

9. Zur Oxydation des Benzolrings im Tierkörper

von Karl Bernhard und Erich Gressly.

(28. XII. 40)

Nach fortgesetzter Fütterung von täglich 3 g Benzol an Hunde und Kaninchen isolierte Jaffé¹⁾ aus dem Harne der Versuchstiere etwa 0,3% Muconsäure. Da dieselbe nach subcutaner Einspritzung nur zu etwa 1% ausgeschieden wurde, hielt Jaffé die ursprünglich gebildete Menge für bedeutend höher und betrachtete die Oxydation des Benzols zu Muconsäure als eine wesentliche Abbaureaktion.

Normale Stoffwechselprodukte aromatischer Aminosäuren sind beim Menschen die Hippursäure, neben meist gepaarten Phenolen und dem Harn-indican. Jedenfalls scheint der Benzolring zum Unterschied vom Cyclohexanring²⁾ schwer zu verbrennen. Muconsäure gehört nicht zu den Harnbestandteilen, auch nach Fütterung von Phenolen, Homogentisinsäure oder Tyrosin wurde sie nie nachgewiesen.

Mori³⁾ fand von subcutan injizierter Muconsäure 73% wieder auf, Neumaerker⁴⁾, ferner Drummond und Finar⁵⁾ gelangten zu ähnlichen Ergebnissen, die Befunde Jaffe's waren nicht reproduzierbar.

Anderseits enthielt nach Fuchs und Soós⁶⁾ der Harn Leukämiekranker, welche aus therapeutischen Gründen tägliche Dosen von 3—5 g Benzol aufnahmen, 0,11% Muconsäure. Bedeutend mehr, nämlich 2,6% gewannen Thierfelder und Klenk⁷⁾ nach intraperitonealer Benzol-Injektion an ein Kaninchen. Weitere Versuche verliefen erfolglos.

Nach Untersuchungen von Böeseken und Slooff⁸⁾ über die Oxydation von o-Benzochinon mit Peressigsäure müsste bei der Aufspaltung des Benzols in vivo die cis-cis-Muconsäure entstehen, während im Harn die trans-trans-Form vorlag. Es wird daher angenommen, dass dieselbe viel eher aus anderen Quellen, z. B. aus Galaktose entstehen könnte. Drummond und Finar⁵⁾ machten indessen die sonderbare Beobachtung, dass dem Harn Benzol-behandelter Tiere zugesetzte cis-cis-Säure nach 24 Stunden in die trans-trans-Form überging.

¹⁾ Jaffé, M., Z. physiol. Ch. **62**, 58 (1909).

²⁾ Bernhard, K., Z. physiol. Ch. **248**, 256 (1937); **256**, 49 (1938).

³⁾ Mori, Y., J. Biol. Chem. **35**, 341 (1918).

⁴⁾ Neumaerker, H., Z. physiol. Ch. **126**, 203 (1923).

⁵⁾ Drummond, J. C., und I. L. Finar, Biochem. J. **32**, 79 (1938).

⁶⁾ Fuchs, D., und A. von Soós, Z. physiol. Ch. **98**, 11 (1916).

⁷⁾ Thierfelder, H., und E. Klenk, Z. physiol. Ch. **141**, 29 (1924).

⁸⁾ Böeseken, J., und G. Slooff, Proc. Acad. Sci. Amst. **32**, 1043 (1929).

Die Befunde *Jaffé's* wurden demnach in verschiedenen Fällen nicht bestätigt und ihre Interpretation angezweifelt.

Das Verhalten des Benzols im Stoffwechsel konnte durch Anwendung von Deuterium als Index entschieden werden. Deuterio-Benzol wurde bereits eingehend untersucht, eine bequeme Darstellungsmethode stammt von *Ingold, Raisin und Wilson*¹⁾. Den Austausch der H-Atome im Benzol gegen D studierten *Horiuti* und *Polanyi*²⁾.

Muconsäure nimmt in 5-proz. schwerem Wasser in Gegenwart von Kaliumhydroxyd während 24 Stunden erhitzt 0,13 % Deuterium auf. Unter biologischen Bedingungen dürften sowohl Benzol als Muconsäure ihre H- bzw. D-Atome nicht austauschen.

Wir erhielten durch Verdünnen von C_6D_6 mit C_6H_6 ein schweres Benzol mit 10,7 Atom % D, und injizierten es intraperitoneal in täglichen Mengen von 1—1,5 cm³ 17 verschiedenen Kaninchen.

Nur einmal gelang die Auffindung von 24 mg oder 0,5 % chemisch reiner Muconsäure. Ihr D-Gehalt betrug 7,2 Atom %. Schweres und leichtes Benzol wurden demnach gleichmässig in die Dicarbonsäure umgewandelt. Es ist damit der Beweis erbracht, dass der Benzolring im Tierkörper zu Muconsäure oxydiert wird. Über den Abbau von Benzolabkömmlingen, etwa den körpervertrauten aromatischen Aminosäuren soll damit natürlich nichts ausgesagt sein.

Kleine Mengen parenteral und oral gegebener Muconsäure (37, 83, 124 und 217 mg/kg/die) fanden wir überhaupt nicht mehr auf. Sie dürften wohl wie die Adipinsäure³⁾ in kleinen Dosen gegeben weitgehend verbrennen. Ein völliger Abbau des Benzols durch Ringoxydation müsste indessen zu Muconsäure-Mengen führen, die, wie *Mori, Neumaerker* und *Drummond* zeigten, zu einem bemerkenswerten Anteil ausgeschieden werden. Dass Polyen-dicarbonsäuren schwer verbrennen, bewiesen *Kuhn* und *Köhler*⁴⁾. Fütterung von Sorbinsäure-amid lieferte in guter Ausbeute Muconamid-säure, woraus mit Lauge trans-trans-Muconsäure entstand.

Wir glauben daher, dass nur ein geringer Teil des Benzols zur Muconsäure abgebaut wird, es sei denn, die gebildete Dicarbonsäure würde als besonders reaktionsfähig sofort weiter verbrennen und nur zufällig in sehr kleinen Mengen im Harne auftreten.

Für eine schwere Angreifbarkeit spricht auch die hohe Toxizität des Benzols⁵⁾, das sich in den Lipoidanteilen des Gewebes verteilen

¹⁾ *Ingold, C. K., C. G. Raisin und C. L. Wilson*, Soc. 1936, 915; s. a. *Erlenmeyer, H. und H. Lobeck*, Helv. 18, 1464 (1935).

²⁾ *Horiuti, J., und M. Polanyi*, Nature (London) 134, 377 (1934).

³⁾ *Bernhard, K., und M. Andreeae*, Z. physiol. Ch. 245, 103 (1937).

⁴⁾ *Kuhn, R., F. Köhler und L. Köhler*, Z. physiol. Ch. 247, 197 (1937).

⁵⁾ *Houben, J.*, Fortschr. der Heilstoffchemie, Abt. II. 2, 1 (1932).

dürfte. *Jaffé* beobachtete bei Hunden Störungen, bei Kaninchen aber eine gute Verträglichkeit. Nach intraperitonealer Injektion stellten sich nach kurzer Zeit mehr oder weniger schwere Vergiftungsscheinungen ein, die von verschiedenen Tieren nicht überstanden wurden.

Experimenteller Teil.

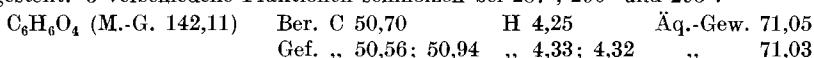
Die Deuterium-Bestimmungen erfolgten nach dem Verfahren von *Keston, Rittenberg und Schoenheimer*¹⁾.

Zur Isolierung der Muconsäure aus dem Harn hielten wir uns an die Angaben *Neumaerker's*²⁾. Wir extrahierten die Harnkonzentrate in den meisten Fällen während 6—7 Stunden mit siedendem Essigester, verschiedene Male aber auch in der Kälte durch 3maliges 5stündiges Schütteln auf einer Maschine. Einige Modellversuche bewiesen die Brauchbarkeit der Arbeitsweise. Aus der folgenden Tabelle ist ersichtlich, dass die dem Kaninchenharn als Natriumsalz zugesetzte Muconsäure befriedigend zurückgewonnen werden konnte. Mengen unter 10 mg dürften bei der notwendigen Behandlung der stark braunen Extrakte mit Kohle verloren gehen.

Harn-Menge cm ³	Zugesetzte Muconsäure		Aufgefundene Muconsäure			
	mg	Smp.	Menge mg	Smp.	Äq.-Gew.	Ausbeute %
100	70	287°	30,0	291°	69,9	43
500	50	290°	13,0	290°	69,5	26
500	100	287°	39,4	289°	70,3	40
500	100	287°	55,2	285°	*	55
1000	100	290°	46,9	290°	*	47

* Äq.-Gew. nicht bestimmt.

Die verwendete Muconsäure wurde nach *Stephen und Weizmann*³⁾ und *Ingold*⁴⁾ hergestellt. 3 verschiedene Fraktionen schmolzen bei 287°, 290° und 295°.



Zur Kontrolle des Austausches der H-Atome in der Muconsäure gegen Deuterium wurden 500 mg derselben mit 785 mg Kaliumhydroxyd (entspr. 4 Mol) in 25 cm³ Wasser, enthaltend 5 Atom % D während 24 Stunden am Rückfluss erhitzt. Nach Abdestillieren des schweren Wassers lösten wir den im Vakuum getrockneten Rückstand in heissem Wasser und versetzten mit verdünnter Salzsäure. Die abgeschiedene Muconsäure wurde in das

¹⁾ *Keston, A. S., D. Rittenberg und R. Schoenheimer, J. Biol. Chem.* **122**, 227 (1937/38).

²⁾ *Neumaerker, H., Z. physiol. Ch.* **126**, 203 (1923).

³⁾ *Stephen, H., und Ch. Weizmann, Soc.* **103**, 269 (1913).

⁴⁾ *Ingold, C. K., Soc.* **119**, 951 (1921).

Ammoniumsalz übergeführt und wieder mit Säure gefällt. Sie schmolz aus Alkohol umkristallisiert bei 293° und enthielt 0,13 Atom% D.

Stoffwechselversuche mit Muconsäure. Reine Muconsäure wurde als Natriumsalz in 3 Versuchen einem Kaninchen injiziert und einem andern Tier verfüttert (vgl. Tabelle). In den während 48—96 Stunden gesammelten Harnmengen war in keinem Fall unveränderte Dicarbonsäure aufzufinden.

Gew. des Tieres g	Muconsäure		
	Applikation	mg/kg die	total mg
2450	intraperitoneal	37	90
2400	intraperitoneal	83	200
2420	intraperitoneal	124	300
2300	per os	217	500

Injektion von Deuterio-Benzol. Gesunde, mit Runkelrüben gefütterte Kaninchen erhielten eine oder mehrere intraperitoneale Benzol-Injektionen von je 1—1,5 cm³ (1 cm³ = 885 mg). Die stark braunen Harne wurden bis 48 Stunden nach der letzten Einspritzung gesammelt und nach den Erfahrungen der Modellyversuche aufgearbeitet. Extraktionsdauer 7—17 Stunden. Alle Einzelheiten ergeben sich aus der Tabelle.

Vers. Nr.	Tier	Benzol				Mucon- säure im Harn	Bemerkungen	
		Gew. g	pro Injektion		total			
			cm ³	mg/kg/die	cm ³	g		
1	m	1940	1	460	3	2,65	—	
2	w	2020	1	438	1	0,88	—	
3	m	2700	1	328	2	1,77	—	
4	m	2300	1	385	3	2,65	24 mg	
5	w	2450	1	361	3	2,65	?	
6	m	2050	1	432	2	1,77	—	
7	m	2500	1,2	426	1,2	1,06	—	
8	m	1950	1,3	590	2,6	2,30	—	
9	m	1530	1,2	696	2,4	2,12	—	
10	m	2200	1,5	605	3,0	2,65	—	
11	m	2540	1,5	525	4,5	3,98	—	
12	m	2200	1,5	605	1,5	1,33	—	
13	w	1900	1,5	702	1,5	1,33	—	
14	m	2200	1,5	605	4,5	3,98	—	
15	m	2400	1,5	555	3,0	2,65	?	
16	w	2400	1,5	555	3,0	2,65	?	
17	m	2440	1,5	545	3,0	2,65	?	

Die Autopsie der Tiere ergab keine makroskopischen Veränderungen. In einigen Fällen war das Benzol in der Bauchhöhle als feine Tröpfchen und durch den Geruch nachweisbar.

Bei Versuch 4 erhielten wir 38,4 mg braune Krystalle von Smp. 285° und daraus durch Behandlung des Ammoniumsalzes mit Tierkohle 24 mg bei 295° schmelzende reine Muconsäure. Im Mischschmelzpunkt mit synth. Muconsäure zeigte sich keine Depression.

3,299 mg gaben 6,16 mg CO₂ und 1,27 mg H₂O
Gef. C 50,92 H 4,31

D-Bestimmung. Da nur eine geringe Menge Substanz vorhanden war und die Muconsäure bei der Verbrennung wenig Wasser liefert, war eine entsprechende starke Verdünnung des Präparates mit gewöhnlicher Muconsäure notwendig.

Einwage: 17 mg aus Harn isolierte Muconsäure
486,1 mg chemisch reine Muconsäure

D-Gehalt des Verbrennungswassers: 0,243 } 0,24 Atom %
0,246 }

Wirklicher D-Gehalt der isolierten Muconsäure: Gef. 7,21
Atom %.

Zusammenfassung.

1. Es wurde das Verhalten des Benzols im intermediären Stoffwechsel unter Anwendung von Deuterium als Index geprüft.

2. Nach intraperitonealer Injektion von Deuterio-Benzol an Kaninchen konnte im Verlaufe von 17 Versuchen nur einmal eine geringe Menge Muconsäure isoliert werden. Sie war Deuterium-haltig. Damit ist die Oxydation des Benzols zu Muconsäure im Tierkörper bewiesen.

3. Kleine Mengen per os und parenteral gegebener Muconsäure verbrennen. Die Befunde Jaffe's haben wir auch in dieser Hinsicht bestätigt.

Wir danken der *Rockefeller Foundation* für die Unterstützung dieser Arbeit.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Zürich.