

GAFF and J.N. DAVIDSON). New York: Academic Press 1955. — 7) ANDERSON, W., D.M. HAYES, A.M. MICHELSON and A.R. TODD: J. Chem. Soc. 1954, 1882. — 8) MICHELSON, A.M.: Tetrahedron 2, 333 (1958).

**Nichtenzymatische oxydative Desaminierung von Amino- und Iminosäuren mittels Wasserstoffsperoxyds**

Durch Einwirkung von Oxydationsmitteln werden die Aminosäuren auf verschiedene Weise abgebaut. Die Perjodat-Oxydation z.B. gibt Anlaß zur Bildung von Aldehyden, Kohlendioxyd und Ammoniak<sup>1-3</sup>). Das 4-Oxyprolin wird in der alkalischen Lösung durch Wasserstoffsperoxyd in Anwesenheit von Kupfer-II-Ionen über die  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -oxy- $\delta$ -aminovaleriansäure (4-Oxy- $\Delta^1$ -pyrrolin-2-carbonsäure) zur Pyrrol- $\alpha$ -carbonsäure umgewandelt<sup>4</sup>).

Wir konnten feststellen, daß unter analogen Reaktionsbedingungen die heterozyklischen Systeme des Prolins und der Pipecolinsäure in der 1,2-Stellung oxydiert werden und daß die Aminosäuren Arginin, Ornithin und Lysin einer oxydativen Desaminierung in  $\alpha$ -Stellung unterliegen. Aus unseren bisherigen Untersuchungen geht hervor, daß durch Oxydation von Prolin und Ornithin die  $\alpha$ -Keto- $\delta$ -aminovaleriansäure (bzw.  $\Delta^1$ -Pyrrolin-2-carbonsäure) (I), von Pipecolinsäure und Lysin die  $\Delta^1$ -Piperidein-2-carbonsäure (im Gleichgewicht mit einer kleinen Menge von  $\alpha$ -Keto- $\epsilon$ -aminocaprinsäure) (II) und von Arginin die  $\alpha$ -Keto- $\delta$ -guanidino-valeriansäure (III) gebildet werden. Wie bekannt, werden die typischen  $\alpha$ -Keto-carbonsäuren wie z.B. die Brenztraubensäure oder die  $\alpha$ -Ketoglutarensäure vom Wasserstoffsperoxyd in Kohlendioxyd und in die um 1 C-Atom ärmere Carbonsäure gespalten. Die  $\alpha$ -Ketoanaloge von Ornithin und Lysin dagegen bleiben im alkalischen Milieu der intramolekularen Zyklisation zufolge von diesem Oxydationsmittel unbeeinflusst, wie wir schon früher bei der Strukturauflösung dieser auf synthetischem Wege dargestellten Präparate festgestellt haben<sup>5</sup>). Durch diesen Umstand wird ermöglicht, unter bestimmten Bedingungen die  $\alpha$ -Keto- $\omega$ -amino (bzw.  $\omega$ -guanidino)-carbonsäuren aus den entsprechenden Diamino- bzw. Iminosäuren durch Wasserstoffsperoxydeinwirkung zu gewinnen.

**Allgemeine Darstellungsmethode.** Zu der alkalischen Lösung von 5 mM der Amino- bzw. Iminosäure und 2,5 mM des Kupfer-II-Sulfates wurde unter stetem Umrühren und Kühlen 3% Wasserstoffsperoxydlösung bei der Temperatur um 15° langsam zugetropft (nähere Einzelheiten sind in der Tabelle angegeben). Nach der Zerlegung des überschüssigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Eisen-II-Sulfat wird die Reaktionslösung mit konzentrierter HCl angesäuert und die Ketosäure in Form des 2,4-Dinitrophenylhydrazons isoliert. Durch Benzaldehydeinwirkung in der 1 N HCl-Lösung wird das kristalline Aminoketosäure-hydrochlorid aus dem Hydrazon in Freiheit gesetzt<sup>6a</sup>).

Tabelle. Reaktionsergebnisse

Amino- bzw. Iminosäure (5 mM)	Reaktionsbedingungen				Entstehende Ketosäure	Ausbeute an 2,4-DNP (%)
	NaOH		3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -ml	Oxydationszeit/min		
	n	ml				
d,l-Prolin . . .	4	25	25	15	I	77,6
d,l-Ornithin . . .	4	25	25	15	I	60,4
d,l-Pipecolinsäure	4	25	15	5	II	14,0
d,l- und l-Lysin	4	25	15	5	II	12,2
l-Arginin . . . .	2	100	25	15	III	15,2

Die Aminoketosäure I läßt sich auch aus dem alkalischen Hydrolysat der Gelatine (das Arginin wird dabei ins Ornithin umgewandelt) unter analogen Oxydationsbedingungen gewinnen, was von präparativer Bedeutung sein könnte. Die niedrigen Ausbeuten an Ketosäure II und III\*) sind auf die Nebenreaktionen bei der Oxydation zurückzuführen.

Die Hydrochloride der Aminoketosäuren I und II sind mit den synthetisch dargestellten Präparaten identisch<sup>6b</sup>), 7) und die Eigenschaften der Ketosäure III stimmen mit den Literaturangaben überein<sup>8</sup>), 9).

Biochemisches Institut der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Masaryk-Universität in Brno, Tschechoslowakei

LUMÍR MACHOLÁN

Eingegangen am 9. März 1959

\*) Die Ketosäure III liegt vielleicht vorwiegend in der azyklischen Form vor, die vom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> weiter leicht angegriffen wird.

1) ARAKAWA, K.: J. Biochem. [Japan] 44, 217 (1957).

2) BRAGG, P.D., u. L. HOUGH: J. Chem. Soc. [London] 1958, 4050.

Naturwiss. 1959

3) SKURSKÝ, L.: Angew. Chem. (im Druck). — 4) RADHAKRISHNAN, A.N., u. A. MEISTER: J. Biol. Chem. 226, 559 (1957). — 5) MACHOLÁN, L., u. E. SVÁTEK: Collection (im Druck). — 6) MACHOLÁN, L.: Collection a) 23, 1159 (1958); b) 22, 479 (1957). — 7) SKURSKÝ, L., u. L. MACHOLÁN: Collection 23, 150 (1958). — 8) MEISTER, A.: J. Biol. Chem. 206, 577 (1954). — 9) BOULANGER, P., u. R. OSTEUX: Biochim. Biophys. Acta 21, 552 (1956).

**Oxydation von Aesculetin und Umbelliferon durch Phenoloxylase\***

Im Rahmen unserer Arbeiten über die enzymatische und nichtenzymatische Oxydation von therapeutisch wirksamen Pflanzenstoffen untersuchten wir die Oxydation des Aesculetins (6,7-Dioxycumarin) und des Umbelliferons (7-Oxycumarin) durch Phenoloxylase. JOSLYN und PONTING<sup>1</sup>) weisen

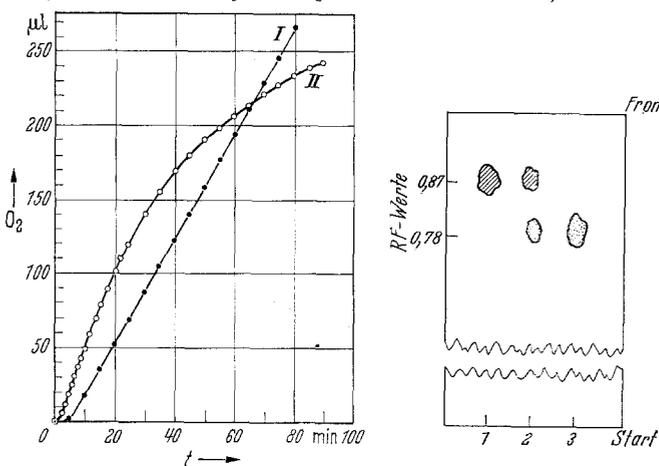


Fig. 1. Oxydation von Umbelliferon (I) und Aesculetin (II) durch Kartoffelphenoloxylase. Warburg-Ansatz I: 0,4 ml methanolische Umbelliferonlösung, 1,0 ml unverdünnte Fermentpräparation, ad 5,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7. Die Umbelliferonkonzentration pro ml Reaktionsansatz ist 8,0 × 10<sup>-3</sup> molar. Warburg-Ansatz II: 0,6 ml methanolische Aesculetinlösung, 0,5 ml Fermentverdünnung 1:5, ad 5,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7. Die Aesculetinkonzentration pro ml Reaktionsansatz ist 6,0 × 10<sup>-3</sup> molar. Die Temperatur betrug jeweils 25° C

Fig. 2. Papierchromatographie des bei Zusatz von Ascorbinsäure enzymatisch oxydierten Umbelliferons. Fleck 1: Reine methanolische Umbelliferonlösung (= 75  $\gamma$  Umbelliferon). Fleck 2: Reaktionsansatz: 0,1 ml methanolische Umbelliferonlösung (= 1,5 mg Umbelliferon), 1,0 ml Ascorbinsäurelösung (= 5 mg Ascorbinsäure), 0,5 ml Fermentpräparation, ad 5,0 ml Citronensäure-Phosphatpuffer pH 7; nach 10minütiger Reaktion werden 0,5 ml 10%ige Salzsäure zur Inaktivierung zugesetzt und 0,1 ml der Reaktionslösung auf das Chromatogramm aufgetragen. Fleck 3: Reine methanolische Aesculetinlösung (= 25  $\gamma$  Aesculetin), Lösungsmittel Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5). Papier: Schleicher & Schüll 2043 bM, absteigend. Identifizierung mittels UV

darauf hin, daß das Aesculetin diesem Ferment als Substrat dienen könnte. Experimentelle Daten werden jedoch nicht angegeben. Unsere Untersuchungen wurden mit einer Fermentpräparation aus Kartoffeln (Sorte „Ackersegen“), die nach dem Verfahren von KUBOWITZ<sup>2</sup>) bis zur 2. Ammoniumsulfatfällung aufgearbeitet worden war, durchgeführt. Die Präparation war frei von phenolischen Stoffen, die eine Überträgerwirkung ausüben könnten.

Fig. 1 zeigt die Oxydation der beiden Oxycumarine. Wird die Oxydation des Umbelliferons bei Zusatz von Ascorbinsäure vorgenommen und die Reaktionslösung anschließend papierchromatographisch untersucht, so konnte Aesculetin als Zwischenprodukt gefunden werden (Fig. 2).

Eine ausführliche Mitteilung über die Untersuchungen erfolgt an anderer Stelle.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Pharmazeutisches Institut der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem

G. SCHENCK, K.-H. FRÖMMING und H. KASTNER

Eingegangen am 15. Januar 1959

\*) 12. Mitteilung über die enzymatische und nichtenzymatische Oxydation von therapeutisch wirksamen Pflanzenstoffen; zugleich 2. Mitteilung über Phenoloxylasen.

1) JOSLYN, M., u. J. PONTING: Adv. Food Res. 3, 1 (1951).

2) KUBOWITZ, F.: Biochem. Z. 292, 221 (1937); 299, 32 (1938).