

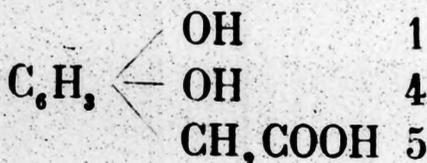
# Ueber das physiologische Verhalten der Gentisinsäure.

Von

**Dr. Alexis Likhatscheff** aus St. Petersburg.

(Aus dem Laboratorium von Prof. E. Baumann in Freiburg i. B.)  
(Der Redaction zugegangen am 28. Oktober 1895.)

Wolkow und Baumann<sup>1)</sup> haben gezeigt, dass die Homogentisinsäure



diejenige Substanz ist, welche das eigenthümliche Verhalten eines von ihnen untersuchten Alkaptonharns bedingte, und dass diese Säure bei der mit Alkaptonurie behafteten Person aus dem Tyrosin entstand. Embden<sup>2)</sup> constatirte dasselbe Verhalten bei einem anderen Fall von Alkaptonurie, der Schwester des von Baumann und seinen Mitarbeitern beobachteten Patienten. Auch in einigen anderen Fällen von Alkaptonurie enthielt der Harn unzweifelhaft Homogentisinsäure. Neuerdings hat Ogden<sup>3)</sup> über einen Fall von Alkaptonurie berichtet, bei welchem die Homogentisinsäure in ungefähr ebenso grossen Mengen wie in dem ersterwähnten Falle sich vorfand. Auch Ogden gelang es, nicht nur ihr Bleisalz, sondern auch die Homogentisinsäure rein darzustellen. Auch dieser Autor fand, dass die Ausscheidung der Homogentisinsäure bei eiweissreicher Diät gesteigert werde und lieferte dadurch eine neue Bestätigung dafür, dass die Muttersubstanz der Homogentisinsäure das Tyrosin ist.

<sup>1)</sup> Wolkow und Baumann, diese Zeitschr., Bd. 15, S. 228, vergl. auch Baumann und Kraske, Münchener med. Wochenschr. 1891, No. 1.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 17, S. 182 und 304.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 20, S. 279.

Der Uebergang des Tyrosins in Homogentisinsäure ist durchaus nicht ohne weiteres verständlich, denn die Constitution beider Körper ist so grundverschieden, dass eine nähere Beziehung beider Körper geradezu ausgeschlossen erscheint.

Um diesen höchst auffälligen Vorgang zu erklären, nehmen Baumann und Wolkow an, dass er durch noch nicht näher definirte Mikroorganismen, deren Wirkung auf das Tyrosin sie mit derjenigen der Bierhefe auf Zucker vergleichen, in den oberen Darmparthieen hervorgerufen wurde. Obgleich diese Theorie noch nicht fest begründet ist und die von Wolkow und Baumann sowie von Embden zu ihrer Bestätigung unternommenen Versuche kein entscheidendes Resultat ergeben haben, so ist doch die Thatsache, dass das Tyrosin unter gewissen Bedingungen im Organismus in Homogentisinsäure übergehen kann, sicher festgestellt.

Ausser der Homogentisinsäure können aber offenbar auch noch andere ihr nahestehende aromatische Substanzen aus dem Tyrosin im Organismus gebildet werden. Dafür spricht wenigstens eine exact durchgeführte Beobachtung. Kirk isolirte aus einem Alkaptonharn eine Säure, die er Urolencinsäure benannte, welche nach Huppert sehr wahrscheinlich als Trioxyphenylpropionsäure  $C_6H_2(OH)_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$  anzusehen ist. Nachdem die Abstammung der Homogentisinsäure aus dem Tyrosin nachgewiesen ist, ist auch die Entstehung der Urolencinsäure mit einiger Wahrscheinlichkeit auf dieselbe Muttersubstanz zurückzuführen und Baumann und Wolkow<sup>1)</sup> nehmen an, dass die Bildung beider Säuren aus dem Tyrosin durch den gleichen Process erfolgt. Nach allem diesem ist die Voraussetzung gestattet, dass es Bedingungen geben kann, unter welchen aus dem Tyrosin auch andere der Homogentisinsäure verwandte Körper entstehen. Es erhebt sich hierbei zunächst die Frage, ob zu ihnen auch die Gentisinsäure zu rechnen sei. Auch diese Säure besitzt reducirende Eigenschaften und ihre alkalischen Lösungen nehmen an der Luft eine dunkle Farbe an, so dass ihr Auftreten im Harn demselben die Eigenschaften eines Alkaptonharns geben müsste.

<sup>1)</sup> L. c.

Daher bot die Untersuchung des Verhaltens der Gentsinsäure im Thierkörper ein gewisses Interesse dar, das übrigens durch die vorstehenden Betrachtungen allein nicht erschöpft ist.

Viele Körper der aromatischen Gruppe verbinden sich im Organismus mit der Schwefelsäure oder dem Glycocoll oder mit Glykuronsäure oder sie gehen zuweilen sowohl die einen als auch die anderen Verbindungen ein. Die Untersuchung der Gentsinsäure in dieser Richtung war von um so grösserer Bedeutung, als diese Beziehungen für die nächsten der ihr verwandten Körper — Homogentsinsäure und Hydrochinon — bereits klar gelegt sind.

Es schien hierbei von Wichtigkeit, weiter zu ermitteln, ob nicht aus der Gentsinsäure im Organismus unter Abspaltung von Kohlensäure Hydrochinon gebildet wird. Eine solche Reaction war aus dem Grunde zu erwarten, weil eine analoge Spaltung schon von Wolkow und Baumann<sup>1)</sup> für die Homogentsinsäure und von Preusse<sup>2)</sup> für die der Gentsinsäure isomere Protocatechusäure constatirt worden ist. Im ersten Fall zerfiel die dem Thier per os zugeführte Homogentsinsäure zum Theil in Tolhydrochinon und Kohlensäure; im zweiten Fall zerfiel die Procatechusäure in Brenzcatechin und Kohlensäure; diese Reactionen sind ihrerseits analog dem Zerfall der Paraoxyphenyllessigsäure in Parakresol und Kohlensäure<sup>3)</sup> und der Spaltung der Paraoxybenzoësäure in Phenol und Kohlensäure<sup>3)</sup>.

Es war ferner von Interesse zu bestimmen, ob nicht aus der Gentsinsäure im Thierkörper Substanzen entstehen, welche, in den Harn gelangt, demselben die Fähigkeit verleihen, die Polarisations Ebene nach links zu drehen, denn die Eigenschaft, im Thierkörper linksdrehende Verbindungen zu erzeugen, kommt, wie es scheint, einer grossen Zahl aromatischer Substanzen zu.

Endlich erschien es von Wichtigkeit, über das Verhalten der Gentsinsäure im Thierkörper in Beziehung auf etwaige

<sup>1)</sup> L. c., S. 284.

<sup>2)</sup> Baumann, Ber. d. D. Chem. Ges., Bd. 12, S. 1450.

<sup>3)</sup> Baumann, diese Zeitschr., Bd. 3, S. 250.

giftige Eigenschaften im Vergleich zu den ihr verwandten Körpern Aufklärung zu gewinnen. Zur Beantwortung dieser Fragen habe ich auf Anregung von Herrn Prof. Baumann die folgenden Versuche unternommen. Bei den Stoffwechseluntersuchungen dienten männliche Hunde als Versuchsthiere.

Mindestens eine Woche vor jedem Versuch wurden die Hunde auf dieselbe Diät gesetzt, wie während der Versuchszeit. Sie wurden mit Hundekuchen gefüttert und wurden täglich zur gleichen Zeit katheterisirt. Während der Normalperiode wurde jeweils der Harn von je 2 Tagen analysirt, während an den Tagen, an welchen die zu untersuchenden Substanzen den Hunden einverleibt wurden, die in 24 Stunden abgesonderten Harnmengen zur Untersuchung gelangten.

### Versuch No. 1.

Hund No. 1, männlichen Geschlechts, von ca. 5 Kgr. Gewicht.

Tabelle I.

Datum.	Harnmenge pro Tag.	Spec. Gew.	SO <sub>2</sub> Menge pro Tag aus den Aetherschwefels.	Bemerkungen.
22. Nov. 1894	120	1,032	0,0680	
23. » »	96	1,040		
24. » »	116	1,037	0,0630	
25. » »	98	1,045		
26. » »	92	1,045	0,0694	Um 4 Uhr 45 M. Nachm. wurde 1,0 gr. Gentsins. eingeführt.
27. » »	80	1,060	0,1877	Um 4 Uhr 15 M. Nachm. wurde 2,0 gr. Gentsins. eingeführt.
28. » »	98	1,047	0,2267	

Die Durchschnittsmenge der pro die in Form von Aetherschwefelsäuren ausgeschiedenen SO<sub>2</sub> betrug an den Tagen vor dem Versuch 0,0668 gr. Nach der ersten Gabe wurde diese Menge um 0,1109 gr. SO<sub>2</sub> erhöht, womit 0,2135 gr. Gentsinsäure (21% der eingeführten) gepaart sein konnten. Nach der zweiten Gabe betrug der Zuwachs 0,1599 gr. SO<sub>2</sub>, womit 0,3158 gr. Gentsinsäure gepaart sein konnten. Damit würden von den eingeführten 3 Gramm Gentsinsäure im Laufe von

2 Tagen 0,5293 gr., d. h. ca. 18% im Harn nachgewiesen. Dieses ist natürlich nur unter der Bedingung richtig, dass der Zuwachs der Aetherschwefelsäuren auf Kosten der Gentsinsäure-Aetherschwefelsäure erfolgte.

Der Hund fühlte sich nach der ersten Gabe allem Anschein nach vollkommen gesund. Nach der zweiten Gabe stellte sich in der Nacht Erbrechen ein. Die erbrochenen Massen reducirten ammoniakalische Silber-Lösung nicht. Hieraus geht hervor, dass zur Zeit des Erbrechens sich keine Gentsinsäure im Magen des Hundes mehr vorfand. Der nach der ersten Gabe der Gentsinsäure aufgefangene Harn war von gelber Farbe und hatte die Neigung, sich beim Stehen an der Luft, besonders an der Oberfläche dunkel zu färben: salpetersaures Silber in ammoniakalischer Lösung reducirte er nicht.

### Versuch No. 2.

Derselbe Hund, völlig normal, erhält in diesem Versuch statt der Gentsinsäure den Gentsinaldehyd.

Tabelle II.

Datum.	Harn- menge.	Spec. Gew.	SO <sub>2</sub> aus der täg- lichen Harnmenge		A B.	Bemerkungen.
			Aus den Sulfaten A.	Aus den Aether- schwefels. B.		
1. Dec.	100	1,035	0,1973	0,0577	3,42	
2. »	121	1,036				
3. »	100	1,042	0,2207	0,0637	3,46	
4. »	115	1,035				
5. »	138	1,033	0,2071	0,0654	3,17	Darreichung v. 2,0 gr. Gentsinsäurealdehyd um 4 Uhr 40 Min.
6. »	117	1,036				
7. »	219	1,033	—	—	—	Darreichung v. 1,0 gr. Gentsinsäurealdehyd um 2 Uhr 55 Min. Nachts (v. 6. Dec.): Der Hund hat erbrochen.
8. »	104	1,038	0,0250	0,1479	0,17	Nachts: Der Hund hat erbrochen (jedoch sehr wenig).
9. »	135	1,026	0,0849	0,0472	1,80	
10. »	138	1,033	0,3234	0,0445	7,27	

Während der 6 Tage vor dem Versuch wurden also durch den Harn pro die durchschnittlich 0,0622 gr.  $\text{SO}_2$  in Form von Aetherschwefelsäuren ausgeschieden. Nach der zweiten Gabe des Aldehyds stieg diese Menge um 0,0857 gr.  $\text{SO}_2$ , welche ca. 0,165 gr. Gentisinsäure zu binden im Stande wäre.

Auf den Aldehyd reagierte der Hund stärker als auf die Gentisinsäure. Auf die erste Gabe von 2 Gramm trat nach 5 Stunden oder etwas später heftiges Erbrechen ein. Am andern Tage war der Hund übel gelaunt. Nach der zweiten Gabe (von 1,0) wurde unbedeutendes Erbrechen beobachtet (ca. 1 Esslöffel). In den folgenden Tagen zeigte der Hund ein krankhaftes Aussehen; am 10. Dec. frass er nichts. Am 12. Dec. war das Thier allem Anschein nach wieder gesund.

Der nach Eingabe des Aldehyds gewonnene Harn war von strohgelber Farbe und färbte sich beim Stehen an der Luft von der Oberfläche aus dunkel. Hierbei ging die Farbe des Harns zuerst in eine grünliche, später in eine schwärzliche über. Ammoniakalische Silberlösung wurde nach einiger Zeit in der Kälte reducirt; mit Eisenchlorid entstand keine Blaufärbung.

Die erbrochenen Massen gaben auch bei diesem Versuch keine Gentisinsäurereaction. Der nach der Eingabe des Aldehyds gewonnene Harn wurde inclusive des Filtrates des zur Aetherschwefelsäurebestimmung verwendeten Harns mit Schwefelsäure angesäuert, auf dem Dampfbade erhitzt und mit Aether ausgeschüttelt. Nach dem Abdampfen des Aethers blieb ein brauner, zum Theil krystallinischer Rückstand übrig, welcher in wässriger Lösung die Gentisinsäurereactionen gab und zwar: Reduction des salpetersauren Silbers in ammoniakalischer Lösung und Blaufärbung durch Eisenchlorid, welche auf Zusatz des Reagens im Ueberschuss verschwindet. Die Prüfung auf einen Gehalt an Stickstoff ergab ein negatives Resultat. Die Abscheidung der Gentisinsäure in reinem Zustande gelang indessen nicht, weil dafür die zu Gebote stehende Menge der Substanz zu gering war.

Die Versuche von Wolkow und Baumann, sowie diejenigen von Embden, welche das Schicksal der Hunden eingegebenen Homogentisinsäure untersuchten, haben darge-

than, dass die Resultate sehr verschieden sind, je nachdem die Säure dem Thiere per os oder unmittelbar ins Blut einverleibt wird. Im ersteren Fall steigt die Menge der Aetherschwefelsäuren sehr erheblich, im letzteren ist die Steigerung, wenn sie überhaupt beobachtet wird, eine nur unbedeutende. Im ersteren Fall wurde es aber, wie schon gesagt, bewiesen, dass im Darm eine Spaltung der Homogentisinsäure in Kohlensäure und Tolhydrochinon stattfindet, welches letzteres in Form einer Aetherschwefelsäure ausgeschieden wurde. In Anbetracht dieses Umstandes habe ich in den folgenden Versuchen die zu untersuchenden Substanzen nicht per os gegeben, sondern ihre Lösungen subcutan injicirt.

### Versuch No. 3.

Hund No. 1. Derselbe war, wie oben bemerkt, nach dem vorigen Versuch krank und erhielt desshalb einige Zeit hindurch ausser Hundekuchen noch Milch. Eine Woche vor dem dritten Versuch wurde er wieder auf die Versuchsdiät gesetzt. Dieses Mal wurden dem Hund 1,5 gr. Gentisinsäure in Form des Natronsalzes in wässriger Lösung (ca. 80 ccm.) subcutan injicirt.

Tabelle III.

Datum.	Har- menge.	Spec. Gew.	SO <sub>2</sub> aus der täglichen Harnmenge.		A B.	Bemerkungen.
			Aus den Sulfaten A.	Aus den Aether- schwefel- säuren B.		
18. Jan.	203	1,022	0,2469	0,0641	3,85	Um 4 Uhr 30 M. Injection von 1,50 Gentisinsäure.
19. >	150	1,036	0,0919	0,2006	0,46	
20. >	141	1,031	0,1754	0,0654	2,68	

Der Ueberschuss an Schwefelsäure, welche nach der Injection in Form von Aetherschwefelsäuren ausgeschieden wurde, (verglichen mit dem vorhergegangenen Tage) betrug 0,1365 SO<sub>2</sub>, welche 0,2696 gr. Gentisinsäure zu binden im Stande war oder ca. 18% der eingeführten Menge. Der Hund war nach der Einspritzung bei guter Laune und befand sich

auch am nächsten Tage in derselben Verfassung wie am Abend zuvor.

Der Harn zeigte auch hier die Neigung, sich an der Luft dunkel zu färben, reducirte aber salpetersaures Silber ebenso wenig wie der Aetherauszug aus demselben. Auf Eisenchloridzusatz nahm sowohl der Harn als auch der Aetherauszug aus demselben eine violette Färbung an, ähnlich derjenigen, welche man mit dem genannten Reagens und der Salicylsäure erhält. Nach dem Erhitzen des Harns mit einer geringen Menge Salzsäure reducirte der Aetherauszug salpetersaures Silber in ammoniakalischer Lösung und gab eine blaue (nicht violette) Färbung mit Eisenchlorid. Beim Schütteln dieses Auszuges mit Sodalösung nahm letztere eine rothgelbe Farbe an, während die Aetherlösung selbst sich aufhellte. Letztere gab nunmehr mit Eisenchlorid und mit salpetersaurem Silber keine Reaction mehr, wodurch die Abwesenheit von Hydrochinon im Harn erwiesen wurde.

#### Versuch No. 4.

Dem Hund No. 1 wurden 3,16 Gramm Gentisinsäure in Form des Natriumsalzes in 4procentiger Lösung subcutan injicirt.

Tabelle IV.

Datum.	Harnmenge.	Spec. Gew.	SO <sub>3</sub> aus der täglichen Harnmenge.		A B.	Bemerkungen.
			Aus den Sulfaten A.	Aus den Aetherschweifelsäuren B.		
25. Jan. 1895	260	1,021	0,2098	0,0666	3,15	Um 3 Uhr 40 Min. Injection von 3.16 gr. Gentisinsäure.
26. " "	190	1,045	0,0786	0,2387	0,33	

Die Zunahme der nach der Injection von Gentisinsäure ausgeschiedenen Aetherschweifelsäure (als SO<sub>3</sub> berechnet) verglichen mit dem vorhergehenden Tage, betrug 0,1721 gr. SO<sub>3</sub>, welche 0,3399 gr. Gentisinsäure zu binden im Stande ist, was ungefähr 11% der injicirten Menge entspricht.

Das Befinden des Hundes nach dem Experiment war kein ganz normales: er frass am zweiten und dritten Tage nichts. Der Harn enthielt geringe Mengen von Eiweiss. Der mit Hilfe des Katheders entleerte Harn war dunkelgelb und dunkelte beim Stehen nach, welche Eigenschaft hier stärker ausgesprochen war als beim vorigen Versuch. Auch der am zweiten Tage nach der Injection gewonnene Harn zeigte dasselbe Verhalten. Die übrigen Eigenschaften des Harns waren dieselben wie beim vorigen Versuch.

Behufs Gewinnung der Gentisinsäure aus dem Harn in reinem Zustande wurde folgendermaassen verfahren: Der Aetherauszug aus dem Harn wurde verdampft, der rothbraune krystallinische Rückstand in einer geringen Menge Essigäther gelöst und mit etwa dem 6fachen Volum Chloroform versetzt. Die Mischung wurde zum Sieden erhitzt und noch heiss filtrirt. Beim Erkalten des Filtrats schieden sich schwach gefärbte Krystalle ab, welche bei  $198^{\circ}$  schmolzen und auch sonst alle Eigenschaften der Gentisinsäure zeigten.

#### Versuch No. 5.

Hund No. 1. Am 6. Febr. 1895 wurden dem Hunde 3,1 gr. Gentisinsäure in Form des in 100 cbcm. Wasser gelösten Natronsalzes unter die Haut gespritzt. Nach der Injection fühlte sich der Hund nicht wohl, er erbrach in der Nacht und hatte noch am anderen Morgen ein krankhaftes Aussehen. Der Harn enthielt Spuren von Eiweiss und zeigte im Uebrigen dasselbe Verhalten wie beim vorhergehenden Versuche. Die Ebene des polarisirten Lichts wurde nicht abgelenkt. Um zu ermitteln, ob im Harn die Gentisinsäure, abgesehen von ihren Schwefelsäureverbindungen, noch in Form von Salzen enthalten war, wurde der Harn nach dem Ansäuern mit Salzsäure in der Kälte sehr schnell mit Aether ausgeschüttelt. Der Aetherauszug gab einen krystallinischen Rückstand, der in der That alle Eigenschaften der Gentisinsäure besass. Um zu erfahren, ob nicht auch Hydrochinon dem Rückstand beigemischt war, wurde letzterer in Aether wieder aufgelöst und die Säure durch Schütteln mit Soda-

lösung der ätherischen Flüssigkeit entzogen. Der Aether hinterliess nur einen unbedeutenden Rückstand, welcher salpetersaures Silber nicht reducirte — ein Beweis für die Abwesenheit des Hydrochirons. Die Menge der wieder gewonnenen — allerdings nicht völlig reinen — Gentisinsäure, welche im ungepaarten Zustande in den Harn übergegangen war, berechnet sich auf ca. 0,9 gr.

Nach der Aetherextraction wurde der Harn mit Salzsäure stark angesäuert, auf dem Dampfbade längere Zeit erhitzt und nun wiederum einer Aetherextraction unterworfen. Der Aetherauszug reducirte sehr stark ammoniakalische Silberlösung, gab aber mit Eisenchlorid nur eine verhältnissmässig schwache Reaction. Die durch die 4., 5. und 6. Extraction gewonnenen Auszüge gaben die letztere Reaction gar nicht mehr, obgleich sie noch die Silberlösung reducirten. Schon dieser Umstand führte zu dem Gedanken, dass hier neben der Gentisinsäure noch Hydrochinon vorhanden sei. Um hierüber Gewissheit zu erlangen, wurde die Gentisinsäure dem Aetherauszug durch Schütteln mit Sodalösung entzogen. Nach dem Verdunsten des Aethers wurde der Rückstand in wenig Wasser aufgelöst und mit Benzoylchlorid und Natronlauge geschüttelt. Dabei wurde eine kleine Menge von Dibenzoylhydrochinon (0.076 gr.), welches bei  $202^{\circ}$  schmolz und die von Döbner<sup>1)</sup> angegebenen Eigenschaften zeigte, erhalten.

#### Versuch No. 6.

Da Baumann und Herter<sup>2)</sup> gezeigt haben, dass die Salicylsäure ein anderes Verhalten im Thierkörper zeigt, als ihre Ester und ihr Amid, wurde bei einem folgenden Versuche statt der Gentisinsäure ihr Aethylester verwendet.

Als Versuchsobject diente ein Pudel (Hund No. 2) von ca. 8,5 Kilogr. Körpergewicht. Zu bemerken ist, dass es sehr schwer war, diesen Hund zu katheterisiren, denn er spannte häufig seine Bauchdecken dermassen an, dass es bei weitem nicht gelang, allen Harn zu entleeren, der in der Blase vor-

<sup>1)</sup> Ann. d. Chemie, Ed. 210, S. 256.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 1, S. 255.

handen war. Der Gentisinsäureäthylester wurde dem Hunde in wässriger Lösung (100 cbcm.) unter die Haut gespritzt.

Tabelle V.

Datum.	Harnmenge.	Spec. Gew.	SO <sub>2</sub> aus der täglichen Harnmenge.		A B.	Bemerkungen.
			Aus den Sulfaten A.	Aus den Aetherschweifelsäuren B.		
28. Febr.	285	1,025	0,2389	0,0799	2,99	
1. März	700	1,017	0,4622	0,2499	1,85	
2. "	212	1,039	0,3043	0,0795	3,83	Um 3 Uhr 35 M. Injection v. 2,0 gr. Gentisinsäureäthylester.
3. "	1017	1,016	0,2228	0,4896	0,45	

Die durchschnittliche Tagesmenge der in den Aetherschweifelsäuren ausgeschiedenen SO<sub>2</sub> betrug für die drei Tage vor der Injection 0,1364 gr. Nach der Injection des Esters wurden 0,3531 gr. Aetherschweifelsäuren, auf SO<sub>2</sub> berechnet, mehr ausgeschieden, welche 0,6974 gr. Gentisinsäure zu binden im Stande waren, d. h. ca. 46% der eingeführten Menge. Dieser Werth ist vielleicht etwas zu hoch berechnet, weil ein Theil des Harns vom vorhergegangenen Tage in der Blase zurückgeblieben sein mochte.

Der am Tage nach der Injection des Esters gesammelte Harn besass dieselben Eigenschaften wie der nach Injection der Gentisinsäure entleerte Harn.

Der Harn wurde folgender Bearbeitung unterzogen: er wurde mit Sodalösung schwach alkalisch gemacht und mit Aether ausgeschüttelt. Der Aetherauszug, welcher freien Gentisinsäureäthylester und Hydrochinon enthalten konnte, wurde eingedampft. Der Rückstand gab nach Auflösung in einer geringen Menge Wasser mit Eisenchlorid keine Reaction — es war also kein Ester zugegen, — wohl aber reducirte er ammoniakalische Silberlösung, wenn auch äusserst schwach, — vielleicht handelte es sich um eine minimale Menge freien

Hydrochinons. Der Versuch, Dibenzoylhydrochinon darzustellen, misslang aber wegen der äusserst geringen Menge der Substanz.

Der Harn wurde nach der eben beschriebenen Aetherextraction schwach angesäuert und zur Darstellung freier Gentisinsäure aus deren im Harn etwa enthaltenen Salzen einer erneuten Aetherextraction unterworfen. Der Aetherauszug wurde eingedampft, wobei Krystalle gewonnen wurden, welche alle für Gentisinsäure charakteristischen Reactionen gaben. Die Menge der Gentisinsäure im Tagesharn betrug 0,3 gr.

Hierauf wurde der Harn mit Salzsäure stark angesäuert, auf dem Wasserbade erhitzt und nach dem Erkalten zum dritten Mal der Aetherextraction unterzogen. Dieser dritte Aetherauszug wurde mit Sodalösung 2 Mal durchgeschüttelt. In dem Rückstand der ätherischen Lösung liess sich eine sehr geringe Menge von Gentisinsäureäthylester nachweisen; denn der in Wasser gelöste Rückstand gab mit Eisenchlorid eine wenn auch nur schwache Blaufärbung. Ferner enthielt der Rückstand eine nicht unbedeutende Menge von Hydrochinon, welches durch die Darstellung des bei  $202^{\circ}$  schmelzenden Dibenzoyl-Hydrochinons nachgewiesen wurde.

Zum Nachweis der vorhandenen Säuren wurde die von der letzten Aetherextraction zurückgebliebene alkalische wässerige Lösung mit Salzsäure stark angesäuert und wieder mit Aether ausgeschüttelt. Dieser vierte Aetherauszug lieferte nach dem Verdunsten Krystalle desjenigen Theils der Gentisinsäure, welche vorher mit Schwefelsäure gepaart war. Ihre Menge betrug auf das Tagesquantum umgerechnet 0,6 gr., d. h. nahezu dieselbe Zahl, welche aus der Zunahme der Aetherschwefelsäuren durch die Umrechnung auf Gentisinsäure sich ergeben hat. Durch Umkrystallisiren aus heissem Chloroform wurde die Gentisinsäure rein erhalten.

Die bisher geschilderten Versuche zeigen, dass nach Application sowohl der Gentisinsäure als auch des Aldehyds oder Aethylesters derselben der Harn besondere Eigenschaften

annimmt: beim Stehen an der Luft färbt es sich, besonders in den oberflächlichen Schichten, dunkel und zeigt ein wenn auch schwaches Reductionsvermögen; hat also grosse Aehnlichkeit mit dem Alkaptonharn.

Diese Eigenschaften lassen sich leicht durch den von mir geführten Nachweis, dass der Harn Gentisinsäure in Form ihrer Salze enthält, erklären. Freies Hydrochinon, welches dem Harn dieselben Eigenschaften verleihen könnte, ist nicht gefunden worden; vielleicht handelte es sich um Spuren desselben im sechsten Versuch, wo dem Thiere Gentisinsäureäthylester injicirt wurde.

Ferner ist in allen Fällen constatirt worden, dass die Menge der Aetherschwefelsäuren nach Einführung der Gentisinsäure, ihres Aldehyds oder Aethylesters ausserordentlich stark anstieg.

Weiter ist bewiesen worden, dass die Gentisinsäure als solche sich mit der Schwefelsäure verbindet.

Auch über den Charakter dieser Verbindung kann man sich Klarheit verschaffen. Wie bemerkt, nimmt der Harn nach Application von Gentisinsäure die Eigenschaft an, mit Eisenchlorid eine violette Färbung zu geben, die derjenigen vollkommen gleicht, welche die Salicylsäure mit diesem Reagens gibt. Da die Gentisinsäure nichts anderes als Oxysalicylsäure ist, so ist obige Reaction ohne Weiteres verständlich, wenn nur eine Hydroxylgruppe und zwar diejenige, welche zur Carboxylgruppe in der Metastellung sich befindet, durch die Aetherschwefelsäurebildung verschwunden ist.

Wie oben erwähnt, ist für einige Körper der aromatischen Gruppe bewiesen, dass bezüglich ihres Paarungsvermögens mit der Schwefelsäure zwischen ihnen und ihren Derivaten eine grosse Verschiedenheit besteht. Meine Versuche zeigen, dass zu diesen Körpern die Gentisinsäure nicht gehört, da die Resultate dieselben blieben, wenn man den Ester oder ein Salz der Säure applicirte.

Aus den Versuchen geht ferner hervor, dass nach subcutaner Injection von Gentisinsäure der Harn gewöhnlich kein Hydrochinon enthält: nur in einem Fall (Versuch No. 5) fand

sich Hydrochinon in Verbindung mit der Schwefelsäure, während die Gentisinsäure sowohl im freien Zustande als auch mit Schwefelsäure gepaart vorhanden war. Nach der Injection des Gentisinsäureäthylesters wurde gleichfalls Hydrochinon nachgewiesen und zwar wiederum nur in Verbindung mit der Schwefelsäure. Aus allem diesem resultirt erstens die Fähigkeit des Organismus, Gentisinsäure in Hydrochinon umzuwandeln, und zweitens die grössere Neigung des letzteren gegenüber der Gentisinsäure, sich mit der Schwefelsäure zu verbinden; denn würden beide genannte Körper mit gleicher Leichtigkeit eine Verbindung mit der Schwefelsäure eingehen, so müsste das Verhältniss zwischen der freien und gebundenen Gentisinsäure, sowie zwischen dem freien und gebundenen Hydrochinon das gleiche sein. Was die Art und Weise der Bildung des Hydrochinons aus der Gentisinsäure anbetrifft, so handelt es sich wahrscheinlich, wie bereits oben bemerkt, um einen ganz analogen Process, wie bei der Bildung des Toluhydrochinons aus der Homögentisinsäure. Ueber den Ort des Ueberganges der Gentisinsäure in Hydrochinon, resp. darüber, ob dieser Process analog der Bildung des Toluhydrochinons im Darm vor sich geht oder nicht, lässt sich mit Bestimmtheit nichts aussagen. Dieser Uebergang wurde nach der subcutanen Injection der Gentisinsäure und ihres Aethylesters beobachtet; dagegen gelang es nicht, nach Einführung des Aldehyds per os den Nachweis dieser Umwandlung zu liefern; allein auch in den Fällen der subcutanen Injection der Gentisinsäure ist man nicht sicher, ob nicht ein Theil derselben im Darm ausgeschieden und dort gespalten wurde, so zwar, dass das hierbei entstandene Hydrochinon wieder resorbirt und als Aetherschwefelsäure ausgeschieden wurde. Von anderen Verbindungen, welche nach Analogie mit manchen Körpern der aromatischen Gruppe aus der Gentisinsäure hätten entstehen können, haben wir nach Verbindungen mit Glycocoll gesucht. Diese Versuche haben indessen zu einem durchaus negativen Resultat geführt.

Ebenso fehlt dem Harn nach Application von Gentisinsäure die Fähigkeit, die Polarisationsenebene zu drehen.

Es ist bereits oben bemerkt worden, dass in das Programm der vorliegenden Arbeit auch die Untersuchung etwaiger giftiger Eigenschaften der Gentsinsäure aufgenommen ist. Parallel mit der Ausführung dieser Untersuchung habe ich auch die Homogentsinsäure, von welcher hierüber fast nichts bekannt ist, nach dieser Richtung hin untersucht. Zum Vergleichsobject diente das Hydrochinon, dessen Wirkung auf den thierischen Organismus bereits von Brieger<sup>1)</sup> studirt worden ist, welcher fand, dass das Hydrochinon hinsichtlich seiner Giftigkeit die Mitte einnimmt zwischen seinen Isomeren, dem Brenzcatechin und dem Resorcin. Zur Untersuchung der Giftigkeit dieser Stoffe setzte Brieger Frösche in ihre Lösungen, wobei er Folgendes constatirte: In einem Glase mit 5 ccm. einer Hydrochinonlösung von 1:1000 starb der Frosch nach 4 $\frac{1}{2}$  Stunden, in einem Glase mit 10 ccm. derselben Lösung nach 2 $\frac{1}{2}$  Stunden, in einem Glase mit 10 ccm. derselben Lösung, verdünnt mit 50 ccm. Wasser, nach 6 Stunden und in einem Glase derselben Lösung, verdünnt mit 100 ccm. Wasser nach 8 $\frac{1}{2}$  Stunden. Krämpfe traten in den ersten Fällen nach einigen Minuten auf, im letzten Falle nach zwei Stunden.

Brieger stellte ferner auch an Warmblütern, und zwar an Kaninchen, Versuche an, wobei er Folgendes fand: Bei einem Körpergewicht des Thieres von 1370 gr. riefen 0,25 gr. Hydrochinon, welches in Milch verabreicht wurde, keinen Effect hervor; 0,5 gr. hatte nach einer halben Stunde Krämpfe zur Folge, doch wurde das Thier später gesund; eine Gabe von 0,75 gr. führte gleichfalls nach einer halben Stunde zu Krämpfen, nach 1 $\frac{1}{2}$  Stunden jedoch zu Dyspnoe und Tod.

Schon aus den Versuchen von Wolkow und Baumann, sowie von Embden konnte man schliessen, dass die Homogentsinsäure weniger giftig ist als das Hydrochinon. Wolkow's

<sup>1)</sup> Zur Kenntniss des physiologischen Verhaltens des Brenzcatechin, Hydrochinon und Resorcin und ihrer Entstehung im Thierkörper, von Brieger Arch. f. Anatomie und Physiologie v. Du Bois Reymond, 1879. Suppl.-Band. S. 61.

und Baumann's Hund, welcher bei einem Körpergewicht von 12 Kilo 4,5 gr. Homogentisinsäure per os erhalten hatte, war während der Dauer des Versuches vollständig munter und gesund. (S. 283 l. c.). Fmbden's Hund, welchem 5,65 gr. Homogentisinsäure subcutan injicirt wurde, blieb gleichfalls am Leben und gesund (S. 332 l. c.), während, wie eben erwähnt, ein Kaninchen nach einer Dosis von 0,5 gr. Hydrochinon bereits nach einer halben Stunde in Krämpfe verfiel.

Dasselbe kann man auf Grund meiner oben angeführten Experimente auch von der Gentisinsäure sagen. Der Hund von ca. 5 Kilo Gewicht überstand eine Gabe von 3 gr. ziemlich leicht (diesem würde für ein Kaninchen eine Dosis von ca. 0,75 gr. entsprechen, d. h. eine bei Hydrochinon tödtliche).

Obgleich nun diese Versuche dargethan haben, dass die Gentisin- und Homogentisinsäure weniger giftig sind als das Hydrochinon, so kann man sich hieraus doch noch keine klare Vorstellung von ihrer Giftwirkung bilden.

Zur weiteren Klärung dieser Frage habe ich eine Reihe von Versuchen an Fröschen angestellt. Da sowohl die Gentisin- als auch die Homogentisinsäure von der Haut verhältnissmässig langsam resorbirt werden, so wurden sie den Thieren unter die Haut gespritzt und zwar in Form der Natronsalze in vier- oder einprocentiger Lösung. Nach der Injection wurde jeder Frosch in ein besonderes Glas mit 10 cbcm. Wasser gesetzt.

Das Hinzufügen des Wassers hatte einen doppelten Zweck. Erstens wurde dadurch das Austrocknen der Frösche verhindert und zweitens wurde erreicht, dass der von den Thieren ausgeschiedene Theil der injicirten Substanzen von neuem resorbirt werden konnte.

Die Resultate dieser Versuche sind in beiliegender Tabelle VI zusammengestellt.

Tabelle VI.

Wie viel Substanz eingeführt ist?	Einführung der Vergiftungsercheinungen nach der Einführung der Substanz.									
	0,0025 (0,25 chem. 1 <sup>o</sup> Lösung).	0,005 (0,5 chem. 1 <sup>o</sup> Lösung).	0,01 (1 chem. 1 <sup>o</sup> Lösung).	0,025 (2 5 chem. 1 <sup>o</sup> Lösung).	0,05 (1,25 chem. 4 <sup>o</sup> Lösung).	0,1 (2,5 chem. 4 <sup>o</sup> Lösung).	0,2 (5 chem. 4 <sup>o</sup> Lösung).	0,4 (10 chem. 4 <sup>o</sup> Lösung).		
Zuckungen . . . . .	—	6 Min.	—	—	—	—	—	—		
Klonische Krämpfe	7 Min.	7 Min.	—	—	—	—	—	—		
Tetanische Krämpfe	50 Min.	12 Min.	4 Min.	1 Min.	1/2 Min.	—	—	—		
Allgemein. Tetanus	—	—	—	3 Min.	2 Min.	—	—	—		
Sopor . . . . .	Nach 24 St. schläfrig.	2 1/2 Stund. schläfrig.	18 Min.	—	—	—	—	—		
Todt . . . . .	—	12 Stund.	2 Stund.	1 Stund. 20 Min.	1/2 Stund.	—	—	—		
Zuckungen . . . . .	—	—	6 Min.	3 1/2 Min.	3 Min.	—	—	—		
Klonische Krämpfe	—	—	8 Min.	7 Min.	—	—	—	—		
Tetanische Krämpfe	—	—	—	12 Min.	4 Min.	—	—	—		
Allgemein. Tetanus	—	—	—	—	—	—	—	—		
Sopor . . . . .	—	—	Von 2 St. bis 5 St. nach Einspritzung schläfrig.	1 Stund.	20 Min.	4 Min.	2 Min.	—		
Todt . . . . .	—	—	—	23 Stund.	1 Stunde 30 Min.	1 Stunde.	6 Min.	—		
Zuckungen . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—		
Klonische Krämpfe	—	—	—	—	—	—	—	—		
Tetanische Krämpfe	—	—	—	—	—	—	—	—		
Allgemein. Tetanus	—	—	—	—	—	—	—	—		
Sopor . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—		
Todt . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—		

Hydrochinon.

Genzinsäure.

Homogenzinsäure.

Zeit des Eintritts der Vergiftungsercheinungen nach der Einführung der Substanz.  
 38 Min.  
 4 Stund. 2 Stund. 1 Stunde  
 schläfrig. schläfrig.  
 3 1/2 Stund.

Hieraus ist zu ersehen, dass bezüglich der Giftigkeit das Hydrochinon mit einer für den Frosch tödtlichen Dosis von 0,005 gr. die erste Stelle unter den drei Substanzen einnimmt: an zweiter Stelle steht die Gentisinsäure mit einer tödtlichen Dosis von 0,025 gr. und zum Schluss kommt die bedeutend weniger giftige Homogentisinsäure mit einer tödtlichen Dosis von 0,4 gr.

Die von mir beobachteten Vergiftungserscheinungen infolge von Hydrochinon sind den von Brieger beschriebenen sehr ähnlich, obgleich in meinen Versuchen der soporöse Zustand den Krämpfen nicht vorherging, sondern folgte, und zwar traten zuerst klonische Krämpfe auf, welche nach grossen Dosen in Tetanus übergingen, unter dessen Erscheinungen der Tod eintrat, oder die Thiere verfielen nach kleineren Dosen in einen mit Dyspnoe verbundenen soporösen Zustand, in welchem sie auch starben.

Die durch Gentisinsäure hervorgerufenen Vergiftungserscheinungen waren den durch Hydrochinon bewirkten sehr ähnlich, obgleich es, wie aus der Tabelle ersichtlich, der Einführung einer 4 bis 5 Mal so grossen Menge der Substanz zur Erreichung analoger Resultate bedurfte; doch auch bei dieser Dosirung konnte ein gewisser Unterschied constatirt werden und zwar: 1. rief das Hydrochinon stärkere Krämpfe hervor als die Gentisinsäure; bei Darreichung nicht tödtlicher Dosen der letzteren gingen nämlich die Krampfbewegungen nicht über Zittern und Zuckungen hinaus, während bei der Hydrochinonvergiftung nicht tödtliche Dosen zu allgemeinen Krämpfen führten; nach letalen Dosen dagegen waren die Krämpfe bedeutend intensiver bei der Vergiftung durch Gentisinsäure als bei der durch Hydrochinon.

2. Der Sopor war bei der Vergiftung durch Gentisinsäure stärker ausgeprägt als bei der durch Hydrochinon. Dieser Unterschied trat bei nicht tödtlichen Dosen schärfer hervor.

Bei der Vergiftung durch Homogentisinsäure wurden Krämpfe fast gar nicht beobachtet — nur in einem Fall zeigte sich ein krampfhaftes Zittern — dafür aber trat der Sopor

der Thiere äusserst stark hervor. Bemerkenswerth ist noch der Fall, in welchem nach Injection von 0,2 gr. Homogentisinsäure am Frosch ungemein starke (wenn der Ausdruck gestattet ist) Würgebewegungen beobachtet wurden: das Thier sperrte den Mund weit auf, aus welchem sich die Speiseröhre gleich einem Handschuhfinger nach aussen umstülpte und, da sich ein Sack von der Grösse einer Nuss bildete, vielleicht auch noch der Magen.

Diese Beobachtung kann man derjenigen des Erbrechens nach Einverleibung der Gentisinsäure und ihres Aldehyds bei Hunden an die Seite stellen. Auch dort trat zuweilen das Erbrechen selbst in den Fällen auf, wo die Substanz subcutan injicirt wurde.

Sowohl dieser Umstand als auch der, dass die Gentisinsäure auch nach Einführung derselben per os in dem Erbrochenen nicht nachgewiesen werden konnte, documentirt sich der centrale Ursprung des Erbrechens. Vielleicht haben übrigens irgend welche aus den injicirten Substanzen im Organismus entstandenen Producte das Erbrechen verursacht. Auf diesen Gedanken führt uns der Umstand, dass das Erbrechen stets viele Stunden nach Einführung der Substanz beobachtet wurde, und dass dasselbe unter den Versuchen mit Gentisinsäure in dem Fall am stärksten ausgeprägt erschien, wo gerade ein bedeutender Theil der Gentisinsäure in Hydrochinon übergegangen war.

Aus dem oben Angeführten geht hervor, dass die Gentisinsäure in physiologischer Beziehung hinsichtlich ihrer Giftigkeit und der Hauptvergiftungssymptome, die Mitte zwischen dem Hydrochinon und der Homogentisinsäure einnimmt. Vergleicht man die Intensität der Wirkung der 3 Substanzen mit ihrem Verhalten im Thierkörper, so ergibt sich eine nicht uninteressante Parallele:

Die fast ungiftige Homogentisinsäure erscheint im Harn als solche und verbindet sich im Organismus nicht mit Schwefelsäure, wie Baumann und Wolkow (l. c.) und Embden (l. c.) dargethan haben.

Die giftige Gentsinsäure verbindet sich im Stoffwechsel zum Theil mit Schwefelsäure, während ein anderer Theil unverändert ausgeschieden wird.

Das stark giftige Hydrochinon endlich wird (bei kleineren Mengen) nicht als solches ausgeschieden, sondern nur in Form von Aetherschwefelsäuren.

Durch die von mir ausgeführten Untersuchungen wird aber auch dargethan, dass in dem Alkaptonharn neben der Homogentsinsäure Gentsinsäure nicht enthalten sein kann. Denn wie Baumann und Wolkow und Embden ermittelten, ist im Alkaptonharn die Aetherschwefelsäureausscheidung nicht vermehrt, was der Fall sein müsste, wenn auch Gentsinsäure vorhanden wäre. Wolkow und Baumann ist es auch nicht geglückt, irgend eine andere der Homogentsinsäure verwandte Substanz aus dem Alkaptonharn abzuscheiden.

Dieser Umstand ist für die Erkennung des Alkaptonharns nicht ohne Bedeutung. Nach Eingabe einer grossen Zahl verschiedener Stoffe, von welchen nicht wenige als Medicamente Verwendung finden, wird der Harn beim Stehen an der Luft von der Oberfläche aus dunkel (wie der Carbolharn). In allen diesen Fällen bemerkt man immer auch eine erhebliche Vermehrung der Aetherschwefelsäuren im Harn. Der Alkaptonharn dagegen ist, ausser durch die seit Boedeker bekannten Merkmale, dadurch ausgezeichnet, dass bei ihm die Aetherschwefelsäureausscheidung durchaus normal bleibt.