

Ueber die Quelle der Hippursäure im Harn.

Von

Dr. C. Schotten.

Privatdocent an der Universität Berlin.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts.)
(Der Redaction zugegangen am 20. August 1883.)

Während die Abstammung der aromatischen Oxy Säuren und der Phenole vom Eiweiss durch Feststellung der Beziehungen derselben zum Tyrosin, als näherem Spaltungsprodukt des Albumins, insbesondere durch die Arbeiten von Baumann¹⁾ vollkommen klar gelegt ist, ist man über die Herkunft der Hippursäure bis jetzt in Unkenntniss gewesen.

Zwar ist man, nachdem Schultzen²⁾ im Harn eines hungernden Menschen, Salkowski³⁾ in dem des hungernden Hundes Hippursäure aufgefunden hatten und nachdem Salkowski und Weyl und Anrep die schon von Meissner und Shepard beobachtete Thatsache bestätigt hatten, dass der Harn der Hunde auch bei reiner Fleischkost nie frei von Hippursäure ist, von der früher hier und da ausgesprochenen Ansicht abgekommen, die Hippursäure stamme, was ihren stickstofffreien Paarling angeht, aus Kohlehydraten oder aus dem Organismus in der Nahrung präformirt zugeführten Benzoylderivaten und ist dafür wohl allgemein zu der Ueberzeugung gelangt, dass das Eiweiss die Muttersubstanz der Hippursäure sei. Aber welches unmittelbare Spaltungsprodukt des Eiweisses zur Bildung der Hippursäure Anlass gebe, sowie

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 282.

²⁾ Archiv für Anatomie und Physiologie 1863, S. 25 und 38.

³⁾ Virchow's Archiv, Bd. 73, S. 409

das Tyrosin zur Bildung der aromatischen Oxysäuren und Phenole, darüber sind bis jetzt höchstens Vermuthungen ausgesprochen worden¹⁾. Salkowski glaubte das Räthsel gelöst zu haben, nachdem es ihm gelungen war²⁾, aus den Fäulnisprodukten von Albuminstoffen Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure zu isoliren und durch Fütterungsversuche von der letzteren festzustellen³⁾, dass sie im Organismus in Benzoësäure verwandelt wird und als Hippursäure im Harn austritt. Die Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure leitet aber Salkowski⁴⁾, ebenso wie die hydroxylierten Säuren, vom Tyrosin ab, da er sie unter den Fäulnisprodukten des letzteren gefunden hat. Gegen diese Deduction spricht erstens, dass man noch nie, weder bei der Fäulnis ausserhalb des Organismus, noch bei den Umsetzungsprozessen innerhalb desselben eine Reduktion der Phenolhydroxylgruppe beobachtet hat, zweitens, dass Benzoësäure nicht durch Reduktionsmittel, sondern im Gegentheil durch energische Oxydationsmittel direkt aus dem Eiweiss dargestellt worden ist, drittens die Erfahrungen von Baumann⁵⁾, welcher niemals unter den Fäulnisprodukten des Tyrosins Phenyllessigsäure oder Phenylpropionsäure nachweisen konnte, obwohl er des Oeffteren grosse Mengen von Tyrosin in Arbeit genommen hat. Es bleibt also die Möglichkeit, dass das von Salkowski benutzte Tyrosin kein reiner Körper gewesen ist und möglicher Weise die Amidosäure enthalten hat, welche im Folgenden als Quelle der Hippursäure im Harn angesprochen werden soll, die α -Amidophenylpropionsäure. Diese Säure haben Schulze und Barbieri schon vor mehreren Jahren⁶⁾ aus den Lupinenkeimlingen durch Extraktion mit Alkohol und neuerdings⁷⁾ aus dem Eiweiss der Kürbissamen

¹⁾ Vergl. Tiemann: Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XIII, S. 385.

²⁾ Ebendasselbst, Bd. XII, S. 407 und 648.

³⁾ Ebendasselbst, Bd. XII, S. 653.

⁴⁾ Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. VII, S. 450.

⁵⁾ Ebendasselbst, Bd. VII, S. 553.

⁶⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XIV, S. 1785.

⁷⁾ Ebendasselbst, Bd. XVI, S. 1711.

durch Kochen mit Salzsäure und Zinnchlorür dargestellt. Die Autoren sprechen selbst die Vermuthung aus, dass die Amidophenylpropionsäure, was ja auch an und für sich wahrscheinlich ist, auch aus dem Eiweiss anderer Pflanzen zu erhalten ist, die bis jetzt noch nicht darauf untersucht wurden.

Ist somit die Amidophenylpropionsäure ein Spaltungsprodukt des Eiweisses, insbesondere des Pflanzeneiweisses, so ist wohl die Annahme gestattet, dass sie die Muttersubstanz der Hippursäure sein möge und Fäulnis- und Fütterungsversuche mit dieser Säure sind angezeigt. Einen Fäulnisversuch hat Baumann¹⁾ bereits ausgeführt: er liess 0.5 gr. der aus Lupinenkeimlingen herrührenden Säure mit Pancreas faulen und erhielt dabei Phenyllessigsäure. Die letztere geht nun allerdings, wie Salkowski²⁾ gezeigt hat, im Organismus nicht in Hippursäure über, sondern sie tritt unoxydirt als Phenacetursäure im Harn aus. Der Versuch von Baumann schliesst aber nicht aus, dass bei anders geleiteter Fäulnis auch Phenylpropionsäure aus der Amidosäure entstehen kann. Hat doch auch Salkowski bei seinen Versuchen aus Hornsubstanz, Serumalbumin und Wolle nur Phenyllessigsäure, keine Phenylpropionsäure erhalten, aus Fibrin nur Phenylpropionsäure, aus frischem Fleisch aber, je nach der Dauer der Einwirkung, sowohl die eine als die andere Säure erhalten. Ausgiebigen Fäulnis- und Fütterungsversuchen steht zur Zeit noch die Schwierigkeit entgegen, mit der die Amidophenylpropionsäure herzustellen ist. Es ist mir indess doch gelungen, einen, obwohl mit geringer Menge angestellten, so doch massgebenden Versuch über das Verhalten der α -Amidophenylpropionsäure im Organismus anzustellen. Die zu diesem Versuche verwendete Säure habe ich mir nach dem von Erlenmeyer und Lipp³⁾ angegebenen Verfahren aus Phenyllessigsäurealdehyd synthetisch dargestellt, da diese Säure sowohl nach der Ansicht von

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 282.

²⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XII, S. 653.

³⁾ Ebendasselbst, Bd. XV, S. 1006.

Erlemeyer und Lipp, als nach der von Schulze und Barbieri mit der Säure aus Lupinenkeimlingen identisch ist. Die Darstellung ist eine sehr schwierige, da sowohl die Herstellung des Phenyllessigsäurealdehyds durch Destillation des phenyllessigsauren Kalks mit Ameisensaurem Kalk, als auch die weitere Behandlung mit Blausäure und Ammoniak nur schlechte Ausbeuten liefert, sodass ich aus einer ziemlich grossen Quantität Phenyllessigsäure noch nicht 1 gr. der α -Phenylamidopropionsäure erhielt. Die Säure besass alle die von Erlemeyer und Lipp (loc. cit.) angegebenen Eigenschaften.

Von dieser Säure erhielt ein kleiner, mütterer Hund, der lange Zeit nur mit Fleisch gefüttert worden war, Nachmittags **0,7** gr.

Der Harn wurde bis zum zweiten Vormittag gesammelt mit der Vorsicht, dass in die untergestellte Flasche etwas Alkohol und Salzsäure gegossen wurde, um eine schnelle Zersetzung der Hippursäure durch Fäulniss zu verhindern. Der zweitägige, wie schon gesagt, mit Alkohol und Säure versetzte Harn wurde 3mal mit einer grossen Menge Aether ausgeschüttelt. Jede durch den Scheidetrichter abgetrennte Portion einer ätherischen Lösung pflege ich mit einer geringen Menge (ca. 20 cc.) Wasser durchzuschütteln und längere Zeit absetzen zu lassen. Das Wasser nimmt einen grossen Theil des Harnstoffs und der anorganischen Salze heraus, die immer in eine alkoholisch-ätherische Lösung mit hineingehen. Der nach Abdestilliren des Aethers bleibende Rückstand wurde mit Wasser und reinem Calciumcarbonat gekocht, das Filtrat mit Thierkohle behandelt und die von Neuem filtrirte Lösung eingedampft. Der geringe hier bleibende Rückstand wurde in 25 cc. Wasser gelöst, mit Salzsäure angesäuert und 3mal mit dem gleichen Volumen Essigäther ausgeschüttelt. Ein vierter Auszug nahm nur noch kaum wahrnehmbare Spuren auf. Das Gewicht des nach dem Verdunsten des Essigäthers bleibenden und 24 Stunden in vacuo über Schwefelsäure getrockneten Rückstandes betrug **0,215** gr. und stellte eine schmierige, mit Krystallen durchsetzte Masse dar. Nach dem

Umkrystallisiren des Ganzen aus wenig Wasser unter Zusatz von Thierkohle wurde wenig über 0,01 gr. langer farbloser Nadeln gewonnen, die gegen 186° schmolzen und stickstoffhaltig waren. Unzweifelhaft bestanden sie aus fast reiner Hippursäure. Die Mutterlauge gab mit Millon'schem Reagens stark rothe Reaction, sie enthielt also die normalen Oxy-säuren.

Da die Menge der verfütterten Amidosäure so gering war, wurde sofort ein Controlversuch ausgeführt. Derselbe Hund erhielt, wieder Nachmittags, 0,7 gr. Phenylpropionsäure. Der Harn wurde, wie im ersten Versuch, bis zum zweiten Vormittag gesammelt und genau in derselben Weise behandelt. Das Gewicht des nach Verdunsten des Essigäthers bleibenden Rückstandes betrug in diesem Fall nach 24-stündigem Trocknen in vacuo über Schwefelsäure **0,737** gr. und stellte grosse von etwas harziger Masse durchsetzte Krystalle dar. Durch Umkrystallisiren aus Wasser unter Zusatz von Thierkohle wurde eine erste Krystallisation von reiner Hippursäure gewonnen, die scharf bei 186° schmolz und deren Gewicht 0,182 gr. betrug. Aus den eingedampften Mutterlaugen wurde durch Waschen mit absolutem Aether eine annähernd gleich grosse Menge weniger reiner Säure gewonnen. Im Aether gelöst waren die normalen Oxy-säuren. Nach Fütterung von 0,7 gr. Phenylpropionsäure war also eine um $0,737 - 0,215 = 0,522$ gr. grössere Menge Säure aus dem Harn zu gewinnen, als nach Fütterung der gleichen Menge Amidophenylpropionsäure. Die nach Fütterung der nicht amidirten Säure aus dem Harn dargestellte Menge an reiner Hippursäure übertrifft die nach Fütterung der Amidosäure gewonnene um mindestens das achtzehnfache.

Ob die nach der Eingabe der Phenylamidopropionsäure im Harn aufgefundene Menge Hippursäure eine die normale übersteigende war, lässt sich nach diesem Versuch nicht entscheiden. Sobald mir grössere Mengen der Amidophenylpropionsäure zur Verfügung stehen, werde ich den Versuch wiederholen. Immerhin glaube ich, gestützt auf dieses Experiment und auf die Erfahrungen, welche man über das Ver-

halten des Tyrosins und der aromatischen Oxysäuren im Organismus gemacht hat und welche ich in einer früheren Arbeit¹⁾ eingehend erörtert habe, Folgendes als wahrscheinlich hinstellen zu dürfen: Die α -Amidophenylpropionsäure, ein Spaltungsprodukt des Eiweisses, wie das Tyrosin, wird gleich diesem im normalen Verdauungsprozess fast vollständig verbrannt. Ein kleiner Theil desselben wird aber durch Fäulnisfermente innerhalb des Darms in Phenylpropionsäure verwandelt. Die letztere wird als solche resorbirt, in den Geweben zu Benzoësäure oxydirt und tritt, nachdem sie sich mit Glycocoll gepaart hat, als Hippursäure im Harn aus. Ob der grössere Reichthum des Harns der Herbivoren an Hippursäure auf einer qualitativen Verschiedenheit der als Nahrungstoffe dienenden Eiweisskörper oder ob er nur auf der grösseren Intensität der im Darm der Pflanzenfresser verlaufenden Fäulnisprozesse beruht, lässt sich erst entscheiden, wenn die quantitativen Verhältnisse der bei der Spaltung von Albumin entstehenden Amidosäuren genauer studirt sein werden. Auch darf die Frage noch nicht als erledigt betrachtet werden, ob nicht sowohl im Verlauf der normalen Darmfäulnis, als namentlich in Krankheitszuständen, in welchen die aromatischen Substanzen des Harns eine Vermehrung erfahren, die niedrigere Homologe jener Säure, die Phenyl-essigsäure aus der Amidophenylpropionsäure entstehen kann, welche nach den Versuchen von Salkowski als Phenacetursäure im Harn austritt.

Die Sonderstellung, welche die Amidophenylpropionsäure und das Tyrosin unter allen aromatischen Substanzen dadurch einnehmen, dass sie im Organismus eine nahezu vollständige Verbrennung erfahren, hängt zweifellos nur von ihrer Constitution ab, der Verbindung des im Organismus sonst so beständigen Benzolkerns mit einer drei Kohlenstoffatome enthaltenden Seitenkette, deren mittleres die Amidogruppe bindet. Ich bin davon überzeugt, dass eine dem Tyrosin homologe Säure mit nur zwei Kohlenstoffatomen in der Seitenkette ein von jenem verschiedenes Verhalten im

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 23.

Organismus zeigen würde und behalte mir die Untersuchung dieses Gegenstandes vor, für den Fall, dass die synthetische Darstellung der Amidooxyphenyllessigsäure gelingen sollte.

Einstweilen habe ich den Nachweis geliefert, dass die Amidophenyllessigsäure, welche sich aus Benzaldehyd, Blausäure und Ammoniak leicht in beliebiger Menge darstellen lässt, ein von ihrer höheren Homologen verschiedenes Verhalten im Organismus zeigt, indem ein grosser Theil derselben in Mandelsäure verwandelt im Urin austritt. Die Untersuchung dieser Vorgänge geschah in folgender Weise:

Zunächst wurde das Verhältniss der präformirten Schwefelsäure zur Aetherschwefelsäure im normalen Harn eines Hundes

festgestellt; es ergab sich $\frac{A}{B} = 26$. Der Hund erhielt dann

6,5 gr. Amidophenyllessigsäure. Der Harn vom folgenden Morgen wurde zunächst auf seinen Gehalt an Phenol und Oxysäuren geprüft. Vier cc. desselben wurden mit Salzsäure angesäuert, mit Aether ausgeschüttelt, der Aether verdampft und der Rückstand mit Millon'schem Reagens geprüft: es zeigte sich eine schwächere Rothfärbung, als in dem auf gleiche Weise behandelten Harn des vorhergehenden Tages.

Auch die Färbung des Harns durch Millon'sches Reagens ohne Aetherextraktion war schwächer, als die des normalen. Das Verhältniss der präformirten Schwefelsäure zur Aether-

schwefelsäure stellte sich $\frac{A}{B} = 50$.

Der Hund erhielt um Mittag wieder 6,5 gr. Amidophenyllessigsäure. Auch der Harn des folgenden Morgens zeigte, mit Millon'schem Reagens behandelt, schwächere, als

normale Färbung, das Verhältniss der Schwefelsäuren $\frac{A}{B}$

war = 44:1. Durch die Fütterung der Amidosäure war also eine entschiedene Abnahme der normalen Phenole und Oxysäuren bewirkt worden. Nun wurde der bei Weitem grösste Theil des Harns der zwei Tage, der von diesen Schwefelsäurebestimmungen übrig geblieben war, nachdem er vorher stark mit Salzsäure und Alkohol versetzt worden,

4mal mit Aether ausgeschüttelt. Der nach Abdestilliren des Aethers bleibende Rückstand wurde mit kaltem Wasser aufgenommen. Heisses Wasser nahm aus dem zurückbleibenden Harz nichts auf. Die wässrige Lösung wurde 3mal mit alkoholhaltigem Aether extrahirt, der Aether abdestillirt und die zurückbleibende ölige Säure mit Bariumcarbonat und Thierkohle gekocht. Nach dem Eindampfen des Filtrats auf ein kleines Volumen schieden sich glänzende Blättchen eines Barytsalzes aus. Eine zweite Krystallisation erfolgte nach weiterem Eindampfen. Die Menge der ersten Krystallisation betrug 1,45, die der zweiten 1,5 gr.

Die aus dem Barytsalz in Freiheit gesetzte Säure zeigte alle Eigenschaften der Mandelsäure. Sie war in Wasser ziemlich leicht löslich und krystallisirte daraus in Prismen, die bei 117° schmolzen. Beim Erhitzen der freien Säure, sowohl wie des Barytsalzes trat der Geruch nach Bittermandelöl auf. Von der ersten Krystallisation des Barytsalzes wurde eine Baryumbestimmung ausgeführt. Das Salz enthielt, bei 130° bis zum constanten Gewicht getrocknet, 31,69% Barium; der mandelsaure Baryt verlangt 31,20%.

Nach Eingabe von 13 gr. Amidophenylessigsäure wurden also aus dem Harn 2 gr. reine Mandelsäure dargestellt, entsprechend 15% der eingegebenen Menge Amidosäure. Da aber die Mandelsäure eine in Wasser leicht lösliche Säure ist, so hatte sich jedenfalls ein Theil dem Nachweis entzogen, trotz des 4maligen Extraction des Harns mit Aether. Ein weiterer Theil war beim Umkrystallisiren und dem häufigen Filtriren der Lösungen verloren gegangen; etwas von dem Urin auch schon vorher zu den Schwefelsäurebestimmungen genommen worden. Es folgt also doch aus dem Versuch, dass ein ganz erheblicher Theil der Amidophenylessigsäure im Organismus durch Austausch der Amidogruppe gegen die Hydroxylgruppe in Mandelsäure verwandelt wird. Eine andere Säure, als diese, war nicht aufzufinden; namentlich keine Hippursäure, und dies musste überraschen, da nach den Versuchen von Schultzen und Gräb¹⁾ dem

¹⁾ Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 142, S. 349.

Organismus zugeführte Mandelsäure als Hippursäure im Harn austritt.

Diese Angabe, die in alle Lehrbücher übergegangen ist, bedurfte also einer Prüfung. Die genannten Beobachter führten diese Untersuchungen zu einer Zeit aus, in welcher der Gehalt des normalen menschlichen Harns an Hippursäure noch bedeutend unterschätzt wurde. Nachdem der eine von ihnen Abends 3 gr. Mandelsäure genommen hatte, liess sich aus dem Morgenharn, soviel Hippursäure darstellen, dass eine Elementaranalyse davon ausgeführt werden konnte. Hiernit ist aber noch nicht gesagt, dass die gefundene Menge die normale überstieg. Ich gab nun einem kräftigem Hund mit Fleisch vermengt 10 gr. Mandelsäure und sammelte den Harn bis zum anderen Morgen. Der Harn zeigte, mit Millon'schem Reagens erwärmt, die normale Färbung. Aetherschwefelsäuren waren nur in ganz geringer Menge darin vorhanden; eine quantitative Bestimmung derselben wurde nicht ausgeführt. Der Harn wurde nun aufgeköcht, colirt, mit Salzsäure stark angesäuert und 3mal mit alkoholhaltigem Aether ausgeschüttelt. Der nach Entfernung des Aethers bleibende Rückstand wurde in wenig heissem Wasser aufgenommen und die Lösung zur Krystallisation hingestellt.

Nach mehreren Tagen hatten sich farblose, kurze Prismen abgesetzt, die alle Reaktionen der Mandelsäure gaben. Die Krystalle schmolzen scharf bei 117° und waren vollkommen stickstofffrei. Die Elementaranalyse ergab 63,06% C und 5,39% H, während die Mandelsäure 63,16% C und 5,29% H verlangt. Das Gewicht dieser ersten Krystallisation betrug 1,3 gr. Auch die zweite Krystallisation (1,4 gr.) war stickstofffrei, sie schmolz bei $112-117^{\circ}$ und gab beim Erhitzen den Geruch von Bittermandelöl.

Eine dritte und vierte Krystallisation (zusammen 2,3 gr.) zeigte auch noch diese Reaktion. Der Schmelzpunkt lag freilich etwas tiefer und die Gegenwart der normalen Oxysäuren in diesen beiden letzten Krystallisationen mochte sich durch die rothe Färbung mit Millon'schen Reagens bemerklich. Nach einmaligem Umkrystallisiren zeigte auch diese Säure

den richtigen Schmelzpunkt und erwies sich stickstofffrei. Hippursäure war also in dem Harn nach Fütterung von Mandelsäure überhaupt nicht aufzufinden. Dagegen hatte von der eingegebenen Menge mindestens die Hälfte den Organismus unverändert durchwandert. Danach sind die Angaben der Lehrbücher, welche die Mandelsäure im Organismus in Hippursäure übergehen lassen, zu corrigiren.