

Bildung von Homogentisinsäure nach Aufnahme großer Mengen von l-Tyrosin per os.

Von

Emil Abderhalden.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Halle a. S.)

(Der Redaktion zugegangen am 9. März 1912.)

Die Untersuchungen von M. Wolkow und Baumann und später von Falta und Langstein haben in einwandfreier Weise bewiesen, daß als Ausgangsmaterial zur Bildung der bei der Alkaptonurie im Harn erscheinenden Homogentisinsäure die beiden aromatischen Aminosäuren der Proteine: Phenylalanin und Tyrosin in Betracht kommen. Seit dieser Feststellung ist immer wieder die Frage diskutiert worden, ob die Homogentisinsäure als ein normales Stoffwechselzwischenprodukt aufzufassen ist oder aber, ob der Abbau der genannten Aminosäuren deshalb ein unvollständiger bleibt, weil er in abnormer Richtung verläuft. Im ersteren Fall hätten wir eine einfache Hemmung im Abbau des Tyrosins und Phenylalanins vor uns. Es würde uns dadurch ein Zwischenprodukt des Zellstoffwechsels bekannt, das uns sonst nie entgegentritt, weil der Abbau der genannten Aminosäuren rasch bis zu einfacheren Endprodukten führt. Die Alkaptonurie ist von diesen Gesichtspunkten aus eifrig studiert worden. Die namentlich von Neubauer sehr wahrscheinlich gemachte Vorstellung über den Abbau der Aminosäuren über die entsprechenden Ketosäuren stützt sich zum Teil auf Beobachtungen, die am Alkaptonuriker erhoben worden sind.

Es ist wiederholt versucht worden, durch experimentelle Erzeugung einer Alkaptonurie, d. h. einer Ausscheidung von Homogentisinsäure, die Frage nach der Natur der Stoffwechsel-

störung bei der genannten Stoffwechselanomalie zu entscheiden.¹⁾ Die Fütterungsversuche mit Tyrosin hatten stets ein negatives Resultat. Wir haben uns selbst bemüht, durch Eingabe großer Mengen von Tyrosin und von Phenylalanin an Tiere, irgendwelche Stoffwechselzwischenprodukte aufzufinden, die etwa einen Zusammenhang mit der Homogentisinsäure vermuten ließen. Wir arbeiteten mit Hunden und Kaninchen. Einmal versuchten wir durch tiefe Chloroformnarkose günstigere Bedingungen zu schaffen. Es gelang uns nicht, außer den bereits bekannten Verbindungen Zwischenglieder des Abbaus der genannten aromatischen Aminosäuren aufzufinden. Leider glückte es auch nie, sehr große Mengen von Tyrosin und Phenylalanin zur Resorption zu bringen. Bei den Kaninchen fanden sich beträchtliche Mengen der aromatischen Aminosäuren im Kot. Die Hunde reagierten auf Zufuhr größerer Quantitäten der Aminosäuren mit Erbrechen, besonders dann, wenn deren Alkalisalze verwendet wurden. Schließlich gingen wir zu Versuchen am Menschen über. Bei Eingabe von 20—30 g Tyrosin und von 25 g Phenylalanin erfolgte keine Bildung von Homogentisinsäure. Die Untersuchung wurde stets so vorgenommen, daß der gesamte Harn zunächst direkt mit Äther und dann mit Essigäther erschöpft wurde. Dann wurde mit Schwefelsäure angesäuert und die Extraktion mit Äther und dann mit Essigäther wiederholt. Hierauf dampften wir den Harn auf ein kleines Volumen ein und extrahierten nochmals. Der Äther wurde verdampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und dann die heiße Lösung nach Anstellung von Reduktionsproben mit Bleiacetat gefällt. Das Bleisalz wurde aus heißem Wasser umkrystallisiert und nach Möglichkeit identifiziert. Es gelang in keinem Fall, auch nur eine Spur von Homogentisinsäure aufzufinden.

Am 12. Januar 1912 erhielt der Institutsdiener Wiese 50 g l-Tyrosin per os. Er aß das Tyrosin in Substanz innerhalb etwa 24 Stunden. Harn und Kot wurden während 72 Stunden gesammelt. Der Kot wurde mit Wasser, dem etwas Ammoniak

¹⁾ Vgl. die Literatur über diesen Gegenstand bei Otto Neubauer. Abbau der Aminosäuren im Organismus, Biochemisches Handlexikon, Bd. 4. S. 360 ff., 1911.

zugesetzt war, ausgekocht. Dann wurde filtriert und eingedampft, bis Krystalle erschienen. Durch fraktionierte Krystallisation konnten schließlich aus dem Kot 6 g reines Tyrosin erhalten werden. Es waren somit 44 g zur Resorption gelangt. Ein Teil davon dürfte allerdings noch den Bakterien des Darmkanals zum Opfer gefallen sein. Der in den ersten 24 Stunden gelassene Urin ergab mit Millons Reagenz nur eine schwache Rotfärbung. Er war hellgelb gefärbt. Schon während der Extraktion mit Äther und Essigäther färbte er sich dunkler. Er roch eigenartig aromatisch. Beim Eindampfen erfolgte bald Braunfärbung. Gleichzeitig schied sich eine braunschwarz gefärbte Masse ab. Von ihr wurde abfiltriert. Das Filtrat gab auf Zusatz von Silbernitrat und Ammoniak sofort Abscheidung von metallischem Silber. Fehlingsche Lösung wurde erst nach weiterer Konzentration des Harnes ausgesprochen reduziert. Das Bleisalz, das bei der Fällung der heißen wässerigen Lösung des Rückstandes des Ätherextraktes erhalten worden war, war nicht einheitlich. Ein Teil krystallisierte, während ein Teil amorph ausfiel. Es gelang, diesen letzteren von den Krystallen durch Auskochen mit viel Wasser zu trennen. Der amorphe Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Bleisulfid eingeengt. Die stark konzentrierte Lösung drehte stark nach links. Es war leider nicht möglich, die stickstoffhaltige Substanz zu identifizieren. Ihre Menge war zu gering. Es schien außerdem noch ein Gemisch vorzuliegen, denn ein Teil der Substanz krystallisierte in Nadelchen, während der kleinere Teil breite Blättchen bildete. Die Substanz reduzierte Fehlingsche Lösung nicht, dagegen Silberlösung in der Kälte.

Von dem krystallisierten Bleisalz konnten aus allen Tagesportionen zusammen nur 0,5 g erhalten werden. Der Harn vom zweiten Tag ergab nur noch Spuren und der am dritten Tag gesammelte Harn ergab überhaupt kein krystallisierbares Bleisalz aus dem Ätherauszug. Das wiederholt aus heißem Wasser umkrystallisierte Bleisalz bildete Prismen. Es schmolz gegen 215°. Es schien somit das Bleisalz der Homogentisinsäure vorzuliegen. Zur Identifizierung wurde eine Probe des Bleisalzes mit einem vor einigen Jahren gewonnenen Präparate von homo-

gentisinsaurem Blei gemischt und dann der Schmelzpunkt festgestellt. Er lag bei 210° , nachdem schon bei 203° Erweichung aufgetreten war. Bei genauerer Untersuchung zeigte es sich, daß das alte Präparat im Laufe der Zeit Krystallwasser verloren hatte. Bei nochmaligem Umkrystallisieren erhielten wir dann den richtigen Schmelzpunkt mit dem Gemische. Aus einer Probe des Bleisalzes stellten wir die Homogentisinsäure selbst dar. Sie schmolz gegen 147° . Es verblieben uns schließlich noch etwa 0,2 g des kostbaren Materiales. Die Identifizierung durch den Schmelzpunkt des Bleisalzes und denjenigen der freien Säuren schien uns doch nicht ausreichend zu sein. Eine Analyse mußte entscheiden. Hier erwies sich die Mikroanalyse von Fritz Pregl als ein Helfer in der Not. Die von Pregl selbst durchgeführte Analyse des im Vakuumtrockenapparat bei der Siedetemperatur des Toluols getrockneten Präparates hatte folgendes Ergebnis:

8,68 mg Substanz gaben 2,13 mg H_2O und 11,26 mg CO_2 .

7,99 mg Substanz gaben 1,99 mg H_2O und 0,44 mg CO_2 .

Gefunden: 2,75 und 2,79% H und 35,38 und 35,63% C.

Berechnet für $(C_8H_7O_4)_2 \cdot Pb$ (541,10) 2,59% H und 35,49% C.

4,99 mg in einer feuchten Kammer aufbewahrtes Bleisalz verloren bei 135° im Platintiegel auf einem Kupferblock erwärmt 0,45 mg an Gewicht = 9,02% H_2O . Berechnet für $(C_8H_7O_4)_2 \cdot Pb + 3 H_2O$ 9,07% H_2O . 4,54 mg lieferten nach wiederholtem Abrauchen mit Schwefelsäure 2,55 mg $PbSO_4$ = 38,37% Pb. Berechnet für $(C_8H_7O_4)_2 Pb$ 38,27% Pb.

Es lag somit unzweifelhaft Homogentisinsäure resp. dessen Bleisalz vor. Da es sich um eine Ausscheidung dieser Säure nach Tyrosinfütterung handelt, dürfen wir trotz der sehr kleinen Menge in Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei der Alkaptonurie schließen, daß sie aus der verabreichten aromatischen Aminosäure entstanden ist. Es ist somit zum ersten Male geglückt, bei einem Individuum, das keine Alkaptonurie aufweist, künstlich Ausscheidung von Homogentisinsäure zu bewirken. Unentschieden bleibt die Frage, ob wir diesen Befund als einen Beweis dafür ansprechen dürfen, daß auch vom normalen Organismus das gesamte Tyrosin

über Homogentisinsäure abgebaut wird. Es ist einerseits möglich, daß der Abbau der Aminosäuren ganz allgemein kein einheitlicher ist. Ferner wäre die Möglichkeit zu berücksichtigen, daß die reichliche Zufuhr von Tyrosin zu einer Störung geführt hat, doch wäre diese Annahme wohl etwas gesucht. Erwähnt sei noch, daß wir aus dem Essigätherextrakt im ganzen 3,5 g Hippursäure isoliert haben. F. 187°.

0,2659 g Substanz brauchten 15,6 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Gefunden : 8,21% N.

Berechnet für $C_9H_9NO_3$ 7,82% N.

Der Befund von Homogentisinsäure im Harn nach Verfütterung von Tyrosin ist durch unsere Untersuchung über jeden Zweifel sichergestellt. Immerhin wäre es von großem Werte für die Deutung der ganzen Beobachtung, wenn der Befund mehrfach und an verschiedenen Individuen erhoben würde. Zunächst sollte Herr Wiese 100 g Tyrosin + 50 g Glykokoll in möglichst kurzer Zeit aufnehmen. Leider führte dieser Versuch zum Abbruch der ganzen Untersuchung. Es trat heftiges Erbrechen und großer Widerwille gegen die Aufnahme derartiger Substanzen ein. Infolgedessen beschloß ich, den Versuch an mir selbst durchzuführen. Ich nahm am 15. Februar 1912 im ganzen 150 g Tyrosin und 85 g Glykokoll auf und zwar zu den folgenden Stunden: 9 Uhr a. m. 50 g l-Tyrosin + 15 g Glykokoll; 10³⁰ a. m. 25 g l-Tyrosin + 15 g Glykokoll; 11⁰⁰ a. m. 25 g l-Tyrosin + 15 g Glykokoll; 11¹⁵ a. m. 10 g l-Tyrosin + 10 g Glykokoll; 11³⁰ a. m. 20 g l-Tyrosin + 10 g Glykokoll; 11⁴⁵ a. m. 10 g l-Tyrosin + 5 g Glykokoll; 12⁰⁰ a. m. 10 g l-Tyrosin + 15 g Glykokoll. Das Tyrosin war in Fachinger-Wasser zum Teil gelöst, zum Teil nur eingeweicht. Im ganzen wurden 2500 ccm Fachinger-Wasser und 2500 ccm gewöhnliches Wasser aufgenommen. Es zeigten sich außer starkem Urindrang gar keine Beschwerden. Der Kot blieb fest. Er wurde während dreier Tage gesammelt. Er enthielt auffallenderweise nur 9 g Tyrosin. Es müssen somit ca. 141 g Tyrosin zur Resorption gelangt sein! Der Harn wurde in möglichst kleinen Zwischenräumen gesammelt. Es wurde in

allen Portionen der Gesamtstickstoff, der Ammoniakstickstoff und der Aminostickstoff nach Sörensen bestimmt. Merkwürdigerweise ergab der Urin nach der Tyrosinfütterung mit Millons Reagens keine Rotfärbung, während die Reaktion vor der Einnahme der Aminosäuren deutlich positiv war. Der Urin war allerdings stark verdünnt. Wären jedoch irgendwie in Betracht kommende Mengen von Tyrosin in den Harn übergegangen, dann hätte ohne Zweifel die Millonssche Reaktion das anzeigen müssen.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die erhaltenen Werte. Es sei bemerkt, daß die einzelnen Bestimmungen zum Teil nicht den Anspruch auf große Exaktheit erheben können. Ein Teil des Urins wurde nämlich stets gleich auf Abbauprodukte des Tyrosins verarbeitet, um eventuell sekundären Zersetzungen vorzubeugen. Ein Teil diente zu den Stickstoffbestimmungen. Da nun besonders am Anfang des Versuches der Harn sehr stark verdünnt war, fielen die Werte für den Ammoniak- und Aminostickstoff oft so klein aus, daß kleine, bei der Formoltitration oft nicht zu vermeidende Unsicherheiten bei der Titration das Resultat erheblich beeinflussen konnten. Für den verfolgten Zweck genügen jedoch die erhaltenen Werte. Sie zeigen, daß der in Form von Glykokoll und Tyrosin aufgenommene Stickstoff zu einem sehr großen Teile in den ersten 24 Stunden im Urin erschien. Am Versuchstage waren im ganzen mit der Nahrung ca. 8 g Stickstoff aufgenommen worden. Am zweiten Tag betrug die Stickstoffaufnahme mit der Nahrung ebenfalls etwa 8 g. 150 g Tyrosin enthalten 11,61 g N und 85 g Glykokoll 15,87 g N. Es waren somit innerhalb dreier Stunden 27,48 g Aminostickstoff aufgenommen worden. Von dieser Menge erschienen innerhalb 24 Stunden nur 0,8705 g im Harn und innerhalb 48 Stunden 1,1694 g. Ohne Zweifel waren selbst bei dieser großen Zufuhr von l-Tyrosin und Glykokoll nur geringe Mengen unveränderter Aminosäuren in den Harn übergegangen. Die Untersuchung des Harnes an den beiden Tagen ergab, das l-Tyrosin nicht nachweisbar war, dagegen konnten 3,5 g Glykokoll in Form des β -Naphthalinsulfo-glycins erhalten werden. Diese Menge

war im 24 stündigen Harn enthalten. Der am zweiten Tag gesammelte Urin enthielt keine Spur von Glykokoll.

Datum	Zeit	Gesamtstickstoff in g	Aminostickstoff in g	Ammoniakstickstoff in g	Urinmenge in g
15. II. 1912	10 ⁰⁵ a.m.	3,075	0,0450	0,1375	250
„	10 ³⁰ „	1,052	Spuren	0,0500	200
„	11 ⁰⁰ „	0,7224	„	0,0264	240
„	11 ³⁰ „	0,3108	„	0,0661	185
„	12 ⁰⁰ „	0,2747	0,0077	0,0155	185
„	12 ¹⁵ p.m.	0,2459	0,2205	0,0126	225
„	12 ³⁰ „	0,4122	0,1792	0,0358	320
„	1 ³⁰ „	1,2114	0,0694	0,0554	330
„	2 ⁰⁰ „	1,0086	0,0240	0,0448	200
„	3 ⁰⁰ „	2,0732	0,0448	0,1120	400
„	4 ⁰⁰ „	1,4568	0,0336	0,1792	400
„	4 ³⁰ „	1,4732	0,0154	0,0616	220
„	5 ⁰⁰ „	1,0086	0,0224	0,0280	200
„	5 ³⁰ „	1,1234	0,0084	0,0610	120
„	7 ⁰⁰ „	1,2112	—	—	200
„	9 ⁰⁰ „	3,0300	0,0825	0,0625	250
16. II. 1912	9 ⁰⁰ a.m.	7,5314	0,1176	0,3763	560
„	10 ⁰⁰ „	1,3197	0,0322	0,0328	100
„	1 ⁰⁰ „	1,1040	0,0098	0,0448	200
„	5 ⁰⁰ p.m.	4,1776	0,0539	0,1421	350
„	11 ³⁰ „	5,8420	0,1050	0,2450	500
17. II. 1912	9 ⁰⁰ a.m.	5,9400	0,0980	0,1960	500
Ausgeschieden in den ersten 24 Stunden .		27,2208	0,8705	1,3247	4470
Ausgeschieden in den zweiten 24 Stunden .		18,3833	0,2989	0,6607	1650

Große Sorgfalt verwendeten wir auf die Hippursäurebestimmung. Sie wurde nach Bunge-Schmiedeberg durchgeführt. Erhalten wurden im ganzen 2,5 g Hippursäure. F. 187°.

8,68 mg Substanz gaben 3,90 mg H₂O und 19,12 mg CO₂,
= 5,03% H und 60,08% C.

7,15 mg Substanz gaben 3,06 mg H₂O und 15,72 mg CO₂,
= 4,79% H und 59,96% C.

4,45 mg Substanz (716 mm, 20°). 0,318 ccm N = 7,84% N.

9,23 mg Substanz (716 mm, 21°). 0,666 ccm N = 7,89% N.

Berechnet für C₉H₉O₃N (179,07):

60,31% C, 5,06% H und 7,82% N.

Alle Bemühungen, irgend ein Abbauprodukt zu finden, das mit dem Tyrosin in Zusammenhang zu bringen war, waren vergeblich. Der Urin reduzierte nicht. Während der vor der Aufnahme des Tyrosins gelassene Harn mit Millon's Reagens eine deutliche Rotfärbung gab, blieb diese Reaktion, wie schon betont, während ca. 36 Stunden negativ. Es war somit nach Aufnahme von 150 g l-Tyrosin keine Homogentisinsäure und auch sonst kein Zwischenprodukt des Abbaus dieser Aminosäure aufgefunden worden, während im ersten Falle nach Aufnahme von ca. 40 g l-Tyrosin Homogentisinsäure in allerdings geringer Menge im Urin erschien. Hervorgehoben sei noch, daß die Bildung der Hippursäure offenbar nicht wesentlich beeinflußt worden ist.

Schließlich zeigen die ausgeführten Versuche, wie vorsichtig man Untersuchungen über die Wirkung bestimmter Stoffe auf die Magen- und Darmschleimhaut zu beurteilen hat. Sehr oft wiederholte Versuche, Hund mit einzelnen Aminosäuren zu ernähren, ließen nie eine eindeutige Schlußfolgerung zu, weil bald Erbrechen eintrat. Es wurde in diesen Fällen an eine Reizwirkung gedacht. Die Versuche am Menschen zeigen, daß sehr große Dosen von Aminosäuren anstandslos vertragen werden. Es zeigen sich jedoch auch hier große Unterschiede. Nach 10 g Tyrosin wurde in einem Fall profuse Diarrhöe beobachtet.

Anhangsweise sei erwähnt, daß Herr Dr. Strassner im hiesigen Institut 25 g dl-Phenylalanin in Kapseln aufgenommen hat. Aus dem Harn ließen sich ganz geringe Mengen von d-Phenylalanin in nicht ganz reinem Zustand gewinnen. Eine Bildung von Homogentisinsäure war nicht erfolgt.

Den Herren Dr. Kautzsch und Dr. Hirsch bin ich für ihre Mithilfe zu Dank verpflichtet.