

KARL THOMAS und KARLHEINZ STALDER

ISOLIERUNG VON METHYLMALONSÄURE AUS NORMALEM MENSCHLICHEM HARN

Aus der Medizinischen Forschungsanstalt (Biochemische Abteilung)
der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen
(Eingegangen am 28. Januar 1957)

B. Helferich zum 70. Geburtstag gewidmet

Die bisher nur im Rattenharn als normaler Bestandteil gefundene Methylmalonsäure konnte auch aus normalem menschlichem Harn isoliert werden.

Das spurenweise Vorkommen von Malonsäure im Harn wurde in einer früheren Arbeit mitgeteilt¹⁾. Dieser Befund ist besonders bemerkenswert, da die Malonsäure *in vitro* die Bernsteinsäuredehydrase stark hemmt²⁾ und sich *in vivo* als toxisch erweist^{3,4)}.

E. BOYLAND und A. A. LEVI⁵⁾ fiel 1936 im Rattenharn — zuerst nach Fütterung mit Anthracen bei Arbeiten über den Abbau polycyclischer Verbindungen — eine ätherlösliche Säure auf, die sich als Methylmalonsäure identifizieren ließ. Sie konnte dann auch aus dem Harn normal gefütterter Ratten isoliert werden, nicht jedoch aus Menschen- und Kaninchenharn. Kürzlich fanden M. FORBES, L. A. BARNES, H. MOKSI und P. GYÖRGY⁶⁾ sie im Harn von Ratten, denen experimentell eine Leberschädigung gesetzt worden war. Nach Fütterung von methylverzweigten Fettsäureamiden an Hunde konnten in unserem Hause von WEITZEL und Mitarbeitern verzweigte Dicarbonsäuren, darunter Methylmalonsäure im Harn nachgewiesen werden⁷⁾. Die Herkunft der Dicarbonsäure aus den verfütterten verzweigten Fettsäuren liegt in dieser Arbeit auf der Hand. Als normaler Bestandteil war die Methylmalonsäure bisher nur im Rattenharn gefunden worden, und es sah so aus, als ob es sich hierbei um eine Stoffwechselbesonderheit der Ratte handelte.

Wir konnten jedoch jetzt mit chromatographischen Methoden auch aus dem normalen menschlichen Harn Methylmalonsäure isolieren. Über weitere Untersuchungen zur Biologie der Methylmalonsäure wird in Kürze an anderer Stelle berichtet werden⁸⁾.

Im Ätherextrakt des Harns, aus dem BOYLAND und LEVI⁵⁾ die Methylmalonsäure durch Umkristallisieren gewannen, ist eine Vielzahl organischer Säuren zu erwarten. Das Abtrennen einer bestimmten Säure durch Auskristallisieren ist daher von der Art der übrigen Bestandteile und den Mengenverhältnissen abhängig. Eine von uns früher benutzte Methode zur Be-

1) K. THOMAS und H. KALBE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **293**, 239 [1953].

2) J. H. QUASTEL und W. R. WOOLDRIDGE, Biochem. J. **22**, 689 [1928].

3) F. E. KRUSIUS, Acta physiol. scand. **2**, Suppl. 3, 105 [1940].

4) S. FORSSMAN, Acta physiol. scand. **2**, Suppl. 5, 102 [1941].

5) Biochem. J. **30**, 2007 [1936]. ⁶⁾ Proc. Soc. exp. Biol. Med. **84**, 162 [1953].

7) G. WEITZEL, H. SCHÖN und H. KALBE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **295**, 173 [1953].

8) K. THOMAS, H. KALBE, J. NAGAI und K. STALDER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck.

stimmung der Bernsteinsäure⁹⁾, die auch zur Isolierung anderer Dicarbonsäuren aus dem Harn anwendbar ist, trennt die Säuren daher durch fraktionierte Destillation ihrer Ester. Noch kleinere Mengen sind mit chromatographischen Methoden erfassbar. Eine papierchromatographische Methode¹⁰⁾ wurde von uns bereits in einigen Arbeiten herangezogen^{1,7)}.

Auch die Verteilungschromatographie am Kieselgel erwies sich zur Trennung organischer Säuren als geeignet. F. A. ISHERWOOD¹¹⁾ wandte sie mit 0.5 *n* H₂SO₄ als stationärer Phase und Chloroform-Butanolkemischen steigender Butanolkonzentration (10%, 20%, 35%) für eine Reihe Pflanzensäuren, darunter auch kurzkettige Dicarbonsäuren an. E. KLENK und W. BONGARD¹²⁾ benutzten in ihrer Methode zur Trennung der Dicarbonsäuren von C₆ – C₁₂, ausgehend von V. MOYLE, E. BALDWIN und R. SCARISBRICK¹³⁾, Phosphatpuffer als stationäre Phase, für Säuren mit geringerer Kettenlänge das ISHERWOODSche Verfahren mit modifizierter Butanolkonzentration (1%, 3%, 5%, 10%, 20%).

Wir haben das Gemisch der ätherlöslichen, petrolätherunlöslichen Säuren des untersuchten Harns zunächst nach der von ISHERWOOD¹¹⁾ angegebenen, von KLENK und BONGARD¹²⁾ weiterentwickelten Methode untersucht. Bei Chromatographie am Kieselgel findet sich bei 7.5% Butanolgehalt des Lösungsmittels eine Fraktion, die papierchromatographisch u. a. einen Fleck mit dem R_S-Wert der Methylmalonsäure (siehe Tab. 1) zeigt. Es wurde auf zwei Wegen versucht, die Säure präparativ rein herauszuarbeiten:

1. wurde eine weitergehende Abstufung der Butanolkonzentrationen vorgenommen, die aber auch zu keiner einheitlichen Methylmalonsäurefraktion führte. Anschließende Chromatographie derselben¹⁴⁾ mit Äther an Kieselsäure mit 0.5 *n* H₂SO₄ als stationärer Phase (MAe) befreite sie zwar von einigen Nebenbestandteilen, die erhaltene Substanz war aber noch immer schmierig und erforderte zur Reinigung weitere verlustbringende Manipulationen.

2. wurde das Rohsäuregemisch zunächst mit Benzol-Äthergemischen steigender Ätherkonzentration als mobiler Phase getrennt (MB). Die Fraktionen wurden papierchromatographisch kontrolliert; die Fraktion, bei der sich dabei Flecken mit den R_S-Werten der Methylmalonsäure zeigten, wurde an einer Kieselgelsäule mit Chloroform-Butanol (MC) weiter aufgetrennt.

Erneut ergab sich eine Reihe mehr oder weniger scharf abgegrenzter Fraktionen. Eine davon enthielt Methylmalonsäure, wie sich bei Papierchromatographie in drei Lösungsmittelgemischen zeigte, nur noch von einer, im basischen Lösungsmittel E abtrennbaren Substanz begleitet. Durch mehrfach wiederholte Sublimation bei 80°/1 Torr bzw. durch präparative Papierchromatographie und anschließende Vakuumsublimation ließ sich ein reines Präparat mit folgenden Eigenschaften gewinnen:

R_S-Werte s. Tab. 1; Schmp. 131° (unkorr.). Die Farbreaktion nach O. RIESTER mit 1.3.3-Trimethyl-indolin-2-methen- ω -aldehyd¹⁵⁾ war positiv. Das Infrarotspektrum

9) K. THOMAS und G. WEITZEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **282**, 170 [1947].

10) H. KALBE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **297**, 19 [1954].

11) Biochem. J. **40**, 688 [1946].

12) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **290**, 181 [1952].

13) Biochem. J. **43**, 308 [1948].

14) Ähnlich wie bei E. F. PHARES, E. H. MOSBACH, F. W. DENISON und S. F. CARSON, Analytic. Chem. **24**, 660 [1952].

15) Unveröffentlicht. Wir danken Herrn Dr. RIESTER für die entgegenkommende Mitteilung der beschriebenen Reaktion, der AGFA AKTIENGESELLSCHAFT FÜR PHOTOFABRIKATION, Leverkusen, für die freundliche Überlassung des genannten Aldehyds.

stimmt gut mit dem der synthetischen Methylmalonsäure überein. Es finden sich Banden bei 2960 cm^{-1} (CH_3 -Valenzschwingung), 1460 cm^{-1} ($\text{C}-\text{CH}_3$ -Deformationschwingung), $2500-2700\text{ cm}^{-1}$ (OH-Valenzschwingung), 1700 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ -Valenzschwingung) und die in der Regel bei Carbonsäuren beobachteten Banden bei 1420 und 1450 cm^{-1} .

Eine kleine Menge der Substanz wurde weiterhin im verschlossenen Röhrchen längere Zeit auf 180° erhitzt. Es trat Zersetzung ein. Papierchromatographisch zeigte sich jetzt der R_S -Wert der Propionsäure (Tab. 1).

Tab. 1. R_S -Werte

Lösungsmittelsystem	% R_S -Wert*)	Vergleichssubstanz**)
B	22.0	22.0 (Methylmalonsäure)
C	44.0	43.0 (Methylmalonsäure)
E	26.0	25.0 (Methylmalonsäure)
E	131.0***)	128.0 (Propionsäure)

B: Xylol-Phenol-85-proz. Ameisensäure 7:3:1 (g/g/v); C: Isoamylformiat-Wasser-98/100-proz. Ameisensäure 11:1:2 (v/v/v); E: Isopropylalkohol-Ammoniumcarbonat-Pufferlösung (1.50 *n* Ammoniumcarbonat in 3.00 *n* Ammoniak) 3:1 (v/v).

*) Wanderungsstrecke bezogen auf Sebacinäure gleich 100.

**) jeweils auf dem gleichen Bogen mitgelaufen.

***) nach dem Erhitzen auf 180° .

Da wir auch in anderen Ansätzen immer wieder dort, wo Methylmalonsäure auftreten sollte, einen Hinweis für sie gefunden haben, halten wir ihr regelmäßiges Vorkommen für gesichert. Von den Mengen, in denen sie vorkommt, läßt sich nur sagen, daß sie sehr gering sind, etwa 10mal weniger als Bernsteinsäure, von der wir früher 2–12 mg je Tagesmenge menschlichen Harns gefunden haben¹⁶⁾. Danach würde Methylmalonsäure also in der Größenordnung von nicht mehr als 1 mg vom Menschen im Tag ausgeschieden werden.

Wir danken Herrn ERNST BOHN und Herrn DETLEV LUCKMANN für fleißige und verständnisvolle experimentelle Mitarbeit sowie der Firma BAYER, Leverkusen, für kostenlose Überlassung von Versuchsmengen Lewatit. Die Untersuchung wurde durch die Hauptverwaltung der BERGBAU-BERUFGENOSSENSCHAFT, Bochum, gefördert. Die Infrarotspektren verdanken wir Herrn Dr. B. FRANCK (Göttingen).

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

20 l Harn von mehreren stoffwechselgesunden Männern wurde i. Vak. bei 50° auf etwa $1/10$ eingengt, mit Phosphorsäure bis p_H 1 angesäuert, durch Kieselgur filtriert und 3 Tage mit täglich gewechseltem Äther im Kutscher-Steudel-Apparat extrahiert. Der Rückstand des mit Na_2SO_4 getrockneten und filtrierten Äthers (Entfernung im wäbr. Äther mitgeschleppter, in Äther schwer- oder unlöslicher Harnbestandteile) wurde in Wasser aufgenommen und über einen stark basischen Anionenaustauscher gegeben (Lewatit MN; OH^\ominus -Form). Der beladene Austauscher wurde mit einigen Litern dest. Wassers nachgewaschen und anschließend mit 1 *n* $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ eluiert. Dann wurde angesäuert und wie oben extrahiert. Beim Trocknen des so gewonnenen Rohsäuregemisches i. Vak. über KOH wurde zugleich der größte Teil der

¹⁶⁾ G. WEITZEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **282**, 174 [1947].

flüchtigen Säuren entfernt. Durch erschöpfendes Auskochen mit Petroläther (Sdp. 40–60°) wurden schwerer flüchtige petrolätherlösliche Säuren (höhere Fettsäuren, Benzoesäure) abgetrennt.

Chromatographie

1. *Silicagel*: Kieselsäure der Fa. Mallinckrodt wurde mit der stationären Phase (7 ccm 0.5 *n* H₂SO₄ pro 10 g) im Becherglas verrührt, bis sie wieder einen staubtrockenen Eindruck machte, dann mit dem Lösungsmittel, das zuerst benutzt werden sollte, in die Säule eingeschlämmt. Im allgemeinen war dies Chloroform mit 1% Butanol bzw. Benzol mit 5% oder 10% Äther.

Es wurden Säulen mit einer Füllung von 10 g, 100 g und 300 g Silicagel benutzt, je nach der Menge des einzusetzenden Säuregemisches. Bei der Beladung der Säulen wurde das Verhältnis 1:100 zwischen Säuregemisch und Silicagel möglichst nicht überschritten, in der Regel wurde ein Verhältnis 1:200 eingehalten.

2. *Lösungsmittel*: Benzol depur. (Riedel-de Haën) wurde mehrfach mit konz. Schwefelsäure auf der Maschine ausgeschüttelt, bis die Schwefelsäure ungefärbt blieb; dann wurde mit Wasser, 10-proz. Natronlauge und wieder mit Wasser geschüttelt, über CaCl₂ getrocknet und über eine 30–40 cm hohe Füllkörperkolonne abdestilliert.

Chloroform, DAB 6, wurde mit konz. Schwefelsäure wie oben, mit Wasser und 2 *n* Na₂CO₃ ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und über P₂O₅ abdestilliert. Dann wurde es über Al₂O₃ aufbewahrt.

Äther, DAB 6, wurde wie Benzol behandelt.

n-Butanol (Riedel-de Haën) wurde durch Destillation über eine Füllkörperkolonne gereinigt. Sdp. 117°.

Die Zusammensetzung der zum Eluieren benutzten verschiedenen Lösungsmittelsysteme zeigt Tab. 2.

Sämtliche Lösungsmittelgemische wurden mit 0.5 *n* H₂SO₄ gesättigt und durch ein trockenes Faltenfilter filtriert.

Tab. 2. Zum Eluieren der Kieselgelsäulen benutzte Lösungsmittelsysteme

Kennbuchst.	1. Bestandteil	2. Bestandteil	in Vol. %
MC	Chloroform	<i>n</i> -Butanol	1; 3; 5; 7.5; 10; 15 bzw. 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 15
MB	Benzol	Äther	10; 20; 30 bzw. 5; 10; 15; 20; 30
MAe	Äther	—	—

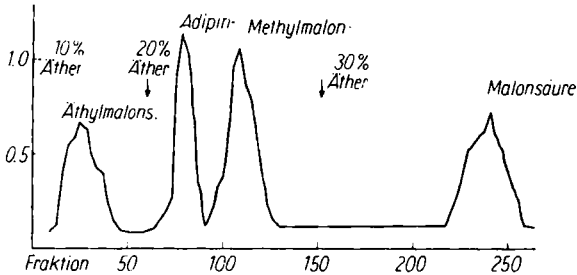
3. *Auftragen des zu trennenden Säuregemisches*: Bei den MC-Säulen wurde das Säuregemisch in tert.-Pentanol gelöst, danach so viel Chloroform zugegeben, daß die Alkoholkonzentration nicht mehr als 1% betrug. Diese Lösung wurde über die Säule gegeben, anschließend die Säule mit einer Schutzschicht aus Silicagel und einem Rundfilter abgeschlossen. Bei den MB- und MAe-Säulen wurde die Versuchssubstanz in Äther gelöst und auf eine kleine Menge Silicagel aufgezogen (bei 10-g-Säulen: 1 g; bei 100-g-Säulen: 5 g). Dieses Silicagel wurde mit dem Lösungsmittelgemisch, mit dem das Eluieren beginnen sollte, auf die vorbereitete Säule gespült und diese durch Schutzschicht und Rundfilter wie oben abgeschlossen.

4. *Fraktionierung*: Das von den Säulen ablaufende Eluat wurde mit einem Fraktionsschneider in jeweils gleiche Volumina getrennt. Wir benutzten vorwiegend ein von A. T. JAMES, A. J. P. MARTIN und S. S. RANDALL¹⁷⁾ angegebene Modell, das in unserem Hause angefertigt wurde.

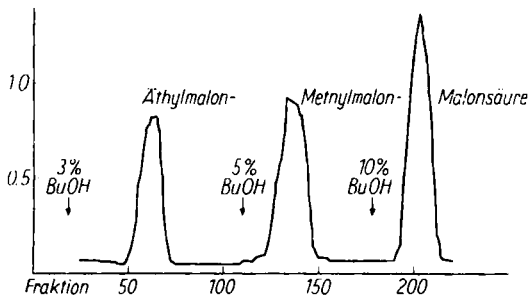
¹⁷⁾ Biochem. J. 49, 293 [1951].

Als Fraktionsvolumina wurden 3,5, 6 und 9ccm gewählt, je nach Größe der Säule. Die Fraktionen bzw. aliquote Teile wurden nach Zugabe einer bestimmten Menge Methanol mit $n/100$ methanol. KOH gegen Kresolrot titriert und entsprechend den Maxima der Titrationskurven zusammengefaßt, titrierte und untitrierte Anteile gesondert. Abdestillieren des Lösungsmittels.

5. *Modellversuche*: Die Trennwirkung der MB-Säule für Adipinsäure, Malonsäure, Methylmalonsäure und Äthylmalonsäure zeigt Abbild. 1. Abbild. 2 zeigt entsprechend die Trennwirkung der MC-Säule. Die MAe-Säule trennt die kurzkettigen Dicarbonsäuren nicht, sie wurde nur in einem Versuche zur Reinigung der Methylmalonsäure herangezogen. Methylmalonsäure bricht an einer 10-g-Säule bereits in den ersten 10–20 Fraktionen durch.



Abbild. 1. Verteilungschromatographie von Adipin-, Äthylmalon-, Methylmalon- und Malonsäure. Säule MB (10 g Silicagel). Eingesetzte Mengen je 10 mg. Wiedergewonnen: Adipinsäure 86,9%; Äthylmalonsäure 79,2%; Methylmalonsäure 99,1%; Malonsäure 68,2%. Ordinate: ccm 0,0108 n KOH in Methanol.



Abbild. 2. Verteilungschromatographie von Äthylmalon-, Methylmalon- und Malonsäure. Säule MC (10 g Silicagel). Eingesetzte Mengen je 10 mg. Wiedergewonnen: Äthylmalonsäure 73,9%; Methylmalonsäure 81,15%; Malonsäure 96,95%. Ordinate: ccm 0,0108 n KOH in Methanol.

6. *Papierchromatographie*: Siehe KALBE¹⁰⁾. Benutzt wurden vorwiegend die dort angegebenen Lösungsmittelgemische B, C und E.

7. *Farbreaktion nach Riester*¹⁵⁾: 50 mg 1.3.3-Trimethyl-indolin-2-methen- ω -aldehyd wurden in 1ccm Eisessig gelöst und 5ccm Acetanhydrid zugefügt. Zu 100–200 γ zu untersuchender Substanz wurde 1ccm von diesem Reagens gegeben. Monosubstituierte Malonsäuren und Malonsäure selbst bilden bei 15–20stdg. Aufbewahren bei Zimmertemperatur im verschlossenen Röhrchen (Ausschluß der Luftfeuchtigkeit) einen tiefblauen Farbstoff, dessen UV-Spektrum ein Absorptionsmax. bei 634 μ zeigt.

8. *Testsubstanzen*: Oxalsäure (C₂) Merck p. A., Schmp. 101°. — Malonsäure (C₃) Merck p. A., Schmp. 135°. — Bernsteinsäure (C₄) Merck p. A., Schmp. 185°. — Glutarsäure (C₅) Handelspräparat, aus Benzol umkrist., Schmp. 97°. — Adipinsäure (C₆) Merck, Schmp. 151°. — Methylmalonsäure aus dem Diäthylester (Fluka, isomerenfrei), Schmp. 133°. — Äthylmalonsäure aus dem Diäthylester (Riedel-de Haën), Schmp. 105–107°.