch Kolieren vom Niederschlag befreit. Der Rückstand wird nochmals mit ca. 200 cm<sup>3</sup> Wasser aufgekocht und kolliert. Nach Abkühlen werden die vereinigten Filtrate zur vollständigen Enteiweißung mit fester Phosphorwolframsäure versetzt; die überschüssige Phosphorwolframsäure wird mit heißer, gesättigter Bariumhydroxyd-lösung gefällt und durch Abnutzen entfernt. Die leicht alkalisch reagierende Lösung wird in der Porzellanschale durch Abblasen auf dem Wasserbad auf ca. 50 cm<sup>3</sup> eingeeengt.

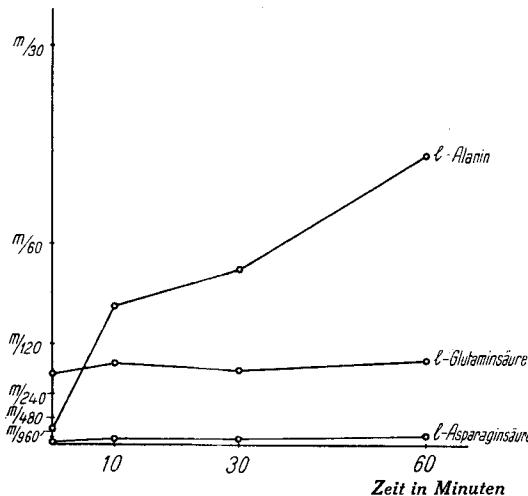


Fig. 2.

Homogenisierte Meerschweinchenleber in gleicher Puffermenge suspendiert,  
10 Sekunden zentrifugiert, 2 cm<sup>3</sup> pro Ansatz.

Dabei ist zu verhindern, dass die Temperatur 40° übersteigt. Nach Zusatz des 8-fachen Volumens Äthanol wird der Ansatz über Nacht stehen gelassen; dann wird vom Niederschlag abfiltriert, der Alkohol im Vakuum entfernt und die Restlösung auf 20 cm<sup>3</sup> eingeeengt. Durch vorsichtiges Ansäuern mit konz. Schwefelsäure bis leicht sauer wird das Barium vollständig entfernt; die filtrierte Lösung wird nun mit 30-proz. Natriumhydroxyd-lösung auf  $\text{p}_\text{H} = 12$  gebracht.

Die Isolierung des Alanins erfolgt als  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindung nach der von *Fischer* und *Bergell*<sup>1)</sup> angegebenen Methode. Das in üblicher Weise dargestellte  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid wird durch Destillation im Hochvakuum gereinigt (Schmelzpunkt 78°), 20 cm<sup>3</sup> einer 10-proz. ätherischen Lösung zum alkalischen Leberextrakt zugegeben und auf der Schüttelmaschine geschüttelt. In Abständen von 1—1½ Stunden wird 3-mal die verbrauchte Natriumhydroxyd-lösung ersetzt, indem bis  $\text{p}_\text{H} = 12$  alkalisiert wird. Nach 24-stündigem Schütteln wird im Scheidetrichter die wässrige Phase von der ätherischen getrennt. Die weitere Verarbeitung erfolgt nach den Angaben von *Emden* und *Schmitz* (loc. cit.). Die wässrige Lösung wird mit konz. Salzsäure bis kongosauer angesäuert und das ausgefällte Reaktionsprodukt durch mehrmaliges Ausschütteln mit Äther extrahiert. Der Äther wird unter Zusatz von 20 cm<sup>3</sup> Wasser im Vakuum entfernt. Es wird bis zur deutlich alkalischen Reaktion mit 2-n. Ammoniak versetzt, das Ungleiche ( $\beta$ -Naphthalinsulfamid) durch Ätherextraktion entfernt und das Reaktionsprodukt nach Ansäuern der wässrigen Lösung durch mehrmaliges Ausschütteln mit Äther ausgezogen. Die vereinigten Ätherextrakte werden 3—4 mal mit ganz wenig Wasser gewaschen. Anschliessend wird der Äther unter Zusatz von 20 cm<sup>3</sup> Wasser im Vakuum verjagt. Der Rückstand wird mit 2-n. Ammoniak möglichst genau neutralisiert, auf ca. 30 cm<sup>3</sup> mit Wasser ergänzt und

<sup>1)</sup> *E. Fischer* und *P. Bergell*, B. 35, 3779 (1902).

tropfenweise mit 10-proz. Bariumchloridlösung versetzt. Nach Abtrennung des dicken Barytniederschlages wird das Filtrat wiederum angesäuert und das ausgefallene  $\beta$ -Naphthalinsulfo-alanin in üblicher Weise mit Äther extrahiert. Der Ätherauszug wird mit ganz wenig Wasser mehrmals gewaschen und der Äther im Vakuum bei Zusatz von 20 cm<sup>3</sup> Wasser vertrieben. Das ausgefallene, ölige Reaktionsprodukt ist nur noch schwach gelblich gefärbt. Es wird in ca. 40—50 cm<sup>3</sup> heissem Wasser gelöst und die heiße Lösung im Heisswassertrichter filtriert. Der nach 24 Stunden ausgefallene krystalline Niederschlag ist nicht frei von ölichen Beimengungen; nach 4—5-maligem Umkristallisieren aus heissem Wasser erhält man eine rein krystalline Substanz, die in lufttrockenem Zustand bei 60° (korrigiert) schmilzt.

Nach *Embden* und *Schmitz* (loc. cit.) schmilzt das krystallwasserhaltige  $\beta$ -Naphthalinsulfo-L-alanin bei 61°. Er hat jedoch beobachtet, dass beim Erwärmten über 82° die Substanz häufig wieder krystallin wird. Nach den Angaben von *Fischer* und *Bergell* (loc. cit.) sintert die Substanz bei 62° und schmilzt erst bei 78—80°. Die krystallwasserfreie Substanz (bei 85° getrocknet) schmilzt nach *Fischer* und *Bergell* (loc. cit.) bei 122—123°. Die Unstimmigkeit der Angaben hängt offensichtlich mit dem Krystallwassergehalt zusammen. Luftgetrocknete Präparate und solche bei Zimmertemperatur im Vakuum getrocknet verhalten sich verschieden. Aus sehr verdünnten Lösungen krystallisiert das Präparat vorzugsweise in Plättchenform, wie *Embden* und *Schmitz* (loc. cit.) angegeben haben; aus konzentrierteren Lösungen erhält man oft büschelförmig verwachsene Nadelchen, wie sie von *Fischer* und *Bergell* (loc. cit.) beschrieben wurden. Schon *Embden* und *Schmitz* (loc. cit.) haben die Erfahrung gemacht, dass sich bei Isolierung aus biologischem Material nur ein kleiner Teil des  $\beta$ -Naphthalinsulfo-alanins in krystalliner Form darstellen lässt. In mehreren Grossansätzen haben wir nur einen Bruchteil des in grossen Mengen ausfallenden Reaktionsproduktes krystallin erhalten können.

### Diskussion der Ergebnisse.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von *M. Neber* konnte gezeigt werden, dass auch homogenisierte Ratten- und Meerschweinchenleber aus Brenztraubensäure und Ammoniumchlorid Alanin bilden können. Die Alaninbildung erfolgt im Gegensatz zu den Angaben von *Kritzmann* auch ohne Zusatz organfremder Enzyme. Sie verläuft nur in Sauerstoffatmosphäre. Sie wird durch Zusatz von oxydationshemmenden Inhibitoren wie HCN, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> unterbunden und ist herabgesetzt, wenn durch intensives Zentrifugieren die strukturierten Anteile aus dem homogenisierten Gewebe entfernt worden sind. Es erhebt sich die Frage, ob diese Art der Alaninbildung mit den bestehenden Hypothesen erklärt werden kann. Bei der acetylierenden Aminierung entsteht durch Bindung von Ammoniak aus Brenztraubensäure die Iminopropionsäure; durch Hydrierung wird Alanin gebildet, wobei eine zweite Molekel Brenztraubensäure als Wasserstoffdonator dient. Die von *Kritzmann* postulierte Alaninbildung führt über die *Wood-Werkman*-Reaktion zur Oxalessigsäure; diese wird zu Asparaginsäure aminiert, durch Umaminierung mit Brenztraubensäure wird Alanin gebildet. Da diese beiden Reaktionsfolgen von Oxydationsvorgängen unabhängig sind, erscheinen sie als Erklärung der beschriebenen Alaninbildung unwahrscheinlich. Im Hinblick auf die von *Kritzmann* aufgestellte Hypothese besteht jedoch noch die Möglichkeit, dass nicht der Oxydationsvorgang als solcher wichtig ist, sondern

dass das dadurch entstehende Kohlendioxyd für die Bildung der Oxal-essigsäure aus Brenztraubensäure benötigt wird. Es hat sich jedoch gezeigt, dass durch Absorption des entstehenden Kohlendioxyds die Alaninbildung nicht verringert wird, und dass Zusatz von Kohlendioxyd in Abwesenheit von Sauerstoff die Bildung nicht ermöglicht. Im Gegensatz zu *Kritzmann* ist es uns nicht gelungen, als Zwischenprodukt Asparaginsäure oder Glutaminsäure nachzuweisen. Es liessen sich somit keine Anhaltspunkte finden, die darauf hindeuten, dass die Alaninbildung in homogenisierter Leber von Ratten und Meerschweinchen auf der von *Kritzmann* postulierten Reaktionsfolge verläuft.

### Zusammenfassung.

1. Homogenisierte Ratten- und Meerschweinchenleber bilden aus Brenztraubensäure und Ammoniumchlorid Alanin.
2. Die Alaninbildung ist von Oxydationsvorgängen abhängig.
3. In Stickstoff- und Kohlendioxydatmosphäre wird aus Brenztraubensäure und Ammoniumchlorid kein Alanin gebildet.
4. Durch Kaliumcyanid und Arsenitrioxyd wird die Alaninbildung stark gehemmt.
5. Es konnten keine Anhaltspunkte gefunden werden, dass Aminodicarbonsäuren als Zwischenprodukte auftreten.
6. Das gebildete Alanin wurde als  $\beta$ -Naphthalinsulfosäure-Verbindung isoliert.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

### 163. Über das Ringgerüst des Yohimbins II<sup>1)</sup>.

#### Keto-yobyrin

von E. Schlittler und R. Speitel.

(25. V. 48.)

Werden Yohimbin (I, R = CH<sub>3</sub>) bzw. Yohimboasäure (I, R = H) oder die entsprechenden Isomeren bei 300° mit Selen dehydriert, so entstehen als Hauptabbauprodukte Yobyrin, Tetrahydro-yobyrin und Keto-yobyrin<sup>2)</sup>. Während Tetrahydro-yobyrin<sup>3)</sup> und Yobyrin<sup>4)</sup> in

<sup>1)</sup> Erste Mitteilung: E. Schlittler und Th. Allemann, Helv. **31**, 128 (1948).

<sup>2)</sup> F. Mendlik und J. P. Wibaut, R. **48**, 191 (1929); R. **50**, 91 (1931).

<sup>3)</sup> P. L. Julian, W. J. Karpel, A. Magnani und E. W. Meyer, Am. Soc. **70**, 180 (1948).

<sup>4)</sup> G. R. Clemo und G. A. Swan, Soc. **1946**, 617.