

Lösung zugefügt die Resistenzbildung einer Tbc-Kultur gegenüber INH verhindert, würde durch eine solche Vorstellung verständlich, da die Pufferung solcher erhöhter Metallionen-Konzentrationen durch den Organismus nicht mehr bewältigt werden könnte, so dass stets genügend Metallionen für die INH-Wirkung vorhanden sind.

Kobalt-Komplex des INH: Eine Lösung von INH in 50-proz. Alkohol wird mit überschüssiger, gesättigter wässriger Kobaltsulfatlösung geschüttelt. Der entstandene feine, kristalline Niederschlag wird abgenutscht und zur Entfernung von Kobaltsulfat mit viel Wasser ausgewaschen. Nach Trocknen am Vakuum erhält man ein feines, rotvioletttes Kristallpulver der Formel $C_6H_6ON_3Co, HSO_4, 2H_2O$.

Co wurde titrimetrisch mit Komplexon I bestimmt; $SO_4^{''}$ wurde gravimetrisch ermittelt.

	4,229 mg Subst. gaben 3,320 mg CO_2 und 1,420 mg H_2O
	1,656 mg Subst. gaben 0,202 cm ³ N_2 (21°; 739 mm)
$C_6H_7O_5N_3SCo, 2H_2O$	Ber. C 21,96 H 3,38 N 12,81 Co 17,96 $SO_4^{''}$ 29,27%
	Gef. „ 21,42 „ 3,76 „ 13,77 „ 17,9 „ 29,17%

Zusammenfassung.

Die tuberkulostatische Aktivität von Picolinsäure-hydrazid und Thiazol-2-carbonsäurehydrazid und ihre Beeinflussbarkeit durch Thio-phen-2-carbonsäurehydrazid und $Cu^{''}$ wird angegeben, und ein zur Resistenzbildung führender Mechanismus wird diskutiert.

Anstalt für anorganische Chemie
und Hygienische Anstalt der Universität Basel.

77. Über den Abbau der Harnsäure zur Oxonsäure (Allantoxansäure).

Vorläufige Mitteilung¹⁾

von Hans Brandenberger.

(I. II. 54.)

Bei der Oxydation der Harnsäure durch Wasserstoffsuperoxyd (oder Luftsauerstoff) in stark alkalischer Lösung entstehen die schön kristallisierenden Salze einer Verbindung $C_4H_3O_4N_3$, die unter den beiden Namen Oxonsäure und Allantoxansäure bekannt ist. Die freie Säure ist sehr unbeständig und zerfällt leicht in CO_2 und Allantoxaidin $C_3H_3O_2N_3$. Die heute allgemein gültigen Anschauungen über die Konstitution dieser zwei Abbauprodukte gehen zurück auf die Arbeiten

¹⁾ Vorgetragen am 6. September 1953 in der Sitzung der Schweiz. Chemischen Gesellschaft (Lugano), vgl. H. Brandenberger, Chim. 7, 233 (1953).

von *Biltz* und Mitarbeitern¹⁾, welche dem Allantoxaidin die Formel I (2,5-Dioxo-4-imino-imidazolidin), der Oxonsäure die Formel II (2,5-Dioxo-4-carboximino-imidazolidin) zusprachen. Über den Verlauf der Oxydation allerdings finden sich in der Literatur Widersprüche. Während *Biltz*¹⁾ annimmt, dass sie ähnlich wie die Bildung des Allantoins (III)²⁾ über die symmetrische Diureido-oxyacetylen-carbonsäure IV verlaufe (Reaktion A), glauben andere Autoren³⁾, dass IV in diesem Falle nicht als Zwischenprodukt in Frage komme, was eine direkte Entstehung aus dem Harnsäure-Imidazolring durch oxydative Aufspaltung des Pyrimidinsystems wahrscheinlich machen würde (Reaktion B).

Um über den Verlauf dieses Oxydationsvorganges Klarheit zu erhalten, haben wir mit Hilfe von vier, in verschiedenen Stellungen mit ¹⁴C markierten radioaktiven Harnsäuren geprüft, welche der fünf Kohlenstoffatome der Molekel (das fünfte ergab sich aus der Differenz) in die Oxonsäure und das Allantoxaidin eingebaut werden. Es hat sich gezeigt, dass Allantoxaidin die vormaligen Kohlenstoffatome 2, 4 und 8 übernimmt, Oxonsäure dazu den Kohlenstoff aus der früheren Stellung 5. Da letzterer durch Ansäuren leicht als CO₂ abgespalten werden kann, muss er in Form einer Carboxylgruppe vorliegen. Das Harnsäure-Kohlenstoffatom 6 wird bei der Oxydation als CO₂ freigesetzt.

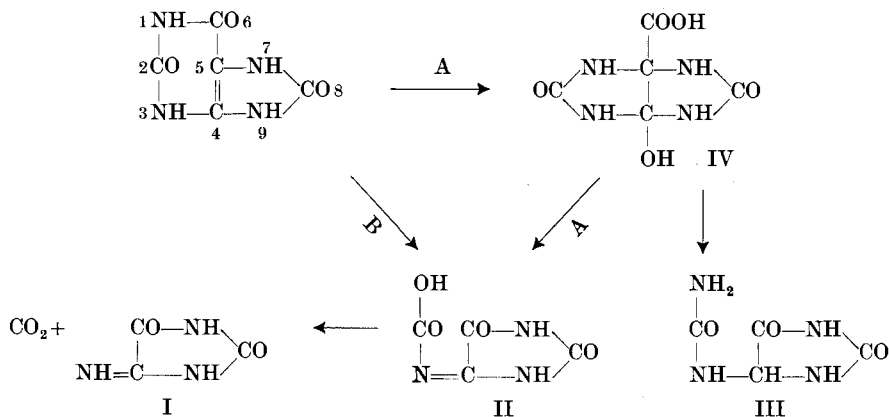
Diese unerwarteten Ergebnisse zeigen, dass alle bisherigen Formulierungen die wahren Verhältnisse nicht wiedergeben, dass zudem im Allantoxaidin und in der Oxonsäure nicht, wie allgemein angenommen, der Imidazolring der Harnsäuremolekel erhalten ist. Diese beiden Substanzen sind aufgebaut aus den Harnsäure-Kohlenstoffatomen 2, 4 und 8 mit den dazwischenliegenden N-Atomen 3 und 9. Dazu kommt ein weiteres N-Atom, entweder 1 oder 7, oder, bei Annahme eines symmetrischen Abbaues, beide zu je 50%. Oxonsäure enthält weiter das ursprüngliche C-Atom 5 in Form einer Carboxylgruppe (Schema I). Sollten die Formeln von *Biltz* für Allantoxaidin und Oxonsäure wirklich stimmen, so müsste der Imidazolring eine sekundäre Bildung sein, was äusserst unwahrscheinlich ist. Eine viel ungezwungenere Deutung sehen wir in der Annahme von symmetrischen Triazin-Strukturen (V und VI für Allantoxaidin, VII und VIII für Oxonsäure). Bei gleichen Bruttoformeln erklären sie die Eigenschaften und Umsetzungen der Substanzen viel besser als die Imidazol-Formulierungen (z. B. Zerfall in Ameisensäure und Biuret oder Oxydation zur Cyanursäure).

¹⁾ Für zusammenfassende Übersicht mit Zitierung der Originalliteratur siehe *H. Biltz & H. Schauder*, J. pr. **106**, 108 (1923).

²⁾ *R. Behrend*, A. **333**, 144 (1904); *W. Schuler & W. Reindel*, Z. physiol. Ch. **208**, 248 (1932); *F. W. Klemperer*, J. Biol. Chem. **160**, 111 (1945); *L. F. Cavaliere & G. B. Brown*, Am. Soc. **70**, 1242 (1948).

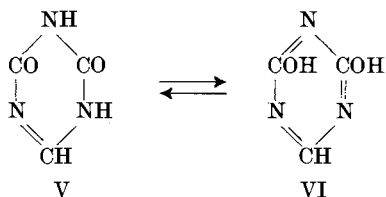
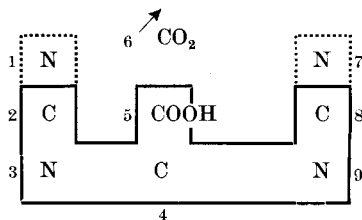
³⁾ *C. S. Venable*, Am. Soc. **40**, 1099 (1918); *F. J. Moore & R. Thomas*, Am. Soc. **40**, 1120 (1918); *M. Frèrejaque*, C. r. **191**, 949 (1930).

Ein Abbau von biologisch synthetisierter „Harnsäure-[7- ^{15}N]“ (ca. 90 % des ^{15}N in Stellung 7) hat gezeigt, dass der markierte Stickstoff aus Stellung 7 teilweise in die Oxonsäure eingebaut und teilweise als Ammoniak abgespalten wird. Das dritte N-Atom der Oxonsäure und des Allantoxaidins muss demnach von den Harnsäure-Stellungen 1 und 7 herrühren, was mit unseren strukturellen Überlegungen im Einklang steht.



Schema I:

Entstehung der Oxonsäure aus Harnsäure
(umrandeter Teil des Harnsäureskelettes
bleibt erhalten).



Radioaktive Ausgangsprodukte: Harnsäure-[2- ^{14}C] und Harnsäure-[4- ^{14}C] wurden bereitet durch Oxydation der entsprechenden radioaktiven Hypoxanthine mit Xanthin-oxydase¹⁾. Harnsäure-[6- ^{14}C] synthetisierten wir ausgehend vom Methyl ester der Bromessigsäure-[1- ^{14}C], wobei wir nach dessen Überführung in Cyanessigsäure-[1- ^{14}C]-methyl ester den Vorschriften von Traube²⁾ und Johns³⁾ folgten. Harnsäure-[8- ^{14}C] haben wir aus Adenin-[8- ^{14}C] durch Desaminierung mit NaNO_2 und nachfolgender Oxydation mit Xanthin-oxydase¹⁾ hergestellt.

¹⁾ E. G. Ball, J. Biol. Chem. **128**, 51 (1939).

²⁾ W. Traube, A. **331**, 64 (1904).

³⁾ C. O. Johns & A. G. Hogan, J. Biol. Chem. **14**, 299 (1913).

Oxydation der Harnsäure zu Oxonsäure erfolgte nach den Vorschriften von *Venable*¹⁾ und *Moore & Thomas*¹⁾. Die Oxonsäure isolierten wir als saures K-Salz:

$C_4H_2O_4N_3K$ Ber. C 24,61 H 1,04 N 21,53 K 20,03%
(195,18) Gef. „ 24,77 „ 1,09 „ 21,64 „ 20,13%

6,105 mg Substanz verbrauchten in $4\frac{1}{2}$ Std. (Wasser; 27°; 3,84 mg PtO_2) 0,69 ml H_2 (ber. für 1 DB 0,70 ml).

Für die Versuche mit den markierten Harnsäuren lösten wir jeweils 17 mg (0,1 mMol) in 0,5 ml 2-n. KOH (1 mMol) und setzten 0,25 ml 3-proz. H_2O_2 zu; Reaktionsdauer 48 Std. bei $25^\circ \pm 2^\circ$. Das abgespaltene CO_2 wurde als $BaCO_3$ isoliert, das K-Oxonat aus Wasser (nicht über 50°) umkristallisiert.

Decarboxylierung der Oxonsäure durch Auflösen von 6–10 mg in 10 Tropfen 15-proz. HCl und vorsichtiges Erwärmen auf 50°. Wir isolierten lediglich das abgespaltene CO_2 als $BaCO_3$.

Bestimmung der Radioaktivität erfolgte mit einem *Geiger-Müller-Zähler* mit Glimmerfenster. Harnsäure und K-Oxonat wurden, da wir sie für weitere Abbauprobe benötigten, nicht zu CO_2 verbrannt, sondern direkt ausgezählt; die durch Eigenabsorption bedingten Korrekturfaktoren entnahmen wir einer Glykokoll-Korrektionskurve. Dieses Verfahren ist natürlich bedeutend ungenauer als das allgemein übliche Auszählen aller Präparate als $BaCO_3$, es gestattete jedoch, mit bedeutend weniger Substanz auszukommen.

Markierung der verwendeten Harnsäure	Spezifische Aktivitäten ²⁾			
	Harnsäure	CO_2 aus Harnsäure	Oxonsäure aus Harnsäure	CO_2 aus Oxonsäure
-2- ^{14}C	234000	1380	209500	78
-4- ^{14}C	21700	39	22900	0
-6- ^{14}C	7195	5200 ³⁾	552	—
-8- ^{14}C	70000	333	90700	0
-8- ^{14}C ⁴⁾	13900	—	12700	—

Experimentelle Einzelheiten sowie auch der Abbau der Harnsäure-[7- ^{15}N] werden an anderer Stelle eingehend beschrieben werden. — Wir danken Herrn Prof. *J. M. Buchanan* für sein grosses Interesse an dieser Arbeit, ihm, sowie auch Dr. *J. L. Rabinowitz* und Dr. *E. Staple* für manche wertvolle Diskussionen.

SUMMARY.

Using isotopic tracer methods, we have established which C and N atoms of the uric acid molecule are incorporated into oxonic acid (allantoxanic acid) and allantoxaidine. These two alkaline oxidation products do not contain the original imidazole ring of uric acid. Symmetrical triazine structures are proposed to replace the generally accepted imidazolidine formulas.

Department of Physiological Chemistry, University of Pennsylvania Medical School, Philadelphia, Pa., und
Theodor-Kocher-Institut der Universität Bern (jetzige Adresse).

¹⁾ L. c.

²⁾ Impulse pro mMol und Minute.

³⁾ Niedrige Aktivität bedingt durch Verdünnung des CO_2 aus Stellung 6 durch Nebenreaktionen.

⁴⁾ Erhalten durch Reinigung und Verdünnung der vorstehend verwendeten Harnsäure-[8- ^{14}C].