

Über die Aufspaltung des Benzolrings im Organismus.

I. Mitteilung.

Das Auftreten von Muconsäure im Harn nach Darreichung von Benzol.

Von

M. Jaffé, Königsberg i. Pr.

(Der Redaktion zugegangen am 9. August 1909.)

Aus dem Urin von Hunden und Kaninchen, welche längere Zeit mit Benzol gefüttert worden waren, gelang es mir, eine N-freie Säure zu isolieren, welche meines Wissens bisher niemals im Harne gefunden worden ist. Ihre Darstellung geschah in folgender Weise: Der Urin wurde — ohne Rücksicht auf die reichlich darin enthaltenen Ätherschwefelsäuren — auf dem Wasserbad abgedampft und mit heißem Alkohol extrahiert. Die während einer längeren Fütterungsperiode gesammelten alkoholischen Auszüge wurden verreinigt, nach dem Verdampfen des Alkohols in Wasser gelöst, mit verdünnter Schwefelsäure stark angesäuert und 5—6 mal auf das gründlichste in der Maschine mit Äther ausgeschüttelt.

Die Ätherauszüge wurden durch Destillation bis etwa auf den 3. oder 4. Teil des Volumens konzentriert und ca. 24 Stunden stehen gelassen. Es hatte sich in dieser Zeit ein schwarzer, harzartig schmieriger, mit Krystallen durchsetzter Bodensatz abgesondert. Die hiervon abgegossene Ätherlösung schied bei allmählichem Verdunsten krystallinische, fest am Glase haftende Krusten aus, die zwar noch stark gefärbt, aber frei von harzigen Beimengungen waren. In der von ihnen getrennten Flüssigkeit bildeten sich bei weiterem Verdunsten neue Krusten und so konnten 3 bis 4 Krystallisationen erhalten werden, bis schließlich auch bei langem Stehen aus dem inzwischen sehr eingedickten öligen Ätherextrakt sich spontan nichts mehr

ausschied. Wohl konnte aus demselben durch eine umständliche Behandlung mit Bleisalzen noch eine sehr geringe Menge Substanz gewonnen werden, doch wurde hiervon meistens Abstand genommen.

Die einzelnen Krystallkrusten wurden zunächst mehrmals mit etwas Äther abgspült, der zu der ursprünglichen Ätherlösung zurückgegossen wurde, alsdann in heißem Wasser unter Zusatz der gerade ausreichenden Menge NH_3 (ein Überschuss ist zu vermeiden) gelöst und durch Kochen mit wenig Tierkohle entfärbt.

Aus dem Filtrat wurde die Substanz durch Ansäuern mit ClH in ganz farblosen Krystallen gewonnen. Größere Schwierigkeit bereitete die Reinigung der zuerst ausgeschiedenen harzigen Masse. Doch gelang sie schließlich auch durch Überführung in das NH_4 -Salz, Behandlung mit Tierkohle, Fällern mit ClH und mehrfache Wiederholung dieses Verfahrens.

Die auf solche Weise in farblosen Krystallen isolierte Säure zeigt folgende Eigenschaften:

Sie ist in Wasser, selbst heißem, äußerst schwer löslich, leichter in heißem Alkohol, in Äther schwer löslich.

Aus heißem Wasser scheidet sie sich bei langsamer Abkühlung in schmalen mikroskopischen Prismen aus, die schräg abgeschnitten, oft in sehr charakteristischen dendritisch verzweigten Formen aneinander gelagert sind. Neben diesen Formen fanden sich auch kurze, dicke, wohl ausgebildete rhombische Krystalle. Bei schneller Abscheidung aus ihren Salzen krystallisiert sie in feinen, oft moosartig verzweigten Nadeln.

Die reine Substanz schmilzt (im Kapillarrohr in völlig wasserfreier Schwefelsäure erhitzt) bei $289\text{--}290^\circ$ unter Zersetzung. In Schwefelsäure, die etwas wasserhaltig ist, bräunt sie sich schon bei 250° und schmilzt unter Zersetzung bei ca. 277° . Die Säure ist N-frei.

Elementaranalyse:

0,1755 g Substanz (im Vakuum getrocknet) gaben 0,3228 g CO_2 und 0,0650 g H_2O , d. i. 50,16% C und 4,11% H.

Hieraus berechnet sich die Formel $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$, welche

verlangt: 50,7% C	gefunden: 50,16% C
4,22% H	4,11% H

Das Silbersalz wurde durch Fällung der genau neutralen Lösung des Ammoniumsalzes mit der berechneten Menge AgNO_3 als farbloser, amorpher, lichtbeständiger Niederschlag erhalten.

0,107 g Substanz (bei 110° getrocknet) gaben 0,0645 g Ag.

Die Formel $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_4(\text{Ag})_2$

verlangt: 60,6% Ag gefunden: 60,28% Ag.

Hiernach ist die Säure zweibasisch.

Die Zusammensetzung und alle Eigenschaften der Verbindung legten die Vermutung nahe, daß die zuerst von H. Rupe¹⁾ genauer beschriebene Muconsäure vorliegt, eine Vermutung, die durch die weitere Untersuchung zur Gewißheit erhoben wurde. Das Verhalten der Verbindung entspricht in jeder Beziehung den Angaben Rupes; nur in bezug auf den Schmelzpunkt besteht keine völlige Übereinstimmung. Ich fand denselben bei $289\text{--}290^\circ$, während Rupe nur bemerkt, daß die Muconsäure im Kapillarröhrchen erhitzt sich gegen 250° bräunt, aber bei 260° noch nicht geschmolzen ist.

Dagegenstimmt die Angabe O. Doebners, der den Schmelzpunkt bei 292° fand, mit der meinigen fast genau überein. Um die Identität der fraglichen Verbindung mit Muconsäure sicher zu stellen, habe ich genau nach den Vorschriften Rupes 1. den Methyläther dargestellt, 2. das Verhalten gegen Brom untersucht und 3. konstatiert, daß die Säure in kohlenurem Natrium gelöst Kaliumpermanganat augenblicklich entfärbt und bei genügendem Zusatz desselben ganz zerstört wird.

Methyläther.

0,147 fein gepulverte Substanz wurden mit der berechneten Menge (0,42) Phosphorpentachlorid in einem kleinen Kolben auf dem Wasserbade erwärmt, bis alles in Lösung gegangen war. Nach Abkühlen in Eiswasser wurde die nötige Menge Methylalkohol in kleinen Anteilen hinzugegossen. Der alsbald sich krystallinisch ausscheidende Äther wurde von der Mutterlauge scharf abgesaugt und nach dem Trocknen an der Luft aus wenig heißem Alkohol umkrystallisiert. Er schied sich in

¹⁾ Annal. d. Chemie, Bd. CCLVI, S. 189.

breiten Nadeln oder schmalen Blättchen ab, die bei 151—152° schmolzen (Rupe gibt den Schmelzpunkt bei 154° an). Die Analyse ergab Zahlen, welche mit der Formel des Muconsäure-dimethyläthers genau übereinstimmten.

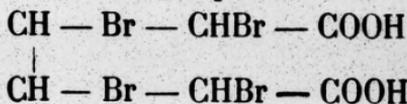
0,0920 g Substanz (vakuumtrocken) gaben 0,1898 g CO₂ und 0,0513 g H₂O.

$$\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_4(\text{CH}_3)_2$$

verlangt: C = 56,4%	gefunden: C = 56,26%
H = 5,9%	H = 6,2%

Verhalten gegen Brom.

Nach Rupe addiert Muconsäure direkt 4 Atome Brom und bildet damit Tetrabromadipinsäure:



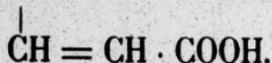
Seiner Angabe folgend habe ich die kleine Menge der mir noch zur Verfügung stehenden Substanz mit Brom übergossen und einen Tag unter der Einwirkung desselben gelassen, alsdann mit Wasser angeschlämmt, mit Schwefligsäurelösung entfärbt und mit Äther aufgenommen. Der nach dem Verdunsten des Äthers bleibende, krystallinische, gelbliche Rückstand wurde in kochendem Wasser unter tropfenweisem Zusatz von Alkohol gelöst. Beim Erkalten schieden sich farblose, mikroskopische Blättchen aus, die abfiltriert und getrocknet ebenso wie das von Rupe beschriebene Produkt bei 230° sich zu bräunen anfangen und bei 250° verkohlten. Ihre Menge (ca. 0,03) war für eine Elementaranalyse nicht ausreichend.

Es kann nunmehr keinem Zweifel mehr unterliegen, daß das nach Benzolfütterung im Harn auftretende Stoffwechselprodukt in der Tat Muconsäure ist.

Mit dem Namen Muconsäure bezeichnete H. Rupe,¹⁾ ein Schüler Ad. v. Baeyers, eine Verbindung, welche er durch Behandeln von β-γ-Dibromadipinsäure mit alkoholischem Kali darstellte und deren genaueres Studium im Laufe der berühmten Untersuchungen A. v. Baeyers über die Konstitution des Benzols eine große Bedeutung gewann:

¹⁾ l. c.

Ihre Konstitution ist $\text{CH} = \text{CH} \cdot \text{COOH}$



Später erhielt O. Doebner¹⁾ dieselbe Säure durch Erhitzen von Glyoxal und Malonsäure bei Gegenwart von Pyridin.

Die Menge der im Harn auftretenden Muconsäure ist sehr gering und entspricht nur einem kleinen Bruchteil (ca. 0,3%) des verfütterten Benzols. Aus dem Harn von 2 Hunden, welche successive 60 g Benzol (in täglichen Dosen von je 3 g) per os erhalten hatten, konnte ich ca. 0,2 g reine Substanz isolieren. Die Tiere vertrugen das Benzol sehr schlecht, fraßen wenig, hatten häufiges Erbrechen und bekamen alsbald tief dunkeln, fast schwarzen Urin, der die Merkmale des Carbolharns fast während der ganzen Fütterungsperiode behielt.

Kaninchen dagegen vertrugen das Benzol im allgemeinen sehr gut. Tägliche Gaben von 2, selbst 3 g, in einer Emulsion mit Gummilösung durch die Schlundsonde eingeführt, konnten wochenlang dargereicht werden, ohne daß — abgesehen von verminderter Freßlust — irgend welche Störungen des Befindens oder Dunkelfärbung des Harns eintrat. Die Ausbeute an Muconsäure war aber auch nicht größer als bei Hunden und entsprach in maximo nur 0,3% des verfütterten Benzols.

Bei der Geringfügigkeit der Ausbeute habe ich mir, vielleicht in etwas weit getriebenem Skeptizismus die Frage vorgelegt, ob nicht der Muconsäurebefund ohne jede Beziehung zum Benzol schon dem normalen Harn angehört. Diese Frage kann mit Bestimmtheit verneint werden. Ich habe wiederholt sehr bedeutende Quantitäten von Hunde- wie von Kaninchenurin, einmal sogar die gesamte 10tägige Harnmenge von 3 Kaninchen untersucht, ohne jemals eine Spur von Muconsäure nachweisen zu können. Es unterliegt also keinem Zweifel, daß die letztere mit der Benzolfütterung in ursächlichem Zusammenhang steht. Ihrem Auftreten würde aber keine größere Bedeutung zuzuschreiben sein, wenn sie wirklich im Stoffwechsel nur in so minimalen Anteilen aus dem Benzol hervorginge. Das ist aber ohne Zweifel nicht der Fall, und es ist mit Sicher-

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, I., S. 1146.

heit anzunehmen, daß die Aufspaltung des Benzols in Form der Muconsäure in viel größerem Umfange vor sich geht, als der Menge des im Harn ausgeschiedenen Produktes entspricht. Zunächst ist wohl die von mir benutzte Isolierungsmethode keine quantitative; ich wollte zunächst den Weg nicht verlassen, der zuerst zur Auffindung der Muconsäure führte. Doch zweifle ich nicht, daß sich eine Methode wird finden lassen, die größere Werte verspricht.

Vor allem aber ist vorauszusetzen, daß eine so leicht oxydierbare Substanz, wie die Muconsäure, eine Verbindung, welche durch Kaliumpermanganat schon in der Kälte zerstört wird, auch im Organismus sehr schnell und in großen Mengen der Oxydation anheimfallen dürfte. Dies ist in der Tat der Fall. Ich habe einem kräftigen Kaninchen 0,8 g reine Muconsäure als Natriumsalz auf 4 Dosen verteilt im Laufe von 12 Stunden subcutan injiziert. Aus dem Harn des Versuchstages und der folgenden 36 Stunden konnte ich nur eine sehr geringe Menge reiner Muconsäure (Sp. 289—290°) isolieren, die nach dem Umkrystallisieren aus heißem Wasser 0,007 g wog. Von der injizierten Menge gelangte also nicht ganz 1% zur Ausscheidung.

Legt man dieses Verhältnis zugrunde, so läßt sich berechnen, daß im Stoffwechsel der Hunde und Kaninchen etwa 25—30% des resorbierten Benzols in Muconsäure übergehen, ein Resultat, welches vielleicht hinter dem tatsächlichen Werte noch zurückbleibt und unseren anderweitigen Erfahrungen über die Schicksale des Benzols im Organismus jedenfalls nicht widerspricht.

Auf die Oxydation der Muconsäure im Organismus scheinen gewisse Momente von Einfluß zu sein; namentlich bin ich der Meinung, daß dieselbe bei sehr lange fortgesetzter Benzolfütterung mehr und mehr, schließlich bis zu völligem Verschwinden der Muconsäure gesteigert wird.

Die beiden Hunde, mit denen ich meine Untersuchung begonnen und welche mit kurzen Unterbrechungen über 3 Monate lang Benzol erhielten, schieden anfangs 0,3% der Muconsäure aus; in einer späteren Periode erhielt ich nach abermaliger Darreichung von 60 g Benzol nur ca. 0,1 reine Säure und

in einer letzten, sich unmittelbar anschließenden Periode konnten aus dem Ätherextrakt mit Mühe und Not Spuren der Substanz gewonnen werden. Hier ist allerdings der Umstand in Betracht zu ziehen, daß die in dem Ätherextrakt so bedeutender Harnquantitäten massenhaft vorhandenen harzigen Verunreinigungen die Krystallisation wahrscheinlich außerordentlich erschweren resp. unmöglich machen. Durch Verarbeitung der Ätherrückstände vermittelt mehrfach modifizierter Bleifällungsmethoden größere Anteile von Muconsäure zu isolieren, ist mir bisher nicht gelungen. Es dürfte sich hiernach für etwaige Nachuntersuchungen empfehlen, den auf Muconsäure zu prüfenden Harn in kürzeren (höchstens 8 tägigen) Fütterungsperioden abzugrenzen.

Die vorstehend mitgeteilten Tatsachen führen fast mit Notwendigkeit zu dem Schlusse, daß durch Aufspaltung des Benzolrings im Tierkörper Muconsäure entsteht; ein weiterer Beweis für die Richtigkeit dieser Schlußfolgerung ist kaum noch erforderlich. Gleichwohl hielt ich es für wünschenswert, einem Einwande zu begegnen, der möglicherweise erhoben werden könnte.

Ich habe zu meiner Untersuchung das gewöhnliche, bei 80—82° siedende Steinkohlenteerbenzol benützt (von Kahlbaum bezogen). Es war nicht ausgeschlossen, daß in demselben eine unbekante, in näherer Beziehung zur Muconsäure stehende Beimengung enthalten ist. So unwahrscheinlich die Existenz einer solchen Beimengung ist, die bei den zahlreichen und gründlichen Untersuchungen des Benzols den Chemikern schwerlich entgangen wäre, und so undenkbar es erscheint, die offenbar recht beträchtlichen Quantitäten Muconsäure, die aus Benzol im Organismus entstehen, auf eine solche hypothetische Quelle zu beziehen, so habe ich trotzdem die Fütterungsversuche mit chemisch reinem, aus reiner Benzoesäure von Kahlbaum dargestellten Benzol wiederholt und dieselben Resultate erhalten wie mit dem Steinkohlenteerbenzol.

1. 2 Kaninchen, deren Urin vorher 10 Tage lang gesammelt

und völlig frei von Muconsäure gefunden war, erhielten täglich je 3 g reines Benzol per os (auf 2 Dosen verteilt). Als im ganzen 30 g verfüttert waren, wurden die gesammelten alkoholischen Harnextrakte gemeinsam verarbeitet. Aus dem konzentrierten Ätherextrakt schied sich allmählich die Muconsäure in den charakteristischen Krusten aus und wurde in der gewöhnlichen Weise gereinigt. Die Menge der reinen Substanz (Sp. 288—289) betrug 0,06; doch war, wie ich mich überzeugen konnte, in der eingeengten öligen Mutterlauge der ersten Krystallisation noch ein Rest vorhanden, von dessen mühseliger Reindarstellung ich Abstand nahm. Die Gesamtausbeute entsprach somit annähernd der aus gewöhnlichem Benzol erhaltenen.

2. Zwei Hunde von mittlerer Größe, welche bisher noch zu keinem Versuche gedient hatten, erhielten pro Tag je 3 g reines Benzol in Kapseln. Die Hunde zeigten während der ganzen Fütterungsperiode nicht die geringste Störung des Befindens und fraßen mit Begierde. Ihr Urin behielt die normale, an einzelnen Tagen etwas dunklere Färbung und enthielt sehr viel gepaarte Schwefelsäure. Nach Darreichung von 30 g wurde der Urin auf Muconsäure verarbeitet, deren Isolierung in diesem Falle auf größere Schwierigkeiten stieß. Der Urin der mit viel Pferdefleisch gefütterten Tiere war sehr reich an Kynurensäure (die bei den ersten Versuchstieren fehlt), die in geringer Menge auch in den Äther übergang und, da sie in bezug auf Löslichkeit und Schmelzpunkt der Muconsäure sehr ähnlich ist, die Trennung von der Muconsäure erschweren mußte. Doch gelang die Trennung, bei der die von mir aufgefundene Kynurensäurereaktion (mit Salzsäure und chlorsaurem Kali) als Wegweiser diente, leichter, als ich dachte und zwar deshalb, weil die Kynurensäure sich aus dem Ätherauszug früher ausschied wie die Muconsäure. Nach ihrer Entfernung schieden sich aus dem Ätherextrakt bei weiterer Verdunstung zunächst ziemlich reichlich Krystalle aus, die sich in ihrem Aussehen wesentlich von der Muconsäure unterscheiden und sich als Schwefel herausstellten. Erst nach mehrfacher Entfernung der Schwefelkrystallisationen bildeten sich in der inzwischen sehr konzentrierten Lösung die charakteristischen Krusten von

Muconsäure, die allerdings noch stark mit Schwefel verunreinigt waren. Durch Behandlung mit verdünntem NH_3 konnte sie von dieser Beimengung befreit, durch Entfärbung des neutralen NH_4 Salzes mit Tierkohle, Fällung mit ClH und KrySTALLISATION aus heißem Wasser rein erhalten werden. — Sie wurde durch den Schmelzpunkt ($292\text{--}293^\circ$) und die Analyse des Silbersalzes identifiziert. (Ag gef. $60,28\%$, verl. $60,6\%$).

Die Menge der völlig reinen Substanz betrug 0,08.

Auf die Isolierung des noch in den Mutterlaugen enthaltenen Restes wurde auch in diesem Falle verzichtet.

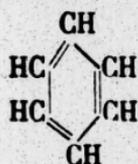
Der Nachweis von Muconsäure im Harn wirft ein überraschendes Licht auf die bisher gänzlich unbekanntem Vorgänge bei dem Abbau des Benzolrings im tierischen Organismus. Daß er für die chemischen Kräfte des Organismus nicht unangreifbar ist, sondern in demselben eine wenigstens teilweise Aufspaltung erleidet, hat man längst als wahrscheinlich angenommen. Selbst diejenigen aromatischen Verbindungen, welche unverändert, in der Seitenkette abgebaut oder in gepaarter Verbindung zur Ausscheidung gelangen, fanden sich bei sorgfältigster Untersuchung nur zu einem mehr oder weniger großen Bruchteile, fast niemals quantitativ im Urin wieder.

Tyrosin und einige andere aromatische Aminosäuren gehen so gut wie vollständig im Organismus zugrunde. Wohl hat Blendermann¹⁾ nach Überschwemmung des Kaninchenorganismus mit Tyrosin eine wohlcharakterisierte Verbindung desselben, das Tyrosinhydantoin und ein weniger sicher gestelltes Derivat, die Oxyphenylmilchsäure, aus dem Harn isolieren können, doch steht dieser Befund bisher ganz vereinzelt da und entspricht in quantitativer Beziehung nicht annähernd dem großen Überschuß des dargereichten Tyrosins.

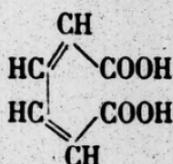
Mit der Darstellung der Muconsäure ist zum ersten Male die Aufspaltung des Benzols im Stoffwechsel in greifbarer Form bewiesen. Ein Vergleich der Formeln zeigt auf den ersten Blick,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VI.

wie leicht die Ableitung der Muconsäure aus dem Benzol durch oxydative Spaltung sich erklärt.



Benzol.



Muconsäure.

Es liegt nun nahe, von dem neu gewonnenen Gesichtspunkte aus das Verhalten derjenigen aromatischen Verbindungen zu studieren, welche im Organismus zu einem größeren Teile zerstört werden. Untersuchungen in dieser Richtung sind in meinem Laboratorium im Gange und haben bereits das Resultat ergeben, daß nach Verfütterung von 40 g reinsten Tyrosins an 2 Kaninchen (in täglichen Dosen von 2 g) sich keine Spur von Muconsäure im Harn auffinden ließ.