universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

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

Wrann, Margarete

1938

Experimenteller Teil

urn:nbn:at:at-ubi:2-2548

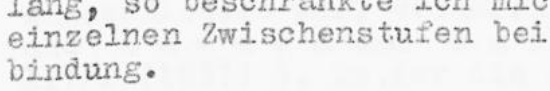
E x p e r i m e n t e l l e r T e i l.

I. Darstellung der a-Amino-ß-Oxybuttersäure und der a-Amino-ß-Oxyvaleriansäure. (Ber.d.Dt.Ch.Ges.67/530) (1934)

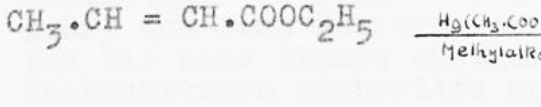
A.) α-Amino-ß-Oxybuttersäure.

Da die Darstellung der -Amino-ß-Oxybuttersäure nach den Angaben von A b d e r h a l d e n und H e y n s bis auf geringe Abweichungen mühelos gelang, so beschränkte ich mich auf die Anführung der einzelnen Zwischenstufen bei der Synthese dieser Verbindung.

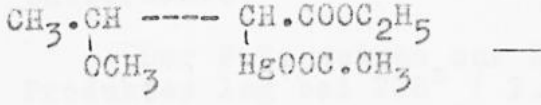
An Crotonsäureaethylester wurde in methylalkoholischer Lösung Quecksilberacetat angelagert:



Durch Behandlung mit KBr wurde der sich am Quecksilber befindende Acetatrest durch Brom ersetzt:



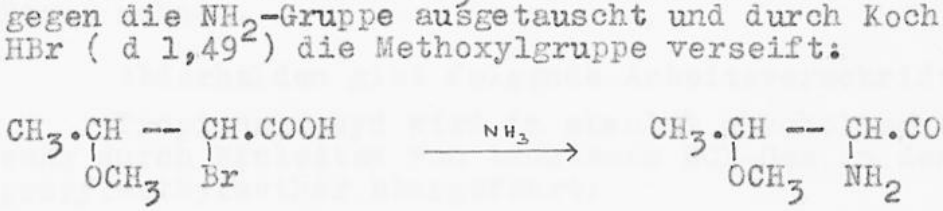
Diese Verbindung ging beim Behandeln mit Brom in Chloroform unter Abscheidung von $HgBr_2$ in den a-Brom-ß-methoxybuttersäureester über. Die Entfärbung des zugesetzten Broms und die Abspaltung von $HgBr_2$ sollte lt.Vorschrift schon nach einer Stunde eintreten. Ich beobachtete abweichend davon, dass diese Entfärbung viel langsamer vor sich ging und erst nach 12 - 24 Stunden beendet war.



Der a-Brom-ß-methoxybuttersäureester wurde durch n/2-NaOH auf der Schüttelmaschine verseift. Abderhalden gibt an, dass diese Verseifung nach 3 Stunden beendet ist (erkenntlich an der vollständigen Lösung des Esters).

Ich beobachtete dagegen völlige Verseifung schon nach 10 Minuten.

In der freien Säure wurde durch zweistündiges Erhitzen mit 25%igem NH_3 in der Druckflasche das Brom gegen die NH_2-Gruppe ausgetauscht und durch Kochen mit HBr (d 1,49) die Methoxylgruppe verseift:



Als die Synthese der a-Amino-ß-Oxybuttersäure abgeschlossen war, erschien die Arbeit von W o o d und M a d d e n und C a r t e r (Journ.biol.Chem. 117/1 (1937)), in der die rasche Verseifung des Esters gleichfalls erwähnt worden ist und somit meine Beobachtung bestätigt. A b d e r h a l d e n und S t e n g e r haben in der Zeitschrift für Physiologische Chemie 251/171 (1938) ihre früheren Angaben nachgeprüft und eine kürzere Verseifungsdauer von einer halben bis eine Stunde angegeben. Letztere ist nach meinen Beobachtungen sicherlich noch immer zu lange gewählt.

Ausgehend von 100 gr käuflich erworbenen Crotonsäureaethylester erhielt ich 9 gr reine a-Amino-ß-oxybuttersäure.

Der F.P. meines zur Elementaranalyse verwendeten Produktes lag bei 228° (F.P.-Apparat nach Prof.Kofler). Abderhalden gibt Braunfärbung bei 225°, Schmelzen unter Zersetzung und Aufschäumen bei 239° an.

Elementaranalyse.

3.940 mgr Subst.: 0.430 ccm N_2 (22°,698 mm) N = 11.60%

4.331 mgr Subst.: 6.465 mgr CO_2, 2,985 mgr H_2O

C = 40.71% H = 7.71%

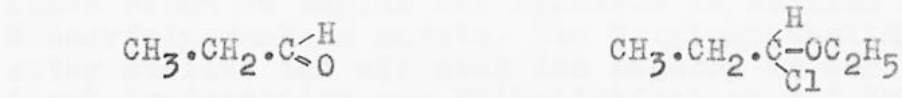
gef.:	C = 40.71%	H = 7.71%	N = 11.60%
ber. (M.G. 119,1):	C = 40.32%	H = 7.61%	N = 11.76%

B.) α-Amino-ß-Oxyvaleriansäure.

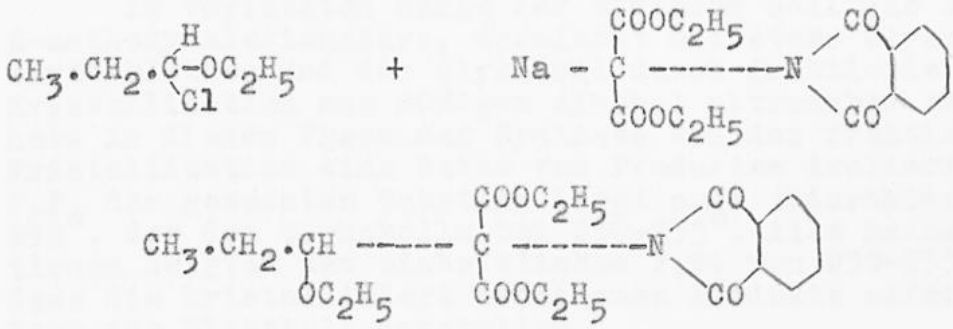
Die Darstellung dieser Aminosäure nach den Angaben A b d e r h a l d e n und H e y n s ist mir, wie schon eingangs erwähnt, trotz mehrfacher Versuche nicht gelungen. Ich gebe auch hier die einzelnen Zwischenstufen der Synthese wieder an und will auf die Schwierigkeiten, auf welche ich gestossen bin, speziell Bezug nehmen.

Abderhalden gibt folgende Arbeitsvorschrift an:

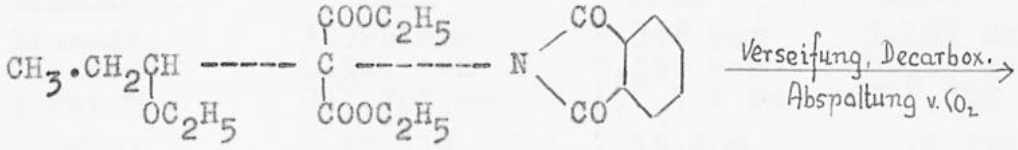
Propionaldehyd wird in absolut alkoholischer Lösung durch Einleiten von trockenem HCl-Gas in den Chlorpropylaethylaether übergeführt:

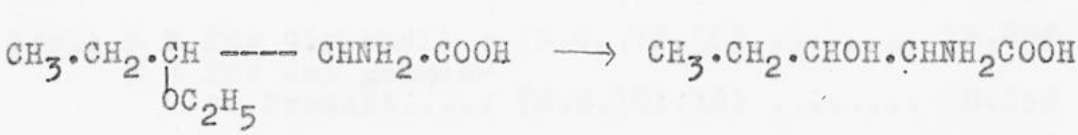


Umsetzung dieses Produktes mit Natriumphtalimidmalonsäurediaethylester:



Nach Verseifung, Decarboxylierung und Abspaltung der Phtalsäure entsteht die a-Amino-ß-aethoxyvaleriansäure, aus der nach Kochen mit HBr die a-Amino-ß-oxyvaleriansäure hervorgeht:





Der Angelpunkt der Synthese liegt offensichtlich in der Gewinnung eines einheitlichen Chlorhalbacetals des Propionaldehyds. Nach Abderhalden folgt die Isolierung der Hauptfraktion durch Vakuumdestillation bei 12 mm in einem Temperaturintervall von 40 - 45°. Diese Fraktion wird nach seinen Angaben noch mindestens zweimal unter

gewöhnlichem Druck destilliert und soll bei 111 -113° unzersetzt übergehen. Ich habe niemals bei der Vakuumdestillation unter gleichen Druckbedingungen eine so hoch siedende Fraktion erhalten. Mein Produkt ging vielmehr schon bei 28 - 30° einheitlich über. Einen wesentlichen Rückstand, welcher der von Abderhalden angegebenen Hauptfraktion entsprechen würde, traf ich niemals an. Bei der Destillation unter normalem Druck beobachtete ich dauernd sehr starke Zersetzung, die bei jeder Destillation 50% und mehr der vorgelegten Menge vernichtete. Ich habe die Darstellung des Chlorpropylaethylaethers noch 3 mal wiederholt, ohne zu anderen Resultaten zu kommen. Um zu grosse Verluste durch die Destillation bei gewöhnlichem Druck zu vermeiden, habe ich meine niedriger siedende Hauptfraktion mehrere Male im Vakuum destilliert und für die weiteren Umsetzungen verwendet, wobei ich im Hinblick auf die abweichenden Befunde schon zu Beginn der Synthese im Stillen mit einem Misserfolg rechnen musste. Den Natriumphthalimidmalonester stellte ich mir nach den Angaben in der Literatur durch Kondensation von Phthalimidkalium mit Brommalonester und nachträglichen Ersatz des H-Atomes gegen Na her. Alle diese Produkte synthetisierte ich mir selbst.

Im vorletzten Gange der Synthese soll die a-Amino-ß-aethoxyvaleriansäure, vermischt mit etwas Glykokoll zurückbleiben und das Glykokoll durch fraktionierte Kristallisation aus 80%igem Alkohol abtrennbar sein. Ich habe in dieser Phase der Synthese bei der fraktionierten Kristallisation eine Reihe von Produkten isoliert. Der F.P. der gesuchten Substanz liegt nach Abderhalden bei 258°, der des Glykokolls bei 230-233°. Alle meine Fraktionen zeigten den einheitlichen F.P. von 230-233°, so dass die kristallisiert erhaltenen Produkte offensichtlich nur Glykokoll darstellen.

Die Stickstoffbestimmungen, die ich mit den einzelnen Fraktionen zur Sicherheit noch ausführte, bestätigten das Vorliegen von Glykokoll.

Fraktion:	A	B	C
Einwage:	3.399 mgr	2,348 mgr	3,183 mgr
Volumen:	0.581 ccm	0.399 ccm	0.553 ccm
t,Barom:	21°,705 mm	19°,708 mm	21°,708 mm
% N:	18.41%	18.50%	18.79%

Ber.: % N für Glykokoll : (M.G. 75.05) 18.69%
% N für das gesuchte Produkt....: (M.G.161.16) 8.69%

Da ich somit nicht in der Lage war, das Ausgangsprodukt für die Synthese (Chlorpropylaethylaether) in einwandfreier Weise zu erhalten und separate, zeitraubende Untersuchungen in dieser Richtung notwendig gewesen wären, musste ich den Versuch, diese Substanz darzustellen, aufgeben.

II. Die K r e b s 'sche Versuchsanordnung.

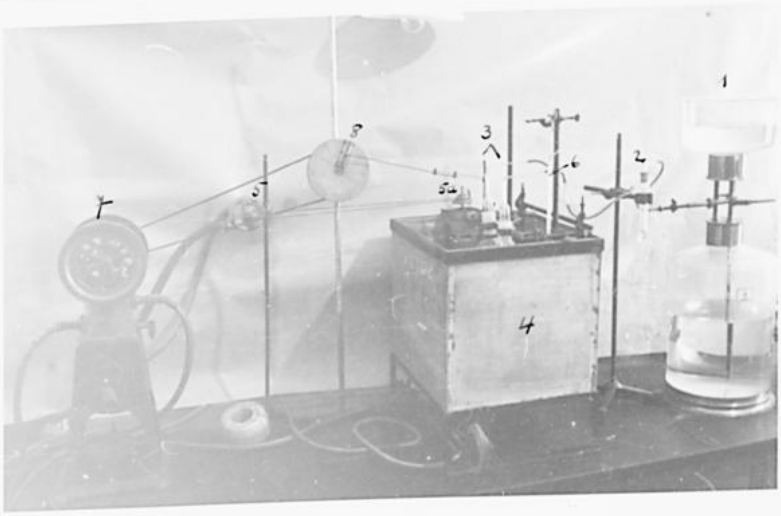
(Krebs, Zeitschr.f.phys.Chem. 217/191, (1933)).

Bei der Krebs'schen Versuchsanordnung werden überlebende Gewebsschnitte, hergestellt nach W a r b u r g (Stoffwechsel von Tumoren, Berlin 1926) in einer Art Ringer-Phosphatlösung mit der zu untersuchenden Aminosäure bei 37 - 38° mehrere Stunden unter konstanter Sauerstoffdurchperlung geschüttelt. Die physiologische Salzlösung wird durch Mischung nachfolgender Lösungen bereitet:

100 ccm 0.9%ige NaCl-Lösung
4 ccm 1.15%ige KCl-Lösung
3 ccm 0.1l-molare $CaCl_2$-Lösung
1 ccm 0.154-molare $MgSO_4$-Lösung
21 ccm Phosphatpuffer.

Letztere wird folgendermassen hergestellt: 40 ccm m/4 -Na_2HPO_4-Lösung und 2 ccm molare HCl-Lösung werden mit Wasser auf 100 ccm verdünnt. P_h der Lösung ist 7,4.

Zur Einübung der Versuchstechnik nach Krebs verwendete ich dl-Alanin als Substrat und Nierenschnitte von Ratten. Nach Krebs ist ja die Niere im besonderen Masse geeignet, Aminosäuren oxydativ zu desaminieren. Beim Versuch mit dl-Alanin wurden zwei Ratten vom durchschnittlichen Gewicht von 200 gr durch Durchtrennung der Halswirbel getötet, möglichst rasch entblutet und die Nieren nach Eröffnung der Bauchhöhle herauspräpariert und in physiologische NaCl-Lösung von 37° gelegt, welche vorher gut mit Sauerstoff durchperlt worden war. Von den Nieren wurden mit Hilfe eines Rasiermessers möglichst dünne Gewebsschnitte von 0.2 - 0.3 mm Dicke hergestellt, die sofort wieder in die physiologische Salzlösung zurückgebracht wurden. Die Herstellung von so dünnen Schnitten ist für die Untersuchungen an überlebenden Organen sehr wesentlich. Die für den Versuch verwendeten Organschnitte entsprachen einem später ermittelten Trockengewicht von 103 mgr. Sie wurden mit 50 ccm phosphathaltiger Salzlösung, 400 mgr dl-Alanin, 0.8 ccm m/20-Arseniger Säure 4 Stunden im Sauerstoffstrom bei 37,5° bewegt. Die apparative Anordnung geht aus der beigegebenen Aufnahme hervor:



Aus dem Sauerstoffgasometer 1) tritt der Sauerstoff in die Waschvorrichtung 2) ein, die zugleich als Blasenzähler dient. Der austretende Sauerstoff wird durch ein T-Stück in die beiden Kolben 3) eingeleitet, die mit der Salzlösung, den Nierenschnitten und der zu prüfenden Aminosäure beschickt sind. Als Versuchskolben verwendete ich Normalschliffkolben nach Greiner und Friedrichs vom Inhalt von 250 ccm. Das Einleitungsrohr für den Sauerstoff endete unter dem Flüssigkeitsspiegel. Die Verengung des Kolbenaufsatzes gab genügend Spielraum, um den Sauerstoff aus dem Reaktionsgefäss entweichen zu lassen. Die Reaktions - gefässe tauchten in einen Thermostaten 4) von 45 Liter Fassungsraum ein, der durch einen Brenner angeheizt wurde. Mit Hilfe einer Wasserturbine 5) und der angebrachten Rührvorrichtung 5a wurde für eine gleichmässige Durchmischung Sorge getragen. Die Temperaturkontrolle erfolgte durch das Thermometer 6). Die Versuchsgefässe wurden durch einen mit Gas betriebenen Heiss - luftmotor 7) mit Hilfe eines Excenters geschüttelt. Vor Hineinbringung der Nierenschnitte in die fertige Versuchslösung (Ringer-Phosphatlösung, Arsenige Säure und dl-Alanin) wurde die Lösung mit Sauerstoff gut gesättigt und auf die Versuchstemperatur vorgewärmt.

Nach der Beendigung des Versuches wurden die Schnitte aus der Lösung durch Zentrifugieren abge - trennt, mit physiologischer NaCl-Lösung nachgewaschen und das Waschwasser mit der übrigen Lösung vereinigt. Die so erhaltene Flüssigkeitsmenge (71 ccm) wurde mit 9 ccm 30%iger Trichloressigsäure zur Enteiweissung versetzt, gut durchgemischt und einige Zeit stehen gelassen. Nach dem Filtrieren durch ein quantitatives Filter fällte ich das Filtrat mit 14 ccm einer kaltgesättigten Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 n-HCl. Die Kristallisation des Hydrazons der Brenztraubensäure begann sofort. Nach einstündigem Stehen

im Eisschrank wurde der Niederschlag abzentrifugiert und auf der Zentrifuge je einmal mit m/4-HCl und Wasser gewaschen. Die Ausbeute des erhaltenen Roh - produktes des Dinitrophenylhydrazons der Brenztraubensäure betrug 83 mgr, F.P. 213°. Krebs erhielt unter gleichen Versuchsbedingungen 84,78 mgr mit dem gleichen F.P. von 213°.

Da offensichtlich das gleiche Hydrazon vorlag, wurde auf eine weitere Reinigung desselben verzichtet.

Die hier angegebene Versuchsanordnung behielt ich bei den Versuchen mit meiner a-Amino-ß-Oxybuttersäure bei.

III. Synthese des a-Aminoacetessigesters und der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure.

A.) Versuch der Synthese des α-Aminoacetessigesters.

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung des α-Aminoacetessigesters diente Acetessigester, der nach den Angaben von W l e u g e l (B.15/1050 (1882)) durch Behandeln mit $NaNO_2$ in schwefelsaurer Lösung in den α-Nitrosoacetessigester übergeführt wurde.

$$CH_3.CO.CH_2.COO.C_2H_5 \xrightarrow{HNO_2} CH_3.CO.C(NOH).COO.C_2H_5$$

Der Nitrosoester wurde nach G a b r i e l und P o s n e r (B.27/1141 (1894)) mit rauchender HCl und Zinnchlorür reduziert. Nach Abtrennung des Zinns als Sulfid wurde das Filtrat im Vakuum bei 40 - 50° vollständig eingedampft. Nach den Angaben der Autoren wird der Rückstand in einer geringen Menge absoluten Alkohol gelöst, wobei etwas Salmiak zurückbleibt. Aus der alkoholischen Lösung sollen nach allmählichem Zusatz von Aether weisse Nadeln ausfallen, welche bei 95° schmelzen und das salzsaure Salz des a-Amino-acetessigesters darzustellen hätten.

Ich erhielt bei der Fällung mit Aether dagegen erst nach stundenlangem Stehen im Eisschrank ein kristallinisches Produkt, das schon bei 85° schmolz und sich als identisch mit dem schon früher von W l e u g e l beschriebenen 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäurediaethylester, F.P. 85,5°, erwies. (Wleugel, B. 15/1050 (1882)).

Auch eine Wiederholung der Reduktion des α-Nitrosoacetessigesters führte zu keinem anderen Resultat. Die geplanten Versuche, ob α-Aminoacetessigester unter den Bedingungen der Krebs'schen Versuchanordnung in Diketobuttersäureester übergeführt wird, mussten daher, wie schon eingangs erwähnt, zurückgestellt werden.

B.) Darstellung der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure.

Für die Herstellung der freien 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure verwendete ich den entsprechenden Diaethylester, den ich nach den Angaben von W l e u g e l (B.15/1050 (1882)) mir darstellte. Aus 12 gr α-Nitrosoacetessigester erhielt ich 1,7 gr 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäurediaethylester.

Die Darstellung der freien 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure aus dem entsprechenden Aethylester erfolgte durch Verseifung von 5 Teilen Ester mit 4 Teilen KOH und 10 Teilen Wasser und Fällung der Lösung mit konzentrierter Salzsäure, nach den Angaben von W l e u g e l (B.15/1050 (1882)). Aus 1,7 gr 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäurediaethylester wurden 0.85 gr der freien Säure erhalten.

Der F.P. der freien Säure lag in Uebereinstimmung mit den Angaben von W l e u g e l bei 201°.

Vorversuche mit 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure.

Da 1,2-Aminoketone die Neigung haben, sehr leicht in Pyrazinderivate überzugehen, so beabsichtigte ich, die Versuchsansätze mit α-Amino-ß-Oxybuttersäure auch auf eine eventuelle Anwesenheit von 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure zu untersuchen. Um das Verhalten dieser Substanz näher kennen zu lernen und um mich mit den Isolierungsmöglichkeiten aus dem Salzgemisch vertraut zu machen, habe ich nachstehende Versuche ausgeführt:

1.) Verhalten der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure beim Eindampfen in Gegenwart überschüssiger Lauge oder Säure.

Beim Eindampfen der freien 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure bei Gegenwart eines Ueberschusses von NaOH oder HCl auf dem Wasserbade

unter normalem Druck trat beträchtliche Braunfärbung ein, die auf eine weitgehende Zersetzung schliessen liess. Die günstigsten Rückgewinnungsbedingungen wurden gefunden, wenn das Eindampfen in neutraler oder schwach alkalischer Reaktion im Vakuum erfolgt war. Die Isolierung der freien 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure soll unter Punkt 2) näher beschrieben werden.

2.) Isolierung der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure aus dem physiologischen Salzgemisch.

Für die Rückgewinnung der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure aus dem Eindampfungsrückstande des physiologischen Salzgemisches kamen prinzipiell zwei Wege in Frage:

a) Extraktion der freien 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure mit absoluten Alkohol.

b) Reinigung der von den begleitenden Salzen weitgehendst abgetrennten 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure durch Sublimation im Vakuum.

ad b) 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure lässt sich im Vakuum von 10 - 12 mm bei einer Temperatur von 150 - 170° gut sublimieren, wenn sich nur wenig 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure im Sublimationsrohr befindet. Eine quantitative Sublimation ist aber nicht möglich, da teilweise Zersetzung eintritt.

Ich gab daher der Extraktion mit absoluten Alkohol den Vorzug, weil sie eine gleichzeitige Abtrennung von den begleitenden Salzen ermöglicht. Die Rückgewinnung und Isolierung der freien 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure aus dem physiologischen Salzgemisch nach Krebs einschliesslich Arseniger Säure gestaltet sich somit unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Punkt 1) folgendermassen:

Versuchsansatz: 0.1 gr 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure gelöst in 10 ccm Dinatriumphosphatpuffer, 50 ccm Salzgemisch nach Krebs und 0.8 ccm Arsenige Säure.

Die Hauptmenge der Lösung wurde bei schwach alkalischer Reaktion bei möglichst niedriger Temperatur bis auf wenige ccm im Vakuum eingeengt, mit verdünnter HCl bis zur schwach kongosauren Reaktion versetzt, um die freie 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure zu erhalten und nun im Vakuum bis zur

Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde im Vakuum gut ausgetrocknet, fein pulverisiert und mit 10 ccm absolutem Alkohol versetzt, in dem die freie 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure in Lösung geht und die anorganischen Salze zum allergrössten Teil ungelöst bleiben. Die Extraktion wurde noch einmal mit 10 ccm absoluten Alkohol wiederholt, die Lösung vom Rückstand abzentrifugiert und wieder unter schonenden Bedingungen bis zur Trockene eingedampft. Die nun zurückbleibende freie 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure nahm ich in sehr wenig Wasser auf, entfärbte die Lösung durch Kochen mit etwas Tierkohle und filtrierte. Beim Erkalten kristallisierte die freie 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure aus, die in kaltem Wasser nahezu unlöslich ist. Eine weitere Reinigung durch abermaliges Umkristallisieren erübrigte sich in der Regel. Die Ausbeute betrug rund 60%.

Dieser Arbeitsgang wurde auch bei den weiteren Versuchen und dem Hauptversuch beibehalten.

3.) Isolierung von 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure aus dem physiologischen Salzgemisch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Trichlorsäure.

Gleicher Versuchsansatz wie unter 2) bei gleichzeitiger Zugabe von 9 ccm 30%iger Trichloressigsäure. Vor dem Eindampfen wurde die Trichloressigsäure mit NaOH neutralisiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach den Angaben unter Punkt 2). - 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure konnte aus diesem Versuchsansatz nicht mehr zurückgewonnen werden.

4.) Enteiweissungsversuche mit 96%igem Alkohol und kolloidalem Eisenhydroxyd + gesättigter Magnesiumsulfat-Lösung.

a) 96%iger Alkohol.

Ein Stück Kalbsniere, entsprechend der Grösse der verwendeten Rattennieren, wurde fein verrieben, in 50 ccm physiologischer Salzlösung suspendiert und mit dem doppelten Volumen 96%igen Alkohol versetzt. Die Enteiweissung war vollständig (Prüfung des

Filtrates mit Sulfosalicylsäure).

Da Vorversuche ergaben, dass das Natriumsalz der Pyrazindicarbonsäure durch Zusatz eines doppelten Volumens von 96%igem Alkohol aus der Lösung verdrängt wird, wurde der Enteiweissungsversuch bei kongosaurer Reaktion wiederholt (freie 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure reagiert kongosauer), um ein Mitreissen des Natriumsalzes der Pyrazindicarbonsäure in den Eiweissniederschlag zu verhindern und gleichzeitig die freie 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure im Alkohol zu lösen. - Bei kongosaurer Reaktion wurde eine vollständige Enteiweissung nicht erzielt.

b) 1%iges Eisenhydroxyd + gesättigte $MgSO_4$-Lösung.

Bei Verwendung von kolloidalem Eisenhydroxyd + gesättigter $MgSO_4$-Lösung fallen die Bedenken einer Verdrängung des Natriumsalzes der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure aus wässriger Lösung weg.

Fein zerriebene Kalbsniere wurde wie unter a) in 50 ccm physiologischer Salzlösung nach Krebs suspendiert, in einen Messkolben von 100 ccm übergespült, mit 25 ccm 1%igem Eisenhydroxyd versetzt und das Eiweiss durch Zugabe von 2 ccm gesättigter Magnesiumsulfatlösung gefällt. - Die Enteiweissung war vollständig.

5.) Isolierung der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nierenschnitten und a-Amino-ß-oxybuttersäure nach Enteiweissung mit kolloidalem Eisenhydroxyd + gesättigter Magnesiumsulfat-Lösung.

a) Versuchsansatz: 0.1 gr 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure, 50 ccm physiologischer Salzlösund nach Krebs, 0.8 ccm Arsenige Säure, 0.05 gr a-Amino-ß-Oxybuttersäure.

Aufarbeitung des Versuchsansatzes wie unter 2), Ausbeute an reiner 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure 55 mgr.

b) Versuchsansatz: Wie a) + Nierenschnitten von zwei Ratten. Versuchsbedingungen wie im Hauptversuch S.39, 4 Stunden Sauerstoffdurchperlung und Schütteln im Thermostaten bei 37,5°. Enteiweissung mit kolloidalem Eisenhydroxyd + gesättigter

Magnesiumsulfatlösung (4b) und Aufarbeitung nach Punkt 2). Ausbeute an reiner 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure 52 mgr, F.P. 201°.

6.) Versuch der Isolierung der 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure bei gleichzeitiger Anwesenheit von p-Nitrophenylhydrazin.

Versuchsanordnung unter Berücksichtigung der Verhältnisse des Hauptversuches bei Enteiweissung mit Trichloressigsäure: 0.1 gr 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure, in 10 ccm Dinatriumphosphatlösung aufgenommen, 50 ccm physiologische Salzlösung nach Krebs, 0.8 ccm Arsenige Säure, 9 ccm 30%ige Trichloressigsäure, 14 ccm kalt gesättigte p-Nitrophenylhydrazinlösung.
Es wurden 3 ccm Aceton dazugegeben, um die Hauptmenge des Nitrophenylhydrazins zu beseitigen. Nach Filtrieren des Hydrazons wurde bei schwach alkalischer Reaktion im Vakuum bis zur Trockene eingedampft und versucht, die Hauptmenge des restlichen Hydrazins durch mehrmaliges Extrahieren mit Aceton zu entfernen. Den Rückstand nahm ich in Wasser auf, filtrierte vom Ungelösten ab und dampfte nach dem Ansäuern mit HCl bis zur kongosauren Reaktion im Vakuum bis zur Trockene ein. Nun wurde der Rückstand, welcher jetzt die freie 2,5-Dimethyl-3,6-pyrazindicarbonsäure enthalten sollte, mit absolutem Alkohol extrahiert und die alkoholische Lösung im Vakuum eingedampft. Ausbeute an 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure minimal und stark verunreinigt.

IV. Hauptversuch mit a-Amino-ß-Oxybuttersäure an überlebendem Nierengewebe.

1. Fällungen mit Dinitrophenylhydrazin und Mononitrophenylhydrazin.

Bei den Stoffwechselversuchen mit α-Amino-ß-oxybuttersäure hielt ich mich an die in Punkt II (S. 39) des experimentellen Teiles näher beschriebene Versuchsanordnung.

a) Fällung mit Dinitrophenylhydrazin.

Vor Beginn der eigentlichen Versuche überzeugte ich mich, dass α-Amino-ß-Oxybuttersäure bei Anwesenheit von Nierenschnitten unter sonstiger Beibehaltung der Versuchsbedingungen in keiner Weise

verändert wird. Bei der Fällung mit Dinitrophenylhydrazin bekam ich keine Abscheidung, die auf die Anwesenheit eines Hydrazones deuten würde.

Um eine genügende Menge Rohprodukt zu erhalten, wurden 9 Versuche angesetzt, die in der anschliessenden Tabelle I zusammengestellt sind. Die Tabelle enthält die verwendete Menge von α-Amino-ß-Oxybuttersäure, das erhaltene Rohprodukt und den F.P. desselben. Die Versuchsdauer betrug 4 Stunden.

T A B E L L E I.

Fällung des mit Trichloressigsäure enteiweissten Filtrates mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

Verwendete a-Amino-ß-Oxybuttersäure.	Rohprodukt	F.P. d.Rohproduktes
gr	gr	Grad
0.400	0.029	123/5
0.300	0.023	130
0.200	0.008	128
0.300	0.021	129
0.300	0.008	128
0.300	0.007	127
0.300	0.010	130
0.250	0.009	126
0.300	0.015	129
	Mittelw. 0.014	

Die Gesamtausbeute an amorphen Rohprodukt betrug 13o mgr. Da die Kristallisationsversuche aus niedrig siedenden Lösungsmitteln scheiterten (Alkohol, Aceton, Essigester), wurden schliesslich höher siedende Lösungsmittel wie Pyridin und Nitrobenzol verwendet, von denen sich das letztere als geeignet erwies. Die Substanz zeigte in dem Spezialschmelzpunktsapparat bei Herrn Prof.Fischer bis 410° keinen F.P., sondern nur allmähliche Verkohlung.

Die Elementaranalyse des nur einmal aus Nitrobenzol umkristallisierten und über Paraffin im Vakuum getrockneten Produktes ergab nachstehende Werte:

3,418 mgr Subst.: 5,289 mgr CO_2 0.988 mgr H_2O 0.150 mgr Asche

1.471 mgr Subst.: 0.345 ccm N_2 (19°, 712 mm)

gef.:	C 44.14%	H 3.38%	N 25.01%	A.4.39%
ber.(M.G.279.17):	C 43.00%	H 3.25%	N 25.09%	

b) Fällung mit p-Nitrophenylhydrazin.

Für die Fällung mit p-Nitrophenylhydrazin wurden 13 Einzelversuche durchgeführt, die ich wieder in der anschliessenden Tabelle II zusammenstelle:

TABELLE II

Fällung des mit Trichloressigsäure enteiweissten Filtrates mit p-Nitrophenylhydrazin.

Verwendete a-Amino-ß-Oxybuttersäure.	Rohprodukt	F.P. d.Rohproduktes
gr	gr	Grad
0.150	0.011	140-155
0.150	0.011	140-155
0.150	0.018	140-150
0.150	0.018	140-150
0.150	0.011	130-140
0.150	0.012	130-140
0.200	0.015	135-140
0.200	0.015	135-140
0.200	0.024	146-150
0.200	0.023	146-150
0,200	0.017	140-150
0,200	0.017	140-150
0.200	0.036	145-155
	Mittelw: 0.018	

Die Gesamtausbeute an amorphen Rohprodukt betrug 228 mgr. Die Versuchsdauer wurde bei dieser Versuchsreihe etwas kürzer gehalten, sie betrug bei je 4 Versuchen 2 1/2, 3 und 3 1/2 Stunden, bei einem Versuche 4 Stunden. Auch hier versagten niedrig siedende Lösungsmittel, um kristallisierte Produkte zu erhalten. Erst Umkristallisieren aus Nitrobenzol verhalf wieder zu einem kristallisierten Körper. Der F.P. nach dreimaligem Umkristallisieren aus Nitrobenzol lag konstant bei 296° und befand sich damit in unmittelbarer Nähe des von K a r r e r und H e r s h b e r g (Chem.Zentr.1934/3507) beschriebenen 1-para-Nitrophenyl-3-methyl-4-p-nitrophenylpyrazolon-(5) (297 - 298°). Zur Sicherheit habe ich einen Teil meines Produktes im Vakuum sublimiert und erhielt einen F.P., der diesmal bei 299° lag.

Vor der Elementaranalyse habe ich die Substanz wieder im Vakuum über Paraffin getrocknet. Die Elementaranalyse ergab nachstehende Werte:

2.993 mgr Subst.: 5,761 mgr CO_2 0.934 mgr H_2O
0.042 mgr Asche
2,521 mgr Subst.: 0.510 ccm N (19°, 715 mm)

ber.(M.G.368.24):	C 52.16%	H 3.29%	N 22.83%	
gef.:	C 53.24%	H 3.54%	N 22.25%	Asche 1.40%

2. Aufarbeitung der mit kolloidalem Eisenhydroxyd + Magnesiumsulfat enteiweissten Versuchsansätze auf 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure.

a) Bei Gegenwart von Arsenig-Säure-Lösung.

Bei diesem Versuch wurden 0.14 gr α-Amino-ß-Oxybuttersäure 3 1/2 Stunden in der physiologischen Salzlösung mit Nierenschnitten geschüttelt. Nach der Beendigung des Versuches zentrifugierte ich von den Nierenschnitten ab und entfernte das Eiweiss durch Fällung mit kolloidalem Eisenhydroxyd + gesättigter Magnesiumsulfatlösung (s.Experim.Teil Vorversuch 4b, Seite 45). Der Filterrückstand wurde gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung nachgewaschen und das Waschwasser mit der Hauptmenge des Filtrates vereinigt. Die Flüssigkeit wurde im Vakuum bei schwach alkalischer Reaktion bis auf ein Volumen von ca. 10 ccm eingeengt, mit HCl bis zur kongosauren Reaktion angesäuert und im Vakuum zur Trockene gebracht. Nach gutem Austrocknen im Exsiccator extrahierte ich den Rückstand in 2 Partien mit absoluten Alkohol (Gesamtmenge 15 ccm), filtrierte von dem ungelöst Gebliebenen ab und dampfte den Alkohol weg. Den etwas

harzigen Rückstand nahm ich mit wenig Wasser auf, kochte mit wenig Tierkohle und filtrierte ab. Nach mehrstündigem Stehen im Eisschrank war keine Abscheidung von 2,5-Dimethyl-3,6-Pyrazindicarbonsäure eingetreten. Auch nach dem Einengen der wässrigen Lösung trat keine Fällung ein.

b) Bei Abwesenheit von Arseniger Säure.

Bei diesem Versuch verwendete ich 0.15 gr α-Amino-ß-Oxybuttersäure. Versuchsdauer und Arbeitsgang waren dieselben wie bei Anwesenheit von Arseniger Säure. Auch in diesem Falle fand ich keine Anzeichen, die auf die Anwesenheit des gesuchten Pyrazinderivates deuten konnten.

V. Verhalten des Leberglykogens nach Verfütterung von a-Amino-ß-Oxybuttersäure an hungernde Ratten.

Junge männliche Ratten (Gewicht 152 - 173 gr) wurden am Vortage des Versuches morgens vor der Fütterung in Stoffwechselkäfigen isoliert. Sie erhielten während der nächsten 24 Stunden keine Nahrung, um das Leberglykogen weitgehend einzuschmelzen. Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Nach 24-stündigem Hungern (Gewichtsverlust 10 - 15 gr) erhielten die Versuchstiere 0.25 bezw. 0.5 gr α-Amino-ß-Oxybuttersäure in 2 bis 3 ccm Wasser gelöst als Natriumsalz mit der Schlundsonde eingeführt. Die Kontrolltiere erhielten 2 cmm Wasser, um analoge Versuchsbedingungen zu haben (eventuelle Glykogenmobilisierung infolge der psychischen Erregung bei der Fütterung). Nach einer Resorptionsdauer von 6 1/2 Stunden wurden die Tiere durch Durchtrennung des Halswirbels getötet, entblutet und die Leber möglichst rasch herauspräpariert, sofort auf einem vortarierten Uhrglas gewogen und in ein Kölbchen gebracht, welches mit 10 ccm kochender, 60%iger KOH beschickt war. Die Einbringung der Leber nach Tötung der Tiere in die kochende Lauge muss möglichst rasch erfolgen, um Glykogenverluste zu vermeiden. Die Zeitdauer vom Moment der Tötung bis zum Einbringen der Leber in die kochende Lauge betrug nicht mehr als 1 - 1 1/4 Minuten.

Die Glykogenbestimmung nach P f l ü g e r beruht darauf, dass das Gewebe durch Kochen mit 60%iger Lauge vollständig zerstört, das Glykogen dagegen nicht angegriffen wird. Nach 3-stündigem Erhitzen der Kölbchen, die mit einem Steigrohr versehen waren, im kochenden Wasserbad (häufiges Umschütteln) wurde die klare Lösung quantitativ in ein Zentrifugenglas von 100 ccm Inhalt übergespült und mit Wasser

auf 25 ccm verdünnt. Das Glykogen wurde durch Zusatz von 55 ccm 96%igem Alkohol ausgefällt und zur Vervollständigung der Fällung liess ich die Zentrifugengläser verschlossen über Nacht stehen. Am nächsten Tag zentrifugierte ich ab. Die darüberstehende Lösung wurde abgegossen und der Rückstand zweimal mit je 10 ccm 70%igem Alkohol und einmal mit je 90%igem, absolutem Alkohol und trockenen Aether gewaschen. Sämtliche Manipulationen wurden auf der Zentrifuge vorgenommen.

Den bei Anwesenheit von Glykogen nahezu rein weissen Rückstand löste ich in 5 ccm 2,4%iger HCl, überführte ihn in ein Reagensglas und spülte das Zentrifugenglas noch dreimal mit 5 ccm der HCl nach. Durch 3-stündiges Erhitzen im kochenden Wasserbad wurde das Glykogen zu Glukose aufgespalten. Die Glukose-Lösung brachte ich dann quantitativ in einen Masskolben von 50 ccm, machte durch tropfenweise Zugabe von Lauge die Lösung schwach alkalisch, wobei ein geringfügiger Niederschlag von Phosphaten auftritt. Nach Auffüllen bis zur Marke 50 und gutem Durchmischen filtrierte ich von dem Niederschlag ab und verwendete für die Zuckerbestimmung 25 ccm des Filtrates (entspricht dem Glykogengehalt der halben Leber).

Die Zuckerbestimmung führte ich nach den Angaben von B e r t r a n d aus (Abderhalden, Handbuch der biol.Arbeitsmethoden, Abtlg.IV,Teil 4: Blut und Lymphe 2, Seite 855). Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass durch Erhitzen mit einer Art Fehling-Lösung das zweiwertige Kupfer der Konzentration an Glukose entsprechend zu Cuprooxyd reduziert wird, welches nach seiner Abtrennung von der übrigen Flüssigkeit durch Aufnahme in schwefelsäurehältigem Ferrisulfat gelöst wird. Das Cuprooxyd reduziert eine äquivalente Menge des Ferrisulfats zu Ferrosulfat, welches durch Titration mit n/10-$KMnO_4$ bestimmt wird. Aus der Menge des verbrauchten $KMnO_4$ berechnet man den Gehalt an Cuprooxyd, von dem auf den Glukosegehalt rückgeschlossen wird. - Die anschliessende Tabelle enthält die Glykogenwerte der Versuchs-u.Kontrolltiere, berechnet auf 100 gr Leber.

T A B E L L E III

Veränderungen des Leberglykogens bei hungernden Ratten nach Verfütterung von 0.25, bezw. 0.50 gr a-Amino-ß-Oxybuttersäure als Natriumsalz.

6 Kontrolltiere:0.20 gr/% Leberglykogen i/Mittel

Nr.der Tiere.	Gewicht d.Tiere n. 24-stünd.Hungern.	Verfütt.Menge v. a-Amino-ß-O.B.	Leberglyk. f.100 gr L.
1	145 gr	0.25 gr	0.04 gr/%
2	145 gr	0.25 gr	0.22 gr%
3	153 gr	0.50 gr	0.26 gr%
4	165 gr	0.50 gr	0.28 gr%
5	169 gr	0.50 gr	0.08 gr%