

# Über die Bildung der Uramidosäuren im Organismus.

## I. Mitteilung.

Von

Privatdozent Dr. **Fritz Lippich.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Institute der Prager deutschen Universität.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. August 1910.)

Nachdem Schultzen<sup>1)</sup> im Jahre 1872 durch seine später vielumstrittene Arbeit über die Entstehung von Methylhydantoin-säure nach Verfütterung von Sarkosin zum erstenmal auf die Fähigkeit des Säugerorganismus, Uramidosäuren zu bilden, hingewiesen hatte, und die Existenz dieser Fähigkeit bald darauf durch die Arbeiten Salkowskis<sup>2)</sup> zur unumstößlichen Tatsache wurde, da glaubte wohl jeder diesem Funde die größte Wichtigkeit für die Aufklärung der Harnstoffbildung beilegen zu müssen.

In der Tat verdankt ihm auch, wie bekannt, die sogenannte Cyansäuretheorie ihre Entstehung; Hoppe-Seyler war es, der diese Theorie seinerzeit populär machte; ihrer Anlage nach stammt sie wohl von Schultzen, der auch bereits die Möglichkeit der Uramidosäurebildung durch Anlagerung von Carbaminsäure diskutierte.

Als dann in der Folge die anderen Harnstoffbildungstheorien aufgestellt wurden, geriet, wohl mehr auf Grund theoretischer Erwägungen, als veranlaßt durch einige wenige, keineswegs unbedingt überzeugende Experimente, die Cyansäuretheorie in Mißkredit; im Zusammenhang damit unterschätzte man auch die Bedeutung der Uramidosäurebildung, zumal, wie es eigentlich in der Natur der Sache liegt, jede der neuen Harnstoffbildungstheorien deren Entstehung in befriedigender Weise zu erklären vermochte.

Auf diese Unterschätzung ist es wohl zurückzuführen,

<sup>1)</sup> Schultzen, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., 1872, S. 578.

<sup>2)</sup> Salkowski, ebenda, Bd. VI, S. 744, 1873.

daß trotz der zahlreichen Arbeiten, die zugunsten der neuen Theorien am Lebenden ausgeführt wurden, keine sich mit der Entstehungsweise der Uramidosäuren im experimentellen Sinne befaßt, oder sie auch nur eingehender berücksichtigt. Außer einigen Versuchen Salkowskis<sup>1)</sup> liegen meines Wissens keine Publikationen über diesen Gegenstand vor, abgesehen natürlich von jenen Arbeiten, die den teilweisen Übergang einer Aminosäure in die entsprechende Uramidosäure beim Durchgang durch den Körper konstatieren.

In den rein chemischen Arbeiten Hofmeisters<sup>2)</sup> und seiner Schüler,<sup>3)</sup> die mit Rücksicht auf dessen Oxydationstheorie ausgeführt wurden, finden wohl die Uramidosäuren hie und da Berücksichtigung, jedoch nur ergänzungsweise, und keineswegs wird irgend nachdrücklich auf ihre Bedeutung für die Theorie der Harnstoffbildung hingewiesen, so daß schließlich die Sachlage am besten mit den Worten Jakobys<sup>4)</sup> (1902) wiedergegeben erscheint, die wohl dem Eindruck entsprechen, den dieser Forscher aus der einschlägigen Literatur empfangen hat: «. . . geht also hervor, daß diese interessante physiologische Synthese nicht zur Entscheidung der Frage herangezogen werden kann, auf welchem Wege im Körper der Harnstoff entsteht».

Auch aus der Folgezeit ist mir keine Arbeit bekannt, die zu anderen Ansichten geführt hätte.

1906 und 1908 habe ich eine Reihe von Arbeiten<sup>5)</sup> über Uramidosäuren veröffentlicht, wobei sich eine Anzahl physiologischer Hinweise und Anwendungen ergaben, die ich hervorzuheben nicht verabsäumte; insbesondere gelang es mir, nachzuweisen, daß die von den bisherigen Harnstoffbildungstheorien geforderten Harnstoffvorstufen mit Aminosäuren unter Bildung

<sup>1)</sup> Salkowski, Diese Zeitschrift, Bd. IV, 1880; Bd. VII, S. 93. 1882/83.

<sup>2)</sup> Hofmeister, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. XXXVII, S. 426, 1896.

<sup>3)</sup> J. T. Halsey, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 325, 1898; Eppinger, Hofmeisters Beiträge, Bd. VI, S. 481, 1905.

<sup>4)</sup> Jakoby, Ergebnisse der Physiologie, Bd. I, S. 544, 1902.

<sup>5)</sup> Berliner Berichte, Bd. XXXIX, S. 2953, 1906; Bd. XLI, S. 2953 und 2974, 1908.

von Uramidosäuren reagieren. Diese Tatsachen gaben mir die Grundlage, zum ersten Male wieder nachdrücklich auf die Bedeutung der Uramidosäuren für die Erforschung der Harnstoffbildung hinzuweisen, was in der folgenden Bemerkung<sup>1)</sup> zum Ausdrucke kommt:

«Es muß nun Sache des Experimentes am Lebenden sein, zu entscheiden, welche von den angeführten Uramidosäurebildungsweisen für den Tierkörper in Betracht kommt; gelingt dies, dann ist auf diesem Wege auch eine Aufklärung über die Verhältnisse der Harnstoffbildung zu erwarten.»

Demgemäß legte ich mir einen Plan zurecht, um in einer Reihe physiologischer Experimente der Entscheidung dieser Frage näherzutreten.

Zunächst fällt bei Betrachtung der über die Uramidosäurebildung im Organismus bekannten Tatsachen besonders auf, daß fast nur körperfremde Aminosäuren diese Synthese eingehen und auch bei diesen keineswegs ein quantitativer Übergang erfolgt; immer treten daneben andere Umwandlungsprodukte oder unveränderte Aminosäure auf. Entweder also die Uramidosäurebildung geht den anderen Umwandlungen voraus und die gefundene Menge ist der übrig bleibende Rest, oder aber die Synthese ist das letzte Mittel, dessen sich der Organismus zur Unschädlichmachung der eingeführten Substanz bedient, wenn die anderen Umwandlungen nicht mehr ausreichen.

Inbesondere erwecken diesen Eindruck jene beiden bekannt gewordenen Fälle von Uramidosäurebildung bei körpereigenen Aminosäuren, dem Tyrosin<sup>2)</sup> und dem Phenylalanin,<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> l. c. S. 2978.

<sup>2)</sup> Blendermann, Diese Zeitschrift, Bd. VI, S. 234, 1882; ich habe schon einmal (l. c. S. 2924) darauf hingewiesen, daß das Tyrosinhydantoin Blendermanns höchstwahrscheinlich ein Kunstprodukt gewesen ist, weil Blendermann den zu untersuchenden Harn mit Säuren erhitzt (Destillation) und die Tyrosinhydantoinensäure schon bei Gegenwart von relativ wenig Mineralsäure anhydriert wird; es wird dies um so wahrscheinlicher, als Dakin nach Verfütterung von Phenylalanin, dessen Uramidosäure sich ebenso leicht wie jene des Tyrosins anhydrieren läßt, nicht das Anhydrid, sondern die Uramidosäure erhielt.

<sup>3)</sup> Dakin, Journ. of biolog. Chem., Bd. VI, S. 235, 1909.

bei welchen diese erst dann neben anderen Umwandlungen und relativ in geringem Umfange beobachtet wird, wenn sehr große Dosen verabreicht, also der Körper förmlich damit überschwemmt wird.

Daß bei anderen körpereigenen Aminosäuren diese Synthese nicht beobachtet wurde,<sup>1)</sup> mag entweder daran liegen, daß überhaupt nicht nach Uramidosäuren gesucht wurde, oder aber daß sie bei jedenfalls relativ geringer Menge übersehen wurden, was um so eher möglich ist, als sie mit Naphthalinsulfochlorid nicht reagieren. Nach dieser Auffassung würde zwischen Uramidosäurebildung bei körperfremden und körpereigenen Aminosäuren nur insofern ein Unterschied bestehen, als letztere in viel größerer Menge zugegen sein müssen, um als Ballast empfunden zu werden.

Die Tatsache der Uramidosäurebildung läßt sich, wie ich schon früher<sup>2)</sup> ausgeführt habe, von verschiedenen Gesichtspunkten aus auffassen.

Wie ich gezeigt habe, reagieren Aminosäuren mit Guanidin unter Bildung von Uramidosäuren; diese Bildung erfolgt relativ etwas schwieriger als andere Uramidosäuresynthesen; der Körper verfügt nur über eine beschränkte Menge von Guanidin, welches außerdem erst aus dem Arginin abgespalten werden muß — es würde sich auf Grund einer solchen Bildungsweise der nur teilweise und relativ schwierige Übergang einer Aminosäure in die entsprechende Uramidosäure auch für den Organismus ganz befriedigend erklären lassen.

Ich konnte ferner feststellen, daß Aminosäure auch direkt mit Harnstoff unter Bildung von Uramidosäure reagiert, was auf eine Verschiebung des Gleichgewichtszustandes zwischen Harnstoff und cyansaurem Ammon zurückzuführen ist.

Eine solche Uramidosäurebildungsweise wäre, wie ich schon anderwärts<sup>3)</sup> ausgeführt habe, auch für den Organismus denkbar. Versuche *in vitro* bei Körpertemperatur haben zwar

<sup>1)</sup> Das Taurin ist seinem Verhalten nach eigentlich zu den körperfremden Aminosäuren zu rechnen.

<sup>2)</sup> l. c.

<sup>3)</sup> l. c.

nur einmal zu einem positiven Resultat geführt, doch ist dies insofern nicht maßgebend, als im Körper die Gleichgewichtsverhältnisse durch die Gegenwart von Kolloiden sehr beeinflusst werden können.

Faßt man die Entstehung der Uramidosäuren als einen der Harnstoffbildung zugeordneten resp. analogen Prozeß auf, dann käme das cyansaure Ammon (resp. die Cyansäure) im Sinne der alten Theorie als Harnstoffvorstufe in Betracht. Dasselbe gilt auch vom carbaminsauren Ammon resp. der Carbaminsäure, die, wie meine Versuche gezeigt haben (Kochen von Aminosäure mit Harnstoff und Barytwasser, mit Urethan und Barytwasser), nicht weniger leicht als das cyansaure Ammon reagieren.

Da nun freie Aminosäuren oder wenigstens freie Amino-  
gruppen im Organismus als stets verfügbar anzunehmen sind, so könnte man auf Grund der Leichtigkeit jener Bildungsweisen zur Auffassung gelangen, die Uramidosäurebildung als der Harnstoffbildung vorangehend anzunehmen, d. h. die Uramidosäuren als Harnstoffvorstufen zu betrachten; allerdings muß dann die weitere Annahme gemacht werden, daß die Uramidosäure direkt zu Harnstoff abgebaut wird, oder daß analog der Desamidierung eine Desureierung erfolgt.

Nach dieser Annahme wäre es erklärlich, daß nach Verfütterung körpereigener Aminosäuren<sup>1)</sup> unter gewöhnlichen Umständen Uramidosäuren vermißt wurden.

Freilich ließen sich andererseits dagegen manche theoretische Bedenken erheben und außerdem liegt ein, wenn auch vereinzelter Fütterungsversuch Salkowskis<sup>2)</sup> vor, wonach Hydantoinsäure den Körper unverändert passiert.

Möglicherweise ist aber gerade diese Säure zu solchen Versuchen weniger geeignet; denn die zahlreichen Arbeiten, welche sich mit dem Nachweis von Glykokoll im normalen

<sup>1)</sup> Und wie aus den Arbeiten Friedmanns, Hofmeisters Beiträge, Bd. XI, S. 151 u. ff., 1908, hervorzugehen scheint, überhaupt solcher Aminosäuren, welche der Organismus leicht und in größerem Umfange abzubauen vermag.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift. Bd. IV, 1880.

Harn mittels der Naphthalinsulfochloridmethode in der Modifikation von Embden<sup>1)</sup> befassen, lassen es nicht ausgeschlossen erscheinen, daß Ureinäthansäure ein Bestandteil des normalen Harnes ist; Embden selbst und auch andere haben schon dieser Möglichkeit gedacht; meine eigenen Versuche, Ureinäthansäure im normalen Menschenharn nachzuweisen, haben bisher zu einem positiven Ergebnis nicht geführt, doch bin ich noch keineswegs zu einem definitiven Abschluß gelangt.

Betrachtet man die Uramidosäurebildung als der Harnstoffbildung analog, dann ist es fast selbstverständlich, die Leber als deren Sitz anzunehmen, obzwar bisher ein zwingender Beweis dafür nicht vorliegt.

Jedenfalls werden sich Versuche über unsere Frage zunächst mit diesem Organ zu befassen haben.

Aus diesen Erörterungen ergeben sich, glaube ich, mit genügender Klarheit die einzelnen Fragestellungen meines oben erwähnten Arbeitsplanes; hinzuzufügen wäre noch, daß sich auch Beziehungen der Uramidosäuren zur Harnsäurebildung, besonders bei den Vögeln ergeben, wenn man die letztere als Synthese aus Harnstoff und einer stickstofffreien Komponente auffaßt.

Im folgenden seien nun einige Versuche mitgeteilt, welche sich mit der Leber als angenommenen Sitz der Uramidosäuresynthese befassen, um die präsumptiven Beziehungen der Leberzellen zu dieser Synthese aufzuklären; dazu war zunächst notwendig, das Verhalten der Leberzellen zu bereits fertigen Uramidosäuren zu prüfen, besonders auch mit Rücksicht auf etwa vorhandene zerstörende Fermente.

Da ein einigermaßen sicheres Urteil bezüglich einer etwa erfolgten Zersetzung nur auf quantitativem Wege zu erwarten war, so wurde als Versuchssubstanz die infolge ihrer Schwerlöslichkeit hierzu besonders geeignete Isobutylhydantoinsäure gewählt.

Eine größere Menge derselben wurde aus 50%igem Alkohol umkrystallisiert, und von der so gereinigten, exsikkator-

---

<sup>1)</sup> Embden u. Reese, Hofmeisters Beiträge, Bd. VII, S. 411, 1906.

trockenen Substanz eine etwa 1% ige Lösung hergestellt; d. h. eine abgewogene Substanzmenge wurde in der entsprechenden Menge Wasser suspendiert, durch einen geringen Überschuß von Normalnatronlauge in Lösung gebracht und die Lösung mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert. Durch Stickstoffbestimmung wurde der genaue Gehalt der Lösung zu 0,942% ermittelt.

Andererseits wurde eine eben entnommene Hundeleber von der Gallenblase befreit und in der Fleischhackmaschine zerkleinert. 140 g des Leberbreies wurden mit 300 ccm einer Kochsalzlösung von 0,8% vier Stunden in der Maschine geschüttelt und sodann koliert; die Kolatur reagierte schwach-sauer gegen Lackmus.

Von dieser Kolatur wurden 75 ccm mit 50 ccm der obigen Natriumsalzlösung gemischt (Probe Nr. 1); weitere 75 ccm Kolatur wurden 15 Minuten im kochenden Wasserbad gehalten und sodann gleichfalls mit 50 ccm der Natriumsalzlösung versetzt (Probe Nr. 2); zur Kontrolle diente einerseits eine Mischung von 75 ccm Kolatur mit 50 ccm Wasser (Probe Nr. 3) und andererseits eine Mischung von 75 ccm Kochsalzlösung von 0,8% mit 50 ccm Natriumsalzlösung (Probe Nr. 4).

Den vier Proben wurde durch Zusatz weniger Tropfen n-Natronlauge eine gegen empfindliches Lackmus eben merkliche alkalische Reaktion erteilt, jede derselben mit 5 ccm Chloroform und 5 ccm Toluol versetzt und im Thermostaten bei 38° C. unter häufigem Umschütteln durch 50 Stunden gehalten.

Darnach wurde jede der vier Proben auf 500 ccm aufgefüllt, mit soviel verdünnter Essigsäure angesäuert, daß nach dem Aufkochen die Reaktion noch schwach-sauer blieb, und filtriert; die Eiweißkoagula der Proben Nr. 1, 2 und 3 wurden einmal ausgekocht; nach Vereinigung der Filtrate und Waschwässer wurde neutralisiert und am Wasserbad bis auf einen kleinen Rest eingedampft; nun wurde in einem Meßzylinder filtriert und mit den Waschwässern bis zur Marke 50 ccm aufgefüllt; die klaren bei Probe Nr. 1, 2 und 3 gelben Filtrate wurden sodann mit 10 ccm verdünnter Schwefelsäure (bis zur

starksauren Reaktion gegen Kongo) versetzt und nach gutem Umrühren längere Zeit sich selbst überlassen.

In Probe Nr. 4 entstand sofort ein reichlicher krystallinischer Niederschlag; in den Proben Nr. 1 und Nr. 2 trat ein solcher allmählich auf, mit der Zeit an Stärke zunehmend; Probe Nr. 3 blieb auch nach langem Stehen klar.

Nach ca. 24stündigem Stehen wurden die Niederschläge der Proben Nr. 1, 2 und 4 auf gewogenen Filtern gesammelt, an der Saugpumpe mit Wasser gewaschen, das Wasser durch Alkohol, dieser durch Äther verdrängt; schließlich wurde über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet: die betreffenden Substanzgewichte betragen: Probe Nr. 1 0,3078 g; Probe Nr. 2 (erhitzt) 0,3178 g; Probe Nr. 4 (Kontrollprobe) 0,3095 g.

Die Übereinstimmung der drei Gewichte zeigt schon zur Genüge, daß eine spezifische oder fermentative Spaltung in größerem Umfange nicht stattgefunden haben kann: die ziemlich erhebliche Differenz gegen das Ausgangsgewicht von 0,471 g erklärt sich aus der Verwendung des Alkohols als Waschflüssigkeit, in welchem die Isobutylhydantoinensäure relativ löslich ist.

Um ein Urteil zu gewinnen, einerseits über den noch in Lösung befindlichen Anteil, andererseits über eine etwa erfolgte Zersetzung und Leucinbildung, wurde das Filtrat samt Waschflüssigkeiten vom Niederschlag der Probe Nr. 1 nach Vertreibung des Äthers auf 200 ccm aufgefüllt und halbiert. Beide Hälften wurden durch Zusatz konzentrierter Schwefelsäure auf einen Gehalt von ca. 5% an dieser Säure gebracht: die eine Hälfte wurde sodann über freier Flamme etwas eingengt und darauf am Rückflußkühler ca. 1 1/2 Stunden gekocht: nach dem Abkühlen wurde viermal mit Äther ausgeschüttelt und der Ätherrückstand gewogen: das Gewicht des so gewonnenen Isobutylhydantoin betrug 0,0597 g; daraus berechnet sich für die noch in Lösung befindliche Isobutylhydantoinensäure eine Menge von 0,1332 g; dies ergibt zusammen mit der gewogenen Substanz 0,4410 g oder 93,63% der zum Versuch verwendeten Menge.

Die andere auf einen Gehalt von ca. 5% Schwefelsäure gebrachte Filtrathälfte wurde mit einer 20%igen Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt; das mit Baryumhydroxyd gesättigte Filtrat wurde abgesaugt, mit Kohlensäure vom Baryt befreit, und bis auf einen kleinen Rest am Wasserbad verdunstet; dieser wurde mit möglichst wenig Wasser aufgenommen, Harnstoff zugefügt und ca. 2 $\frac{1}{2}$  Stunden gekocht, nach dem Abkühlen konnte durch Ansäuern mit Schwefelsäure ein nennenswerter Niederschlag von Isobutylhydantoinsäure nicht erzielt werden.

Bei einem zweiten derartigen Versuch wurde die eben entnommene und in der Maschine zerkleinerte Hundeleber mit ausgeglühtem Kieselgur gut verrieben und sodann mit zirka dem gleichen Volumen reinen Wassers unter Zusatz von Chloroform und Toluol und unter zeitweiligem Schütteln in der Maschine längere Zeit in der Kälte extrahiert; schließlich wurde zentrifugiert.

Wie beim ersten Versuch wurden vier Proben zusammengestellt.

Probe Nr. 1 enthielt 50 ccm Zentrifugat und 50 ccm der oben verwendeten Natriumsalzlösung.

Probe Nr. 2 ebenso nach viertelstündigem Erhitzen der 50 ccm Zentrifugat im kochenden Wasserbad.

Probe Nr. 3 und Nr. 4 bestanden aus je 50 ccm Wasser und 50 ccm Zentrifugat resp. 50 ccm Natriumsalzlösung.

Die Proben behielten in diesem Versuch ihre natürliche kaum merklich saure Reaktion; Lauge wurde nicht zugefügt. Die Digestionsdauer im Thermostaten betrug 72 Stunden bei 37°C.

Die weitere Verarbeitung erfolgte genau wie im ersten Versuche, nur wurden vor dem Koagulieren den auf 400 ccm aufgefüllten Flüssigkeiten je 2 ccm gesättigte Kochsalzlösung zugefügt.

Schließlich ergaben sich für die Proben Nr. 1, 2 und 4 die folgenden Substanzgewichte: 0,3050 g; 0,3058 g; 0,3036 g; also dasselbe Ergebnis wie im ersten Versuch.

Ein dritter Versuch mit Leberpreßsaft konnte mangels einer geeigneten hydraulischen Presse nicht ausgeführt werden.

Die gelblich gefärbten Krystallisationen der Proben Nr. 1 und Nr. 2 beider Versuche wurden vereinigt unter Zusatz von etwas Tierkohle in heißem Wasser gelöst, filtriert und in zwei Fraktionen krystallisieren gelassen. Die erste aus kleinen Nadeln bestehende Fraktion schmolz im geschlossenen Kapillarrohr rasch erhitzt bei  $189^{\circ}$  und zeigte einen Stickstoffgehalt nach Kjeldahl von 16,21%; die zweite aus langen Nadeln bestehende Fraktion schmolz ebenso bei  $190^{\circ}$ , ihr Stickstoffgehalt nach Kjeldahl betrug 16,017% [berechnet 16,091%]; gröbere Verunreinigungen der Niederschläge sind also wohl ausgeschlossen.

Nachdem diese Versuche die Unfähigkeit der auf dem beschriebenen Wege gewonnenen Leberextrakte, Isobutylhydantoin säure abzubauen, ergeben hatten, konnte daran gegangen werden, ebensolche Extrakte in bezug auf ihre synthetisierenden Fähigkeiten zu prüfen.

Am geeignetsten wegen der Leichtigkeit ihres Nachweises erschien wieder die Isobutylhydantoin säure und es wurde daher Leucin zum Ausgangsmaterial einer etwaigen Synthese gewählt.

Die Versuche schließen sich an die von mir gefundenen Uramidosäurebildungsweisen an.

Demgemäß wurde versucht, ob Leberextrakt imstande ist, direkt aus Aminosäure und Harnstoff Uramidosäure zu bilden.

Von dem bei vorstehend beschriebenem 2. Zersetzungsversuch gewonnenen Zentrifugat aus Hundeleber wurden 75 ccm mit 0,5 g Leucin und 1,5 g Harnstoff versetzt, je 5 ccm Chloroform und Toluol hinzugefügt und im Thermostaten bei  $37^{\circ}$  durch 72 Stunden digeriert: die gleichzeitig angesetzte Kontrollprobe bestand aus 75 ccm Wasser 0,5 g Leucin, 1,5 g Harnstoff und je 5 ccm Chloroform und Toluol.

Das verwendete Leucin besaß einen Stickstoffgehalt von 10,083%.

Nach Unterbrechung des Versuches wurden beide Proben auf 375 ccm aufgefüllt, mit verdünnter Essigsäure schwach angesäuert und aufgeköcht, nachdem vorher noch je 2 ccm gesättigte Kochsalzlösung zugefügt worden waren.

Das Eiweißkoagulum der Versuchsprobe wurde einmal

ausgekocht und Filtrat und Waschwässer derselben ebenso wie die Kontrollprobe im Vakuum abgedampft.

Der so erhaltene krystallinische Rückstand der Kontrollprobe löste sich in wenig Wasser nur teilweise auf: auf Zusatz von etwas verdünnter Schwefelsäure trat sofortige klare Lösung ein; auch nach längerem Stehen der sauren Lösung wurde eine Krystallisation nicht beobachtet.

Der Rückstand der Kontrollprobe war gelblichweiß, un deutlich krystallinisch; auch er löste sich in wenig Wasser nur teilweise; die vom Umlöslichen abfiltrierte Flüssigkeit gab nach dem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure keine krystallinische Fällung, auch nicht nach längerem Stehen.

Der weißliche Filtrerrückstand wurde von Alkohol nicht aufgenommen, er löste sich in wenig Wasser sofort und vollständig auf Zusatz von etwas Säure: die saure Lösung setzte auch nach längerer Zeit keine Krystalle ab: wurden wenige Milligramme jenes Rückstandes mit einem Überschuß von Harnstoff und 1—1,5 ccm Wasser in einer mit Steigrohr versehenen Eprouvette längere Zeit gekocht (1—1½ Stunden), so traten nach dem Abkühlen und Ansäuern mit Schwefelsäure die charakteristischen Krystalle der Isobutylhydantoinsäure auf.

Augenscheinlich bestand also der Rückstand aus unverändertem Leucin, und es hatte sich kein Anhaltspunkt dafür ergeben, daß durch den verwendeten Leberextrakt eine irgend nachweisbare Menge Isobutylhydantoinsäure gebildet worden war.

Bei einem zweiten synthetischen Versuche wurden gemäß meinen Beobachtungen auch das Guanidin und die Carbaminsäure in Betracht gezogen; es wurde wie folgt vorgegangen:

Ähnlich wie früher wurde aus Hundeleber durch Zerreiben mit Kieselgur, sofortiges Schütteln in der Maschine mit zirka dem gleichen Volumen Wasser (4 St.) und Zentrifugieren ein wässriger Extrakt hergestellt; gleichzeitig war ein Teil derselben Hundeleber mit 0,8%iger Kochsalzlösung geschüttelt worden.

100 ccm des wässrigen Extraktes wurden mit 1 g Leucin (Präparat wie im vorhergehenden Versuch) und 3 g Guanidincarboxat versetzt; da die ursprünglich ganz schwach alkalische

Reaktion alsbald sehr bedeutend zunahm, wurde mit Essigsäure angesäuert, mit n-Natronlauge neutralisiert, und sodann je 5 ccm Chloroform und Toluol zugesetzt. (Probe Nr. 1.)

Weitere 100 ccm des wässerigen Extraktes wurden mit 1 g Leucin und 2 g gut zerriebenen Amylurethan versetzt; als Desinfektionsmittel konnten, wegen der leichten Löslichkeit des Urethans in Chloroform und Toluol, letztere nicht in Betracht kommen; es wurden daher 0,5 g Fluorkalium zugesetzt und die daraufhin eintretende schwach saure Reaktion durch n-Natronlauge abgestumpft. (Probe Nr. 2.)

100 ccm des kochsalzhaltigen Extraktes wurden mit 1 g Leucin, 3 g Harnstoff und je 5 ccm Chloroform und Toluol versetzt. (Probe Nr. 3.)

Jeder der drei Versuchsproben entsprach eine analog zusammengesetzte Kontrollprobe.

Kontrolle zu Probe Nr. 1: 50 ccm Wasser, 0,5 g Leucin, 1,5 g Guanidincarbonat, mit Essigsäure angesäuert, mit n-Natronlauge neutralisiert, je 5 ccm Chloroform und Toluol.

Kontrolle zu Probe Nr. 2: 50 ccm Wasser, 0,5 g Leucin, 1 g Amylurethan, 0,25 g Fluorkalium, Neutralisation wie oben.

Kontrolle zu Probe Nr. 3: 50 ccm Kochsalzlösung von 0,8%, 0,5 g Leucin, 1,5 g Harnstoff, je 5 ccm Chloroform und Toluol.

Sämtliche 6 Proben verblieben 86 Stunden im Thermostaten bei 37° C.

Darnach wurde wie früher verdünnt, bei schwach essigsaurer Reaktion (in den kochsalzfreien Proben unter Zufügen etwas gesättigter Kochsalzlösung) aufgeköcht, heiß filtriert usw.

Sämtliche Filtrate wurden im Vakuum zur Trockene verdampft.

Die drei Kontrollproben hinterließen krystallinische weiße Rückstände, die sich in wenig Wasser nur teilweise, auf Zusatz von etwas verdünnter Schwefelsäure aber sofort klar auflösten: in der zur Probe Nr. 3 gehörigen Kontrollprobe trat nach einigem Stehen der sauren Lösung eine deutliche Krystallisation von Isobutylhydantoinensäure auf, die beiden anderen Kontrollproben blieben klar.

Jede der drei Versuchsproben hinterließ einen gelblichen teilweise krystallinen Rückstand; dieser wurde mit wenig Wasser behandelt, filtriert und das Filtrat mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert; in keinem Falle wurde ein charakteristischer krystallinischer Niederschlag erhalten.

Die getrockneten Filtrerrückstände wurden mit Äther extrahiert; ein nennenswerter Rückstand wurde nur bei Probe Nr. 2 erhalten, dieser bestand jedoch aus etwas Amylurethan; Isobutylhydantoin war somit nicht in jenen Rückständen enthalten.

Die nun folgende Extraktion mit Alkohol ergab etwas bemerkenswertere Rückstände, dieselben bestanden zum Teil aus etwas in Lösung gegangenen Leucin, freie Isobutylhydantoin-säure war jedoch nicht nachweisbar.

Wurden die Rückstände endlich unter Erwärmen in wenig Wasser gelöst und von den wenigen ungelöst gebliebenen Flocken abfiltriert, so trat nach dem Erkalten keine Krystallisation auf und ebensowenig wurde eine solche nach dem Ansäuern erhalten.

Wurde schließlich eine solche wässerige Lösung mit überschüssigem Harnstoff versetzt und längere Zeit (2—3 St.) gekocht, so fielen nach dem Ansäuern reichlich Isobutylhydantoin-säurekrystalle aus.

Dieselben wurden (Probe Nr. 3) abfiltriert, gewaschen, aus heißem Wasser umkrystallisiert und ergaben einen Schmelzpunkt im geschlossenen Kapillarrohr von  $190^{\circ}$  und einen Stickstoffgehalt von 16,10%.

Aus den Versuchen scheint also hervorzugehen, daß Hundeleberextrakt unter den mitgeteilten Bedingungen zur Uramidosäuresynthese nicht befähigt ist.

Ohne mich hier auf eine ausführlichere Diskussion der obigen Versuche einzulassen, möchte ich nur die Verwendung des Amylurethans zu synthetischen Versuchen rechtfertigen. Unter den hier eingehaltenen Bedingungen wäre irgend ein carbaminsaures Salz kaum verwendbar gewesen; ferner konnte man mit der bekannten esterspaltenden Fähigkeit der Leber rechnen<sup>1)</sup> und so das Auftreten von Carbaminsäure in statu

<sup>1)</sup> In der Tat enthielt Probe Nr. 2 nur noch sehr geringe Mengen

nascendi erwarten; wenn nun auch Alkohole schon in geringen Konzentrationen hemmend auf fermentative Prozesse resp. auf organische Katalysatoren einwirken, so konnte ein solcher Effekt infolge der Schwerlöslichkeit des Amylalkohols in Wasser (falls derselbe nicht sofort weiter verändert wird) kaum in größerem Umfange erwartet werden.

Wenn nun auch die vorliegenden Versuche nach allen Richtungen hin zu einem negativen Resultat geführt haben, so bin ich doch weit davon entfernt, dasselbe als für alle Fälle passend resp. als verallgemeinerungsfähig anzusehen. Physiologische Experimente — das zeigt die neuere Literatur leider nur allzuoft — können nur dann zu einigermaßen sichern Schlüssen führen, wenn sie nach allen möglichen Richtungen hin, mit Beachtung der Art, Individualität, momentanen Umstände usw., aber auch der chemischen Faktoren variiert werden.

Demgemäß lag es nicht in meiner Absicht, die mitgeteilten Versuche schon jetzt für sich zu veröffentlichen, wenn mich nicht eine Publikation hierzu gezwungen hätte, die jüngst aus dem Straßburger physiologisch-chemischen Institute von Philosophow<sup>1)</sup> über dasselbe Thema veröffentlicht wurde.

Dieselbe könnte nämlich den Anschein erwecken, als ob die Idee, die Uramidosäurebildung im Organismus neuerdings wieder für die Theorie der Harnstoffbildung zu verwerten, aus jenem Institute hervorgegangen sei, und dies umsomehr, als meine Arbeiten mit keinem Worte erwähnt werden.

Da ich mir nun das bescheidene Verdienst zuschreiben darf, die chemischen Analogien resp. Grundlagen aufgefunden zu haben, welche es gestatten, die Uramidosäuren von anderen und viel weiteren Gesichtspunkten aus, als dies vorher möglich war, zur Harnstoffbildung in Beziehung zu bringen — das Aufsuchen solcher Analogien bezeichnet Hofmeister<sup>2)</sup> als einen unerläßlichen Faktor, um auf dem schwierigen Gebiete der Harnstoffforschung einen Fortschritt zu erzielen —, so glaube

---

von Urethan, während in der zugehörigen Kontrollprobe trotz der halben Menge noch relativ viel vorhanden war.

<sup>1)</sup> Biochemische Zeitschr., Bd. XXVI, S. 131, 1910.

<sup>2)</sup> l. c.

ich einigmaßen berechtigt zu sein, jenen Gegenstand für mich in Anspruch nehmen zu dürfen.

Ich sehe mich daher keineswegs durch die Arbeit Philosophows zur Unterbrechung oder Abänderung meiner Versuche veranlaßt, um so weniger, als dieselbe bezüglich der Uramidosäurebildung zu dem entgegengesetzten Resultate führt.

Bei der geringen Zahl der vorliegenden Experimente hätte es keinen Sinn, sich auf eine ausführliche Polemik einzulassen, es sei jedoch hervorgehoben: daß die Durchströmung einer Fleischfresserleber mit Pflanzenfresserblut bei so grundlegenden Versuchen Bedenken erregen darf; ferner vermißt man — wenigstens sind sie nicht angegeben — die unerläßlichen Kontrollversuche, welche prüfen, ob Rinderblut nicht für sich aus Taurin und Glykokoll Taurocarbaminsäure zu bilden vermag, und, was besonders wichtig ist, ob ein Rückstand aus einem mit Glykokoll versetzten und durch überlebende Leber geleiteten Blut nicht für sich Kohlensäure und Ammoniak im Rohr abspaltet; denn in der zahlreichen Literatur über die Harnstoffbildung aus Aminosäuren in der Leber finden sich Angaben über die Entstehung von alkohollöslichen Ammoniak und möglicherweise auch Kohlensäure abspaltenden Körpern, die mit Harnstoff nicht identifiziert werden konnten;<sup>1)</sup> übrigens kann die Abspaltung von Kohlensäure und Ammoniak aus einem nicht krystallisierenden Sirup wohl nur dann mit einiger Sicherheit auf die Gegenwart von Uramidosäure bezogen werden, wenn die beiden Körper in einem bestimmten Verhältnisse zu einander stehen.<sup>2)</sup>

Endlich wäre noch bezüglich der Verwendung des Glykokolls zu bemerken, daß, falls auch in seiner Gegenwart Uramidosäurebildung zustande kommt, damit für die Erkenntnis der Harnstoffbildung wenig gewonnen ist, weil erst der Über-

<sup>1)</sup> Vgl. Chassevant u. Richet, *Compt. rend. de la soc. de biologie*, 1897; Gottlieb, *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, Bd. XLII, 1899; Schwarz, ebenda, Bd. XLI, 1898; Salaskin, *Diese Zeitschrift*, Bd. XXV, S. 449, 1898; Loevi, ebenda, Bd. XXV, S. 511, 1898; derselbe, *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, Bd. XLV, 1901; Jakoby, *Diese Zeitschrift*, Bd. XXX, 1900.

<sup>2)</sup> Die Gegenwart von Taurin im Alkoholextrakt spricht nicht unbedingt gegen dieses Argument, weil die Gegenwart alkohollöslicher Substanzen die Löslichkeit des Taurins in Alkohol erhöhen kann.

gang des Glykokolls in Harnstoff erklärt werden muß, was uns eigentlich auf den früheren Stand zurückführt; demgemäß muß auch Philosophow schließlich bemerken, daß zwar die von ihm angenommene Uramidosäurebildung aus Glykokoll und Taurin am besten nach der Hofmeisterschen Oxydationstheorie zu erklären sei, daß sie aber auch mit anderen Vorstellungen (worunter wohl die anderen Harnstofftheorien gemeint sind) vereinbar sei.

Zum Schlusse möchte ich noch eine Angabe Philosophows bezüglich des Schmelzpunktes der Taurocarbaminsäure berichtigen, insofern er nämlich angibt, daß diese Säure scharf bei  $182^{\circ}$  ohne Zersetzung schmilzt; nun ist es aber gerade ein Charakteristikum der Uramidosäuren, daß sie im Momente des Schmelzens sich anhydrisieren. Durch das dadurch bedingte Aufschäumen wird der Schmelzpunkt in allen Fällen mehr oder weniger unscharf; am allerwenigsten gestattet dies aber (wie Philosophow für die Taurocarbaminsäure angibt), die Schmelzpunktsbestimmung an einer und derselben Portion zu wiederholen. Von diesem Verhalten macht auch die Taurocarbaminsäure keine Ausnahme. Man kann das Aufschäumen gleichmäßiger d. h. den Schmelzpunkt schärfer gestalten, wenn man die Bestimmung unter erhöhtem Druck d. h. im geschlossenen Kapillarrohr ausführt; bei der Taurocarbaminsäure versagt aber dieses Mittel, weil das Aufschäumen zu langsam erfolgt; ich konnte daher auch für diese Säure einen scharfen Schmelzpunkt nicht angeben;<sup>1)</sup> für das offene Kapillarrohr ist dies natürlich um so weniger möglich. Hier beginnt die Säure, nachdem sie gesintert ist, bei  $182^{\circ}$  allmählich aufzuschäumen, und dieses Aufschäumen erstreckt sich nun, ohne daß es zur deutlichen Meniscusbildung kommt, über ein größeres Temperaturintervall.

Nach all dem erscheinen mir die Versuche Philosophows keineswegs voll überzeugend und es wird wohl, ganz abgesehen von dem näheren Modus der Uramidosäurebildung, auch der Beweis für die Entstehung der Uramidosäuren in der Leber erst mit Sicherheit zu erbringen sein.

<sup>1)</sup> l. c. S. 2969.