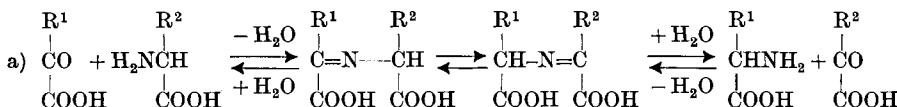


## 9. Über $\alpha, \alpha'$ -Iminosäuren-dehydrasen

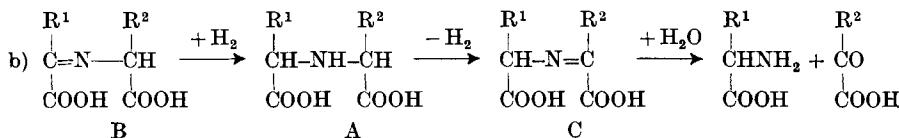
von P. Karrer und H. Brandenberger.

(30. XI. 50.)

Vor einigen Jahren<sup>1)</sup> haben wir die Frage diskutiert, ob sich die Transaminierung der  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren, für die *Braunstein & Kritzmann*<sup>2)</sup> das Reaktionsschema a) vorschlugen:



nicht in der Weise abspielen kann, dass die primär gebildeten *Schiff*'-schen Basen (B) zu Imino-dicarbonsäuren (A) hydriert und letztere nachher zu den isomeren *Schiff*'-schen Basen (C) erneut dehydriert werden (Schema b):



In letzterem Fall müssten Fermente existieren, welche solche  $\alpha, \alpha'$ -Imino-dicarbonsäuren A zu den Schiff'schen Basen (B oder C) dehydrieren können.

In unserem Institut wurden daher seinerzeit einige solche  $\alpha, \alpha'$ -Imino-dicarbonsäuren hergestellt<sup>3)</sup> und ihr Verhalten zu verschiedenen Organextrakten und Organ-homogenaten geprüft. Es handelte sich um die vier stereoisomeren  $\alpha, \alpha'$ -Imino-dipropionsäuren (D), drei isomere  $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-isocapronsäuren (E) und die  $\alpha, \alpha'$ -Imino-essigsäure-propionsäure (F).

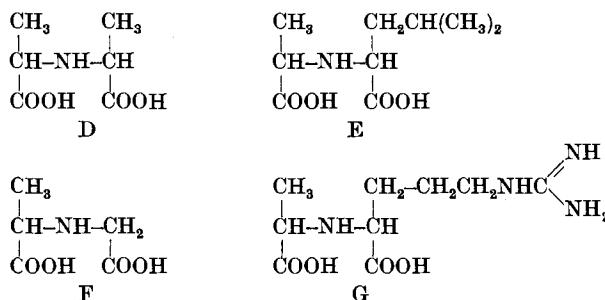
Aber alle diese Verbindungen wurden weder durch Nierenextrakte noch durch Leber- oder Nieren-Gewebebrei dehydriert und analog verhielt sich auch Octopin (G). Es schien daher, dass die genannten Gewebe keine  $\alpha, \alpha'$ -Imino-dicarbonsäuren-dehydrasen enthalten und den Imino-dicarbonsäuren keine Bedeutung im Stoffwechsel zukommt.

<sup>1)</sup> *P. Karrer, H. Koenig & R. Legler, Helv.* **24**, 127 (1941).

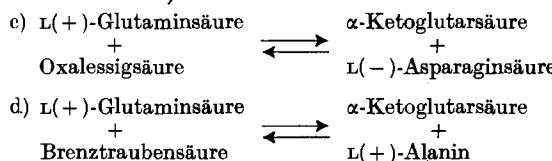
<sup>2</sup>) A. E. Braunstein & M. G. Kitzmann, *Nature* **140**, 503 (1937); *Enzymologia* **2**, 129 (1937).

<sup>3</sup>) P. Karrer, H. Koenig & R. Legler, Helv. **24**, 861 (1941); P. Karrer & R. Appen-zeller, Helv. **25**, 595, 1149 (1942).

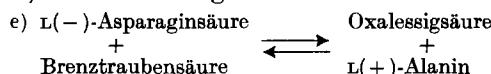
Nun wurde aber von verschiedenen Forschern, insbesondere von Cohen<sup>1)</sup> sowie von Green, Leloir & Nocito<sup>2)</sup> gezeigt, dass die Transaminierungsreaktion eine viel grössere Substrat-Spezifität besitzt als dies nach den ersten Arbeiten von Braunstein der Fall zu sein schien.



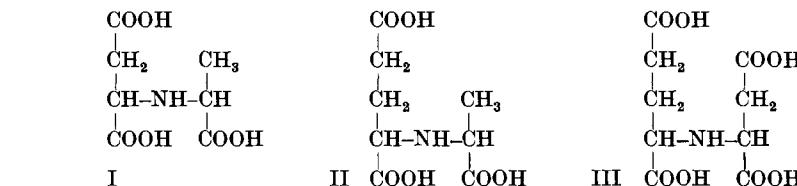
Die genannten Autoren wiesen nach, dass sich Transaminierungen nur abspielen, wenn Glutaminsäure (bzw.  $\alpha$ -Ketoglutarsäure) daran beteiligt ist. Nach Cohen<sup>1)</sup> sind nur die beiden folgenden Transaminierungen sicher nachweisbar,



während sich die von *Braunstein* ebenfalls beschriebene Transaminierungsreaktion e) nicht bestätigen liess.



In einer soeben erschienenen Abhandlung<sup>3)</sup> hat Cohen aber seine früheren Auffassungen, dass Transaminierungen nur zwischen  $\alpha$ -Keto-glutarsäure einerseits und Asparaginsäure bzw. Alanin andererseits möglich sind, zurückgezogen. Nach seiner gegenwärtigen Auffassung sollen sich die meisten Aminosäuren, die im Eiweiss vorkommen, an der Transaminierungsreaktion mit Ketoglutarsäure beteiligen können, wenn auch mit verschiedener Leichtigkeit.



<sup>1)</sup> *P. P. Cohen*, Biochem. J. **33**, 551, 1478 (1939); J. Biol. Chem. **136**, 565, 585 (1940); *P. P. Cohen & G. L. Hekhuis*, J. Biol. Chem. **140**, 711 (1941).

<sup>2)</sup> D. E. Green, L. F. Leloir & V. Nocito, J. Biol. Chem. **161**, 559 (1945).

<sup>3)</sup> *P. S. Cammarata & Philip P. Cohen, J. Biol. Chem. 187, 439 (1950).*

Als eventuelle Zwischenprodukte der Transaminierungen c), d) und e) kämen die  $\alpha, \alpha'$ -Imino-dicarbonsäuren III, II und I in Frage, von denen jede zwei asymmetrische C-Atome enthält und daher in vier isomeren Formen vorkommen muss. Wir haben einige dieser Verbindungen synthetisiert, und zwar folgende optische Isomere<sup>1)</sup>:

Von Typus I:

1.  $\alpha, \alpha'$ -Imino-DL-bernsteinsäure-DL-propionsäure (doppeltes Racemat), aus DL-Asparaginsäure und *d,l*- $\alpha$ -Brompropionsäure.

2.  $\alpha, \alpha'$ -Imino-L-bernsteinsäure-DL-propionsäure (Bernsteinsäurehälften L-Konfiguration, Propionsäurehälften racemisch) aus L-Asparaginsäure und *d,l*- $\alpha$ -Brompropionsäure.

Von Typus II:

1.  $\alpha, \alpha'$ -Imino-L-glutarsäure-DL-propionsäure (Glutarsäurehälften L-Konfiguration, Propionsäurehälften racemisch) aus L-Glutaminsäure und *d,l*- $\alpha$ -Brompropionsäure.

2.  $\alpha, \alpha'$ -Imino-DL-glutarsäure-DL-propionsäure (doppeltes Racemat) aus DL-Alanin und *d,l*- $\alpha$ -Bromglutarsäure.

3.  $\alpha, \alpha'$ -Imino-DL-glutarsäure-L-propionsäure (Glutarsäurehälften racemisch, Propionsäurehälften L-Konfiguration) aus *d,l*- $\alpha$ -Bromglutarsäure und L-Alanin.

Von Typus III:

1.  $\alpha, \alpha'$ -Imino-DL-glutarsäure-L-bernsteinsäure (Glutarsäurehälften racemisch, Bernsteinsäurehälften L-Konfiguration) aus *d,l*- $\alpha$ -Bromglutarsäure und L-Asparaginsäure.

2.  $\alpha, \alpha'$ -Imino-DL-glutarsäure-DL-bernsteinsäure (doppeltes Racemat) aus *d,l*- $\alpha$ -Bromglutarsäure und DL-Asparaginsäure.

Von den vorgenannten Verbindungen liess sich bisher nur die  $\alpha, \alpha'$ -Imino-DL-bernsteinsäure-DL-propionsäure (Typus I, 1) in kristallinem Zustand herstellen. Die anderen Iminosäuren erhielten wir nur in amorpher Form. Der Umstand, dass sie alle Mischungen optischer Isomerer sind, mag zu ihrer geringen Kristallisationsneigung beitragen. Die Reinigung der Verbindungen führten wir teils durch Destillation oder Chromatographie ihrer Ester, vor allem aber über ihre Bleisalze durch, die in analysenreiner Form gewonnen wurden. Die aus den Bleisalzen regenerierten Iminosäuren zeigten keine Ninhydrinreaktion und waren somit auch nicht durch Spuren von  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren verunreinigt.

<sup>1)</sup> Von diesen Verbindungen ist unseres Wissens in der Literatur nur die  $\alpha, \alpha'$ -Imino-glutarsäure-propionsäure erwähnt. *Stadnikoff* (B. **40**, 1018 [1907]) brachte äquivalente Mengen Glutaminsäure-diäthylester-hydrochlorid, Acetaldehyd und Kaliumcyanid in Reaktion und versetzte das entstandene Esternitril mit Salzsäure. Er gelangte so zu einer leimähnlichen Masse, die beim Behandeln mit Aceton erstarrte. Das Produkt wurde nicht näher beschrieben, so dass wir über Identität oder Verschiedenheit mit den von uns hergestellten Säuren nichts aussagen können.

Die für die Synthese benützten Verfahren waren folgende:

a) Kondensation einer  $\alpha$ -Brom-carbonsäure mit einer  $\alpha$ -Amino-carbonsäure in wässrig-alkalischer Lösung und Isolierung der entstandenen Iminosäure über das Bleisalz. Es handelt sich hier um die gleiche Methode, die früher in unserem Institut zur Synthese verschiedener  $\alpha, \alpha'$ -Imino-dicarbonsäuren Anwendung fand<sup>1)</sup>.

b) Kondensation eines  $\alpha$ -Brom-carbonsäureesters mit einem  $\alpha$ -Aminocarbonsäureester in Benzol und Isolierung des entstandenen Imino-säureesters durch fraktionierte Destillation im Hochvakuum oder durch Chromatographie; Verseifung des Esters durch Schwefelsäure oder Bariumhydroxyd.

Hierauf haben wir die vorerwähnten Iminosäuren der Einwirkung von Fermentlösungen unterworfen. Als Enzymquellen dienten:

1. Im Turmix bereitete Homogenate von frischen Lebern und Nieren von Schweinen und Rindern;

2. wässrige Extrakte von Aceton-Trockenpulvern von Schweinelebern und Rindernieren.

Die Dehydrierungsversuche führte man in Warburg-Gefäßen aus und bestimmte die  $O_2$ -Absorption manometrisch. Die Ermittlung des gebildeten Ammoniaks erfolgte in grösseren Ansätzen in geschlossenen Gefäßen. In allen Fällen wurden die verwendeten Enzymlösungen gleichzeitig auf ihren Gehalt an D-Aminosäureoxydase (bei Verwendung von Aceton-Trockenpulver-Extrakten) bzw. D- und L-Aminosäureoxydasen (bei Verwendung von Organ-Homogenaten) geprüft.

Die Ergebnisse der fermentativen Dehydrierungen waren folgende:

1. Die  $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-glutarsäuren (II) und die  $\alpha, \alpha'$ -Imino-glutarsäure-bernsteinsäuren (III) wurden durch Fermente, die sich in den vorgenannten Organ-Homogenaten und Extrakten aus Aceton-Trockenpulver vorfinden, schnell dehydriert.

2. Die  $\alpha, \alpha'$ -Imino-bernsteinsäure-propionsäuren (I) wurden in der Regel durch unsere Fermentpräparate nicht angegriffen; ausnahmsweise positive Ergebnisse liessen sich nicht reproduzieren, so dass es scheint, dass die  $\alpha, \alpha'$ -Imino-bernsteinsäure-propionsäure entweder enzymatisch nicht dehydrierbar ist oder die notwendigen Fermentsysteme so labil sind, dass wir sie nur ausnahmsweise beobachten konnten.

3. In Übereinstimmung mit früheren Versuchen<sup>1)</sup> wurden die zu Vergleichszwecken nochmals geprüften  $\alpha, \alpha'$ -Imino-dipropionsäuren (Formel D) und  $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-isocarbonsäure (Formel E) wiederum enzymfest gefunden. Sie lassen sich durch die verwendeten Enzymlösungen nicht dehydrieren.

4.  $\alpha, \alpha'$ -Imino-glutarsäure-propionsäure (II) und  $\alpha, \alpha'$ -Imino-glutarsäure-bernsteinsäure (III) liessen sich mit einem (zufällig erhaltenen)

<sup>1)</sup> P. Karrer & R. Appenzeller, Helv. 25, 595, 1149 (1942).

nen) Fermentextrakt aus Schweineleber-Trockenpulver dehydrieren, das keine D-Aminosäureoxydase enthielt und DL-Alanin nicht dehydrierte. Auch in anderen Versuchen verliefen die Dehydrierungen der Iminosäuren II und III und des Alanins nicht parallel. Daraus darf geschlossen werden, dass die Fermente, welche die Iminosäuren II und III angreifen, von D-Aminosäure-oxydase verschieden sind.

5. Bei den Dehydrierungen der Iminosäuren II und III durch die Fermente, die sich in den Extrakten aus den Leber- bzw. Nieren-Aceton-Trockenpulvern vorfinden, wird als Folge der Hydrolyse der gebildeten *Schiff'schen* Basen (Formel C) und nachfolgenden Desamierung der gebildeten Aminosäuren Ammoniak frei, dessen Menge dem Sauerstoffverbrauch, d. h. der Dehydrierung parallel geht. Die gemessenen Ammoniakmengen betrugen 35—90% der nach der Theorie maximal zu erwarteten Menge<sup>1)</sup>.

---

Die Ergebnisse unserer bisherigen Untersuchungen sind noch sehr lückenhaft und lassen eine Reihe von Fragen offen, die weiterbearbeitet werden müssen. Was wir bisher zeigen können, ist die Tatsache, dass es Iminosäuren-dehydrasen gibt, welche bestimmte Iminosäuren, nämlich  $\alpha, \alpha'$ -Imino-glutarsäure-propionsäuren (II) und  $\alpha, \alpha'$ -Imino-glutarsäure-bernsteinsäuren (III) zu *Schiff'schen* Basen dehydrieren (Reaktionsschema b). Es scheint, dass Glutaminsäure ein notwendiger Bestandteil einer dehydrierbaren  $\alpha, \alpha'$ -Iminosäure ist; ob sie sich durch Asparaginsäure in dieser Rolle ersetzen lässt (Säure I), erscheint fraglich bzw. unwahrscheinlich. Die nachgewiesenen Iminosäuren-dehydrasen sind von D-Aminosäure-dehydrase verschieden.

Weiterer Abklärung bedarf die Frage, welche Konfiguration der  $\alpha, \alpha'$ -Iminosäure dehydriert wird (D- oder L-), ob die Dehydrierung an der Glutaminsäureseite oder an der Seite des anderen Aminosäurerestes einsetzt und ob die Transaminierung der Aminosäuren über solche Iminosäuren verläuft bzw. verlaufen kann.

Wir werden uns bemühen, diejenigen  $\alpha, \alpha'$ -Iminosäuren, welche zur Beantwortung der vorerwähnten, noch offenen Fragen notwendig sind, herzustellen.

Leider war es bisher nicht möglich, die in dieser Untersuchung verwendeten Iminosäuren zu kristallisieren (mit einer Ausnahme). Das mag z. T. damit zusammenhängen, dass es sich um Mischungen verschiedener Racemate oder optisch isomerer Verbindungen handelt. Die Substanzen sind daher nur relativ rein. Wesentlich ist aber, dass sie keine nachweisbaren Mengen Aminocarbonsäuren als Verunreinigung enthalten (Prüfung mit Ninhydrinreaktion und Papierchromatogramm).

---

<sup>1)</sup> Dabei haben wir zur Vereinfachung der Berechnung angenommen, dass 50% der Iminosäure am Glutarsäure-Kohlenstoffatom, die anderen 50% auf der Seite des andern Aminosäurerestes dehydriert werden.

## Experimenteller Teil.

### a) Darstellung der $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-bernsteinsäure.

1. Kondensation von *D,L*-Asparaginsäure mit *d,l*- $\alpha$ -Brom-propionsäure in wässriger, alkalischer Lösung. 10 g *D,L*-Asparaginsäure (0,075 Mol) und 18 g *d,l*- $\alpha$ -Brompropionsäure (0,12 Mol) wurden in 250 ml Wasser, welches 16 g Natriumhydroxyd (0,4 Mol) enthielt, gelöst und drei Wochen bei 25°, dann noch drei Tage bei 37° stehengelassen. Hierauf säuerte man mit verdünnter Salzsäure an und dampfte im Vakuum bis zur Trockene ein. Den Rückstand extrahierten wir mehrmals mit siedendem Alkohol. Durch Eindampfen der alkoholischen Auszüge erhielten wir eine halb zähflüssige, halb feste Masse, welche in heissem Wasser gelöst, mit einem Überschuss von Bleioxyd aufgekocht und siedend filtriert wurde. Die Rückstände zogen wir noch mehrmals mit kochendem Wasser aus.

Das aus den erkalteten Filtraten mikrokristallin ausgefallene Bleisalz — die Mutterlauge lieferte nach dem Einengen noch eine weitere Fraktion — wurde abgenutscht, in 250 ml heissem Wasser gelöst und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zersetzt. Nach dem Abfiltrieren des gefällten Bleisulfides wurden die Chlorionen mit Silbercarbonat entfernt und die im Filtrat verbliebenen Silberionen mit Schwefelwasserstoff ausgefällt.

Beim Eindampfen des klaren Filtrates zur Trockene verblieb ein gallertartiger Rückstand. Er wurde in wenigen Tropfen Wasser in der Wärme gelöst und die Lösung bis zur Trübung mit absolutem Alkohol versetzt. Nur durch längeres Stehenlassen, wobei von Zeit zu Zeit wieder etwas absoluter Alkohol zugetropft werden musste, liess sich die Säure in mikrokristalliner Form gewinnen. Sie wurde abgenutscht, mit Alkohol und Äther gewaschen, in wenigen Tropfen Wasser wieder gelöst und durch langsame Alkoholzusatz in gleicher Weise erneut zur Abscheidung gebracht.

Wir erhielten 400 mg einer  $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-bernsteinsäure, welche um 195° unter Zersetzung schmolz. Der Schmelzpunkt ist stark abhängig von der Geschwindigkeit des Erhitzens. Aus den Filtraten und Waschflüssigkeiten konnten wir noch 200 mg der Substanz gewinnen, so dass die Totalausbeute 0,6 g betrug, das sind 4% der Theorie.

$C_{11}H_{11}O_6N$  (205,17) Ber. N 6,83% Gef. N 6,90%

Ninhydrin-Reaktion bei allen Fraktionen negativ.

2. Kondensation von *L*-Asparaginsäure-diäthylester mit *d,l*- $\alpha$ -Brom-propionsäure-äthylester in absolutem Benzol. In 70 g absolutes Benzol wurden 20 g *L*-Asparaginsäure-diäthylester und 20 g Brom-propionsäure-äthylester eingetragen (je ca. 0,1 Mol). Das Gemisch liessen wir zwei Tage unter Ausschluss von Feuchtigkeit stehen und erwärmen dann fünf Stunden auf dem Wasserbad. Nach guter Kühlung mit Eis schüttelten wir die Reaktionsmasse zweimal mit Sodalösung und extrahierten die wässrige Schicht mit Äther. Die Benzol- und Äther-Auszüge wurden mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet und die Lösungsmittel sowie der überschüssige Brom-propionsäure-ester im Vakuum entfernt. Den Rückstand haben wir in einem Claisen-Kolben der Destillation im Hochvakuum unterworfen, wobei der Triäthylester der Imino-propionsäure-bernsteinsäure unter 0,2 mm Druck bei 120° ( $\pm$  3°) überging. Ausbeute etwas mehr als 7 g. Aus dem verbleibenden, harzigen Rückstand konnten in einem Kugelrohr noch 2 g des gleichen Esters abdestilliert werden.

Durch Rektifikation der beiden vereinigten Fraktionen in einem Kugelrohr erhielten wir 8,9 g Triäthylester — das sind 47% der Theorie — in Form eines farblosen Öls, welches sich bei längeren Stehen leicht gelb färbte.

$C_{13}H_{23}O_6N$  Ber. C 53,96 H 8,01 N 4,84  $OC_2H_5$  46,72%  
(289,32) Gef. „ 53,89 „ 7,98 „ 5,02 „ 46,68%

3. Kondensation von *D,L*-Asparaginsäure-diäthylester mit *d,l*- $\alpha$ -Brom-propionsäure-äthylester in absolutem Benzol. Dieser bedeutend kleinere Ansatz wurde mit einem Überschuss an Aminosäureester ausgeführt, um durch Bindung des sich abspaltenden Bromwasserstoffes die Kondensation zu fördern. Trotzdem die Be-

dingungen für Kondensation und Aufarbeitung die gleichen waren, fiel die Ausbeute an racemischem Imino-propionsäure-bernsteinsäure-triäthylester geringer aus als beim vorhergehenden Ansatz.

$C_{13}H_{23}O_6N$  Ber. C 53,96 H 8,01 N 4,84%  
(289,32) Gef. „, 53,34 „, 7,86 „, 4,86%

4. Verseifung des  $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-bernsteinsäure-triäthylesters. 7,0 g Ester wurden mit 500 ml 0,15-n. Bariumhydroxyd-Lösung während 10 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt, wobei das Öl langsam in Lösung ging. Die heiße Lösung haben wir mit der berechneten Menge 2-n. Schwefelsäure versetzt und genau auf den Äquivalenzpunkt eingestellt. Das Bariumsulfat wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Die freie Säure verblieb dabei als zähflüssiges Öl, welches sich beim Trocknen zu einem Schaum aufblähte. Ninhydrin-Reaktion negativ.

5. Überführung der Säure in das sekundäre Bleisalz. Die Imino-tricarbonsäure wurde in wenig Wasser gelöst, mit einem Überschuss von Bleicarbonat mehrmals aufgekocht und siedend filtriert. Schon beim Abkühlen des Filtrates fiel ein Teil der Säure als Bleisalz aus. Ein Zusatz von Alkohol vervollständigte die Fällung.

Das Bleisalz wurde abgenutscht, mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Nach einmaligem Umkristallisieren ergab die Analyse, dass das sekundäre Salz vorlag.

$C_7H_9O_6NPb$  Ber. C 20,48 H 2,21 N 3,41%  
(410,36) Gef. „, 19,81 „, 2,40 „, 3,51%

Beim Eindampfen der Mutterlauge zeigte sich, dass ein beträchtlicher Teil der Säure nicht in das Salz übergeführt worden war. Eine nochmalige Behandlung mit einem Überschuss an Bleicarbonat erwies sich deshalb bei allen grösseren Ansätzen als notwendig. Das Bleisalz kann auf diese Weise aus dem Ester leicht in einer Ausbeute von 85—90% gewonnen werden.

Für die Durchführung der fermentativen Versuche haben wir das reine Bleisalz auf folgendem Wege in das Natriumsalz (oder Kaliumsalz) übergeführt: Lösen in Wasser, Ausfällen des Bleies mit Schwefelwasserstoff, Einengen des Filtrates und Einstellen mit normaler Natronlauge (oder Kalilauge) auf pH 7,6 (potentiometrisch bestimmt). Eindampfen und Trocknen am Hochvakuum.

b) *Darstellung der  $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-glutarsäure.*

1. Kondensation von DL-Alanin-äthylester mit *d,l*- $\alpha$ -Bromglutarsäure-dimethylester und Trennung der Ester durch Destillation. 4,8 g DL-Alanin-äthylester (0,04 Mol) und 8,4 g Brom-glutarsäure-dimethylester (0,035 Mol) wurden in 20 g trockenem Benzol gelöst, wie üblich kondensiert und das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Der nicht umgesetzte Alaninester konnte im Wasserstrahlvakuum leicht entfernt werden. Zur Abtrennung des Brom-glutarsäureesters vom entstandenen Reaktionsprodukt war ein *Claisen*-Kolben mit kleiner Fraktionierkolonne notwendig. Damit liess sich das Ausgangsprodukt unter 0,04 mm bei 87° abdestillieren. Um unsere Substanz nicht unnötig zu überhitzen, überführten wir den Destillationsrückstand in ein Kugelrohr. Durch zweimaliges Destillieren — Luftbadtemperatur bei 0,02 mm Druck 105° — erhielten wir 2,2 g Ester als farbloses Öl, das sind 23% der Theorie.

$C_{12}H_{21}O_6N$  Ber. C 52,35 H 7,69 N 5,09%  
(275,30) Gef. „, 52,05 „, 6,65 „, 4,94%

5,16 mg Substanz liefern 10,0 mg Silberjodid an Stelle der berechneten 13,2 mg (*Zeisel*'sche Bestimmung).

Der niedrige Wasserstoffgehalt und der Fehler bei der *Zeisel*-Bestimmung lassen sich durch die Annahme erklären, dass ein Teil der Substanz als Lactam vorlag.

Die Hydrolyse erfolgte mit 2-n. Schwefelsäure. Schon bei Zimmertemperatur ging der Ester darin langsam in Lösung. Zur Aufspaltung von eventuell vorhandenem Lactam wurde noch zwei Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Aus der heißen Lösung fällten

wir die Sulfationen durch Zusatz der genau äquivalenten Menge Barytlauge als Bariumsulfat. Das Filtrat lieferte beim Eindampfen eine hygroskopische Gallerte, die wir nicht in krystalline Form überführen konnten. Ninhydrin-Reaktion negativ.

Die Identifizierung der Substanz als Imino-propionsäure-glutarsäure gelang durch Fällung des sekundären Bleisalzes.

2. Kondensation von L-Alanin-äthylester mit *d,l*- $\alpha$ -Brom-glutarsäure-dimethylester und Trennung der Ester durch Chromatographie. 3,0 g L-Alanin-äthylester (0,026 Mol) und 6,0 g *d,l*- $\alpha$ -Bromglutarsäure-dimethylester (0,025 Mol) wurden in 9 g absolutem Benzol, wie in früheren Beispielen beschrieben, kondensiert und die Reaktionsprodukte aufgearbeitet.

Die Trennung des Estergemisches geschah in Benzollösung chromatographisch an einer Säule von 250 g Aluminiumoxyd. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte zuerst mit Benzol, dann mit Benzol-Äther-Gemisch und schliesslich mit Äther. Eluiert hat man mit methanolhaltigem Äther.

Brom-glutarsäure-dimethylester haftete am schlechtesten. Er wurde schon bei der Entwicklung mit Benzol-Äther ausgewaschen, während der Iminoester erst mit methanolhaltigem Äther eluiert werden konnte.

$C_{12}H_{21}O_6N$	Ber. C 52,35	H 7,69	N 5,09%
(275,30)	Gef. „ 53,34	„ 7,38	„ 5,06%

3,32 mg Substanz lieferten 7,72 mg Silberjodid statt 8,52 mg (Zeisel'sche Bestimmung).

Für eine weitere chromatographische Reinigung stand uns zu wenig von dem Produkt zur Verfügung.

3. Kondensation von *d,l*- $\alpha$ -Brom-propionsäure-äthylester mit L-Glutaminsäure-diäthylester, Trennung des Estergemisches durch Destillation und Reinigung des Endproduktes durch Chromatographie. 13 g inaktiver  $\alpha$ -Brom-propionsäure-äthylester und 17 g frisch destillierter L-Glutaminsäure-diäthylester wurden in 30 ml trockenem, thiophenfreiem Benzol gelöst und 5 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschliessend erhitzte man das Gemisch 8 Stunden auf dem Wasserbad, liess erkalten, schüttete zweimal mit eisgekühlter wässriger Sodalösung aus und trocknete über Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wurde verdampft und der nicht umgesetzte  $\alpha$ -Brom-propionsäureester im Hochvakuum wegdestilliert. Den Rückstand löste man wieder in absolutem Benzol und reinigte ihn durch Chromatographie an neutralem Aluminiumoxyd. Die stickstoffhaltigen Fraktionen wurden im Hochvakuum destilliert. Der  $\alpha,\alpha'$ -Imino-propionsäure-glutarsäure-triäthylester ging bei 110–120° über und zeigte folgende Analysenwerte:

$C_{14}H_{25}O_6N$	Ber. C 55,42	H 8,31	N 4,62%
(303,35)	Gef. „ 55,77	„ 8,65	„ 4,84%

2,5 g dieses Iminosäureesters wurden zur Verseifung in 13 ml 2-n. Schwefelsäure 4 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Schwefelsäure haben wir mit so viel Bariumhydroxyd gefällt, bis die Lösung weder mit Schwefelsäure noch mit Bariumhydroxyd eine Trübung zeigte. Die wässrige Lösung der freien Säure verdampfte man im Vakuum zur Trockene. Die Ninhydrin-Probe war negativ.

4. Das sekundäre Bleisalz der Imino-propionsäure-glutarsäure. Auch zur Reinigung der Imino-propionsäure-glutarsäuren eignen sich die Bleisalze. Deren Darstellung erfolgt wie diejenige des Salzes der Imino-propionsäure-bernsteinsäure; sie unterscheiden sich jedoch von diesem durch ihre grössere Wasserlöslichkeit. Nach Abfiltrieren des Bleicarbonates ist deshalb die Lösung auf ein kleines Volumen einzuengen. Zur Vervollständigung der Salzabscheidung haben wir mindestens das doppelte Volumen Alkohol zugesetzt.

Auf diese Weise erhielten wir z. B. aus Ansatz 1 in guter Ausbeute ein sekundäres Salz mit folgenden Analysenzahlen:

$C_8H_{11}O_6NPb$	Ber. C 22,64	H 2,61	N 3,29%
(424,39)	Gef. „ 22,28	„ 2,38	„ 3,14%

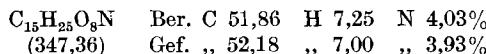
c) Darstellung der  $\alpha, \alpha'$ -Imino-bernsteinsäure-glutarsäure.

1. Kondensation von L-Asparaginsäure-dimethylester mit *d,l*- $\alpha$ -Brom-glutarsäure-dimethylester und Destillation des entstehenden Imino-bernsteinsäure-glutarsäure-tetramethylesters. 0,8 g L-Asparaginsäure-dimethylester und 1,2 g *d,l*- $\alpha$ -Brom-glutarsäure-dimethylester wurden in 3 g Benzol in gewohnter Weise kondensiert und das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Als Nebenprodukt entstand ein kristalliner Körper, welcher durch Abgiessen der benzolischen Lösung isoliert und als 2,5-Diketo-piperazin-3,6-diessigsäure-dimethylester identifiziert werden konnte.

Die Destillation im Hochvakuum erfolgte in einem Kugelrohr und ergab eine scharfe Fraktionierung. Unter 0,005 mm destillierten zwischen 75 und 105° zuerst die Ausgangsprodukte ab, dann zwischen 130 und 140° ein sehr konsistentes Öl, bei dem es sich um noch unreinen Tetramethylester der Imino-bernsteinsäure-glutarsäure handelte. Durch Rektifikation war eine weitgehende Reinigung möglich, doch fiel die Methoxylbestimmung immer noch zu niedrig aus. Wir vermuten deshalb, dass der Ester sich teilweise in das Lactam anhydriert hatte.

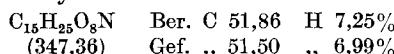
2. Kondensation von DL-Asparaginsäure-diäthylester mit *d,l*- $\alpha$ -Brom-glutarsäure-dimethylester und Trennung des Gemisches durch Chromatographie. 10 g DL-Asparaginsäure-diäthylester wurden mit 12 g *d,l*- $\alpha$ -Brom-glutarsäure-dimethylester in 15 g Benzol in üblicher Weise kondensiert und die Reaktionslösung aufgearbeitet. Das erhaltene Estergemisch chromatographierten wir aus Benzollösung an einer Aluminiumoxydsäule von 45 cm Länge und 4,5 cm Weite, welche 750 g Aluminiumoxyd vom pH 8—9 enthielt. Die Entwicklung erfolgte zuerst mit Benzol, dann Benzol-Äther und schliesslich Äther allein, total ca. 3 l Lösungsmittel. Eluiert haben wir mit methanolhaltigem Äther.

Den erwarteten Iminocster erhielten wir auf diese Weise als mittlere Fraktion in verhältnismässig reinem Zustande. Sein Verseifungsprodukt gab keine Ninhydrin-Reaktion.

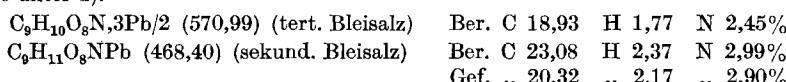


Die Verseifung geschah mit Schwefelsäure in gleicher Art, wie wir sie früher an anderen Beispielen beschrieben haben.

3. Kondensation von L-Asparaginsäure-dimethylester mit DL- $\alpha$ -Brom-glutarsäure-diäthylester und Reinigung des Reaktionsproduktes durch Chromatographie. 17 g inaktiver  $\alpha$ -Brom-glutarsäure-diäthylester und 13,5 g L-Asparaginsäure-dimethylester löste man in 30 ml trockenem thiophenfreiem Benzol, liess das Gemisch 4 Tage bei Zimmertemperatur stehen und erwärmte es anschliessend 7 Stunden auf dem Wasserbad. Die Reaktionsmasse wurde mit eiskalter Sodalösung zweimal ausgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurden die nicht umgesetzten Ausgangssubstanzen im Hochvakuum bei 120° entfernt. Den bräunlichen Rückstand chromatographierte man an neutralem Aluminiumoxyd, Lösungsmittel Benzol. Die ersten stickstoffhaltigen Durchlauf-Fraktionen wurden eingedampft und analysiert:



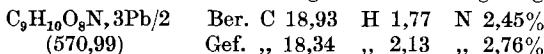
Diesen Ester haben wir zur Verseifung 4 Tage mit 2-n. Schwefelsäure stehengelassen. Die Schwefelsäure entfernte man mit Bariumhydroxyd. Die wässrige Lösung wurde auf ein kleines Volumen eingeengt und zur Überführung in das Bleisalz mit festem Bleicarbonat mehrere Male aufgekocht und heiß filtriert. Bei der amorph ausgefallenen Substanz handelte es sich zum Teil um das sekundäre, zum Teil um das tertiäre Bleisalz (siehe unter 4).



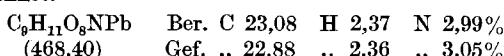
Das Bleisalz wurde in wässriger Lösung mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die Lösung vom Bleisulfid getrennt und im Vakuum zur Trockene verdampft.

4. Die Bleisalze der Imino-bernsteinsäure-glutarsäure. Auch diese Säure liess sich leicht in Bleisalze überführen und auf diesem Wege reinigen. Es entstehen auf dem üblichen Wege nebeneinander das tertiäre und das sekundäre Salz. Durch Umkristallisieren war es möglich, die beiden voneinander zu trennen.

Das tertiäre Bleisalz ist in Wasser viel schwerer löslich, es kristallisiert schon beim Erkalten des Filtrates aus und wurde nach längerem Stehen abgesaugt und getrocknet.



Das sekundäre Salz lässt sich aus dem Filtrat durch Alkoholzusatz ausfällen. Wir haben es ebenfalls erst nach längerem Stehen und erneutem Versetzen mit Alkohol abgesaugt und getrocknet.



d) *Darstellung von Ausgangsprodukten für die beschriebenen Synthesen.*

1. Veresterung von Aminosäuren. Für die Veresterung aller Aminosäuren verwendeten wir die Methode von *Fischer*<sup>1</sup>).

2.  $\alpha$ -Brom-propionsäure. Wir gewannen diese Substanz durch direkte Bromierung von Propionsäure unter Anwesenheit von rotem Phosphor, Eingießen des Reaktionsproduktes in Eiswasser, Extraktion der mit Schwefelsäure stark angesäuerten Lösung mit Äther und Destillation<sup>2</sup>).

3.  $\alpha$ -Brom-glutarsäure-dimethylester. Dieser Ester ist unseres Wissens in der Literatur noch nicht beschrieben. Wir stellten ihn analog der Vorschrift dar, welche *Ingold*<sup>3</sup>) und in etwas abgeänderter Form *Karrer & Kehrer*<sup>4</sup>) für die Herstellung des entsprechenden Diäthylesters gaben. Durch Überführung von Glutarsäure in das Chlorid, Bromierung bei 60° und Eingießen in absoluten Methylalkohol liess er sich in einer Ausbeute von 63% der Theorie gewinnen. Der  $\alpha$ -Brom-glutarsäure-dimethylester ist ein farbloses Öl, welches bei 0,4 mm zwischen 100 und 104° siedet.



Als Nebenprodukte entstehen bei dieser Synthese immer Glutarsäure-dimethylester sowie in kleinerer Menge eine wenig höher siedende, mehr Brom enthaltende Substanz, welche teilweise kristallisiert. Die Kristalle sind gut löslich in Äther, schlecht in Methanol. Durch Umkristallisieren gewinnt man sie in Form feiner Nadelchen vom Smp. 176–177°.

e) *Bereitung der Ferment-Präparate.*

Das verwendete Fleisch — meist Schweinsleber oder Rindsniere — wurde unter Kühlung mit Trockeneis vom Schlachthof in das Laboratorium gebracht und dort spätestens eine Stunde nach der Schlachtung verarbeitet.

1. Frischfleisch-Homogenate. 10 g Leber oder Niere wurden mit 100 ml eiskühltem 0,067-n. Phosphatpuffer vom pH 7,7 zwei Minuten in einer Turmix-Maschine bei hoher Tourenzahl homogenisiert, das pipettierbare Homogenat sofort für die Messungen verwendet. Den Gehalt an D- und L-Aminosäure-oxydasen haben wir bei den meisten Ansätzen durch gleichzeitige Einwirkung auf Alanin kontrolliert.

Ein auf diese Weise bereitetes Homogenat besitzt den grossen Vorteil, dass es sich mit der Pipette genau und gleichmässig abmessen lässt.

2. Leber- und Nieren-Trockenpulver. Das frische Fleisch wurde mit dem Wiegenmesser fein zerhackt und mit der fünffachen Menge reinem Aceton unter Licht-

<sup>1)</sup> *E. Fischer*, B. **34**, 433 (1901); *E. Fischer & E. Koenigs*, B. **40**, 2058 (1907).

<sup>2)</sup> *N. Zelinsky*, B. **20**, 2026 (1887); *K. Auwers & R. Bernhardi*, B. **24**, 2219 (1891).

<sup>3)</sup> *C. K. Ingold*, Soc. **119**, 316 (1921).

<sup>4)</sup> *P. Karrer & F. Kehrer*, Helv. **27**, 146 (1944).

ausschluss einen halben Tag stehengelassen. Nun haben wir abgenutscht und den Rückstand mit der gleichen Menge frischen Acetons versetzt. Nach weiterem 15- bis 20stündigem Stehen in der Dunkelheit haben wir die Flüssigkeit abgesaugt, das Ungelöste mit Aceton gut gewaschen und das gelbliche Pulver im leeren Exsikkator durch längeres Evakuieren getrocknet.

Unter Lichtausschluss aufbewahrt, waren die Trockenpulver mehrere Monate haltbar.

3. Ferment-Rohextrakte aus Aceton-Trockenpulvern. 3 g Trockenpulver schüttelten wir mit 30 ml 0,067-m. Phosphatpuffer vom pH 7,7 während 20 Minuten auf der Maschine. Dann wurde 20 Minuten zentrifugiert, die hellgelbe, klare Lösung abgegossen und sofort für unsere Messungen verwendet. Ihren Gehalt an D-Aminosäureoxydase haben wir bei jedem Ansatz durch gleichzeitige Einwirkung auf Alanin kontrolliert.

#### f) Fermentative Dehydrierungen.

1. Das Messverfahren. Die Messungen haben wir in der *Warburg*-Apparatur bei 38,0° vorgenommen, wobei der Gasraum Luft enthielt. Gemessen wurde der Sauerstoffverbrauch in mm<sup>3</sup> als Funktion der Zeit. Um das durch gleichzeitig stattfindende Decarboxylierung entstehende CO<sub>2</sub> zu binden, enthielt der Seitenansatz der Reaktionsgefässe Kalilauge. Substrat- und Fermentlösung wurden vor dem Austemperieren zusammen in das Hauptgefäß pipettiert. Die ersten 10 Minuten des Oxydationsvorganges konnten manometrisch nicht erfasst werden. Es handelt sich demnach bei unseren Bestimmungen um Relativ-Werte.

Bei jeder Versuchsreihe wurde durch Blindansätze der Sauerstoffverbrauch der Fermentlösung allein (Ansatz ohne Substrat) kontrolliert. Dies ist besonders bei den Versuchen mit Frischfleisch-Homogenat unumgänglich, da dessen Eigenatmung oft hoch ist.

Um Zufallsresultate auszuschliessen, wurden bei fast allen Messungen mindestens zwei Gefässe für den gleichen Ansatz verwendet. Nur wenn die Ergebnisse dieser Parallelversuche sich innerhalb der apparativ bedingten Fehlergrenzen deckten, fand die Messung Berücksichtigung.

#### Versuchsanordnung:

im Hauptgefäß a) 2 ml Fermentrohextrakt oder 2 ml Frischfleisch-Homogenat;  
 b) 2 ml 0,067-m. Phosphatpuffer, pH 7,7, welcher — sofern es sich nicht um einen Blindansatz handelt — enthält:  
 bei den ersten Versuchen 10 mg Substrat,  
 bei den späteren Versuchen das Substrat in 1/20 molarer Konzentration,

im Seitenansatz 7 Tropfen 40-proz. Kalilauge,

im Gasraum Luft,

Temperatur 38,0°,

Schliessen der Hahnen nach 10 Minuten.

Da der verwendete Phosphatpuffer die freien Iminosäuren nicht völlig abzupuffern vermochte, haben wir diese als Alkalosalze eingewogen, und zwar die Säure I meist als Na-Salz, die Säure II und III als K-Salz. Die Herstellung dieser Salze geschah durch Titration der wässrigen Lösung der Säuren mit NaOH resp. KOH bis zum pH 7,7 ( $\pm$  0,2).

Im folgenden begnügen wir uns, einige typische Versuche wiederzugeben, möchten jedoch darauf hinweisen, dass zahlreiche weitere, gleichsinnige Resultate vorliegen.

Die verwendeten Iminosäuren werden in den Tabellen mit den untenstehenden Abkürzungen bezeichnet:

Säure I rac.	= $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-bernsteinsäure, racemisch, dargestellt aus DL-Asparaginsäure und <i>d,l</i> -Brom-propionsäure.
Säure I part.	= $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-L-bernsteinsäure, partiell racemisch, dargestellt aus L-Asparaginsäure und <i>d,l</i> -Brom-propionsäure.
Säure II rac.	= $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-glutarsäure, racemisch, dargestellt aus DL-Glutaminsäure und <i>d,l</i> - $\alpha$ -Brom-propionsäure.
Säure II part.	= $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-L-glutarsäure, partiell racemisch, dargestellt aus L-Glutaminsäure und <i>d,l</i> - $\alpha$ -Brom-propionsäure.

Säure II part. iso     =  $\alpha, \alpha'$ -Imino-L-propionsäure-DL-glutarsäure, dargestellt aus L-Alanin-äthylester und DL- $\alpha$ -Brom-glutarsäure-dimethylester.  
 Säure III rac.     =  $\alpha, \alpha'$ -Imino-bernsteinsäure-glutarsäure, racemisch, dargestellt aus DL-Asparaginsäure und *d,l*- $\alpha$ -Brom-glutarsäure.  
 Säure III part.     =  $\alpha, \alpha'$ -Imino-L-bernsteinsäure-glutarsäure, partiell racemisch, dargestellt aus L-Asparaginsäure und *d,l*- $\alpha$ -Brom-glutarsäure.  
 Diprop. S.     =  $\alpha, \alpha'$ -Imino-dipropionsäure, racemisch.  
 Prop. Cap. S.     =  $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-L-isocapronsäure.

2. Dehydrierungen mit Iminosäureoxydase aus Frischfleisch-Homogenat:  
 Rindsleber.

Zeit	Blindversuche				Säure I rac. 10 mg	DL-Alanin 10 mg
	0'	10'	20'	30'		
0'	0	0	0	0	0	0
10'	9	7	8	7	9	9
20'	21	18	20	18	19	22
30'	29	24	27	23	23	24
45'	40	34	37	32	29	30
60'	48	40	47	40	36	36
75'	58	50	57	50	40	42
90'	66	58	66	59	54	53
					113	119

## Schweinsniere.

Zeit	Blindversuche				DL-Alanin 10 mg	Säure I rac. 10 mg
	0'	10'	20'	30'		
0'	0	0	0	0	0	0
10'	6	11	9	7	38	43
20'	12	20	17	15	79	86
30'	18	30	23	21	113	120
60'	30	42	35	35	205	210
75'	34	46	38	38	243	245
					30	32

## Schweinsleber.

Zeit	Blind- versuche	DL-Alanin 10 mg	Säure II part. 10 mg		Säure III part. 10 mg	
			0'	10'	0'	10'
0'	0	0	0	0	0	0
10'	2	3	7	5	10	12
20'	6	8	17	14	24	24
30'	15	17	29	27	39	40
40'	19	23	40	37	52	54
50'	25	31	51	47	66	68
60'	30	37	60	57	75	79
70'	41	47	75	70	90	93
80'	47	56	86	82	102	106
90'	57	66	96	91	114	118
100'	67	75	105	102	125	128
					138	128

## Schweinsleber.

Zeit	Blind-versuche		DL-Alanin 0,05 mol.		Säure II part.0,05 mol.		Säure III part.0,05 mol.	
0'	0	0	0	0	0	0	0	0
30'	9	8	39	41	34	31	17	21
60'	29	32	90	95	81	70	53	64
90'	57	63	135	140	137	122	88	93

## Schweinsleber.

Zeit	Blind-versuche		DL-Alanin 10 mg		Diprop. S. 10 mg		Prop.Cap.S. 10 mg	
0'	0	0	0	0	0	0	0	0
10'	-1	1	4	5	0	-1	0	0
20'	4	4	14	15	2	2	6	4
30'	12	12	28	31	10	10	14	12
40'	14	15	36	41	14	13	19	16
50'	20	20	49	55	20	20	23	18
60'	20	21	55	63	21	20	24	19
75'	22	24	71	79	28	26	28	23
90'	28	29	76	82	35	33	36	30

## Rindsniere.

Zeit	Blind-versuche		DL-Alanin 0,05 mol.		Säure II rac. 0,05 mol.		Säure III rac. 0,05 mol.	
0'	0	0	0	0	0	0	0	0
30'	2	9	31	23	8	11	12	14
60'	8	16	53	42	20	24	28	30
90'	14	22	71	62	31	37	43	44
120'	15	23	84	78	38	46	55	54
150'	21	28	98	94	48	59	69	68
180'	25	32	112	110	59	71	84	82

## Rindsniere.

Zeit	DL-Alanin 0,05 mol.		Blind-versuche				Säure II part.0,05 mol.	
	0'	30'	0	0	0	0	0	0
0'	0	0	0	0	0	0	0	0
30'	23	27	14	14	13	14	37	43
60'	49	55	27	27	24	26	74	85

## Schweinsleber.

Zeit	Blind-versuche		DL-Alanin 0,05 mol.	Säure II part. iso 0,05 mol.	Säure III rac. 0,05 mol.
0'	0	1	0	0	0
30'	16	17	35	37	29
60'	38	42	83	91	73
90'	55	62	127	136	120
120'	69	77	160	170	157

## Schweinsleber.

Zeit	Blind-versuche		DL-Alanin 0,05 mol.	Säure II rac. 0,05 mol.
0'	0	0	0	0
30'	11	11	32	27
60'	26	28	63	56
90'	42	43	93	84
120'	56	56	113	102
150'	70	66	130	125
180'	75	68	142	141

## 3. Dehydrierungen mit Trockenpulver-Rohextrakten:

## Rindsnieren-Pulver.

Zeit	Blind-versuche		DL-Alanin 10 mg	Säure II part. 10 mg	Säure III part. 9 mg
0'	0	0	0	0	0
30'	-4	-4	28	23	29
60'	-5	-2	57	50	60
90'	-4	0	88	78	91
120'	-3	0	116	103	120

## Rindsnieren-Pulver.

Zeit	Blind-versuche		DL-Alanin 10 mg	Diprop. S. 10 mg	Prop. Cap. S. 10 mg
0'	0	0	0	0	0
30'	-3	-4	28	27	-4
60'	1	-3	64	65	-1
90'	-1	-4	80	83	2
120'	0	-2	120	122	4

## Rindsnieren-Pulver.

Zeit	Blind-versuche		DL-Alanin 0,05 mol.	Säure II rac. 0,05 mol.	Säure III rac. 0,05 mol.
0'	0	0	0	0	0
30'	-4	0	44	32	15
60'	-6	0	79	63	16
90'	-5	1	111	89	29
120'	-2	3	141	118	30

## Rindsnieren-Trockenpulver.

Zeit	Blind-versuche		DL-Alanin 0,05 mol.	Säure II part. iso 0,05 mol.	Säure III rac. 0,05 mol.
0'	0	1	0	1	0
30'	0	1	41	43	31
60'	1	1	79	84	64
90'	0	1	119	123	102
120'	1	1	164	170	149

## Rindsnieren-Pulver.

## Schweinsleber-Pulver.

Zeit	Blind-vers.	DL-Alanin 0,05 mol.	Säure I part. 0,05 mol.	Zeit	Blind-vers.	DL-Alanin 0,05 mol.	Säure I part. 0,05 mol.
0'	0	0	0	0'	0	0	0
10'	-2	13	1	10'	0	8	0
20'	-2	30	3	20'	-1	15	1
30'	-5	42	1	30'	-3	20	2
40'	-8	58	-1	40'	-2	25	0
50'	-7	68	1	50'	0	34	1
60'	-8	80	-3	60'	-2	38	0

## Schweinsleber-Pulver, ohne Aminosäuren-dehydrasen (bräunlich).

Zeit	Säure III rac. 0,05 mol.	Säure III part. 0,05 mol.	Blind-versuche	Säure I part. 0,05 mol.
0'	0	0	0	0
10'	2	4	0	-3
20'	6	9	1	-1
30'	9	11	1	-1
50'	16	19	3	0
70'	20	24	3	1
90'	27	29	4	2

## g) Ammoniak-Bestimmungen.

1. Vorbereitung der Messungen. Gleiche Volumen Substrat- und Ferment-Lösung, dazu ein Tropfen Toluol zur Sterilhaltung, wurden in einen Erlenmeyer pipettiert und über Nacht im Brutschrank bei 37–38° stehengelassen. Beide Lösungen waren genau so bereitet, wie diejenigen für die Oxydationsversuche am Warburg-Apparat. Die Substratlösung war immer 0,05 molar, so dass die Mischlösung die Iminosäuren oder das Alanin in  $\frac{1}{40}$  molarer Konzentration enthielt.

Durch eine gleichzeitig angesetzte manometrische Messung kontrollierten wir das Oxydationsvermögen des in Verwendung kommenden Rohextraktes auf die angesetzten Substrate.

Am nächsten Morgen wurden die Ammoniak-Bestimmungen aller Ansätze der Versuchsreihe möglichst kurz hintereinander vorgenommen.

2. Die Messmethode. Wir verwendeten zu diesen Bestimmungen die Apparatur von Parnas-Wagner, arbeiteten aber, wie Foreman<sup>1)</sup> und später auch Raynaud<sup>2)</sup> empfohlen haben, in möglichst konz. alkoholischer Lösung, um einer Neubildung von Ammoniak während der Wasserdampfdestillation entgegenzuwirken. Die gleichzeitig angesetzten Blindversuche lieferten denn auch nur unbedeutende, sehr konstante Blindwerte, welche jeweils von den ermittelten Ammoniakmengen in Abzug gebracht worden sind.

3 ml der zu prüfenden Lösung wurden mit 12 ml Alkohol und einem Tropfen Thymolptalein versetzt und mit Kalilauge genau bis zum Farbumschlag alkalisiert. Das Gemisch füllten wir in den Kolben der Parnas-Apparatur ein und spülten mit Alkohol nach. Ein kräftiger Wasserdampfstrom von vier Minuten genügt, um alles Ammoniak überzutreiben. Für die Titration des stark alkoholischen Destillates verwendeten wir als Indikator zwei Tropfen einer 1-proz. alkoholischen Lösung von alizarinsulfosaurem Natrium.

## 3. Die Messergebnisse.

Rohextrakt aus Trockenpulver von	Substrat	mg Ammoniak (ohne Blindwert)	O <sub>2</sub> -Verbrauch in mm <sup>3</sup> pro 120 Min.
Rindsniere	DL-Alanin	0,376 mg	70 mm <sup>3</sup>
	Säure I, part.	0,005 mg	0 mm <sup>3</sup>
	Säure II, part.	0,138 mg	100 mm <sup>3</sup>
Rindsniere	DL-Alanin	0,082 mg	30 mm <sup>3</sup>
	Säure III, part.	0,258 mg	100 mm <sup>3</sup>
		0,027 mg	90 mm <sup>3</sup>
Schweinsleber	Säure II, part.	0,228 mg	170 mm <sup>3</sup>
	Säure III, part.	0,282 mg	170 mm <sup>3</sup>
	Säure I, part.	0,014 mg	0 mm <sup>3</sup>

Bei Annahme eines 100-proz. Ablaufs der Fermentreaktion berechnet sich für DL-Alanin eine maximale Entwicklung von 0,637 mg Ammoniak ( $\frac{3}{40}$  Millimol sind 1,275 mg, es wird aber nur D-Alanin desaminiert).

## Zusammenfassung.

Es wurden verschiedene (stereoisomere)  $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-glutarsäuren,  $\alpha, \alpha'$ -Imino-glutarsäure-bernsteinsäuren und  $\alpha, \alpha'$ -Imino-bernsteinsäure-propionsäuren hergestellt und ihr Verhalten zu Fer-

<sup>1)</sup> F. W. Foremann, Biochem. J. 14, 451 (1920).

<sup>2)</sup> M. Raynaud, Bl. Soc. Chim. biol. XXX, 713 (1948).

menten, die sich in Leber und Nieren finden, untersucht. Während sich in Nieren- und Leberhomogenaten und in Extrakten aus Aceton-Trockenpulver der genannten Organe keine Fermente nachweisen liessen, welche  $\alpha, \alpha'$ -Imino-dipropionsäuren,  $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-isocapronsäure, Octopin und  $\alpha, \alpha'$ -Imino-bernsteinsäure-propionsäuren dehydrieren, wurden  $\alpha, \alpha'$ -Imino-propionsäure-glutarsäuren (II) und  $\alpha, \alpha'$ -Imino-glutarsäure-bernsteinsäuren (III) bei Gegenwart der genannten Fermentsysteme durch Sauerstoff rasch dehydriert. Es scheint demnach, dass zur Angreifbarkeit solcher Imino-dicarbon-säuren durch Dehydrasen Glutaminsäure am Aufbau der Imino-dicarbonsäure teilhaben muss. Als Folge der Hydrolyse der durch die Hydrierung gebildeten *Schiff'schen* Basen und nachfolgenden Desaminierung der gebildeten Aminosäuren wird Ammoniak freigesetzt, dessen Menge dem Sauerstoffverbrauch, d. h. der Dehydrierung parallel geht.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

---

## 10. Sur la bromuration de sels d'argent d'acides organiques dans le trichloréthylène

par M. Stoll et A. Rouvé.

(12 V 1943)<sup>1)</sup>.

La dégradation de sels d'argent d'acides organiques par le brome a fait l'objet de différentes études<sup>2)</sup>. L'utilisation de cette méthode pour la préparation d'acides  $\omega$ -bromés a été spécialement étudiée par *H. & C. Hunsdiecker*<sup>3)</sup>. Ces auteurs indiquent, pour les monoesters des acides dicarboniques supérieurs, des rendements de 65 à 80% de la théorie. Pour arriver à ces résultats, ils préconisent l'emploi de dissolvants stables vis-à-vis du brome, tels que  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CS}_2$ , etc.:



En reprenant cette réaction, nous avons fait la constatation très curieuse que de tous les dissolvants étudiés, précisément celui qui n'était pas stable vis-à-vis du brome donnait les meilleurs rendements. Ainsi les rendements moyens obtenus pour la bromuration du sel d'argent du monoester thapsique dans le tétrachlorure de carbone

---

<sup>1)</sup> Date de dépôt du pli cacheté, ouvert par la rédaction le 19 XII 1950 à la demande du déposant, la Maison *Firmenich & Cie, succrs de Chuit, Naeff & Cie*, Genève.

<sup>2)</sup> Pour l'énumération chronologique de ces études, voir *K. Ziegler*, A. 551, 37 (1942).

<sup>3)</sup> B. 75, 291 (1942).