

Titolazione: 100 mg di sostanza pura sono neutralizzati da 4,7 cm<sup>3</sup> di NaOH 0,1-n. (fenolfthaleina), ossia 1,02 equivalenti.

C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> peso-equiv. calc. 217,44 trov. 212,93

Le analisi sono state eseguite dai Sigg. *W. Manser* e *G. Cornali* nel nostro laboratorio microanalitico.

### Zusammenfassung.

Bei der Kondensation von Äthoxalylketonen bzw. ihrer Natrium-enolate mit Chloral entstehen  $\alpha$ -Keto- $\beta$ -acyl- $\gamma$ -trichlormethyl- $\gamma$ -lactone. Die Konstitution dieser Substanzen ergibt sich auf Grund ihrer Eigenschaften, welche denjenigen einer Reihe früher von uns aus den entsprechenden Äthoxalylverbindungen und Fettaldehyden dargestellter  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -lactone analog sind.

Da diese  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -trichlormethyl- $\gamma$ -lactone identisch sind mit den nach dem englischen Patent 592 283 aus den gleichen Ausgangsmaterialien unter etwas andern Bedingungen hergestellten Verbindungen, so besitzen auch letztere die Struktur von  $\alpha$ -Keto- (bzw. Enol)- $\gamma$ -lactonen und nicht, wie die Patenturheber annehmen, diejenige von Chloraliden.

Laboratorio di Chimica Organica della  
Scuola Politecnica Federale di Zurigo.

---

## 264. Über die Beeinflussung der chemischen Alaninbestimmung durch Asparaginsäure.

### Vergleich des mikrobiologisch und chemisch ermittelten Alaningehaltes einiger Eiweisskörper

von G. Ritzel und O. Wiss.

(I. IX. 49.)

Die quantitative chemische Bestimmung kleiner Mengen aliphatischer  $\alpha$ -Aminosäuren bietet insofern Schwierigkeiten, als in vielen Fällen keine für die einzelnen Aminosäuren charakteristischen Reaktionen bekannt sind. Neuerdings ist es gelungen, die einzelnen Vertreter auf chromatographischem Wege voneinander zu trennen und so wenigstens teilweise eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen<sup>1)</sup>. Für Glykokoll und Alanin sind Methoden ausgearbeitet worden, die auf Desaminierung mittels Ninhydrin und spezifischer

<sup>1)</sup> Vgl. zusammenfassende Darstellung: *A. J. P. Martin* und *R. L. M. Synge*, Adv. in Prot. Chem. **2**, 1 (1945); *A. Tiselius*, Adv. in Prot. Chem. **3**, 67 (1947).

Bestimmung des Reaktionsproduktes, das heisst des Formaldehyds bzw. Acetaldehyds, be. uhen<sup>1</sup>).

Grosse Verbreitung haben in letzter Zeit die mikrobiologischen Aminosäurebestimmungen erfahren<sup>2</sup>). Es ist auch gelungen, beinahe für jede einzelne Aminosäure eine brauchbare Methode zu finden. Naturgemäss liegen die Fehlerquellen der chemischen Bestimmungen einerseits und der mikrobiologischen andererseits auf ganz anderen Gebieten. Ein Vergleich einer chemischen mit einer mikrobiologischen Methode ist deshalb für die Beurteilung der Zuverlässigkeit besonders aufschlussreich. In der vorliegenden Arbeit wurde der Alaningehalt verschiedener Eiweisskörper vergleichsweise chemisch und mikrobiologisch ermittelt.

### Experimenteller Teil.

#### 1. Chemische Alaninbestimmungsmethode.

Die Alaninbestimmung erfolgt nach einer früher beschriebenen Methode<sup>3</sup>): 1 cm<sup>3</sup> Analyse, enthaltend ca. 50–100  $\gamma$  Alanin, wird mit 5 cm<sup>3</sup> 1-proz. Pikrinsäurelösung versetzt und nach Zusatz von Ninhydrin und Bimssteinpulver mit kleiner Flamme während 20 Minuten bei schwachem Sieden gehalten. Der gebildete Acetaldehyd wird in der Vorlage in 3 cm<sup>3</sup> 0,2-proz. Natriumhydrogensulfidlösung aufgefangen, anschliessend mit Piperazin und Natriumnitroprussid behandelt und der entstandene Farbstoff spektrophotometrisch bestimmt. Berechnung: Extinktion mal 460 ergibt  $\gamma$  Alanin pro cm<sup>3</sup> Analyse. Wir haben früher den von *Lieb-Zacherl* für die Milchsäurebestimmung angegebenen Apparat verwendet, haben ihn aber neuerdings, wie aus Fig. 1 hervorgeht, vereinfacht:

Einfluss der Asparaginsäure: *Van Slyke* und Mitarbeiter<sup>4</sup>) haben auf Grund der Desaminierung der Aminosäuren durch Ninhydrin eine Gesamtaminosäurebestimmung ausgearbeitet, die auf der Messung des gebildeten Kohlendioxyds beruht. Sie haben festgestellt, dass die Asparaginsäure insofern die Bestimmung stört, als in geringem Umfang auch die zweite Carboxylgruppe decarboxyliert wird. Es kommt somit bei Anwesenheit von Asparaginsäure auch zu einer Mehrbildung von Acetaldehyd, so dass die Alaninbestimmung bei Gegenwart von Asparaginsäure zu hohe Werte ergibt. Die Mehrbildung von Acetaldehyd ist immerhin so klein, dass sie vernachlässigt werden kann, wenn Asparaginsäure in kleinerer prozentualer Konzentration vorliegt als Alanin. Eine Korrektur bei Bestimmung des freien Alaningehaltes im Blute ist deshalb nicht nötig<sup>3</sup>). Wenn jedoch die Asparaginsäurekonzentration gleich oder grösser ist als die Alaninkonzentration, so besteht die Möglichkeit, dass ein messbarer Fehler zustande kommt, der durch gleichzeitige Bestimmung des Asparaginsäuregehaltes ausgeschaltet werden muss. Fig. 2 zeigt die Beeinflussung der Alaninbestimmung bei Gegenwart verschiedener Mengen Asparaginsäure.

Kurve 1 ist eine Alanineichkurve. Kurve 2 ergibt sich, wenn an Stelle von Alanin Asparaginsäure verwendet wird. Kurve 3 zeigt die Verhältnisse, wenn zu einer konstanten Menge Alanin (50  $\gamma$ ) steigende Mengen Asparaginsäure zugegeben werden. Aus dem Vergleich von Kurve 1 und 2 ergibt sich, dass Asparaginsäure eine Extinktion gibt, die 15%

<sup>1</sup>) *D. A. Mac Fadyen*, J. Biol. Chem. **158**, 107 (1945); *B. Alexander*, *G. Landwehr* und *A. M. Seligman*, J. Biol. Chem. **160**, 51 (1945); *R. Krüger*, Helv. **32**, 238 (1949); *A. I. Virtanen*, *T. Laine* und *T. Toivonen*, Z. physiol. Ch. **266**, 193 (1940); *A. I. Virtanen* und *N. Rautanen*, Suomen Kemistilehti B, **XIX**, 56 (1946); *P. Roine*, Suomen Kemistilehti **19 B** (1946); Ann. Acad. Sci. Fennicae Ser. A. II. Chem., Nr. **26**, 1 (1947); *P. Roine* und *N. Rautanen*, Acta Chemica Scandinavica **1**, 854 (1947); *B. Alexander* und *A. M. Seligman*, J. Biol. Chem. **159**, 9 (1945); *O. Wiss*, Helv. **31**, 22 (1948).

<sup>2</sup>) Vgl. zusammenfassende Darstellung: *E. E. Snell*, Adv. in Prot. Chem. **2**, 85 (1945).

<sup>3</sup>) *O. Wiss*, Helv. **31**, 22 (1948).

<sup>4</sup>) *D. D. Van Slyke*, *R. T. Dillon*, *D. A. MacFadyen* und *P. Hamilton*, J. Biol. Chem. **141**, 627 (1941).

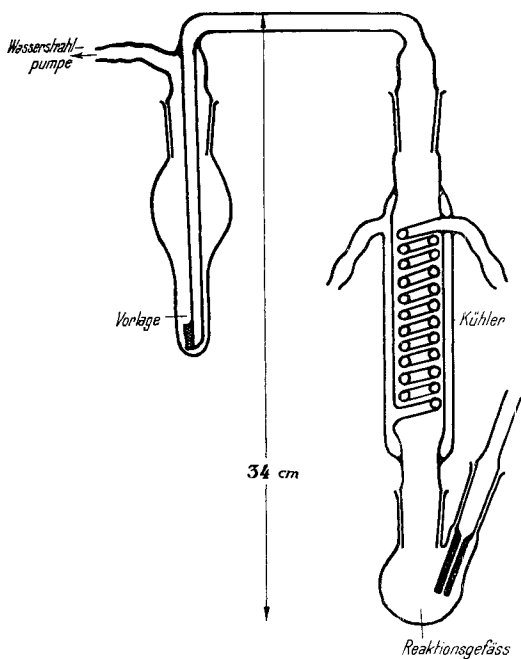


Fig. 1.

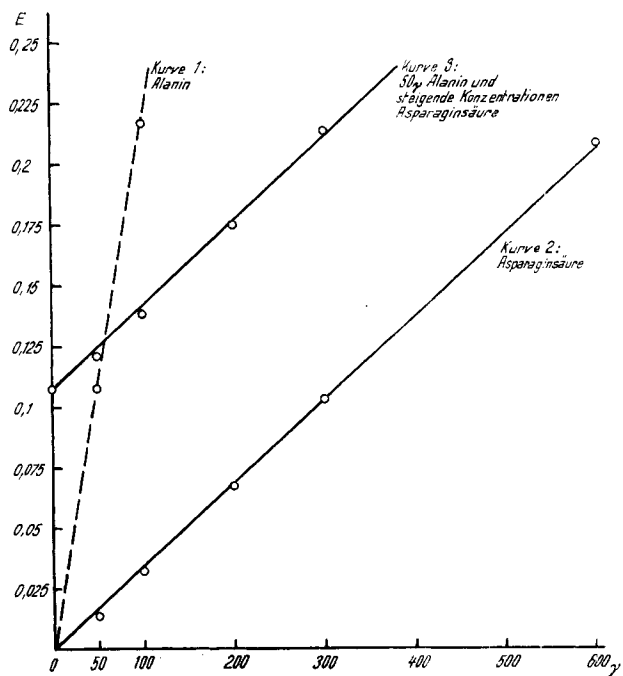


Fig. 2.

derjenigen des Alanins beträgt. Aus dem parallelen Verlauf von Kurve 2 und 3 ist zu ersehen, dass eine rechnerische Korrektur möglich ist.

Bei Bestimmung des Alaningehaltes in Eiweisshydrolysaten liegen die Verhältnisse insofern komplizierter, als eine grosse Anzahl anderer Aminosäuren gleichzeitig desaminiert wird. Es erhebt sich deshalb die Frage, wie weit die Alaninbestimmung von den begleitenden Aminosäuren beeinflusst wird. Wir haben zu diesem Zweck eine Aminosäurelösung hergestellt, deren Mischung ungefähr einem Eiweisshydrolysat entspricht. Lösung A: je 50 mg Glykokoll, L-Alanin, L-Valin, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Tryptophan, L-Histidin, L-Arginin, L-Lysin, L-Glutaminsäure, L-Prolin, L-Oxyprolin, DL-Serin, DL-Methionin und DL-Threonin werden in 500 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. Lösung B: gleiche Zusammensetzung wie Lösung A, ausserdem noch 100 mg L-Asparaginsäure/500 cm<sup>3</sup> enthaltend. Es werden bei der Bestimmung von je 1 cm<sup>3</sup> der Lösungen in Parallelansätzen folgende Alaninwerte erhalten:

Lösung A: 99% und 108% der zugesetzten Menge

Lösung B: 102% und 106% der zugesetzten Menge

Es ist daraus ersichtlich, dass die Methode innerhalb ihrer Fehlergrenze die richtigen Werte ergibt und dass die Asparaginsäure in der in üblichen Eiweisshydrolysaten vorkommenden Konzentration die Bestimmung nicht beeinträchtigt.

### 2. Mikrobiologische Alaninbestimmung.

Wir bestimmen den Alaningehalt mit der mikrobiologischen Methode von *Sauberlich* und *Baumann*<sup>1)</sup>, die auf der Milchsäurebildung von *Leuconostoc citrovorum* 8081 beruht. Der Nährboden enthält ausser den bei anderen mikrobiologischen Aminosäurebestimmungen verwendeten Bestandteilen noch „*Lilly's Reticulogen*“. In Abweichung von den Angaben der oben genannten Autoren verwenden wir pro Ansatz 2 cm<sup>3</sup> Nährlösung; die Titration der gebildeten Milchsäure erfolgt mit 0,1-n. Natronlauge.

### 3. Eiweisshydrolyse.

5 g Eiweiss entweder in Form des reinen Eiweisskörpers — Protamine-Edestin-Casein — oder als Organacetontrockenpulver werden mit 50 cm<sup>3</sup> konstant siedender Salzsäure während 16 Stunden am Rückfluss im Luftbad beim Sieden gehalten. Die überschüssige Salzsäure wird anschliessend durch mehrmaliges Einengen im Vakuum vertrieben und der Rückstand so verdünnt, dass pro cm<sup>3</sup> ca. 50  $\gamma$  Alanin enthalten sind.

### 4. Alaningehalt einiger Eiweisskörper.

	% Alanin chemisch bestimmt	% Alanin mikrobiologisch bestimmt
Pankreas (Mensch) . . . . .	6,3 (0,93)*	6,5 (0,95)
Pankreas-Carcinom (Mensch) . . . . .	6,1 (0,62)	6,4 (0,64)
Leber (Mensch) . . . . .	5,7 (1,20)	5,7 (1,20)
Leber-Carcinom (Mensch) . . . . .	5,6 (1,00)	6,1 (1,10)
Atrophisch-cirrhotische Leber (Mensch) . . . . .	6,1 (1,00)	6,2 (1,10)
Leber (Schwein) . . . . .	5,1	5,1
Pankreas (Schwein) . . . . .	4,5	4,7
Niere (Schwein) . . . . .	5,2	5,1
Casein I . . . . .	3,9	3,9
Casein II . . . . .	4,2	4,3
Scombrin . . . . .	6,3	6,6
Clupein . . . . .	5,3	6,0
Sturin . . . . .	6,1	6,3
Edestin . . . . .	8,1	7,5

\* Zahlen in Klammern = Alaningehalt auf Frischorgan berechnet.

<sup>1)</sup> *H. E. Sauberlich* und *C. A. Baumann*, *J. Biol. Chem.* **177**, 545 (1949).

Die Tabelle zeigt, dass beide Methoden gut übereinstimmende Werte ergeben. Dass die Asparaginsäure die Bestimmung nicht stört, geht daraus hervor, dass Asparaginsäurehaltige Eiweisskörper (Leber, Pankreas, Casein, Edestin) eine gleich gute Übereinstimmung zeigen wie die Asparaginsäure-freien (Scombrin, Clupein Sturin).

### Zusammenfassung.

1. Es wird der Einfluss hoher Konzentrationen Asparaginsäure auf die chemische Alaninbestimmung untersucht und festgestellt, dass in einfacher Mischung von Alanin und Asparaginsäure letztere eine Erhöhung der Alaninwerte zur Folge hat. Der Fehler lässt sich aber leicht bei gleichzeitiger Bestimmung der Asparaginsäure rechnerisch ausschalten. Die Asparaginsäure in Eiweisshydrolysaten in üblicher Konzentration (bis zu ca. der doppelten Menge des Alanin-gehaltes) stört die Bestimmung nicht.

2. Verschiedene Hydrolysate von Eiweisskörpern werden chemisch und mikrobiologisch auf den Alanin-gehalt geprüft, und es wird eine gute Übereinstimmung der Methoden festgestellt.

Herrn Professor Dr. A. Werthemann danken wir für die freundliche Überlassung einiger Organpräparate.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

---

## 265. Über Steroide.

94. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### Weitere Steroidhormone mit zusätzlicher Doppelbindung in 11-Stellung<sup>2)</sup>

von Ch. Meystre und A. Wettstein.

(19. VIII. 49).

Unlängst konnten wir mitteilen<sup>3)</sup>, dass 11-Dehydro-progesteron das am Kaninchen stärkst wirksame der bekannten Gestagene darstellt. Diese in Arbeiten von Reichstein<sup>4)</sup> beschriebene Verbindung, die wir nach einem modifizierten Verfahren gewonnen hatten, übertraf nämlich das genuine Hormon Progesteron um das Dreifache an Wirkung. Auch das erstmals hergestellte  $\Delta^{11}$ -Anhydro-corticosteron-

<sup>1)</sup> 93. Mitt., siehe Helv. **32**, 1957 (1949).

<sup>2)</sup> Vorgetragen von A. W. anlässlich des 1. Internat. Kongresses für Biochemie, Cambridge, 19. Aug. 1949.

<sup>3)</sup> Ch. Meystre, E. Tschopp und A. Wettstein, Helv. physiol. acta **6**, C 60 (1948); Helv. **31**, 1463 (1948).

<sup>4)</sup> P. Hegner und T. Reichstein, Helv. **26**, 715 (1943); J. von Euw und T. Reichstein, Helv. **29**, 669 (1946).