

# Über den Abbau von 2,5-Diketopiperazinen im Organismus des Kaninchens.

Von  
**Emil Abderhalden.**

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. März 1908.)

In einer gemeinschaftlich mit Yutaka Teruuchi<sup>1)</sup> ausgeführten Untersuchung ist gezeigt worden, daß der Stickstoff von Glycinanhydrid und dl-Alaninanhydrid beim Hunde nach Zuführung dieser 2,5-Diketopiperazine per os als Harnstoff im Urin wiedererscheint, wenigstens stiegen die Harnstoffzahlen entsprechend der in Form der genannten Anhydride verabreichten Stickstoffmenge an. Unentschieden blieb, in welcher Weise diese Anhydride abgebaut worden waren. Am wahrscheinlichsten erschien die Annahme, daß die Diketopiperazine zunächst zu den entsprechenden Dipeptiden aufgespalten und diese dann weiter in die Komponenten — die Aminosäuren — zerlegt worden sind. Diese Aufspaltung könnte schon unter der Einwirkung des alkalischen Pankreas- und speziell Darmsaftes vor sich gehen. Glycinanhydrid und Alaninanhydrid werden leicht durch Alkali aufgespalten. Direkte Versuche ergaben kein positives Resultat und auch Versuche, 2,5-Diketopiperazine mit Hilfe von Organextrakten aufzuspalten, führten zu keinem sicheren Ergebnis. Wir versuchten, die Frage nach dem Abbau der 2,5-Diketopiperazine nun auf folgendem Wege zu entscheiden. Überschwenmt man den tierischen Organismus mit Aminosäuren, dann wird ein Teil davon im Urin unverändert ausgeschieden. Dies

<sup>1)</sup> Emil Abderhalden und Yutaka Teruuchi, Über den Abbau einiger Aminosäuren und Peptide im Organismus des Hundes, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 159, 1906.

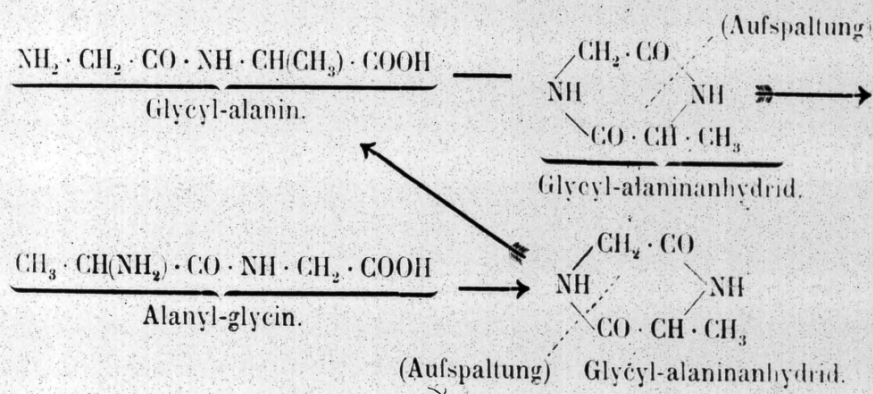
tritt namentlich dann ein, wenn racemische Aminosäuren verfüttert werden. Im Urin erscheint dann ein mehr oder weniger großer Teil der in der Natur nicht vorkommenden Komponente des Racemkörpers. Beim Kaninchen genügen, wie es scheint, kleinere Mengen von racemischen Aminosäuren pro Kilogramm Körpergewicht berechnet als beim Hunde. Verfüttert man einem Hunde von etwa 4 kg Körpergewicht 10 g dl-Alanin, dann findet man im Durchschnitt 0—1 g l-Alanin im Urin. Bei Kaninchen von 1 kg Körpergewicht fanden wir nach Verabreichung von 2,5 g dl-Alanin stets l-Alanin im Urin und zwar 0,1—0,35 g. Wir bemerken zu diesen Zahlen, daß sie sich ausschließlich auf die analyse-reinen  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivate der genannten Aminosäure beziehen. Die Ausbeute an Rohprodukten war stets viel größer. Unzweifelhaft kommen auch beträchtliche individuelle Schwankungen vor. Es bezieht sich das auch auf den Menschen. Während in dem einen Falle beim Gesunden schon nach Zufuhr von 10 g dl-Alanin im Urin l-Alanin auftrat, konnte in anderen Fällen selbst nach Eingabe von 15 g dl-Alanin höchstens andeutungsweise l-Alanin als  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivat isoliert werden. Es sei hierzu erwähnt, daß nach gemeinschaftlich mit O. Gross (Greifswald) ausgeführten Untersuchungen der Alkaptonuriker auf Zufuhr von Glykokoll und dl-Alanin nicht anders reagiert als das normale Individuum. Diese Beobachtungen schienen uns die Möglichkeit zu ergeben, festzustellen, ob beim Abbau der 2,5-Diketopiperazine Aminosäuren entstehen. Ist dies der Fall, dann ist zu erwarten, daß z. B. nach Verfütterung von dl-Alaninanhydrid l-Alanin im Urin auftritt. Die ersten Versuche führten zu keiner Entscheidung. Sie wurden am Hunde ausgeführt. Ein 4500 g schwerer Hund erhielt mit Fleisch vermischt 10 g dl-Alaninanhydrid. Dasselbe Tier hatte wiederholt nach Eingabe von 10 g dl-Alanin 0,45 g l-Alanin im Urin ausgeschieden. Nach der Eingabe des genannten Anhydrids war eine Ausscheidung von l-Alanin nicht zu beobachten. Zwar gab der Harn in der gewohnten Weise mit  $\beta$ -Naphthalinsulfchlorid behandelt stets eine Reaktion, jedoch war die Menge des gebildeten Derivates so gering, daß eine sichere Identifizierung ganz unmöglich war. Ein Versuch mit 10 g Glycinanhydrid

hatte keinen besseren Erfolg. Auch ein Versuch am Menschen hatte kein eindeutiges Ergebnis. Offenbar erfolgt die Resorption der schwer löslichen Anhydride sehr langsam, dazu kommt, daß, falls eine Aufspaltung zum entsprechenden Dipeptid erfolgt, dieses wieder in die Komponenten zerlegt werden müßte. So würden nur ganz allmählich Aminosäuren entstehen und eine plötzliche Überschwemmung, wie nach der Eingabe der Aminosäuren selbst, wäre ausgeschlossen.

Wir haben schließlich einige Versuche am Kaninchen ausgeführt. Es ist uns gelungen, nach Einführung größerer Mengen von Glycinanhydrid Glykokoll im Urin nachzuweisen, ferner nach Zuführung von dl-Alaninanhydrid l-Alanin und nach Eingabe von dl-Serinanhydrid d-Serin. Es ist uns ferner im ersteren Falle geglückt neben Glykokoll Glycyl-glycin zu gewinnen und im zweiten Falle neben l-Alanin Alanyl-alanin wahrscheinlich zu machen. Es ist möglich, daß die beobachteten Dipeptide als Beweis dafür aufzufassen sind, daß die verfütterten Anhydride zunächst zu den entsprechenden Dipeptiden aufgespalten, und diese dann in die Aminosäuren zerlegt werden. Es darf jedoch nicht außer acht gelassen werden, daß der Urin des Kaninchens alkalisch reagiert und eine sekundäre Spaltung von etwa mit dem Urin ausgeschiedenen Anhydriden nicht ausgeschlossen ist. Vor allem ist die Gefahr sehr groß, daß bei der Gewinnung der  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivate durch Schütteln des alkalischen Harns mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid eine Aufspaltung von etwa vorhandenen Anhydriden auftritt. Wir haben uns durch einen Kontrollversuch überzeugt, daß durch die angewandte Methode eine Bildung von Dipeptiden aus Anhydriden bei Anwendung von Glycinanhydrid und Alaninanhydrid nicht ausgeschlossen ist. Leider reichte die Menge des isolierten Dipeptids nach Verfütterung von dl-Alaninanhydrid nicht zu einer eindeutigen optischen Untersuchung aus. Das Präparat drehte etwas nach rechts. Es war aber nicht völlig rein, wie die Analyse ergab.

Ist somit vorläufig nicht sicher zu entscheiden, ob die isolierten Dipeptide bereits als solche zur Ausscheidung gelangten oder sekundär aus ausgeschiedenem Anhydrid entstanden sind, so weist der Befund von Aminosäuren doch mit großer Wahr-

scheinlichkeit darauf hin, daß der Abbau der 2,5-Diketopiperazine über die entsprechenden Dipeptide erfolgt ist. Wir haben uns durch Kontrollversuche überzeugt, daß unter den angewandten Bedingungen dem Urin zugesetzte Anhydride und Dipeptide nicht in ihre Komponenten zerlegt werden. Gegen eine derartige sekundäre Entstehung der isolierten Aminosäuren spricht auch ohne weiteres der Umstand, daß das isolierte Alanin und Serin optisch aktiv waren, und zwar handelte es sich in beiden Fällen um die in der Natur nicht vorkommende Komponente, d. h. um l-Alanin und d-Serin. Wir wollen noch die Möglichkeit in Erwägung ziehen, daß der tierische Organismus unter Umständen durch Anhydridbildung aus einem Dipeptid und Aufspaltung des gebildeten 2,5-Diketopiperazins eine Änderung in der Struktur eines bestimmten Dipeptids herbeiführen könnte, ohne einen totalen Abbau bis zu den Aminosäuren zu bewirken. So könnte er z. B. aus Glycyl-alanin Glycyl-alaninanhydrid bilden und durch dessen Aufspaltung zu Alanyl-glycin gelangen.



Wir setzen unsere Untersuchungen fort und hoffen durch Verwendung von gemischten Anhydriden einen exakteren Einblick in derartige Beziehungen zu erhalten.

Zu den Versuchen ist zu bemerken, daß die ganze Menge der Anhydride möglichst auf einmal verabreicht wurde. Es war stets mit Schwierigkeiten verknüpft, die Produkte zur freiwilligen Aufnahme zu bringen. Wir kneteten sie zum Teil mit Brot zusammen, formten kleine Kugeln und führten diese per os ein, zum Teil schwemmten wir die Anhydride in Wasser auf und gossen dann das Gemisch durch eine Schlund-

sonde ein. Am raschesten kamen wir schließlich zum Ziel, indem wir Kohlblätter mit einer dünnen Schicht von Gummi arabicum-Lösung überzogen und dann das Anhydrid aufstreteten. Das Kaninchen fraß die Kohlblätter anstandslos und so erreichten wir eine rasche, mühelose Aufnahme der ganzen Menge des 2,5-Diketopiperazins in kurzer Zeit. Der Urin wurde in einer mit Toluol versetzten Schale aufgefangen. Durch eine Reihe von Kontrollproben überzeugten wir uns, daß das Kaninchen, das auffallend reichlich und oft Urin von sich gab, normalerweise keine mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid reagierenden Produkte im Harne enthielt. Während der Versuche wurde der Urin alle 24 Stunden untersucht. Es zeigte sich, daß der zuerst gelassene Urin die größte Menge Aminosäuren enthielt. Schon am zweiten Tage war die Ausbeute recht gering und am vierten Tage ließen sich überhaupt keine Aminosäuren mehr nachweisen.

Versuch 1. Verfütterung von 12 g Glycinanhydrid. Isoliert am ersten Tage 0,5 g  $\beta$ -Naphthalinsulfo-glycin, am zweiten Tage 0,15 g und am dritten Tage 0,05 g. Alle drei Präparate sinterten gegen  $154^{\circ}$  und schmolzen bei  $159^{\circ}$  (korr.).

0,1649 g Substanz gaben 0,3275 g  $\text{CO}_2$  und 0,0626 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{NS}$ :

Gefunden:

54,34% C und 4,15% H.

54,16% C und 4,21% H.

Aus der Mutterlauge des  $\beta$ -Naphthalinsulfo-glycins wurde eine Verbindung isoliert, die aus kochendem Alkohol beim allmählichen Abkühlen in Blättchen krystallisierte. Ihre Menge betrug 1,5 g. Sie schmolz gegen  $180$ — $182^{\circ}$ . Die Analyse gab auf  $\beta$ -Naphthalinsulfo-glycyl-glycin stimmende Werte.

0,1458 g Substanz gaben 0,2784 g  $\text{CO}_2$  und 0,0605 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$ :

Gefunden:

52,17% C und 4,35% H.

52,07% C und 4,61% H.

Um festzustellen, ob das gewonnene Produkt wirklich die angenommene Zusammensetzung hatte, haben wir 0,75 g der isolierten Verbindung mit 30 ccm 10%iger Salzsäure zwei Stunden am Rückflußkühler gekocht.<sup>1)</sup> Wir erhielten nach dem

<sup>1)</sup> Vgl. Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung von Polypeptiden bei der Hydrolyse der Proteine, Ber. d. Deutschen Chem. Gesellsch., Jg. XL, S. 3548, 1907.

Abstumpfen der Salzsäure 0,45 g  $\beta$ -Naphthalinsulfo-glycin, außerdem haben wir in der Mutterlauge Glykokoll als Esterchlorhydrat nachgewiesen. Das gewonnene  $\beta$ -Naphthalinsulfo-glycin schmolz nach vorherigem Sintern gegen  $159^{\circ}$  (korr.).

0,1764 g Substanz gaben 0,3523 g  $\text{CO}_2$  und 0,0683 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{NS}$ : Gefunden:

54,34% C und 4,15% H. 54,47% C und 4,32% H.

Versuch 2. Verfütterung von 10 g dl-Alanin an ein Kaninchen. Isoliert am ersten Tage 0,5 g  $\beta$ -Naphthalinsulfo-l-alanin. Am zweiten und dritten Tage konnten nur noch Spuren einer  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindung gewonnen werden. Das bei  $90^{\circ}$  getrocknete Produkt schmolz zwischen  $127$  und  $128^{\circ}$  (korr.) und drehte in Alkohol gelöst nach rechts.

0,1800 g Substanz gaben 0,3705 g  $\text{CO}_2$  und 0,0783 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{NS}$ : Gefunden:

55,91% C und 4,66% H. 56,14% C und 4,83% H.

Außer dieser Verbindung wurde aus der Mutterlauge ein gegen  $175^{\circ}$  schmelzendes Produkt isoliert, das bei der Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure  $\beta$ -Naphthalinsulfoalanin lieferte. Höchstwahrscheinlich lag  $\beta$ -Naphthalinsulfo-alanyl-alanin vor.

Versuch 3. Verfüttert 10 g dl-Serinanhydrid. Isoliert 0,75 g p-Nitrobenzoyl-d-serin.<sup>1)</sup> Es zeigte  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -39,75^{\circ}$  in  $1/2$ -n-Natronlauge. F. gegen  $190^{\circ}$  unter Zersetzung.

0,1423 g Substanz gaben 0,2472 g  $\text{CO}_2$  und 0,0491 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_6\text{N}_2$ : Gefunden:

47,24% C und 3,97% H. 47,37% C und 3,83% H.

<sup>1)</sup> Emil Fischer u. Walter A. Jacobs, Spaltung des racemischen Serins in die optisch-aktiven Komponenten, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XXXIX, S. 2942, 1906.