

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Ueber den Abbau der [Alpha]-Amino-[Beta]-Oxybuttersäure durch überlebendes Nierengewebe

Wrann, Margarete

1938

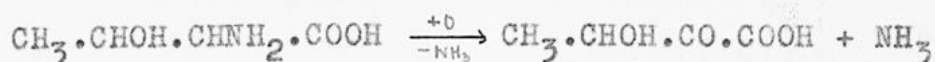
Problemstellung und Arbeitsübersicht

[urn:nbn:at:at-ubi:2-2548](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:at:at-ubi:2-2548)

Problemstellung und Arbeitsübersicht.

Unter Berücksichtigung der Versuchsergebnisse von Knoop am ganzen Tier und der Versuchsergebnisse von Krebs an überlebendem Nierengewebe waren somit bei der α -Amino- β -Oxybuttersäure und der α -Amino- β -Oxyvaleriansäure folgende Abbaumöglichkeiten gegeben (Den Formelbildern sind die Umsetzungsmöglichkeiten der α -Amino- β -Oxybuttersäure zu Grunde gelegt):

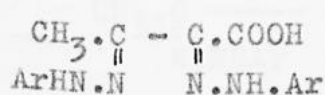
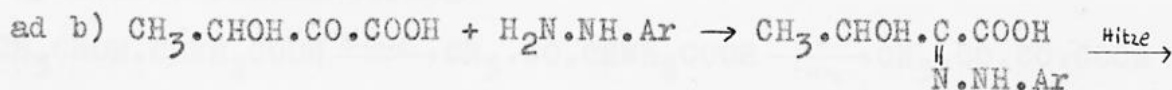
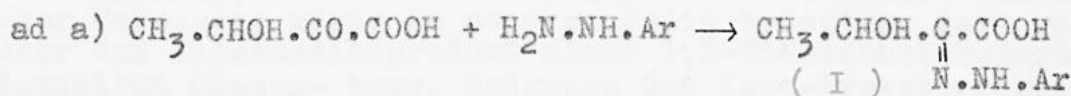
1.) Oxydative Desaminierung der α -Amino- β -Oxybuttersäure zur α -Keto- β -Oxybuttersäure nach Krebs.



Da bei der Krebs'schen Versuchsanordnung der weitere Abbau der entstandenen α -Ketonsäure durch Arsenige Säure gehemmt ist, so wäre mit Hilfe eines Phenylhydrazinderivates

a) in der Kälte die Bildung eines Hydrazons,

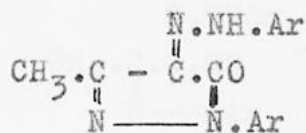
b) in der Hitze ^{die} eines Osazons, bzw. Hydrazons des entsprechenden Ketopyrazolonderivates zu erwarten.



(Osazon)

(II)

→



(Pyrazolonderivat)

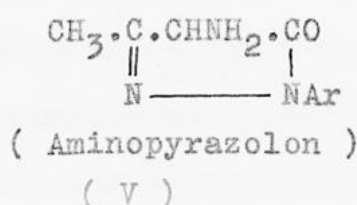
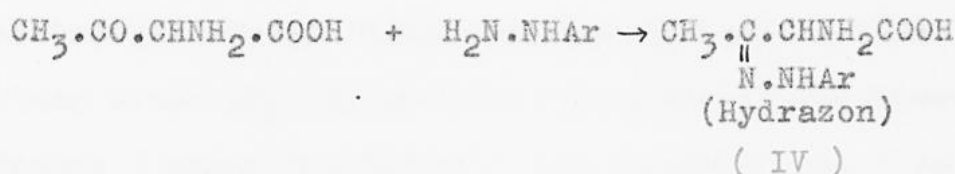
(III)

2.) β -Oxydation der α -Amino- β -Oxybuttersäure zur
 α -Amino- β -Ketobuttersäure nach Knoop.



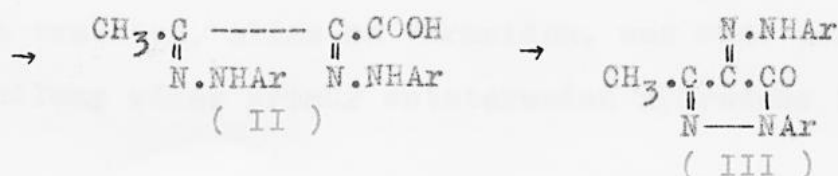
Für diese Verbindung wären folgende Umsetzungsmöglichkeiten gegeben:

- a) Bildung eines Hydrazons in der Kälte auf Grund
der anwesenden Ketongruppe, bzw. eines Amino-
Pyrazolonderivates in der Hitze.

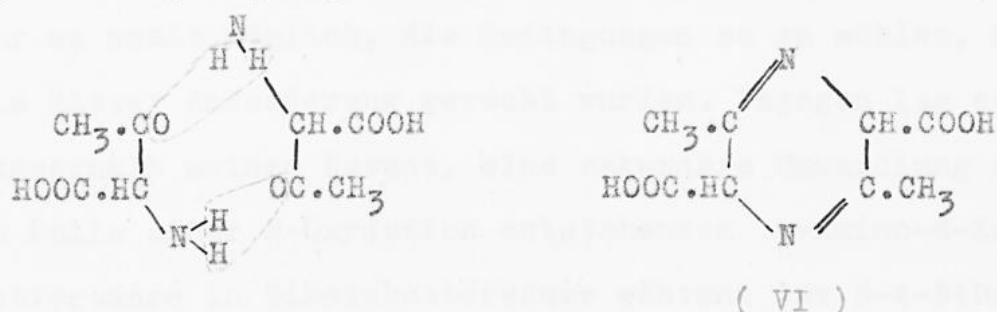


- b) Sekundäre Veränderung der einmal entstandenen
 α -Amino- β -Ketobuttersäure auf Grund ihres chemischen Ver-
haltens als 1,2-Aminoketonderivat.

I. Bei 1,2-Aminoketonen (Aminoaldehyd, Aminoaceton) ist die Aminogruppe ziemlich labil und kann gegen Sauerstoff ausgetauscht werden, weshalb diese Verbindungen in alkalischer Lösung Fehling reduzieren und beim Erwärmen mit überschüssigem essigsaurem Phenylhydrazin in die Osazone des Glyoxals, bzw. des Methylglyoxals übergehen. Ein solcher Uebergang würde in unserem Falle bedeuten, dass wir über das Intermediärprodukt einer 1,2-Diketobuttersäure zu demselben Osazon- bzw. Hydrazon des Keto-Pyrazolonderivates gelangen müssten wie bei der Annahme einer auftretenden oxydativen Desaminierung.



II. 1,2-Aminoketonsäuren gehen äusserst leicht unter Ringschluss in Pyrazinderivate über. In unserem Falle müsste somit aus 2 Molekülen 1-Amino-2-Ketobuttersäure die 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure entstehen:



Aus den angegebenen Formelbildern geht hervor, daß auf Grund des besonderen Verhaltens der 1,2-Aminoketone (Abspaltung einer NH_2 -Gruppe unter gleichzeitiger Sauerstoffaufnahme) unter Umständen (z.B. Hitzefällung) im Falle eines Abbaues im Sinne der β -Oxydation das gleiche Hydrazon des Ketopyrazolonderivates entstehen kann, wie bei einem Abbau durch oxydative Desaminierung. Eine eindeutige Entscheidung der Frage, welche Reaktionsfolge beim Abbau der α -Amino- β -Oxybuttersäure durch Überleben des Nierengewebe tatsächlich eintritt, ist daher nur möglich, wenn es gelingt, das primäre Oxydationsprodukt durch Phenylhydrazin als Hydrazon zu fassen. In diesem Falle müsste man bei der oxydativen Desaminierung die Verbindung I, dagegen bei der β -Oxydation die Verbindung IV erhalten. Weiters wäre eine Entscheidung noch möglich durch Isolierung eines Derivates der 3,6-Pyrazindicarbonsäure (Verbindung VI).

Ich musste daher bei der Aufarbeitung der Versuchsansätze und der Fällung mit dem Phenylhydrazinderivat vor allem trachten, alles zu vermeiden, was eine sekundäre Umwandlung eines primär entstehenden Hydrazons in das

Osazon bzw. das Hydrazon des Ketopyrazolonderivates begünstigen könnte. In dieser Phase des Arbeitsganges war es somit möglich, die Bedingungen so zu wählen, dass sie dieser Anforderung gerecht wurden. Dagegen lag es ausserhalb meines Zutuns, eine sekundäre Umwandlung der im Falle einer β -Oxydation entstehenden α -Amino- β -Ketobuttersäure in Diketobuttersäure während der 3-4-Stündigen Versuchsdauer im Thermostaten bei 38 Grad, P_h 7,4 und dauernder Sauerstoffdurchperlung zu verhindern. Mein Bestreben war somit vor allem darauf gerichtet

- 1.) nach Möglichkeit die primär entstandene Ketosäure durch Fällung in der Kälte als Hydrazon abzufangen und
- 2.) die Versuchsansätze auf eine eventuelle Anwesenheit einer 3,6-Pyrazindicarbonsäure zu prüfen.

Mein Arbeitsprogramm gliederte sich somit in Hinblick auf die verschiedenen Umsetzungsmöglichkeiten der Oxyaminosäure in folgende Punkte, wobei ich deren Ergebnis gleich vorwegnehmen will:

I. Darstellung von α -Amino- β -Oxybuttersäure und α -Amino- β -Oxyvaleriansäure nach der Arbeitsvorschrift von Abderhalden und Heyns. (Experim. Teil S 35)

Während die Darstellung der ersteren Säure, abgesehen von geringfügigeren Abweichungen, die auch von amerikanischen Autoren später beobachtet worden sind (C a r t e r und Mitarbeiter, Journ. biol. Chem. 117/1 (1937)), mühelos gelang, war ich dagegen nicht in der Lage, die letztere Säure nach den Angaben von Abderhalden zu erhalten, weshalb ich trotz mehrerer vergeblicher Versuche meine Untersuchungen auf die α -Amino- β -oxybuttersäure beschränken musste.

II. Einübung der Krebs'schen Versuchstechnik an Hand einer bekannten Aminosäure (Alanin), von der Krebs

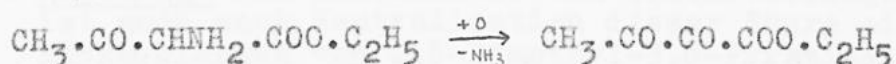
auch die Ausbeute an Hydrazon mitgeteilt hatte.

(Experim. Teil S 39).

Die von Krebs angegebenen Ausbeuten sind auch von mir erhalten worden.

III. Synthese des α -Aminoacetessigesters und der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure, um mit ihnen nachstehende Versuche auszuführen. (Experim. Teil S 41)

a) Spaltet α -Aminoacetessigester unter den Reaktionsbedingungen, wie sie bei der Krebs'schen Versuchsanordnung gegeben sind (schwach alkalische Reaktion, Temperatur $37,5^{\circ}$, Sauerstoffdurchperlung, 3-4-stündige Versuchsdauer) Ammoniak ab und geht er unter Sauerstoffaufnahme in 1,2-Diketobuttersäureester über ?



Es sei vorweggenommen, dass die Synthese des Aminoacetessigesters nicht gelang, da bei allen Ansätzen, trotz genauester Einhaltung der Arbeitsvorschriften immer nur der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäureester erhalten werden konnte. Auf diese Versuche musste ich daher, obwohl sie für die Fragestellung und für die Diskussion meiner Befunde sehr wesentlich gewesen wären, verzichten.

b) Gelingt es, 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure unter Berücksichtigung der Krebs'schen Versuchsanordnung aus dem physiologischen Salzgemisch inklusive Nierenschnitten und bei gleichzeitiger Anwesenheit der α -Amino- β -Oxybuttersäure möglichst quantitativ zu isolieren ?

Hierzu waren nachfolgende Vorversuche nötig:

1.) Prüfung des Verhaltens von 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure beim Eindampfen einer rein wässrigen Lösung dieser Säure im alkalischen und sauren

Reaktion unter normalem Druck und im Vakuum.

Ergebnis: Isolierung gelingt nur in neutraler oder schwach alkalischer Reaktion, wenn das Eindampfen unter möglichst schonenden Bedingungen (Vakuum) vorgenommen wird.

2.) Wiederholung dieses Versuches unter Berücksichtigung der oben erwähnten Ergebnisse bei gleichzeitiger Anwesenheit des physiologischen Salzgemisches. Hier wurde auch versucht, die Isolierung der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure neben der Extraktion aus dem eingedampften Salzlückstand mit absolutem Alkohol durch Sublimation im Vakuum der Wasserstrahlpumpe durchzuführen.

Ergebnis: Der Extraktion mit absolutem Alkohol ist der Vorzug zu geben.

3.) Versuch der Isolierung von 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure aus dem Salzgemisch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Trichloressigsäure, welche von Krebs zur Enteiweissung im Nierenschnittenversuch vorgeschrieben worden ist.

Ergebnis: Bei Anwesenheit von Trichloressigsäure ist auch nach Neutralisation dieser Säure eine Rückgewinnung von 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure nicht mehr möglich.

4.) Das negative Ergebnis der Verwendung der Trichloressigsäure als Entweissungsmittel machte es notwendig, für jene Versuche, in denen auf die Anwesenheit von 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure geprüft werden sollte, ein anderes Entweissungsmittel ausfindig zu machen.

a) 96%iger Alkohol. Die Enteiweissung mit 96%igem Alkohol gelang zwar ohne weiteres, wenn dieselbe bei schwach alkalischer Reaktion vorgenommen wurde. Dagegen misslang sie bei kongosaurer Reaktion, welche unbedingt eingehalten werden musste, um eine Verdrängung der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure als Alkalisalz aus der Lösung zu verhindern.

b) Kolloidales Eisenhydroxyd + gesättigtes Magnesiumsulfat. Mit Hilfe dieses Mittels gelang es, das Eiweiss quantitativ zu entfernen und die 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure aus den Versuchsansätzen mit Nierenschnitten zurückzugewinnen.

5.) Versuch der Isolierung der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nierenschnitten und α -Amino- β -Oxybuttersäure nach

Enteiweissung mit kolloidalem Eisenhydroxyd + Magnesiumsulfat.

Ergebnis: Unter Berücksichtigung von Punkt 1, 2 und 4b gelingt die Rückgewinnung von zugesetztem 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure aus einem mit kolloidalem Eisenhydroxyd + Magnesiumsulfat enteiweisstem Versuchsansatz in einer Ausbeute von 55%.

6.) Versuch der Isolierung der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure bei gleichzeitiger Anwesenheit des Phenylhydrazinderivates, welches zur Fällung eines eventuell entstandenen Hydrazons verwendet werden sollte.

Ergebnis: Bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Phenylhydrazinderivates ist eine Rückgewinnung der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure nicht möglich, auch dann nicht, wenn man den grössten Teil des überschüssigen Phenylhydrazins durch Acetonzusatz zu entfernen trachtet.

Die Isolierung eines entstandenen Ketons als Hydrazon und die Aufarbeitung auf 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure im selben Versuchsansatz war demnach auf Grund des Vorversuches 6 nicht möglich. Da die Isolierung eines eventuell gebildeten Hydrazons hier als die Hauptaufgabe erschien, so wurde beim Hauptversuch die Krebs'sche Versuchsanordnung mit der Trichloressigsäure-Enteiweissung im grossen und ganzen beibehalten und die Prüfung auf eine Anwesenheit von 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure in speziellen Versuchsansätzen durchgeführt.

IV. Hauptversuch mit α -Amino- β -Oxybuttersäure an überlebendem Nierengewebe. (Experim. Teil S 46)

1.) Versuchsanordnung nach Krebs. Aufarbeitung ^{der} mit Trichloressigsäure enteiweissten Versuchsansätze auf eine eventuell entstandene Ketoverbindung durch Fällung mit

a) Dinitrophenylhydrazin

b) p-Nitrophenylhydrazin

bei niedrigerer Temperatur.

Ergebnis: Die Versuche werden im Sinne einer β -Oxydation gedeutet und in einem getrennten Abschnitt ausführlich behandelt.

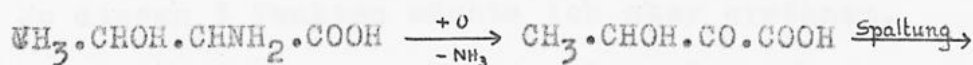
2.) Versuchsanordnung nach Krebs, Enteiweissung aber mit kolloidalem Eisenhydroxyd + Magnesiumsulfat zwecks Prüfung auf eventuell entstandene 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure.

Ergebnis: Es wurde kein Anhaltspunkt gefunden, der auf eine Bildung der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure hinweisen würde.

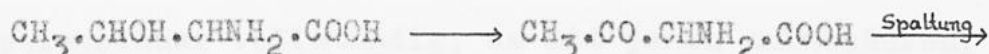
V. Als Ergänzung für die Befunde des Hauptversuches wurde noch das Verhalten des Leberglykogens hungernder Ratten untersucht, das vielleicht zur Stützung der Annahme einer β -Oxydation beim Abbau dieser Oxyaminosäure im Organismus beitragen könnte. (Experim. Teil S. 50)

Zum Verständnis dieser Fütterungsversuche sei folgendes vorausgeschickt:

Erfolgt der Abbau der α -Amino- β -Oxybuttersäure analog dem Abbau der übrigen Aminosäuren durch oxydative Desaminierung, so müsste aus dieser Oxyaminosäure Milchsäure entstehen, welche im Organismus leicht in Kohlehydrat übergeht und in der Leber als Glykogen aufscheinen würde.



Erfolgt dagegen der Abbau im Sinne von Knoop durch β -Oxydation, dann wären als Spaltprodukte Essigsäure und Glykokoll zu erwarten, von denen die erstere kein Kohlehydratbildner ist.



Da die Frage einer Abspaltung von Glykokoll nach Knoop zwar im Bereiche der Möglichkeit liegt, aber nicht geklärt ist und Glykokoll selbst im Organismus keineswegs leicht in Kohlehydrat übergeht, so würde eine Zunahme des Glykogengehaltes in der Leber (aus Glykokoll) zwar die Möglichkeit einer β -Oxydation dieser Aminosäure nicht ausschliessen, dagegen das Ausbleiben einer Zunahme des Uberglykogens doch eher im Sinne einer β -Oxydation zu deuten sein.

Ergebnis der Fütterungsversuche: Eine Zunahme des Glykogengehaltes der Leber hungernder Ratten im Vergleich zu dem der Kontrolltiere konnte nicht nachgewiesen werden.

Ich möchte jedoch diesen Fütterungsversuchen keine zu grosse Bedeutung beilegen, da folgende Einwände gemacht werden könnten:

1.) Die α -Amino- β -Oxybuttersäure enthält zwei asymmetrische Kohlenstoffatome, existiert somit in 4 verschiedenen Isomeren. Da von diesen 4 Isomeren nur eine die physiologisch wirksame Form darstellt (Wachstumsfaktor !), so ergibt sich daraus die Möglichkeit, dass nur ein Viertel der verfütterten Säuremenge überhaupt für eine Umsetzung im Organismus in Frage kommt. Es wäre daher denkbar, dass die verfütterte Menge zu gering war, um zu einer Glykogenablagerung in der Leber zu führen, wenn beim Abbau durch oxydative Desaminierung Milchsäure entstehen sollte.

2.) Der Abbau der Aminosäuren im Organismus erfolgt wesentlich langsamer als der der Kohlehydrate, so dass trotz Ausdehnung der Resorptionsdauer auf 6 1/2 Stunden mit der Möglichkeit zu rechnen ist, dass während dieser Zeit kohlehydratbildende Abbaustufen nicht in solchem Ausmasse gebildet werden, um eine Glykogenbildung erkennen zu lassen.

3.) Untersuchungen über die Resorptionsbedingungen von α -Amino- β -Oxybuttersäure liegen nicht vor.

Zu diesen 3 Punkten möchte ich aber erwähnen, dass die verfütterte Menge in einzelnen Versuchen so gross gewählt worden war, dass auch ein Viertel dieser Menge im Falle einer Milchsäurebildung durch α -oxydative Desaminierung für eine Glykogenbildung noch ausreichen könnte. Weiters genügt die gewählte Resorptionsdauer vollständig, um mit jenen Aminosäuren, von denen ein Uebergang in Kohlehydrate im Organismus

angenommen wird, einen Glykogenansatz in der Leber zu erzielen, woraus gleichzeitig hervorgeht, dass die Resorptions in hinreichendem Masse erfolgt sein muss.

Aus diesen Gründen glaubte ich daher die Fütterungsversuche vornehmen zu können, ohne spezielle Voruntersuchungen über Resorptionsgeschwindigkeit ausführen zu müssen, die infolge Mangel an Ausgangsmaterial ohnedies sehr schwer durchzuführen gewesen wären.

Ergebnisse der Hauptversuche mit α -Amino- β -Oxybuttersäure an überlebendem Nierengewebe.

Bei den ersten Versuchen wurde die Fällung der mit Trichloressigsäure enteiweissten Versuchsansätze mit Dinitrophenylhydrazin vorgenommen, welches auch von Krebs bei seiner Isolierung der primär entstandenen Ketosäuren verwendet worden war. Während im Vorversuch mit Alanin das Hydrazon der Ketonensäure in einer Ausbeute von 83 mgr (verwendete Alaninmenge 400 mgr) erhalten worden war, konnte ich bei meinem Versuchsansatz mit 400 mgr α -Amino- β -Oxybuttersäure lediglich ein Fällungsprodukt in einer Menge von 29 mgr erhalten. Diese geringe Ausbeute des Kondensationsproduktes mit Dinitrophenylhydrazin bot den ersten wenig erfreulichen Hinweis, dass ein Abbau dieser Substanz durch überlebendes Nierengewebe nur

in geringem Ausmasse erfolgt. Dies geht auch daraus hervor, dass die Fällung mit Dinitrophenylhydrazin erst nach Stehen über Nacht beendet war ⁺⁾ .

An dieser geringen Ausbeute dürfte wahrscheinlich das Vorliegen eines Gemisches von 4 Isomeren von geringem Ausschlag gewesen sein, da nach Krebs hinsichtlich der Desaminierbarkeit bei den optischen Antipoden der in der Natur vorkommenden Aminosäuren kein Unterschied besteht. Die Fällung mit Dinitrophenylhydrazin ist in der Kälte vorgenommen worden. Die geringe Ausbeute an Fällungsprodukt machte es daher notwendig im ganzen 9 Versuche auszuführen, um eine genügende Menge an Rohprodukt zu erhalten, mit welchem Kristallisationsversuche angestellt werden sollten. Die gesamte Ausbeute an Rohprodukt betrug 130 mgr, die Ausbeute bei den einzelnen Versuchen schwankte zwischen 7 und 29 mgr. Für die einzelnen Ansätze waren 250 - 400 mgr α -Amino- β -Oxybuttersäure verwendet worden. Der F.P. des Rohproduktes lag zwischen 125° und 130°. Für die Kristallisationsversuche verwendete ich zuerst niedrig siedende Lösungsmittel wie Essigester, Aceton, Alkohol etc., ohne aber zu kristallisierten Produkten zu gelangen. Ich musste daher auf höher siedende Lösungsmittel übergehen. Nach wenig erfolgreichen Versuchen mit Pyridin erhielt ich schliesslich aus Nitrobenzol einen schön kristallisierten Körper, der sich von dem Rohprodukt aber dadurch unterscheidet, dass er bis 340° nicht schmolz (F.P.-Apparat ⁺⁾

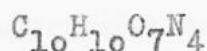
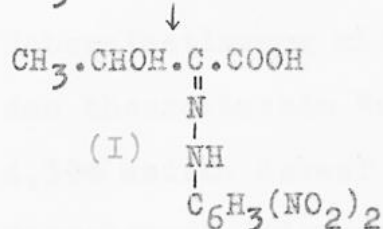
Dass α -Amino- β -Oxybuttersäure (dl-Allothreonin) vom Organismus schwer angegriffen wird, geht auch aus den Fütterungsversuchen von Snyder & Corley an Hunden hervor. (Journ. biol. Chem. 122/491 (1938)).

nach Kofler) und auch im Spezialapparat bei Herrn Professor Fischer bis 410° keinen F.P. zeigte, sondern nur allmählich verkohlte. Die Erhöhung des F.P. des aus Nitrobenzol umkristallisierten Dinitrophenylhydrazinderivates weist darauf hin, dass voraussichtlich Ringschluss zu einem Pyrazolonderivat stattgefunden hat. Ueber Ringschlussbildung von Hydrazonen beim Umkristallisieren aus hochsiedenden Lösungsmitteln ist in der Literatur schon öfter berichtet worden. Ein Reinheitskriterium der Substanz war somit durch Ermittlung eines scharfen F.P. nicht möglich. Ich habe daher in Hinblick auf die beträchtlichen Substanzverluste bei den bisher vorgenommenen Kristallisationsversuchen die restliche Substanz von wenigen mgr, ohne sie noch einmal umzukristallisieren, zur Elementaranalyse verwendet, um wenigstens ein ungefähres Bild oder eine Vergleichsmöglichkeit in bestimmten Grenzen mit den möglichen Formelbildern zu erhalten.

Die erhaltenen Werte meines Dinitrophenylhydrazinderivates waren folgende:

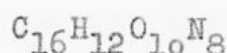
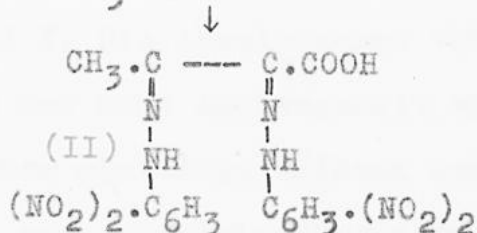
C 44.14%	H 3.38%	N 25.01%	Asche 4.39%
----------	---------	----------	-------------

Zur besseren Uebersicht seien alle in Frage kommenden Formelbilder mit ihrem Prozentgehalt an C, H und N (sowie O) in Bezug auf die Fällung mit Dinitrophenylhydrazin auf der folgenden Seite nochmals aufgestellt.

1.) Möglichkeiten im Falle der reinen oxydativen Desaminierung.

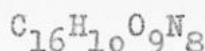
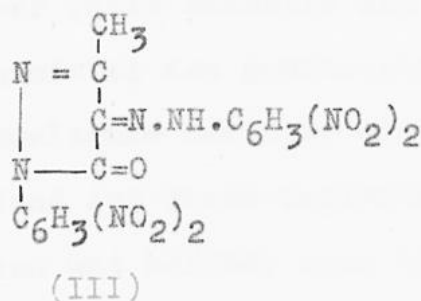
(M.G. 298,17)

40.26% C 37.56% O
3.38% H 18.80% N



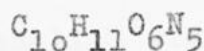
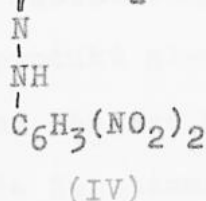
(M.G. 476,26)

40.33% C 33.60% O
2.54% H 23.53% N



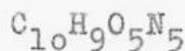
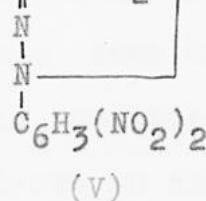
(M.G. 458,24)

41.92% C
2.20% H
31.42% O
24.46% N

2.) Möglichkeiten im Falle der reinen β -Oxydation.

(M.G. 297,19)

40.39% C 32.30% O
3.73% H 23.58% N



(M.G. 279,17)

43.00% C 28.66% O
3.25% H 25.09% N

(Vergl. C 44.14% H 3.38% N 25.01% Asche 4.39%)

Ein Vergleich mit den Prozentzahlen der 5 überhaupt in Betracht kommenden Verbindungen ergibt am ehesten eine Uebereinstimmung mit Formelbild V. Die Abweichungen von den theoretischen Werten sowie der hohe Aschengehalt von 4,39% weisen darauf hin, dass das einmalige Umlösen aus Nitrobenzol, wie vorauszusehen war, zur Reinigung nicht ausgereicht hat. Immerhin liess das Ergebnis der Elementaranalyse den vorsichtigen Schluss zu, dass an meiner α -Amino- β -Oxybuttersäure eine β -Oxydation erfolgt war.

Ich begann daher eine neue Versuchsreihe, verwendete aber jetzt anstelle des Dinitrophenylhydrazins als Fällungsmittel das p-Nitrophenylhydrazin, von dem niedriger schmelzende Derivate erwartet werden konnten. Teilweise fand ich diese Derivate auch in der Literatur beschrieben und hoffte, dass dadurch eine Identifizierung erleichtert werden würde.

Auch bei dieser zweiten Versuchsreihe musste ich die Beobachtung machen, dass die Ausbeute an gefälltem Rohprodukt gleichfalls sehr niedrig war. Auch hier waren daher längere Serienversuche notwendig, um eine genügende Substanzmenge zum Umkristallisieren zu erhalten. Ähnlich wie bei den Versuchen mit Dinitrophenylhydrazin wurde die Fällung mit p-Nitrophenylhydrazin wieder bei niedrigerer Temperatur vorgenommen. Im ganzen wurden 13 Versuchsansätze gemacht. Versuchsdauer 2 1/2 bis 3 1/2 Stunden, Versuchsmenge 150 - 200 mgr α -Amino- β -Oxybuttersäure, Gesamtausbeute an Rohprodukt 228 mgr. Die Ausbeute bei den einzelnen Versuchsansätzen schwankte zwischen 11 und 21 mgr. Der F.P. des Rohproduktes lag zwischen 140° und 150°.

In einigen Versuchen liess ich die enteiiweisste Lösung mit Nitrophenylhydrazin im Brutschrank bei 38° über Nacht stehen und erhielt Rohprodukte, die genau denselben F.P. zeigten wie die in der Kälte gefällten Versuchsansätze. Eine sekundäre Veränderung des im Versuch einmal gebildeten Abbauproduktes schien durch das Stehen bei Brutschranktemperatur nicht erfolgt zu sein.

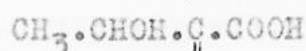
Auch beim p-Nitrophenylhydrazinderivat gelang es nicht, durch Verwendung niedrig siedender Lösungsmittel zu kristallisierten Produkten zu gelangen. Ähnlich wie in der 1. Versuchsreihe erwies sich endlich Nitrobenzol als das geeignete Lösungsmittel. Der F.P. des mehrmals umkristallisierten Produktes lag bei 296° und stimmte mit dem von K a r r e r und H e r s h b e r g (Chem. Zentralblatt 1934, IV/3507) beschriebenen F.P. des Nitrophenylhydrazons des Methylnitrophenylketopyrazolons überein (Formelbild III, S.30).

Die Elementaranalyse ergab folgende Zusammensetzung:

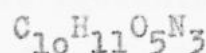
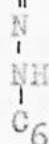
C	53.24%	H	3.54%	N	22.25%	Asche	1.40%
---	--------	---	-------	---	--------	-------	-------

Auch hier wies die zur Analyse verwendete, dreimal aus Nitrobenzol (bis zur Schmelzpunktskonstanz) umkristallisierte Substanz leider keinen vollständigen Reinheitsgrad auf. Obwohl die F.P.-Identität des von mir erhaltenen Produktes mit der von Karrer beschriebenen Verbindung auf ein bestimmtes Derivat hinweist (Formelbild III), möchte ich doch der Uebersicht halber und zum Vergleich der Prozentzahlen die überhaupt in Betracht kommenden Formelbilder anführen:

1. Möglichkeiten im Falle der reinen oxydativen Desaminierung.

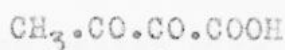


(I)

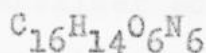
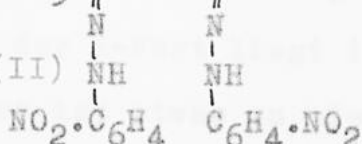


(M.G. 253.15)

47.42% C 31.60% O
4.38% H 16.60% N

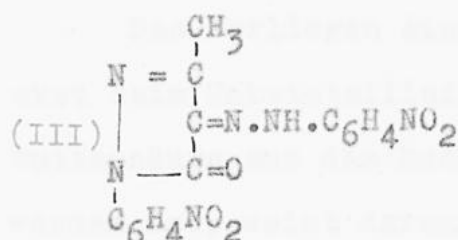


(II)

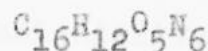


(M.G. 386.25)

49.74% C 24.85% O
3.65% H 21.76% N



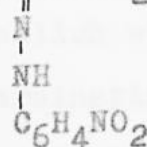
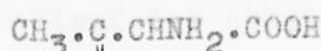
(III)



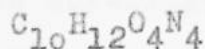
(M.G. 368.24)

52.16% C
3.29% H
21.72% O
22.83% N

2.) Möglichkeiten im Falle der reinen β -Oxydation.

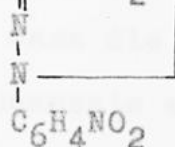
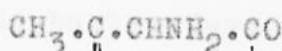


(IV)

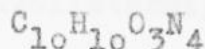


(M.G. 252.19)

47.60% C
4.80% H
25.38% O
22.22% N



(V)



(M.G. 234.17)

51.27% C 20.50% O
4.30% H 23.93% N

(Vergl. C 53.24% H 3.54% N 22.25% Asche 1.4%)

Ein Vergleich der bei der Verbrennung meiner Substanz erhaltenen Prozentzahlen zeigt am besten eine Uebereinstimmung mit Formel III. Eine grössere Abweichung zeigt sich nur am C-Wert (+ 1,07%), der H-Wert liegt innerhalb der Fehlergrenze, der N-Wert ist etwas zu niedrig. Die Prozentzahlen der übrigen Formelbilder schliessen auf jeden Fall aus. Ich glaube daher mit Sicherheit annehmen zu dürfen, dass ich das von K a r r e r beschriebene Produkt in Händen hatte, zumal der F.P. genau übereinstimmte.

Das Vorliegen eines Ketopyrazolonderivates, welches erst beim Umkristallisieren des Osazons der 1,2-Diketobuttersäure aus dem hochsiedendem Nitrobenzol erhalten worden ist, weist darauf hin, dass die Abfangung des primären Oxydationsproduktes (der α - bzw. β -Ketonsäure) nicht gelungen ist. Da die Versuchsbedingungen in beiden Versuchsreihen die gleichen waren und ein verschiedener Ablauf des Abbaues der α -Amino- β -Oxybuttersäure nicht verständlich wäre, so muss ich annehmen, dass die annähernde Uebereinstimmung des im ersten Versuchsansatz erhaltenen Pyrazolonderivates mit Methylamino-Dinitrophenylpyrazolon eine zufällige ist, die durch den unvollständigen Reinheitsgrad und den hohen Aschengehalt vorgetäuscht worden ist.

Wie eingangs erwähnt, könnte das Nitrophenylhydrazon des Ketomethylnitrophenylpyrazolons (III) sowohl durch oxydative Desaminierung einerseits entstehen, wenn die OH-Gruppe der primär entstandenen α -Keto- β -Oxysäure zur Ketongruppe oxydiert worden wäre, als auch durch primäre

β -Oxydation gebildet werden, wenn nachträglich die CHNH_2 -Gruppe in eine Ketogruppe umgewandelt worden wäre. Ich stehe damit vor der schwierigen Aufgabe, welchem Abbauweg der α -Amino- β -Oxybuttersäure durch das überlebende Nierengewebe ich den Vorzug geben soll. Ich glaube auf Grund der eingehaltenen Reaktionsbedingungen während des Versuches und der anschliessenden Aufarbeitung der Versuchsansätze mich aus folgenden Gründen eher für die β -Oxydation entscheiden zu müssen:

Es muss festgehalten werden, dass der Uebergang des anfänglich bei niedriger Temperatur schmelzenden Kondensationsproduktes mit Nitrophenylhydrazin in eine höher schmelzende Verbindung unter Wasseraustritt erst beim Umkristallisieren aus Nitrobenzol erfolgt ist, in einem Stadium also, in dem überschüssiges Nitrophenylhydrazin nicht mehr vorhanden war. Damit ein Ringschluss zu einem Pyrazolonderivat überhaupt eintreten kann, muß in β -Stellung zur Karboxylgruppe der Nitrophenylhydrazinrest schon eingeführt gewesen sein. Wäre der erste Angriff an der α -Amino- β -Oxybuttersäure in α -Stellung erfolgt, dann müsste die Nitrophenylhydrazingruppe am α -C-Atom sitzen und dadurch einen Ringschluss zu einem Pyrazolonderivat unmöglich machen. Diese Ueberlegung würde daher auf einen primären Angriff in β -Stellung hinweisen.

Offen ist die Frage, wann der Eintritt des Nitrophenylhydrazinrestes am α -C-Atom erfolgt ist. Nehme ich an, dass als erster Angriff beim Abbau der α -Amino- β -Oxybuttersäure durch das Nierengewebe eine α -Keto- β -Oxybuttersäure gebildet worden ist, dann kann ich mir nicht

vorstellen, wie bei der niedrigen Temperatur während des Einwirkens des Nitrophenylhydrazins die am β -C-Atom sitzende OH-Gruppe in eine Ketogruppe umgewandelt worden sein soll, die die Bildung des Osazons der 1,2-Diketobuttersäure ermöglicht hätte. Denn soweit mir bekannt ist, erfolgt Osazonbildung ja nur, wenn auf ein 1,2-Ketol Phenylhydrazin in der Hitze einwirkt. Eine Bildung des Osazons der 1,2-Diketobuttersäure bei meiner Versuchsanordnung halte ich daher für sehr unwahrscheinlich.

Andererseits könnte ich mir vorstellen, dass bei Eintritt der β -Oxydation die primär entstandene α -Amino- β -Ketobuttersäure schon während der immerhin langen Versuchsdauer von 2 1/2 bis 3 1/2 Stunden (P_h 7,4, konstante Sauerstoffdurchperlung, Temperatur $37,5^\circ$) die $CHNH_2$ -Gruppe unter Sauerstoffaufnahme und NH_3 -Abspaltung gegen die CO-Gruppe ausgetauscht hat, wodurch meines Erachtens allein die Möglichkeit für eine anschliessende Osazon-Bildung aus der jetzt vorliegenden 1,2-Diketobuttersäure bei niedriger Temperatur gegeben ist.

Zusammenfassend stelle ich mir die Bildung des Nitrophenylhydrazons des Ketomethylnitrophenylpyrazolons in der Weise vor, dass der primäre Angriff durch β -Oxydation erfolgt war unter Bildung von α -Amino- β -Ketobuttersäure. Diese Verbindung hat nun, während sie noch mit Nierenbrei in Berührung stand, offensichtlich die Aminogruppe unter gleichzeitiger Sauerstoffaufnahme abgespalten und ist in 1,2-Diketobuttersäure übergegangen. Diese 1,2-Diketo-buttersäure gab mit p-Nitrophenylhydrazin das entsprechende Osazon und bildete beim Umkristallisieren aus Nitrobenzol

unter Ringschluss bei gleichzeitiger Wasserabspaltung das Hydrazon des Ketomethylnitrophenylpyrazolons.

Weitere Untersuchungen, welche diese Annahme von mir stützen könnten, musste ich leider aus Substanzmangel zurückstellen. Ich möchte daher die bisher gewonnenen Erfahrungen als eine Vorarbeit für eine systematische Untersuchung der noch offenen Fragen in einem späteren Zeitpunkt betrachten.

In den Rahmen dieser geplanten Untersuchungen würde auch die Frage hineinfallen, wo überhaupt die hemmende Wirkung der Arsenig-Säure beim biologischen Abbau von Aminosäuren durch überlebendes Gewebe zu suchen ist. Offensichtlich hemmt die Arsenig-Säure wie auch die Blausäure in erster Linie die Decarboxylierung von α -Keton-säuren. Ob Arsenig-Säure aber auch die β -Oxydation verzögert und beeinflusst, ist unbekannt. Sollte dies der Fall sein, so würde es vielleicht erklären, warum die Ausbeuten bei meinen Versuchen, bei denen als primärer Abbauvorgang wohl die β -Oxydation anzunehmen ist, so gering waren.

Dass ich an eine Beeinflussung der β -Oxydation durch die Arsenig-Säure gedacht habe, geht daraus hervor, dass ich bei einem Versuche, die eventuell als Nebenprodukt entstandene 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure aus den ent-eiweissten Versuchsansätzen zu isolieren, mit Absicht die Arsenig-Säure weggelassen habe, ohne aber deshalb zu einer Aenderung des Resultates zu kommen.

Damit möchte ich auch zum Ausdruck bringen, dass das ganze Problem einer Isolierung primärer Abbauprodukte von Oxyaminosäuren durch überlebendes Nierengewebe auf Grund der bisher gewonnenen Erfahrungen äusserst kompliziert ist und im Rahmen meiner Arbeit nicht endgültig gelöst werden konnte.