

276. Alexander Ellinger: Ueber die Constitution der Indolgruppe im Eiweiss (Synthese der sogen. Skatolcarbonsäure) und die Quelle der Kynurensäure.

[Aus dem Univ.-Laborat. f. med. Chemie und experimentelle Pharmakologie zu Königsberg i./Pr.]

(Vorgetragen in der Sitzung vom 18. April 1904 vom Verfasser.)

Seit geraumer Zeit sind unter den Fäulnisproducten der Eiweisskörper vier Substanzen bekannt, welche den Indolring enthalten: Das Indol<sup>1)</sup> selbst, das Skatol<sup>2)</sup>, die sogenannte Skatolcarbonsäure<sup>3)</sup> und Skatolessigsäure<sup>4)</sup>. Während die Constitution der beiden ersten Körper durch die Synthese festgestellt ist, stützt sich die für die Skatolcarbonsäure angenommene und in die Lehrbücher der physiologischen

Chemie übergegangene Formel<sup>5)</sup> dieser Substanz,  $C_6H_4 \begin{array}{c} \text{C. CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C. COOH} \\ \text{NH} \end{array}$

nur auf den Befund, dass die Säure glatt in Skatol und Kohlensäure zerfällt, und die Skatolessigsäure, der ihr Entdecker Nencki die

Formel  $C_6H_4 \begin{array}{c} \text{C. CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C. CH}_2. \text{COOH} \\ \text{NH} \end{array}$  zuschrieb, ist nur als ein Homologes

der vorigen Verbindung erkannt, ohne dass die Stellung der Seitenketten irgendwie sichergestellt wäre.

Als Muttersubstanz aller genannten Körper nahm Nencki im Anschluss an eine früher schon von E. Salkowski geäußerte Anschauung einen im Eiweissmolekül vorgebildeten Atomcomplex an:

den der Skatolaminoessigsäure,  $C_6H_4 \begin{array}{c} \text{C. CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C. CH}(\text{NH}_2). \text{COOH} \\ \text{NH} \end{array}$ , und setzte

so die Entstehung der vier Substanzen in Parallele mit der Bildung des Phenols, Kresols, der *p*-Oxyphenylessigsäure und *p*-Oxyphenylpropionsäure aus dem Tyrosin, welche durch Experimente sichergestellt war.

<sup>1)</sup> Kühne, diese Berichte 8, 206 [1875] und Nencki, ebenda 8, 336 und 722 [1875].

<sup>2)</sup> Brieger, diese Berichte 10, 1027 [1877].

<sup>3)</sup> E. und H. Salkowski, diese Berichte 13, 189, 2217 [1880].

<sup>4)</sup> Nencki, Monatsb. für Chem. 10, 506 [1889].

<sup>5)</sup> Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass E. und H. Salkowski, entsprechend den damaligen Kenntnissen über die Indolgruppe, sich jeder Äußerung über die Stellung des Carboxyls in der gefundenen Säure enthielten. Die angegebene Formel taucht meines Wissens zuerst bei Nencki (l. c.) auf.

Die Voraussage Nencki's erfuhr eine glänzende Bestätigung, als Hopkins und Cole<sup>1)</sup> vor etwa zwei Jahren unter den pankreatischen Verdauungsproducten des Caseïns einen Körper von der empirischen Formel der Skatolaminoessigsäure isolirten, aus welchem sie später<sup>2)</sup> durch Einwirkung verschiedener Bacterienarten die sämmtlichen bekannten Fäulnisproducte der Indolgruppe rein gewannen. Das neu gefundene hydrolytische Spaltungsproduct der Eiweisskörper erwies sich zugleich als das seinen Reactionen nach längst bekannte und viel gesuchte, von Nencki<sup>3)</sup> und Anderen als Muttersubstanz der thierischen Farbstoffe erkannte Tryptophan, welches mit Bromwasser eine violette Färbung und Fällung giebt. Hopkins und Cole nahmen für das Tryptophan die von Nencki aufgestellte Formel der Skatolaminoessigsäure unbedenklich an, ohne die Constitution der Skatolcarbonsäure, auf welche sich ihre Tryptophanformel stützte, einer Revision zu unterziehen.

Unabhängig von den beiden englischen Experimentatoren und vor dem Erscheinen ihrer zweiten Mittheilung habe ich in Gemeinschaft mit M. Gentzen<sup>4)</sup> gezeigt, dass im Dickdarm des Kaninchens aus Tryptophan in grossen Mengen Indol durch Fäulnis entsteht, während das Verhalten des Harns der Versuchsthiere gegen die Entstehung einer nennenswerthen Quantität Skatol sprach. Dies, sowie der Befund, dass aus Skatol, welches in den Dickdarm des Kaninchens gebracht wird, sich Indol höchstens in Spuren bildet, erweckte, wie in der Dissertation des Hrn. Gentzen ausführlicher erörtert ist, Bedenken gegen die Zulässigkeit des Nencki'schen Schemas von der Entstehung der Indolkörper und gegen die Richtigkeit der Tryptophanformel von Hopkins und Cole.

Als wichtigstes Argument gegen diese Annahmen erschien endlich die Beobachtung von Wislicenus und Arnold<sup>5)</sup>, dass die von ihnen aus Propionylameisensäure-Phenylhydrazon synthetisch erhaltene Skatolcarbonsäure, für welche die Constitution  $C_6H_4 \begin{array}{c} \text{C. CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH} \end{array} \text{C. COOH}$  erwiesen war, sich mit der Fäulnissäure nicht identisch gezeigt hatte.

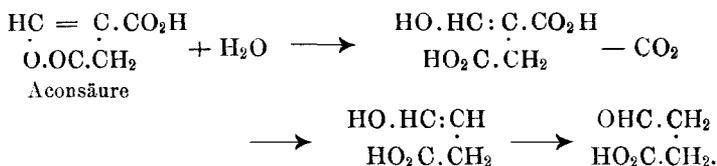
Von der Annahme ausgehend, dass das Verhalten der Fäulnissäure ebenso gut der Formel  $C_6H_4 \begin{array}{c} \text{C. CH}_2 \cdot \text{COOH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH} \end{array} \text{CH}$  entsprechen könne, ver-

1) Journal of Physiology 27, 418 [1901].      2) Ebenda 29, 451 [1901].

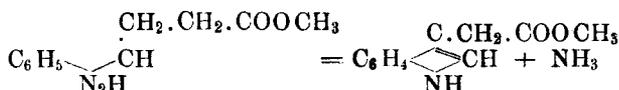
3) Diese Berichte 28, 560 [1895].

4) Hofmeister's Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 171 [1903] und M. Gentzen: Ueber die Vorstufen des Indols bei der Eiweissfäulnis im Thierkörper. Inaug.-Diss. Königsberg 1904.      5) Ann. d. Chem. 246, 334 [1886].

suchte ich die Synthese dieser Indol-*Pr*-3-Essigsäure nach der Methode von E. Fischer<sup>1)</sup>. Ein glücklicher Zufall brachte es mit sich, dass das zur Synthese notwendige Ausgangsmaterial, die  $\beta$ -Aldehydopropionsäure, welche von Perkin jun. und Sprankling<sup>2)</sup> zuerst dargestellt worden ist, durch eine Untersuchung von E. Freiherrn von Ungern-Sternberg<sup>3)</sup> aus dem Königsberger chemischen Laboratorium neuerdings bequemer zugänglich wurde. Die Säure entsteht in vortrefflicher Ausbeute durch Kochen der Aconsäure mit Wasser, wie die folgenden Formeln es veranschaulichen.

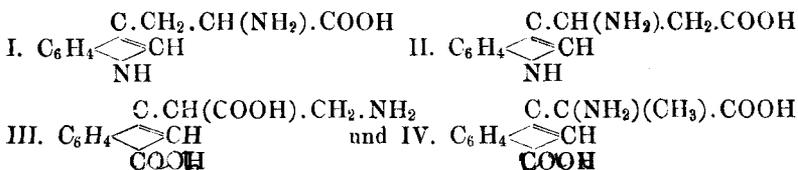


Das Phenylhydrazon des Aldehydopropionsäuremethylesters liefert bei der Chlorzinkschmelze oder besser noch nach dem Vorgange von W. Wislicenus bei mehrstündigem Erhitzen mit alkoholischer Schwefelsäure den Ester der Indol-*Pr*-3-Essigsäure



Die aus dem Ester durch Verseifen mit alkoholischem Kali und Ansäuern gewonnene Säure erwies sich in allen ihren Reactionen, im Schmelzpunkt und der Krystallform identisch mit der von E. und H. Salkowski erhaltenen Säure. Diese ist also künftig als Indol-*Pr*-3-Essigsäure zu bezeichnen.

Mit der alten Formel der Skatolcarbonsäure fällt natürlich auch die bisherige Tryptophanformel. Vier Möglichkeiten kommen nunmehr für die Constitution des Tryptophans in Betracht:

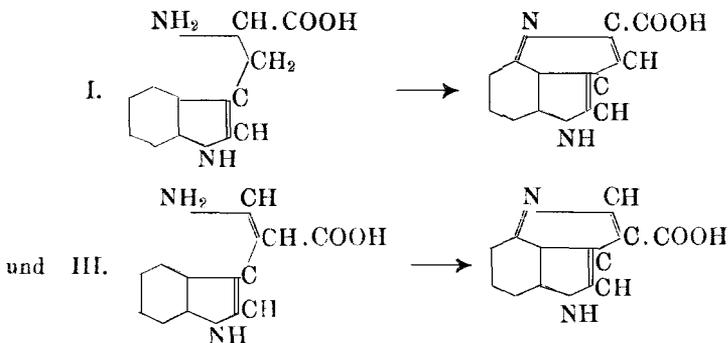


<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. 236, 116 [1888].

<sup>2)</sup> Journ. chem. Soc. 75, 11 [1889].

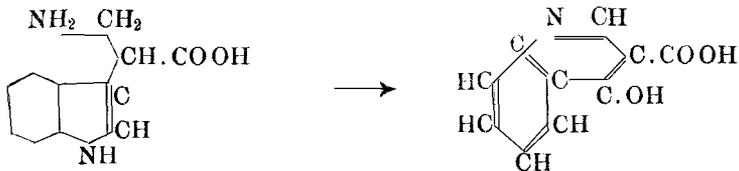
<sup>3)</sup> Erich Freiherr von Ungern-Sternberg: Ueber die  $\beta$ -Aldehydopropionsäure aus Aconsäure. Inaug.-Diss. Königsberg 1904.

Eine Auswahl unter diesen Formeln zu treffen, ermöglichte folgende Erwägung: Die Verbindungen I und III können ihrer Constitution nach in Chinolinderivate übergehen.



Verbindung I würde das Derivat einer  $\alpha$ -Chinolincarbonsäure, Verbindung III das Derivat einer  $\beta$ -Chinolincarbonsäure liefern. Nun ist aber als  $\gamma$ -Oxy- $\beta$  chinolincarbonsäure die Kynurensäure bekannt<sup>1)</sup>, ein Stoffwechselproduct des Hundes, von dem bis jetzt physiologisch nur feststeht, dass es bei vermehrter Eiweiszufuhr in der Nahrung in grösserer Menge ausgeschieden wird, und dass sich eine Vorstufe desselben unter den pankreatischen Verdauungsproducten des Eiweisses in der in Alkohol löslichen, durch Aceton fällbaren Fraction findet (Glässner und Langstein<sup>2)</sup>).

Der Thierversuch hat gezeigt, dass verfüttertes Tryptophan im Organismus des Hundes in Kynurensäure übergeht. Damit ist nicht nur das alte Problem von der Herkunft der Kynurensäure in verständlicher Weise aufgeklärt, sondern auch die Constitution des Tryptophans mit grösster Wahrscheinlichkeit im Sinne der Formel III entschieden.



Volle Sicherheit über die Structur des Tryptophans werden vielleicht in Aussicht genommene Versuche bringen, die Indolecyanessig-

<sup>1)</sup> R. Camps, Zeitschr. für physiol. Chem. 33, 390 [1901].

<sup>2)</sup> Hofmeister's Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1, 34 [1902]. — Siehe da auch Literatur über Kynurensäure.

säure darzustellen und aus dieser durch Reduction nach der Mendiuschen Reaction zum Tryptophan zu gelangen.

Der Uebergang des Tryptophans in ein Chinolinderivat scheint sich auch ohne Mitwirkung des Thierkörpers leicht zu vollziehen. Hopkins und Cole haben bei Oxydation des Tryptophans mit Eisenchloridlösung einen Körper von der Formel  $C_9H_7NO$  erhalten, der nach ihrer Ansicht vielleicht als ein bisher nicht bekanntes Oxychinolin aufzufassen ist.

Für unsere Auffassung von der Constitution der Eiweisskörper ist die Tendenz zur Schliessung des Pyridinrings im Tryptophan von Bedeutung. Viele Autoren<sup>1)</sup> sind geneigt, im Eiweissmolekül einen vorgebildeten Pyridinkern anzunehmen, namentlich weil die aus Eiweiss erhältlichen »Melanoidine« bei der Reduction Pyridin liefern<sup>2)</sup> und mit Rücksicht auf die Entstehung der Kynurensäure aus Eiweiss. Diese Annahme wird auf Grund der neuen Tryptophanformel überflüssig.

Es liegt nahe, nach dem im Thierkörper beobachteten Vorgang auch an einen genetischen Zusammenhang zwischen Tryptophan und manchen in den Pflanzen gebildeten Pyridin- und Chinolin-Abkömmlingen zu denken. Auf chemische und physiologische Beziehungen, welche diese Vermuthung stützen, soll an anderer Stelle eingegangen werden.

### Experimentelles.

#### I. Synthese der Indol-Pr-3-Essigsäure.

Käufliche Itaconsäure wurde durch Zufügen von Brom in Itadibrombrenzweinsäure und diese durch Verreiben mit Soda in der Kälte nach der von Metzging<sup>3)</sup> beschriebenen Methode in Aconsäure übergeführt. Die aus Essigester umkrystallisirte Säure wurde mit unwesentlichen Modificationen nach den Angaben von Ungern-Sternberg's in  $\beta$ -Aldehydopropionsäure übergeführt.

12 g Aconsäure wurden mit 360 g Wasser 12 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Das Wasser wurde im Vacuum bei  $35^{\circ}$  abgedampft, der Rückstand mit wenig absolutem Aether aufgenommen und die ätherische Lösung durch ein trocknes Filter gegossen. Der Aether wurde im Vacuumexsiccator über Paraffin verdunstet, und

<sup>1)</sup> Vergl. F. Hofmeister: Ueber Bau und Gruppierung der Eiweisskörper in »Ergebnisse der Physiologie« von Asher und Spiro, I, 1, S. 763 [1902].

<sup>2)</sup> Samuely, Hofmeister's Beitr. z. chem. Physiol. und Pathol. 2, 355 [1902].

<sup>3)</sup> Metzging: Studien über die Aconsäure. Inaugural-Dissertation, Königsberg 1901.

schon nach 20 Stunden war der Rückstand grösstentheils krystallinisch erstarrt, und nach etwa 48 Stunden bestand er ausschliesslich aus Krystallen, soweit sich das mikroskopisch controlliren liess.

Die nicht weiter gereinigte Säure wurde mit Ammoniak neutralisirt und mit der berechneten Menge Silbernitratlösung versetzt. Das gelatinös ausfallende, gelblich gefärbte Silbersalz wurde abgesaugt und, da es offenbar sein Wasser sehr schwer verliert, wiederholt in der Reibschale mit absolutem Alkohol verrieben, wiederum abgesaugt, mit absolutem Alkohol und absolutem Aether gewaschen und im Vacuumexsiccator bis zur Gewichtsconstanz getrocknet.

Das trockne Silbersalz wurde in Aether suspendirt und mit der berechneten Menge Jodmethyl 10 Stunden lang in der Maschine geschüttelt. Nach Abdunsten des Aethers im Vacuum blieb der von v. Ungern-Sternberg<sup>1)</sup> beschriebene und analysirte Methylester der  $\beta$ -Aldehydopropionsäure als zähes Oel zurück.

Der Ester wurde mit wenig absolutem Aether aufgenommen und zu etwas mehr als der theoretischen Menge Phenylhydrazin zugesetzt. Da das Hydrazon nach Abdunsten des Aethers im Vacuum und längerem Stehen nicht krystallisirte, wurde der Rückstand ohne weitere Reinigung mit alkoholischer Schwefelsäure 5 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Auf 4 g Hydrazon wurden 10 ccm concentrirter Schwefelsäure und 90 ccm absoluter Alkohol verwandt.

Die erkaltete Lösung wurde mit 300 ccm Wasser versetzt, worauf sich ein fein vertheiltes Oel ausschied, das durch viermaliges Ausschütteln mit grossen Quantitäten Aether der Lösung entzogen wurde. Der Aether wurde abdestillirt und der Rückstand, welcher noch etwas Alkohol enthielt, mit 20 ccm 10-procentiger, alkoholischer Kalilauge 1 Stunde am Rückflusskühler gekocht. Die erkaltete Flüssigkeit wurde mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt und mit Schwefelsäure angesäuert.

Es entstand sofort ein bräunlicher, ziemlich schmieriger Niederschlag (A), der anscheinend nur zum kleineren Theil aus der gesuchten Säure bestand. Die von dem Niederschlag abfiltrirte Lösung gab selbst in starker Verdünnung die Reactionen der sogen. Skatolcarbonsäure. Sie wurde mit Aether ausgeschüttelt, bis die Rothfärbung mit Eisenchlorid und Salzsäure nur noch ganz schwach auftrat. Der Aether-Rückstand erstarrte im Vacuum-Exsiccator nach 14 Stunden vollständig krystallinisch und wog trocken 1.15 g.

Der Niederschlag A wurde durch wiederholtes Auswaschen mit verdünnter Natronlauge vom Filter gelöst, und in starker Verdünnung

<sup>1)</sup> l. c. S. 19.

mit Schwefelsäure angesäuert. Von dem schmierigen Niederschlag, der abermals entstand, wurde abfiltrirt und das Filtrat ebenfalls mit Aether ausgeschüttelt. Auch diese Aetherextraction ergab einen krystallinischen Rückstand von 0.45 g. Die Gesamtausbeute an roher Säure beträgt demnach ca. 47 pCt. der theoretischen Menge.

Die aus Aether erhaltene Säure wurde nach dem Vorgange von E. und H. Salkowski einmal aus Wasser und einmal aus Benzol umkrystallisirt. Sie krystallisirt in Blättchen wie die Fäulnissäure und schmilzt bei 165° (nach Salkowski bei 164°). Beim Umkrystallisiren, namentlich aus Wasser, erleidet man bedeutende Verluste. Aus der wässrigen Mutterlauge lässt sich durch Neutralisiren mit Ammoniak und Fällung mit Silbernitrat noch analysenreines Silber-salz gewinnen. Der Silbergehalt wurde zu 38.12 pCt. gefunden (ber. 38.30 pCt.)

Die Säure giebt die von E. und H. Salkowski angegebenen charakteristischen Reactionen mit Salzsäure und verdünnter Eisenchloridlösung, mit concentrirter Salzsäure und Chlorkalk, sowie mit Salpetersäure und Kaliumnitrit. Ueber ihren Schmelzpunkt erhitzt, zerfällt sie in Skatol und Kohlensäure.

0.1792 g Sbst.: 0.4510 g CO<sub>2</sub>, 0.0880 g H<sub>2</sub>O. — 0.1750 g Sbst.: 12.2 cem N (17°, 749 mm).

C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>. Ber. C 68.57, H 5.14, N 8.00.  
Gef. » 68.64, » 5.47, » 7.97.

Nach diesen Daten ist an der Identität der synthetischen Indol-Pr-3-Essigsäure mit der bei der Eiweissfäulniss erhaltenen sogen. Skatolcarbonsäure wohl nicht zu zweifeln.

Die Darstellung der Indolessigsäure wird sich künftighin vielleicht noch vereinfachen lassen; denn, wie durch qualitative orientirende Versuche festgestellt wurde, entsteht sie auch beim Kochen des sowohl von Perkin und Sprankling wie von v. Ungern-Sternberg dargestellten Phenylhydrazids des  $\beta$ -Aldehydpropionsäurephenylhydrazons mit alkoholischer Schwefelsäure. Da dieser Körper direct aus der Aldehyd-säure durch Einwirkung von Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung entsteht, liesse sich so die etwas umständliche Darstellung des Esters umgehen.

## II. Uebergang des Tryptophans in Kynurensäure im Organismus des Hundes.

Eine Hündin von etwa 30 kg Gewicht wurde vom 30. März bis 16. April mit 500 g Brot und 1/2 L Milch gefüttert. Vom 2. April an

wurde in der 24-stündigen Harnmenge die ausgeschiedene Kynurensäure nach der Methode von Jaffe<sup>1)</sup> bestimmt. Am 5. April wurden dem Thiere 1.5 g Tryptophan in 3 Dosen in Gelatinecapseln verabreicht, am 11. April 0.9 g in 2 Dosen. Da sich am 4. April Durchfall einstellte, wurden vom 8. an Knochen der Nahrung beigegeben, welche auf die Kynurensäureausscheidung keinen Einfluss haben.

Das Verhalten der Kynurensäureausscheidung zeigt die folgende Tabelle, in welcher die Versuchstage mit \* bezeichnet sind.

Datum	Harnmenge in ccm	Kynurensäure in mg
2./3. April	1320	unwägbare Spur
3./4. »	870	do.
4./5. »	640	10
*5./6. »	1220	<b>220.3</b>
6./7. »	630	34.4
7./8. »	550	33.6
8./9. »	460	4.2
9./10. »	470	3.3
10./11. »	540	2.8
*11./12. »	470	<b>152.2</b>
12./13. »	380	1.2
13./14. »	510	0.3

Von der Reinheit der Kynurensäure überzeugte ich mich durch Bestimmung des Schmelzpunktes, die Jaffe'sche Reaction und Ueberführung in Kynurin bezw. dessen Platinsalz.

Hopkins und Cole geben an, dass aus 100 g Casein etwa 1.5 g Tryptophan zu erhalten sind. Nach den Bestimmungen von Josephsohn scheidet ein Hund etwa von der gleichen Grösse wie das Versuchsthier

nach 100 g Casein, die in Form von Nutrose verfüttert wurden, durchschnittlich 154 mg aus. Die entsprechende Tryptophanmenge, als solche verfüttert, hat fast die doppelte Kynurensäure-Ausscheidung bewirkt. Man darf also die Ausbente an Kynurensäure als eine ausgezeichnete ansprechen, und es liegt vorerst kein Grund vor, noch eine weitere Quelle der Kynurensäure neben dem Tryptophan anzunehmen.

<sup>1)</sup> Nähere Angaben siehe in A. Josephsohn, Beiträge zur Kenntniss der Kynurensäure-Ausscheidung beim Hunde. — Inaug.-Dissertation, Königsberg 1898.