

Über eine Synthese mit Essigsäure in der künstlich durchbluteten Leber.

(Beiträge zur Kenntnis der Leberfunktionen. II. Mitteilung.)

Von

Otto Neubauer und Otto Warburg.

(Aus der II. medizinischen Klinik in München.)
(Der Redaktion zugegangen am 24. Oktober 1910.)

Die Versuche, über welche hier berichtet werden soll, wurden vor fast 4 Jahren in der Absicht begonnen, die Desaminierungsprodukte der Phenylaminoessigsäure in der künstlich durchbluteten Leber aufzusuchen. Wir stießen dabei gleich im ersten Versuch auf eine ätherlösliche Säure, die sich aber als N-haltig erwies und deshalb kein einfaches Desaminierungsprodukt sein konnte; trotzdem die so erhaltene Substanz in ihren Eigenschaften gut charakterisiert war, so mußte doch wegen der geringen Menge, in der sie entstand, eine große Reihe von Versuchen ausgeführt werden, ehe die Quantität zu einer genaueren Untersuchung und Identifizierung ausreichte. Die Frage nach den Produkten der Desaminierung wurde von uns nicht weiter verfolgt; sie ist seither von dem einen von uns in Gemeinschaft mit H. Fischer bearbeitet worden.¹⁾

Die Anordnung der Durchströmungsversuche war so, wie sie in der Publikation von Neubauer und Fischer¹⁾ beschrieben ist, ja es dienten sogar dieselben Versuche, die zur Isolierung der Desaminierungsprodukte angestellt wurden, gleichzeitig zur Darstellung der im folgenden zu beschreibenden Substanz (in der erwähnten Publikation als «Substanz A» bezeichnet).²⁾

¹⁾ O. Neubauer und H. Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. LXVII, S. 230 (1910).

²⁾ Herrn Dr. H. Fischer und Herrn Dr. W. Groß sind wir für ihre freundliche Unterstützung bei diesen Versuchen zu bestem Danke verpflichtet.

Nach 2—3stündiger Dauer wurde die Durchströmung abgebrochen, die Leber zerkleinert, durch Kochen unter Zusatz von Wasser und etwas primärem Natriumphosphat koaguliert; in gleicher Weise wurde mit der Durchströmungsflüssigkeit verfahren. Die vereinigten Filtrate und Waschwässer wurden auf dem Wasserbade eingeeengt, mit Salzsäure angesäuert und im Schütteltrichter wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Den vereinigten Ätherextrakten wurden die ätherlöslichen Säuren durch Ausschütteln mit einem kleinen Überschuß von Normalnatronlauge wieder entzogen, die alkalische Lösung angesäuert und die Säuren durch Ausschütteln wieder in ätherische Lösung übergeführt: nach dem Verdunsten des Äthers verblieb ein bräunlicher Rückstand, der mit etwas Wasser und Tierkohle gekocht, ein fast wasserhelles Filtrat lieferte: aus diesem schieden sich beim Stehen im Vakuum über Schwefelsäure Krystallnadeln ab: «Substanz A» (s. Neubauer und Fischer, a. a. O. S. 235; aus der Mutterlauge konnten Phenylglyoxylsäure und l-Mandelsäure gewonnen werden).

Eigenschaften der «Substanz A». Sie krystallisierte in Form langer farbloser, sehr spröder Nadeln, die sich in heißem Wasser leicht, in kaltem nur schwer lösten (weniger als 1^o/₁₀), und so leicht umkrystallisiert werden konnten. In Alkohol und Äther waren sie etwas löslich.

Schmelzpunkt 191° (korr.).

Die wässerige Lösung drehte die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts. Die Bestimmung der Drehung wurde in wässriger Lösung vorgenommen.

I. 0,0396 g Substanz; Gewicht der Lösung 5,877 g, spezifisches Gewicht 1,0015, also Prozentgehalt 0,6747.

Beobachtete Drehung im 2 dm-Rohr + 2,63°.

Daraus berechnet spezifische Drehung $[\alpha]_D = + 194,9^\circ$.

II. 0,0400 g Substanz; Gewicht der Lösung 7,1245 g, spezifisches Gewicht 1,0013, Prozentgehalt 0,5622.

Drehung im 2 dm-Rohr + 2,22°.

Daraus berechnet spezifische Drehung $[\alpha]_D = + 197,4^\circ$.

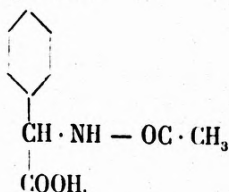
Bei Anstellung der Lassaigueschen Probe erwies sich die Substanz als N-haltig. Die wässerige Lösung der Substanz reagierte sauer gegen Lackmuspapier und gegen Kongopapier.

Die Titration mit Phenolphthalein als Indikator ergab:

0,0923 g Substanz verbrauchen zur Neutralisation 4,8 ccm n_{10} -Natronlauge. Daraus berechnet sich, unter der Annahme, daß eine einbasische Säure vorliegt, ein Molekulargewicht von 192.

Wir glaubten zunächst, daß aktive Uraminophenylelessigsäure vorläge,¹⁾ daß also die Leber die Aminosäure mit Carbinsäure gepaart habe. Dafür sprachen die saure Reaktion, das Molekulargewicht (für Uraminosäure berechnet 194) und die optische Aktivität.

Die Bestimmung des N-Gehaltes lehrte aber, daß der N-Gehalt nur halb so groß war, wie er für Uraminosäure erwartet werden mußte. Dagegen stimmten die N-Bestimmungen gut auf Acetyl-Phenylaminoessigsäure.



0,0923 g Substanz geben bei der Bestimmung nach Kjeldahl soviel Ammoniak, als 4,8 ccm n_{10} -Säure entspricht; daraus ergibt sich ein N-Gehalt von 7,29%.

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CHNH} \cdot \text{OC} \cdot \text{CH}_3 - \text{COOH}$: 7,25%.

0,0976 g Substanz liefern nach Dumas 6,2 ccm N (17°, 766 mm) entsprechend 7,53% N.

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CHNH} \cdot \text{OC} \cdot \text{CH}_3 - \text{COOH}$: 7,25%.

Für die Formel der Acetylverbindung der Phenylaminoessigsäure stimmt ferner das oben angeführte Ergebnis der Titration:

0,0923 g Substanz haben verbraucht 4,8 ccm n_{10} -Lauge

Theorie verlangt für Acetyl-Phenylaminoessigsäure 4,76 „ „

Nach Hydrolyse mit Schwefelsäure und darauffolgendem

¹⁾ Uraminophenylelessigsäure konnte aus dem Harn zweier Hunde, die Phenylaminoessigsäure erhalten hatten, gewonnen werden (O. Neubauer, D. Arch. f. kl. Med., Bd. XCV, S. 233 (1910)); es ist jedoch wohl möglich, daß sie erst bei der Verarbeitung aus Aminosäure und Harnstoff entstanden war.

Versetzen der konzentrierten Lösung mit Alkohol entwickelte sich der typische Geruch des Essigesters.

Zur völligen Sicherstellung haben wir die bis jetzt noch nicht bekannte Acetyl-Phenylaminoessigsäure synthetisch dargestellt, um ihre Eigenschaften mit denen der bei der Durchströmung gebildeten Substanz vergleichen zu können.

Darstellung von dl-Acetyl-Phenylaminoessigsäure. Bei dieser Darstellung folgten wir im wesentlichen den Vorschriften, wie sie von Emil Fischer¹⁾ für die Darstellung anderer Acetylaminosäuren gegeben worden sind.

8,5 g Phenylaminoessigsäureäthylester wurden mit 16 g Essigsäureanhydrid vermischt und $\frac{1}{2}$ Stunde lang im Wasserbad erwärmt, dann wurde das Gemisch zur Entfernung des Essigsäureanhydrids mit etwas Alkohol und Wasser versetzt und im Vakuum bei ca. 60° verdampft. Der Rückstand, der den Äthylester der Acetylphenylaminoessigsäure enthalten mußte, wurde verseift, indem er mit 70 ccm Normalnatronlauge bis zur völligen Lösung erwärmt und dann noch eine Zeitlang bei Zimmertemperatur stehen gelassen wurde; beim Versetzen mit 70 ccm Normal-salzsäure fiel die Acetylverbindung aus, sie wurde mit Wasser gewaschen: Ausbeute 8,3 g; die Mutterlauge lieferte beim Einengen noch 0,5 g. Die Substanz wurde aus heißem Wasser umkrystallisiert und im Trockenschrank getrocknet.

Sie krystallisiert in Form von Prismen, die sich schwer in kaltem, ziemlich leicht in warmem Wasser lösen. Schmelzpunkt 198,5° (korr.). N-Bestimmung (nach Kjeldahl).

0,1904 g Substanz verbrauchen 9,8 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure, entsprechend 7,21% N.

Berechnet für $C_{10}H_{11}O_3N$: 7,25% N.

Die bei der Leberdurchblutung erhaltene Säure unterschied sich demnach von der synthetisch dargestellten Acetyl-Phenylaminoessigsäure vor allem durch den um $7\frac{1}{2}^{\circ}$ niedrigeren Schmelzpunkt. Diese Differenz konnte aber darauf beruhen, daß die bei der Durchblutung gewonnene Substanz die optisch aktive (rechtsdrehende) Modifikation der Acetylverbindung war, während bei der synthetischen Darstellung natürlich die racemische Modifikation entstanden war.

¹⁾ Emil Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIV, S. 449, (1901).

Zur Entscheidung haben wir aus der synthetisch dargestellten racemischen (dl-) Acetyl-Phenylaminoessigsäure durch Alkaloidspaltung die aktive (d-) Modifikation gewonnen.

d-Acetyl-Phenylaminoessigsäure. 16,8 g der racemischen Verbindung wurden in ca. 350 ccm kochenden Wassers gelöst, 25,8 Cinchonin eingetragen, vom Ungelösten heiß abfiltriert. Das Filtrat, das beim Erkalten keine Abscheidung zeigte, wurde eingeeengt und fraktioniert krystallisiert; die erste Krystallfraktion wurde einigemal aus heißem Wasser umkrystallisiert und dann in die freie Acetyl-Phenylaminoessigsäure übergeführt: 3,8 g Cinchoninsalz werden in 50 ccm heißem Wasser gelöst (die Lösung gelingt nicht vollständig) und mit 2,5 ccm Normalnatronlauge, nach dem völligen Erkalten noch mit weiteren 5,8 ccm Normalnatronlauge versetzt; dann wird in Eis gekühlt, das ausgefallene Cinchonin abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wird mit 0,8 ccm Normalsalzsäure neutralisiert, im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeeengt, mit 7,4 ccm Normalsalzsäure versetzt und 1—2 Stunden mit Eis gekühlt; die ausgeschiedenen Krystalle werden abgesaugt; Ausbeute ca. 1 g.

Zur völligen Reinigung wird aus heißem Wasser umkrystallisiert und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Titration (mit Phenolphthalein als Indikator):

0,2060 g Substanz verbrauchen 10,5 ccm $n/10$ -Natronlauge
Berechnet für $C_9H_{10}ON \cdot COOH$: 10,65 »

Stickstoffbestimmung (Kjeldahl):

0,2060 g Substanz verbrauchen 10,65 ccm $n/10$ -Säure,
entsprechend 7,24% N
Berechnet für $C_{10}H_{11}O_3N$: 7,25% »

Der Schmelzpunkt lag niedriger als bei der racemischen Verbindung, bei 190° (korr.). Er entspricht dem Schmelzpunkt der bei den Leberdurchblutungen erhaltenen Substanz. Auch in den übrigen Eigenschaften zeigte sich völlige Übereinstimmung.

Die Substanz erwies sich in wässriger Lösung als rechtsdrehend.

0,4487 g Substanz, Gewicht der Lösung 52,83 g, spezifisches Gewicht 1,00197, daher Prozentgehalt 0,8510.

Drehung im 1 dm-Rohr $+ 1,68^\circ$.

Daraus berechnet spezifische Drehung $[\alpha]_D = + 197,3^\circ$.

Das Acetylprodukt, das zur Bestimmung der Drehung gedient hatte, wurde, um es auf seine optische Reinheit zu

prüfen, nochmals in das Cinchoninsalz übergeführt: aus der ersten Krystallfraktion des erhaltenen Cinchoninsalzes wurde wieder die freie Acetylverbindung gewonnen und optisch untersucht.

0,2091 g Substanz, Gewicht der Lösung 33,8408 g, spezifisches Gewicht 1,0014, somit Prozentgehalt 0,6188.

Drehung im 2 dm-Rohr + 2,43°.

Daraus berechnet $[\alpha]_D = + 196,4^\circ$.

Es ergab sich also eine genügende Übereinstimmung mit dem früher erhaltenen Werte: da durch die nochmalige Überführung in das Cinchoninsalz die optische Drehung nicht gesteigert worden war, kann die untersuchte Verbindung mit großer Wahrscheinlichkeit als optisch rein angesehen werden.

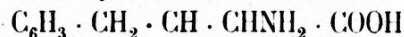
Da die bei den Durchblutungen erhaltene Substanz wie in ihren übrigen Eigenschaften so auch in ihrer optischen Aktivität mit der synthetisch erhaltenen d-Acetyl-Phenylaminoessigsäure übereinstimmt, so darf es als feststehend betrachtet werden, daß in der künstlich durchbluteten Hundeleber aus zugesetzter dl-Phenylaminoessigsäure neben Phenylglyoxylsäure und l-Mandelsäure auch d-Acetyl-Phenylaminoessigsäure gebildet wird.

Acetylierungen im Tierkörper sind bisher nur in ganz geringer Zahl bekannt geworden. R. Cohn¹⁾ fand m- und p-Acetylamidobenzoesäure im Harn von Kaninchen, die m- resp. p-Nitrobenzaldehyd erhalten hatten. Die schon früher von Jaffé und Cohn²⁾ gefundene Bildung von Furfuracrylsäure aus eingegebenem Furfurol ist ebenfalls als Anlagerung von Essigsäure zu deuten, jedoch ist hier die Art der Anlagerung eine andere (keine Acetylierung, sondern Kondensation). Die Essigsäuregruppe spielt ferner eine Rolle bei den komplizierten Paarungsprozessen, welchen eingeführtes Halogenbenzol im Organismus des Hundes unterliegt: die sog. Mercaptursäure ist als acetyliertes α -Cystein aufzufassen.

¹⁾ Cohn, Diese Zeitschrift, Bd. XVII, S. 284 (1893).

²⁾ Jaffé u. Cohn. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XX, S. 2311 (1887).

Endlich ist nach Abschluß der vorliegenden Untersuchungen von Knoop¹⁾ mitgeteilt worden, daß Hunde nach Einführung von racemischer Phenyl- α -aminobuttersäure



die Acetylverbindung der eingegebenen Aminosäure ausscheiden, und zwar die rechtsdrehende Modifikation. Knoop hat ferner die höchst interessante Beobachtung gemacht, daß dieselbe d-Acetylverbindung auch nach Verabreichung der entsprechenden Ketonsäure $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH}$ (in geringerer Menge auch nach Verabreichung der entsprechenden Alkoholsäure $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{COOH}$) im Harn erscheint.

Unsere Erfahrungen mit der Phenylaminoessigsäure zeigen, daß diese Paarung mit Essigsäure auch bei anderen Aminosäuren vorkommt; sie erweisen ferner die Rolle der Leber bei dieser Synthese. Die früher mitgeteilten Untersuchungen über das Schicksal der Phenylaminoessigsäure in der künstlich durchbluteten Leber²⁾ haben uns gezeigt, daß in diesem Organ oxydative Desaminierung, Reduktion und oxydative Kohlensäureabspaltung stattfindet; dazu kommt nun noch die Paarung mit Essigsäure. Damit ist die große Bedeutung für die Stoffwechselforgänge, die man diesem Organ von altersher zuzuschreiben geneigt ist,³⁾ neuerdings erwiesen.

Das von der Leber nach Zusatz von racemischer Phenylaminoessigsäure gebildete Acetylprodukt war optisch aktiv und zwar rechtsdrehend. Wir suchten nun festzustellen, welchem optischen Anteil der zugesetzten Aminosäure das rechtsdrehende Acetylprodukt entspricht. Ein Versuch, durch Kochen mit Mineralsäure aus synthetischer d-Acetylphenylaminoessigsäure den Essigsäurerest abzuspalten und so zu der entsprechenden aktiven Phenylaminoessigsäure zu kommen, schlug fehl, da völlige Racemisierung eintrat. Wir gingen deshalb in der Weise vor, daß wir l-Phenylaminoessigsäure (dargestellt nach E. Fischer⁴⁾)

¹⁾ Knoop, Diese Zeitschrift, Bd. LXVII, S. 496 (1910).

²⁾ O. Neubauer und H. Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. LXVII, S. 230 (1910).

³⁾ Vgl. Hofmeister, Die chemische Organisation der Zelle. Braunschweig 1901, S. 10.

⁴⁾ E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI, S. 1290 (1908).

in der oben angegebenen Weise in die Acetylverbindung überführten; diese erwies sich als linksdrehend; daraus geht hervor, daß die bei der Durchblutung entstandene rechtsdrehende Acetylverbindung der d-Aminosäure entspricht, also der im Tierkörper angreifbaren optischen Modifikation der Phenylaminoessigsäure; auch das stimmt mit den Befunden Knoop's bei der Verfütterung der Phenylaminobuttersäure überein.

Ob nun die Paarung mit Essigsäure in der Weise erfolgt, daß von vornherein ein Teil der d-Modifikation der Phenylaminoessigsäure acetyliert wird, oder ob (worauf die Erfahrungen Knoop's hindeuten) das Acetylprodukt erst sekundär aus primär gebildeter Ketonsäure — in unserem Falle also der von uns bei der Leberdurchblutung bereits nachgewiesenen Phenylglyoxylsäure¹⁾ — entsteht, kann derzeit wohl noch nicht entschieden werden. Es sei hier nur darauf hingewiesen, daß auch bei der Entstehung der Acetylprodukte aus eingegebenem m- und p-Nitrobenzaldehyd Oxydations- und Reduktionsprozesse mitspielen: Reduktion der NO_2 - zur NH_2 -Gruppe, Oxydation der CHO- zur COOH-Gruppe; es gelang R. Cohn nicht, nach Eingabe von Nitrobenzoesäure oder von Amidobenzoensäure Acetylierungsprodukte im Harn nachzuweisen.²⁾

Auch die Frage, ob eine Acetylierung auch beim Abbau der Aminosäuren der natürlichen Eiweißkörper stattfindet, mit anderen Worten, ob der Essigsäurepaarung im normalen intermediären Stoffwechsel Bedeutung zukommt, kann erst auf Grund weiterer Untersuchungen diskutiert werden.

Die Beantwortung der Frage, welchem Material die zur Acetylierung nötige, vom Organ gelieferte Essigsäure entstammt, dürfte gerade bei der Leber keine Schwierigkeit bieten. Embden³⁾ und seine Mitarbeiter haben gezeigt, daß

¹⁾ O. Neubauer und H. Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. LXVII, S. 236 (1910).

²⁾ R. Cohn, Diese Zeitschrift, Bd. XVII, S. 292 (1893); Bd. XVIII, S. 136 (1894).

³⁾ Embden, Salomon und Schmidt, Hofmeisters Beiträge, Bd. VIII, S. 9 (1906).

gerade in der Leber der Abbau von Fettsäuren (und Aminosäuren) zu Oxybuttersäure stattfindet und dieser Abbau erfolgt nach früheren Feststellungen Knoop's¹⁾ wahrscheinlich unter Abspaltung von Essigsäuremolekülen. Ferner ist daran zu denken, daß beim Abbau der β -Oxybuttersäure, resp. der Acetessigsäure, den Embden ebenfalls in die Leber verlegt, möglicherweise eine Aufspaltung in zwei Essigsäuremoleküle stattfindet, eine Annahme, die von v. Noorden²⁾ vertreten wird. Auch eine Bildung der Essigsäure aus Kohlenhydraten ist sehr wohl denkbar, doch fehlen zurzeit noch bestimmte Anhaltspunkte für eine solche Annahme.

¹⁾ Knoop, Der Abbau aromat. Fettsäuren im Tierkörper. Freiburg i. B. 1904.

²⁾ v. Noorden, Handbuch d. Path. d. Stoffwechsels. II. Auflage, II. Band, S. 72 (1907).