

Das bei der Oxydation des Sclareols mit Chromsäure früher<sup>1)</sup> erhaltene Präparat vom Smp. 123—124° wurde zur Kontrolle nochmals durch Umkrystallisieren aus Petroläther (a') wie auch durch Sublimation (b') gereinigt und analysiert. Der Schmelzpunkt beider Präparate betrug 123—124°.

a') 3,762 mg Subst. gaben 10,588 mg CO<sub>2</sub> und 3,530 mg H<sub>2</sub>O  
 b') 3,763 mg Subst. gaben 10,595 mg CO<sub>2</sub> und 3,525 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	Ber. <sup>1)</sup>	C 76,75	H 10,47%
	Gef. a')	„ 76,81	„ 10,50%
	„ b')	„ 76,84	„ 10,48%

Die sauren Bestandteile der Oxydation mit Permanganat wurden mit Diazomethan verestert. Durch Umkrystallisieren aus Hexan konnte ein krystallisierter Methylester vom konstanten Smp. 111—112° erhalten werden.

3,806 mg Subst. gaben 9,779 mg CO<sub>2</sub> und 3,605 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	Ber. C	70,55	H 10,66%
	Gef. „	70,12	„ 10,60%

Dieses Präparat war nach der Mischprobe identisch mit dem Methylester der Ausgangssäure, der zum Vergleich durch Umsetzung derselben mit Diazomethan bereitet worden war und gleichfalls bei 111—112° schmolz.

3,728 mg Subst. gaben 9,635 mg CO<sub>2</sub> und 3,504 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	Ber. C	70,55	H 10,66%
	Gef. „	70,53	„ 10,52%

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung *Hs. Gubser*) ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg.  
 Technischen Hochschule, Zürich.

## 70. Über die biologische Harnstoffbildung

(IV. Mitteilung<sup>2)</sup>)

von F. Leuthardt und B. Glasson.

(2. IV. 42.)

Die Harnstoffbildung in der Säugetierleber erfolgt durch Anlagerung von Kohlendioxyd und Ammoniak an das Ornithin, wobei zuerst Citrullin, dann Arginin gebildet wird; die nachfolgende Spaltung des letzteren durch die Leberarginase liefert unter Rückbildung des Ornithins den Harnstoff (*Krebs* und *Henseleit*<sup>3)</sup>). Diese

<sup>1)</sup> Helv. **14**, 650 (1931). Als berechneter Wasserstoffwert wurde infolge eines Druckfehlers damals 10,74 anstatt 10,47% angegeben.

<sup>2)</sup> 1. Mittlg. physiol. Ch. **252**, 238 (1938). — 2. Mittlg. Bioch. Z. **299**, 281 (1938). — 3. Mittlg. Z. physiol. Ch. **265**, 1 (1940).

<sup>3)</sup> Z. physiol. Ch. **210**, 805 (1940).

Theorie des „Ornithinzyklus“ stützt sich vor allem auf die Tatsache, dass durch Zusatz von Ornithin oder Citrullin die Harnstoffsynthese in Organschnitten unter geeigneten Bedingungen stark gesteigert werden kann. Durch Verfütterung von Arginin, dessen Guanidin-Gruppe durch das Stickstoffisotop  $N^{15}$  markiert war, konnten *Schoenheimer et al.*<sup>1)</sup> direkt beweisen, dass das Arginin tatsächlich die Muttersubstanz des im Urin ausgeschiedenen Harnstoffs ist. Neuerdings wurde auch die Ableitung des Kohlenstoffs aus dem Hydrogencarbonat der Suspensionsflüssigkeit durch Verwendung des radioaktiven und des stabilen Kohlenstoffisotops sichergestellt (*Evans und Slotin*<sup>2)</sup>, *Rittenberg und Waelsch*<sup>3)</sup>).

Ungeklärt blieb bisher die starke Steigerung der Harnstoffbildung durch bestimmte nicht stickstoffhaltige Verbindungen, wie Milchsäure oder Brenztraubensäure. Da die Harnstoffsynthese aus Kohlendioxyd und Ammoniak im physiologischen Milieu mit einer Zunahme der freien Energie verknüpft ist<sup>4)</sup>, die letzten Endes durch die Atmung kompensiert werden muss, kann man annehmen, dass die genannten Körper irgendwie an der Koppelung dieser Vorgänge beteiligt sind. Ihr Einfluss auf die Gewebsatmung geht aber keineswegs ihrer Wirkung auf die Harnstoffsynthese parallel (*Krebs*<sup>5)</sup>). Die bisherigen Vorstellungen über den Mechanismus der Synthese, wonach zunächst durch Anlagerung einer Molekel Kohlendioxyd an das Ornithin dessen  $\delta$ -Carbaminderivat und daraus durch Addition einer Molekel Ammoniak Citrullin gebildet wird, bieten keine Möglichkeit, den Einfluss der veratmeten Verbindungen zu erklären. Wir teilen im Folgenden eine Reihe von Befunden mit, die zusammen mit den bereits bekannten Tatsachen einen Weg zur Behebung dieser Schwierigkeit andeuten.

Zu den Versuchen eignet sich am besten die Leber von jungen Meerschweinchen nach 24—48 Stunden Hunger. Bei der Ratte ist die Harnstoffbildung aus Ammoniumsalzen auch ohne Hydrogencarbonat oder Atmungssubstrat viel beträchtlicher als beim Meerschweinchen. Die Suspensionsflüssigkeit enthält stets 200 mg% Glucose.

Schüttelt man Leberschnitte mit Ammoniumsalzen ohne Zusatz von Hydrogencarbonat oder eines andern Atmungssubstrates als Glucose, so wird wenig oder kein Harnstoff gebildet, trotzdem durch die Atmung ein Mehrfaches der benötigten Menge Kohlendioxyd geliefert wird.

Zusatz von Hydrogencarbonat zur phosphathaltigen Lösung steigert die Harnstoffbildung; noch wirksamer aber sind Brenz-

1) J. Biol. Chem. **127**, 342 (1939) und **130**, 729 (1939).

2) J. Biol. Chem. **136**, 805 (1940).

3) J. Biol. Chem. **136**, 799 (1940).

4) Vgl. *Huffman* in „Chemistry of the Amino Acids and Proteins“, ed. by C. L. A. Schmidt, Baltimore 1938, pag. 859.

5) Erg. Enzymforsch. **3**, 247 (1934).

traubensäure und Oxalessigsäure. Man kann also nicht nur das Hydrogencarbonat durch diese Verbindungen ersetzen, sondern dieselben steigern darüber hinaus die Harnstoffsynthese in spezifischer Weise. Dass ihre Wirkung nicht einfach auf einer Vermehrung des Atmungskohlendioxyds beruht, geht überdies aus der Tatsache hervor, dass bei ihrer Gegenwart nur sehr wenig Hydrogencarbonat in der Suspensionsflüssigkeit nachgewiesen werden kann. Die übrigen in Tab. 1 genannten Verbindungen sind weniger wirksam. Da sie alle in Brenztraubensäure oder Oxalessigsäure übergehen können, gelangen sie wahrscheinlich auf diesem Umweg zur Wirkung. (Die mit der Schnittmethode gemessenen Stoffwechselquotienten entsprechen nicht exakt den tatsächlichen Umsatzgeschwindigkeiten im Gewebe, kleine Unterschiede können durch verschiedene Schnittdicke oder Diffusionsgeschwindigkeit der Substrate bedingt sein. Vgl. 2. Mittlg.)

Die Oxalessigsäure kann aus der Brenztraubensäure durch direkte Addition einer Molekel Kohlendioxyd entstehen (*Wood et al.*<sup>1</sup>), *Evans und Slotin*<sup>2</sup>), *Krebs*<sup>3</sup>)).

Neben dieser Reaktion wurde bisher auch die Harnstoffsynthese als Beispiel für eine direkte Fixierung von Kohlendioxyd in den Geweben höherer Tiere angesehen (*Barron*<sup>4</sup>)). Unsere Versuche legen es nahe, auch hier zunächst eine Bindung des Kohlendioxyds durch die Brenztraubensäure anzunehmen. Damit wäre das C-Atom des Harnstoffs nicht unmittelbar aus dem anorganischen Hydrogencarbonat abzuleiten, sondern aus der Oxalessigsäure; d. h. dieselbe überträgt entweder direkt, unter Rückbildung der Brenztraubensäure, oder im Verlauf ihrer weiteren Umwandlungen eine labile Carboxylgruppe auf das Ornithin. Es stellt sich hier aber gleichzeitig die Frage, in welcher Weise die beiden Ammoniakmolekeln in die Amidgruppe eingeführt werden.

Die erste, fassbare Zwischenstufe der Harnstoffsynthese ist das Citrullin. Dasselbe soll nach *Krebs*<sup>5</sup>) durch Addition einer Molekel Ammoniak an das  $\delta$ -Carbamino-Ornithin entstehen. Die *Siegfried*'schen Carbaminosäuren bilden sich jedoch sehr leicht aus den Komponenten Aminosäure und Kohlendioxyd und stehen mit denselben in reversiblen Gleichgewicht; die spezifische Wirkung der Oxalessigsäure und Brenztraubensäure wäre nicht verständlich, wenn man diese Entstehungsweise des Citrullins annimmt. Die Verbindung könnte aber auch durch Anlagerung einer vorgebildeten Säure-

<sup>1</sup>) J. Biol. Chem. **139**, 483 (1941).

<sup>2</sup>) J. Biol. Chem. **136**, 301 (1940).

<sup>3</sup>) Biochem. J. **34**, 1383 (1940).

<sup>4</sup>) Ann. Rev. Biochemistry **10**, 16 (1941).

<sup>5</sup>) Ann. Rev. Biochemistry **5**, 262 (1936).

amidgruppe an das Ornithin entstehen. Da bei der biologischen Kreatinsynthese die Übertragung einer Amidgruppe vom Arginin auf das Glykokoll stattfindet (*Borsook und Dubnoff*<sup>1</sup>); *Bloch und Schoenheimer*<sup>2</sup>), scheint uns auch die Verschiebung einer Säureamidgruppe im Bereich der Möglichkeit zu liegen.

Tatsächlich liefern gewisse Säureamide beim Schütteln mit Leberschnitten grosse Mengen Harnstoff. Wie der eine von uns schon früher mitgeteilt hat (vgl. 1. Mittlg.), ist das Glutamin neben dem Ammoniak überhaupt der beste Harnstoffbildner. In der Meer-schweinchenleber übertrifft es beim Fehlen eines andern Substrats als Glucose das Ammoniak sogar um ein Beträchtliches (vgl. Tab. 2), und zwar erfolgt die Harnstoffsynthese ohne intermediäre Ammoniak-  
abspaltung. Ähnlich verhält sich das Asparagin; nur sind hier die Verhältnisse wegen der stärkern fermentativen Hydrolyse der Säureamidgruppe weniger übersichtlich.

Es hat sich gezeigt, dass auch das Halbamid der Bernstein-säure (die Succinamidsäure) dem Glutamin als Harnstoffbildner nicht nachsteht (Tab. 2 und 4). Acetamid und Milchsäure-amid liefern nicht mehr Harnstoff als die Kontrollen. Die sauren Ammoniumsals der entsprechenden Dicarbonsäuren geben zwar mehr Harnstoff als die äquivalente Menge Ammoniumsalz ohne Zusatz der Säure, aber weniger als das Amid (Tab. 2 und 4). Die Wirkung der genannten Dicarbonsäure-Halbamide ist also durchaus spezifisch. Aus der Tatsache, dass dieselben auch unter solchen Bedingungen in Harnstoff übergehen, unter denen aus Ammoniumsalzen allein nur sehr wenig gebildet werden kann, ergibt sich die Frage, ob sie normale Intermediärprodukte der Harnstoffsynthese sind. Es ist wenig wahrscheinlich, dass so verschiedenartige Verbindungen unmittelbare Vorstufen für die Bildung des Citrullins darstellen; sie könnten aber alle in ein und denselben Körper umgewandelt werden, welcher dann unmittelbar in die Harnstoffsynthese einbezogen wird.

Über die Natur dieser Intermediärstufe lassen sich augenblicklich nur Vermutungen äussern. Da die den erwähnten Amiden zugrundeliegenden Dicarbonsäuren alle in Oxalessigsäure übergehen können, liegt es nahe, als Zwischenstufe das (unseres Wissens noch nicht bekannte) Halbamid der Oxalessigsäure  $\text{HOOC}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CONH}_2$  anzunehmen, das auch direkt aus Ammoniak und Oxalessigsäure entstehen könnte. Die Citrullinsynthese lässt sich dann folgendermassen formulieren:

- 1)  $\text{HOOC}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3 + \text{CO}_2 = \text{HOOC}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$
- 2)  $\text{HOOC}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH} + \text{NH}_3 = \text{HOOC}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CONH}_2$  oder
- 2a) Dicarbonsäure-amid  $\longrightarrow \text{HOOC}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CONH}_2$
- 3)  $\text{HOOC}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CONH}_2 + \text{NH}_2\cdot(\text{CH}_2)_3\cdot\text{CHNH}_2\cdot\text{COOH} =$   
 $\text{HOOC}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3 + \text{NH}_2\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot(\text{CH}_2)_3\cdot\text{CHNH}_2\cdot\text{COOH}.$

<sup>1</sup>) J. Biol. Chem. **134**, 635 (1940).

<sup>2</sup>) J. Biol. Chem. **134**, 785 (1940).

Wir betonen, dass dieses Schema provisorischer Natur ist. Es steht mit keiner der bekannten Tatsachen im Widerspruch und bietet eine Möglichkeit, das bisher nicht erklärliche Verhalten der Atmungssubstrate und der Säure-amide zu verstehen, ist indes in wesentlichen Teilen nicht bewiesen. Wir möchten uns die weitere experimentelle Bearbeitung vorbehalten.

Für die Bildung des Arginins aus dem Citrullin zeigt eine Beobachtung von *Borsook* und *Dubnoff*<sup>1)</sup> einen möglichen Weg. Beim Schütteln überlebender Nierenschnitte mit Citrullin entsteht Arginin. Die Reaktion wird durch Glutaminsäure, Glutamin, Asparaginsäure oder Asparagin stark beschleunigt. Man kann also annehmen, dass der Stickstoff dieser Verbindungen unmittelbar für die Argininsynthese verwendet werden kann, offenbar durch „Umaminierung“. Ob dabei die  $\alpha$ -Aminogruppe unmittelbar beteiligt ist, oder die Säureamidgruppe, ist jedenfalls bei der Glutaminsäure nicht ohne weiteres zu entscheiden, da dieselbe in der Niere der Ratte sehr leicht in das Glutamin übergeht (*Krebs*<sup>2)</sup>). Es ist möglich, dass die Argininsynthese in der Leber ähnlich verläuft; nur wird dort das Arginin sehr rasch gespalten.

*S. J. Bach*<sup>3)</sup> hat geringe Harnstoffbildung aus Citrullin beobachtet, wenn die Ansätze kein Ammoniumsalz, wohl aber eine Ketsäure enthielten. Er nimmt eine Oxydation des Citrullins durch die letztere an, wobei Harnstoff und Glutamin gebildet wird.

In den folgenden Tabellen sind die Resultate einiger typischer Versuche mitgeteilt. Die ausführliche Publikation erfolgt an anderer Stelle.

Tabelle 1.

Meerschweinchen. Phosphatsalzgemisch ohne Hydrogencarbonat (5 cm<sup>3</sup> 0,1-m. Phosphatpuffer p<sub>H</sub> 7,4 + 50 cm<sup>3</sup> Salzgemisch<sup>4)</sup>). Konzentration des Ammoniaks und der übrigen Substanzen: 0,02 Millimol in 3 cm<sup>3</sup>. Versuchsdauer 150 Minuten. Temp. 38°. Q = mm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub> (durch Ureasespaltung gebildet) pro mg Trockengewicht.

	Q
NH <sub>4</sub> Cl ohne Zusatz . . . . .	0,8
mit Oxalessigsäure . . . . .	6,1
„ Brenztraubensäure . . . . .	8,0
„ Milchsäure . . . . .	4,4
„ $\alpha$ -Ketoglutarsäure . . . . .	3,5
„ Fumarsäure . . . . .	1,4
„ Äpfelsäure . . . . .	1,5
„ Citronensäure . . . . .	1,5

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. **140** Proc. XVIII (1941).

<sup>2)</sup> Biochem. J. **29**, 1951 (1935).

<sup>3)</sup> Biochem. J. **33**, 1833 (1939).

<sup>4)</sup> *Krebs*, Z. physiol. Ch. **217**, 191 (1933).

Tabelle 2.

Meerschweinchen. Phosphatsalzgemisch ohne Hydrogencarbonat (5 cm<sup>3</sup> 0,1-m. Phosphatpuffer p<sub>H</sub> 7,4 + 50 cm<sup>3</sup> Salzgemisch). Konzentration des Ammoniaks und der übrigen Substanzen: 0,02 Millimol in 3 cm<sup>3</sup>. Versuchsdauer 150 Min. Temp. 38°. Q = mm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub> pro mg Trockengewicht.

	Q
NH <sub>4</sub> Cl . . . . .	1,7
mit Oxalessigsäure . . . . .	6,2
„ Brenztraubensäure . . . . .	5,5
Glutamin . . . . .	4,6
NH <sub>4</sub> Cl mit Glutaminsäure . . . . .	2,8
Succinamidsäure . . . . .	4,9
NH <sub>4</sub> Cl mit Bernsteinsäure . . . . .	0,6

Tabelle 3.

Meerschweinchen. Phosphatsalzgemisch wie Tab. 1; Zusatz von 0,156-m. NaHCO<sub>3</sub>. Konzentration und Versuchsbedingungen wie übrige Versuche.

	Phosphat ohne NaHCO <sub>3</sub>	Phosphat + 0,005-m. NaHCO <sub>3</sub>	Phosphat + 0,025-m. NaHCO <sub>3</sub>
	Q	Q	Q
NH <sub>4</sub> Cl ohne Zusatz . . . . .	0,7	1,6	3,1
mit Brenztraubensäure . . . . .	7,3	7,3	8,9
„ Oxalessigsäure . . . . .	7,3	7,9	8,9
NH <sub>4</sub> Cl ohne Zusatz . . . . .	0,2	—	2,3
mit Oxalessigsäure . . . . .	4,9	—	12,8
„ Brenztraubensäure . . . . .	6,6	—	11,7
„ Ketoglutarsäure . . . . .	3,4	—	5,8
Glutamin . . . . .	3,8	—	9,1

Tabelle 4.

Ratte. Konzentration und Versuchsbedingungen wie übrige Versuche.

	Phosphat ohne NaHCO <sub>3</sub>	Phosphat + 0,025-m. NaHCO <sub>3</sub>
	Q	Q
NH <sub>4</sub> Cl ohne Zusatz . . . . .	3,4	6,3
Glutamin . . . . .	3,4	—
Asparagin . . . . .	6,5	—
NH <sub>4</sub> Cl mit Brenztraubensäure . . . . .	6,1	11,5
„ „ Oxalessigsäure . . . . .	9,7	13,2
Succinamidsäure . . . . .	7,6	9,8
NH <sub>4</sub> Cl mit Bernsteinsäure . . . . .	3,3	—