

# Darstellung von $\alpha$ -Methyltryptophan und sein Verhalten im Tierkörper.

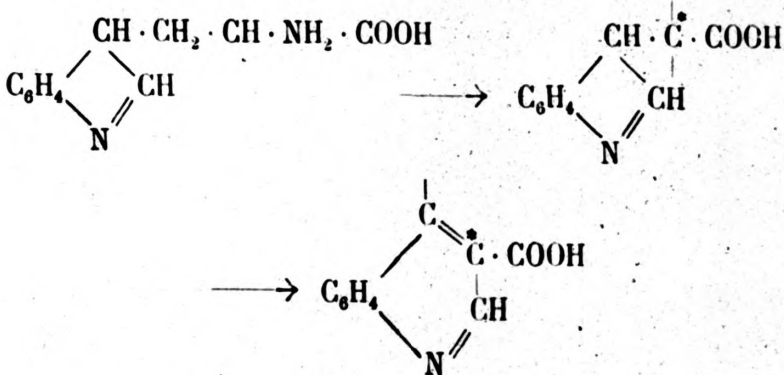
Von

A. Ellinger und Z. Matsuoka (Osaka, Japan).

(Aus dem Universitäts-Laboratorium für medizinische Chemie und experimentelle Pharmakologie zu Königsberg i. Pr.)

(Der Redaktion zugegangen am 25. März 1914.)

Der Weg, auf dem die von Ellinger entdeckte Umwandlung des Tryptophans in Kynurensäure im Tierkörper vor sich geht, ist in seinen Zwischenstationen bisher nicht aufgeklärt. Nachdem die Konstitution des Tryptophans festgestellt war, sprach sich Ellinger<sup>1)</sup> im Anschluß an die Arbeiten von Ciamician, Plancher und deren Schülern für die Annahme aus, daß die dreigliedrige Seitenkette des Indolrings zu einer zweigliedrigen oxydiert werde und das mit dem Carboxyl verbundene Kohlenstoffatom der Seitenkette sich an der Schließung des Chinolinrings beteilige, entsprechend folgenden Formelbildern:

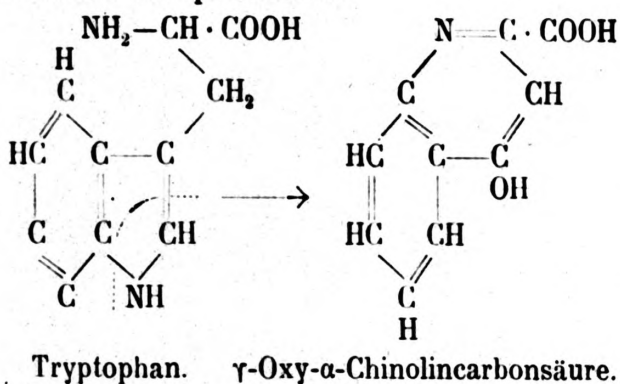


Diese Anschauung ging von der allgemein akzeptierten Formulierung der Kynurensäure als  $\gamma$ -Oxy,  $\beta$ -chinolincarbon-säure aus, die durch die Synthese von Camps<sup>2)</sup> gesichert schien.

<sup>1)</sup> Ber. d. chem. Ges., Bd. 39, S. 2517 (1906).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 33, S. 390, 1901.

Die von Ellinger in seinen früheren Arbeiten diskutierte Bildung des Chinolinderivats aus Tryptophan unter Beteiligung des Aminostickstoffs an der Schließung des Chinolinrings mußte zurückgewiesen werden, nachdem das Tryptophan als  $\alpha$ -Aminosäure erkannt war; sie hätte ohne Wanderung der Carboxylgruppe nur zu einer  $\alpha$ -Chinolincarbonsäure führen können, etwa folgendem Schema entsprechend:



Neuerdings ist es nun durch die vorläufige Mitteilung von Miss Homer<sup>1)</sup> über die Konstitution der Kynurensäure fraglich geworden, ob diese Säure wirklich die Carboxylgruppe in  $\beta$ -Stellung und nicht vielmehr in  $\alpha$ -Stellung enthält.

Der Beweis für die  $\alpha$ -Stellung scheint uns zwar allein auf Grund der Angabe, daß die gereinigte Kynurensäure aus dem Harn nicht den Schmelzpunkt  $266^\circ$ , den Camps für die synthetische  $\beta$ -Säure fand, sondern den Schmelzpunkt  $288^\circ$ , gegen  $290^\circ$  bei der synthetischen  $\alpha$ -Säure, hat, noch nicht erbracht. Aber die Beweisführung von Camps für die Konstitution der Kynurensäure als  $\beta$ -Säure fällt mit dem Nachweis, daß die Säure aus dem Harn bei ausreichender Reinigung viel höher schmilzt, als bisher angegeben wurde. Diese Tatsache aber haben auch wir bestätigen können.

Sollte sich die von Miss Homer ausgesprochene Annahme, daß Kynurensäure die Carboxylgruppe in  $\alpha$ -Stellung enthält, bewahrheiten, so wäre der von Ellinger zuerst angenommene, hier an zweiter Stelle erwähnte Modus des Chinolineringschlusses wieder diskutabel.

Es wird auf diesen Punkt ausführlicher einzugehen sein bei der Besprechung der Versuchsergebnisse, die der eine von

<sup>1)</sup> Journal of physiology, Bd. 46; Proc. Soc. Phys., Bd. 18, 1913.

uns in den letzten Jahren gemeinsam mit Flamand über den Modus der Kynurensäurebildung erhalten hat. Hier soll nur in unmittelbarem Bezug auf die Fragestellung dieser Arbeit kurz erörtert werden, was von dem Verhalten des  $\alpha$ -Methyltryptophans erwartet werden konnte.

Wir hatten die Synthese dieser Verbindung ausgeführt, bevor die Veröffentlichung von A. Homer erfolgt war. Die Bildung der racemischen Aminosäure vollzog sich ohne Schwierigkeiten auf dem gleichen Wege, auf dem Ellinger und Flamand zum d-l-Tryptophan gelangt waren, indem der  $\alpha$ -Methylindolaldehyd mit Hippursäure kondensiert wurde, das gebildete Azlacton zur Methylindyl- $\alpha$ -benzoylaminoacrylsäure aufgespalten und diese mittels Natrium in alkoholischer Lösung unter Abspaltung der Benzoylgruppe zum  $\alpha$ -Methylindolalanin reduziert wurde.

Wenn der erste Modus der Kynurensäurebildung der richtige war, so war die Möglichkeit vorhanden, daß das  $\alpha$ -Methyltryptophan eine in  $\alpha$ -Stellung methylierte Kynurensäure ( $\beta$ -Säure) lieferte.

Die gehegte Erwartung hat sich nicht bestätigt. Eine substituierte Oxychinolincarbonsäure hat sich aus dem Harn nach Injektion des Methyltryptophans nicht isolieren lassen. Das einzige faßbare Produkt war unverändertes Methyltryptophan. Nach der ziemlich geringen Ausbeute an wieder gewonnenem Ausgangsmaterial ist anzunehmen, daß ein erheblicher Teil im Tierkörper in unbekannter Weise zersetzt worden ist.

Ob bei der Passage durch den Tierkörper nur die eine der beiden optischen Komponenten unverändert ausgeschieden wurde, läßt sich nicht mit Bestimmtheit entscheiden. Eine Drehung der Polarisationssebene durch die Lösung des Produkts aus dem Harne konnte nicht wahrgenommen werden, aber bei der geringen Substanzmenge ist es nicht ausgeschlossen, daß ein optisch-aktiver Körper mit kleiner spezifischer Drehung vorlag.

Wir beabsichtigten, die analogen Vorgänge bei racemischem Tryptophan zu studieren und bemühten uns, nach der Vorschrift von Abderhalden und Baumann<sup>1)</sup> Ver-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 55, S. 412, 1908.

dauungstryptophan zu racemisieren. Aber es gelang uns trotz vielfacher Versuche nicht, das l-Tryptophan durch längere oder kürzere Einwirkung von reinem und unreinem Pyridin oder Chinolin bei verschiedenen Temperaturen in die racemische Form überzuführen.

Der negative Ausfall des Injektionsversuchs mit dem Methyltryptophan kann natürlich für die Frage der Kynurensäure-Bildung wenig Aufschlüsse geben. Man darf zunächst nur folgern, daß es kein Argument für den ersten oben entwickelten Modus liefert, daß die Umwandlung der Indol- in Chinolinverbindungen hier nicht verläuft wie bei den Versuchen extra corpus, in denen z. B. aus Methylindol, Chloroform und Kalilauge ebenso gut  $\beta$ -Chlorchinaldin wie aus Indol  $\beta$ -Chlorchinolin wird.

Ist die Kynurensäure aber eine  $\alpha$ -Säure, so fehlt uns entweder bisher überhaupt jede intimere Kenntnis des Reaktionsverlaufs bei der Entstehung aus Tryptophan oder — wenn der angedeutete zweite Modus den Tatsachen entspricht — so ließen sich zwei Möglichkeiten für das Verhalten des Methyltryptophans in Erwägung ziehen.

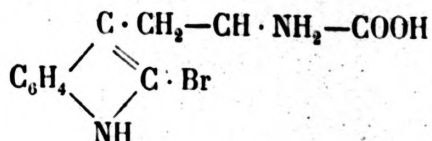
Die Methylgruppe im Pyrrolring brauchte den Reaktionsverlauf nicht zu stören, dann mußte das Methyltryptophan ebenso gut Kynurensäure liefern wie das Tryptophan selbst. Diese Möglichkeit ist durch den Ausfall des Versuchs ausgeschlossen.

Oder der Eintritt der Methylgruppe hindert die im Schema II angenommene Aufspaltung des Pyrrolrings. Diese Annahme wäre mit dem Ausfall unsrer Versuche verträglich.

Zwei Schlußfolgerungen auf rein chemischem Gebiet dürfen aus dem Verhalten des von uns dargestellten Methyltryptophans noch gezogen werden. Die Verbindung gibt weder die Farbenreaktion mit Bromwasser noch mit Glyoxylsäure und Schwefelsäure. Neuberg und Popowski<sup>1)</sup> haben gezeigt, daß die violett gefärbte Bromverbindung aus Tryptophan entsteht durch Eintritt eines Bromatoms an Stelle eines Wasserstoffes.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 2.

Da nach dem Eintritt der Methylgruppe in  $\alpha$ -Stellung die Bromreaktion ausbleibt, dürfte das in Reaktion tretende Wasserstoffatom das in  $\alpha$ -Stellung befindliche sein, der gefärbten Verbindung also die Formel



zukommen.

Über die Farbenreaktionen des Tryptophans mit Aldehyden hat A. Homer<sup>1)</sup> sich dahin ausgesprochen, daß die Reaktion sich zwischen der NH-Gruppe des Pyrrolrings und der CHO-Gruppe der Aldehyde abspielt.

Nach unsern Beobachtungen ist es wahrscheinlicher, daß sich das  $\alpha$ -C-Atom des Pyrrolkerns bei der Kondensation mit der Aldehydgruppe beteiligt.

#### Experimentelles.

#### Darstellung des Methylindolaldehyds.

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Ellinger<sup>2)</sup> für die Gewinnung von Indolaldehyd aus Indol, die nach Plancher und Ponti<sup>3)</sup> die beste Ausbeute an Methylindolaldehyd lieferte. 20 g  $\alpha$ -Methylindol werden in 100 ccm 96%igem Alkohol gelöst und mit 72 ccm Chloroform am Rückflußkühler bis zum beginnenden Sieden auf dem Wasserbad erhitzt. Im Laufe von vier Stunden tropft man 500 ccm 10%ige alkoholische Kalilauge ein, welche durch Lösen von 50 g Ätzkali in der gleichen Menge Wasser und Auffüllen mit 96%igem Alkohol auf  $\frac{1}{2}$  l hergestellt sind. Nach beendigtem Zusatz der Kalilauge wird noch  $\frac{1}{2}$  Stunde stark gekocht. Vom Reaktionsprodukt wird der Alkohol und unverändertes Chloroform auf dem Wasserbade abdestilliert. Der neutral reagierende Rückstand wird mit heißem Wasser in einem Rundkolben aufge-

<sup>1)</sup> Biochemical journal, Bd. 7, S. 116 (1913).

<sup>2)</sup> Ellinger, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 39, S. 2515.

<sup>3)</sup> G. Plancher e U. Ponti, Rendic. della R. Accad. dei Lincei. Classe d. scienze fisiche, 16. I. Sem., Ser. Va, 31 (1907).

nommen und in einem Dampfstrom destilliert, bis das Destillat die Methylindolreaktion nicht mehr gibt.

Die am Ende der Destillation vollkommen klare Lösung wird sofort heiß durch einen Heißwassertrichter filtriert. Aus dem Filtrat scheiden sich beim Erkalten schwach gelb gefärbte lange Nadeln des  $\alpha$ -Methylindol- $\beta$ -aldehyds aus, die bei  $198^{\circ}$  C. schmelzen. Zum größten Teil war der Methylindolaldehyd krystallinisch in den harzähnlichen Klümpchen eingeschlossen geblieben. Die Klümpchen wurden in der Schale zerkleinert, und der Methylindolaldehyd wiederholt ausgekocht. In dem Destillat findet man unverändertes Methylindol und Chlormethylchinolin; die Trennung des Methylindols vom Chlormethylchinolin wurde nach der von Ellinger gegebenen Vorschrift ausgeführt. Die Ausbeute an Methylindolaldehyd betrug 47% der theoretischen Menge.

#### Kondensation von Methylindolaldehyd mit Hippursäure zum Azlacton.

8 g Methylindolaldehyd, 10 g wasserfreie Hippursäure und 3 g frisch geschmolzenes Natriumacetat werden gut miteinander verrieben, mit 20 ccm Essigsäureanhydrid übergossen und 15 Minuten lang im kochenden Wasserbade erhitzt.

Nach einigen Minuten beginnt eine intensive dunkelrote Färbung, und von der Wand des Gefäßes aus schmilzt allmählich die Masse zusammen, um alsbald zu einem krystallinischen Kuchen zu erstarren.

Der Kuchen wird zunächst mit lauwarmem Wasser wiederholt ausgezogen, bis das Waschwasser nicht mehr sauer reagiert, dann in der Reibschale verrieben und mit etwa 1 l Wasser wiederholt ausgekocht. Das abgesaugte Rohprodukt wog lufttrocken etwa 13,5 g.

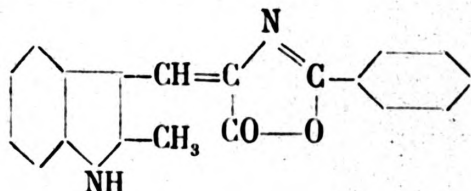
Das rohe Azlacton wird gepulvert, im Trockenschrank bei  $90^{\circ}$  C. getrocknet und aus heißem absoluten Alkohol umkrystallisiert.

Es krystallisiert mit zwei Molekülen Äthylalkohol. Beim Abdestillieren der Hauptmenge des Alkohols scheidet sich noch etwas Substanz aus der Mutterlauge ab.

0,1517 g lufttrockene Substanz verloren beim Trocknen bei 100° C. 0,0045 g Alkohol.

0,1472 g bei 100° getrocknete Sub: 0,4061 g CO<sub>2</sub> und 0,0640 g H<sub>2</sub>O.

0,1711 g bei 100° C getrocknete Substanz lieferten 13,8 ccm N bei 16° C. und 757 mm Druck.



Berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C = 75,45 H = 4,67 N = 9,27.  
 Gefunden: (302,13) C = 75,24 H = 4,86 N = 9,31.

Aufspaltung des Azlactons zur ungesättigten Säure:  
 Methylindol- $\alpha$ -benzoylaminoacrylsäure.

12 g Azlacton werden mit 1200 ccm 1%iger Natronlauge auf freier Flamme erhitzt, bis sich Ammoniakentwicklung bemerkbar macht.

Der ungelöst gebliebene Rückstand wird abfiltriert und in der gleichen Weise wiederholt behandelt, bis alles gelöst ist. Die vereinigten alkalischen Filtrate werden über Nacht stehen gelassen.

Wenn sich Niederschläge aus dem Filtrat abgeschieden haben, was bei übermäßigem Erhitzen der Fall ist, so werden sie abfiltriert; falls das Filtrat nur getrübt ist, wird die Flüssigkeit mit Äther geschüttelt. Der von der alkalischen Lösung aufgenommene Äther wird durch Luftdurchleiten verjagt. Das ganz klare gelbliche Filtrat wird mit verdünnter Schwefelsäure unter Umrühren versetzt, bis die Flüssigkeit auf Kongo reagiert. Die Säure fällt sofort als flockiger Niederschlag und nach eintägigem Stehen in krystallinischen Drusen aus.

Die Substanz wird auf die Nutsche gebracht und aus etwa 65%igem Alkohol umkrystallisiert.

Sie scheidet sich in glänzenden weißen Prismen aus, die makroskopisch schwach gelblich gefärbt erscheinen. Die Säure

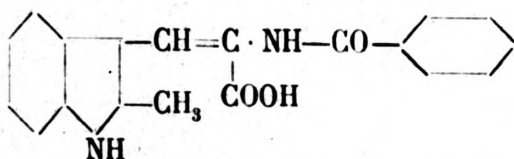
schmilzt bei  $205^{\circ}$  und zersetzt sich sofort unter Gasentwicklung.

0,1581 g bei  $100^{\circ}$  getrocknete Säure:

0,4122 g  $\text{CO}_2$  und 0,0735  $\text{H}_2\text{O}$ .

0,1864 g bei  $100^{\circ}$  getrocknete Säure:

13,9 ccm N bei  $16^{\circ}$  C. und 760 mm Druck.



Berechnet für  $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ : C = 71,21 H = 5,34 N = 8,75.

Gefunden: (320,2) C = 71,10 H = 5,20 N = 8,72.

### Reduktion und Spaltung der Methylindol- $\alpha$ -benzoyl-aminoacrylsäure.

6 g Säure wurden mit 150 ccm absolutem Alkohol in einen Kolben gebracht und auf dem Wasserbade am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Im Laufe einer halben Stunde wurden 18 g metallisches Natrium in kleinen Scheiben eingetragen, von Zeit zu Zeit wurden weitere 50 ccm absoluten Alkohols in kleinen Portionen hinzugegeben und die Flüssigkeit im Sieden gehalten, bis die Reaktion vollendet war. Die alkalische Flüssigkeit wurde in die fünffache Menge Wasser gegossen und 4—5 mal mit Äther ausgeschüttelt.

Der Ätherrückstand aus alkalischer Lösung wog trocken 0,96 g und zeigte einen charakteristischen Geranium-Geruch.

Die alkalische mit Äther erschöpfte Lösung wurde mit Schwefelsäure bis zur Reaktion auf Kongopapier angesäuert und nach eintägigem Stehen von einem beträchtlichen Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag aus der sauren Flüssigkeit betrug lufttrocken 2,35 g, er bestand zum großen Teil aus unverändertem Ausgangsmaterial.

Das Filtrat von der Säurefällung wurde 4—5 mal mit Äther erschöpft, bis der Äther sich nicht mehr färbte, dann 3—4 mal mit Essigäther geschüttelt. In Äther gingen 0,702 g und in Essigäther 0,06 g Substanz. Im Ätherrückstand wurden sowohl unverändertes Ausgangsmaterial als Benzoesäure nachgewiesen.



Die Lösung wurde auf einen Gehalt von 5% Schwefelsäure gebracht, mit Mercurisulfat gefällt und in Anlehnung an die Hopkinssche Vorschrift auf Tryptophan verarbeitet. Der Niederschlag wird mit 5%iger Schwefelsäure gut gewaschen, in Wasser suspendiert und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff auf dem kochenden Wasserbade zersetzt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Lösung wird vom Schwefelwasserstoff durch einen starken Luftstrom befreit. Die Schwefelsäure wird mit Barytwasser genau neutralisiert, das schwefelsaure Baryum abfiltriert. Die klare etwas gelbliche Flüssigkeit wird unter vermindertem Druck unter Zusatz von Alkohol eingeeengt. Das Methyltryptophan schied sich dabei in Nadeln krystallisiert aus. Aus 60%igem Alkohol wurde Methyltryptophan ein- oder zweimal umkrystallisiert. Die Ausbeute betrug 39% der Theorie. Es ist optisch inaktiv, zeigt einen schwach süßlichen Geschmack, reagiert gegen Lackmus sehr schwach sauer und gibt nicht die Farbenreaktionen des Tryptophans mit Bromwasser und mit Glyoxylsäure + Schwefelsäure. Der Schmelzpunkt ist nicht scharf. Bei 215° beginnt eine Färbung, gegen 234° C. ist die Substanz völlig geschmolzen.

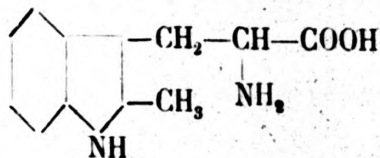
Bei der Analyse gab die Substanz folgende Zahlen:

0,1422 g im Vakuum getrocknete Substanz:

0,3432 g CO<sub>2</sub> und 0,0845 g H<sub>2</sub>O.

0,1191 g im Vakuum getrocknete Substanz:

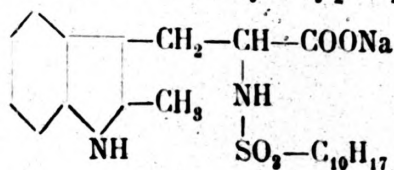
12,6 ccm N bei 11° C. und 765 mm Druck.



Berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C = 66,01 H = 6,47 N = 12,84.

Gefunden: (218,13) C = 65,82 H = 6,65 N = 12,63.

$\beta$ -Naphthalinsulfo-dl-Methyltryptophannatrium.



0,2 g Methyltryptophan wurde in 4 ccm Normalnatronlauge gelöst und mit einer ätherischen Lösung von 0,4 g  $\beta$ -

Naphthalinsulfochlorid 3 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Es wurden noch zweimal je 2 ccm Normalnatronlauge in Intervallen von einer Stunde hinzugegeben. Während des Schüttelns schied sich eine krystallinische Masse aus. Sie wurde abfiltriert und aus heißem Wasser umkrystallisiert. Aus der Mutterlauge schied sich noch etwas Substanz bei dem weiteren Einengen aus.

Die Krystalle bestanden aus mikroskopischen Nadeln und schmolzen bei 172—173° C.

Zur Analyse war die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2085 g Substanz verbrauchten, nach Kjeldahl bestimmt, 9,5 ccm  $n/10$ -Schwefelsäure.

Berechnet für  $C_{22}H_{19}N_2O_4SNa$ : N = 6,52

Gefunden (429,87): N = 6,38.

### Oxydation von Methyltryptophan zu $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -Indolaldehyd.

Die Oxydation des Methyltryptophans erfolgte nach der von Hopkins und Cole<sup>1)</sup> gegebenen Vorschrift. 0,85 g Substanz wurden in 500 ccm Wasser gelöst und auf dem siedenden Wasserbade die fünffache Menge Eisenchlorid in 10%iger Lösung in kleinen Portionen zugegossen. Die dunkel gefärbte Flüssigkeit blieb eine Stunde auf dem Wasserbade und wurde dann noch eine Viertelstunde auf der Flamme im Sieden gehalten.

Die erhaltene Lösung wurde 3 mal je 30 Minuten im Schüttelapparat mit Äther ausgeschüttelt, die Ätherlösungen gründlich mit Wasser gewaschen und der Äther abdestilliert.

Die mit Äther ausgeschüttelte Lösung wurde durch Zusatz von Natronlauge vom Eisen befreit, und es wurde von neuem, wie oben angegeben, oxydiert. Durch zweimalige Wiederholung der Operation wurden nur 0,0323 g der Substanz aus dem Methyltryptophan erhalten.

Die aus heißem Wasser umkrystallisiert erhaltene Substanz bestand aus wenig gelb gefärbten, rhombischen

<sup>1)</sup> Journ. of physiol., Bd. 29, S. 451, 1903.

Täfelchen und schmolz bei  $198^{\circ}$  C. Die Mutterlauge gab noch intensive rote Färbung beim Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure und rote Niederschläge nach dem Erkalten. Wegen des Mangels an Material mußten wir uns mit folgenden zwei Beweisen zur Identifikation des Methylindolaldehyds begnügen.

Ein kleiner Teil wurde in wenig Alkohol heiß gelöst und nach Zusatz von alkoholischer Pikrinsäurelösung erhitzt; beim Erkalten schieden sich gelbe rosettenförmig gruppierte Prismen aus, die bei  $181^{\circ}$  C. schmolzen. Den gleichen Schmelzpunkt geben Plancher und Ponti<sup>1)</sup> für das Pikrat des Methylindolaldehyds an.

Ein anderer kleiner Teil wurde mit alkoholischer Lösung von Nitrophenylhydrazin nach Zusatz von einigen Tropfen Eisessig erhitzt. Es schieden sich rhombische Täfelchen oder Prismen von kaliumpermanganatähnlichem Aussehen aus, die bei  $272^{\circ}$  schmolzen. Plancher und Ponti geben für das Nitrophenylhydrazon des Methylindolaldehyds den Schmelzpunkt  $273^{\circ}$  an.

#### Verhalten des Methyltryptophans im Tierkörper.

Einem Kaninchen von 4 kg wurden 2mal 0,6 g freie Säure als wässrige Lösung subcutan injiziert. Die Verarbeitung des Harns war in erster Linie auf die Auffindung einer Methylkynurensäure gerichtet. Der Urin, der während 24 Stunden nach der Injektion der Säure gesammelt war, wurde deshalb auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit heißem Alkohol mehrmals ausgezogen; der Alkohol wurde verjagt.

Der Rückstand wurde mit 5%iger Schwefelsäure aufgenommen und mit Äther in einen kleinen Kolben gebracht und mehrfach durchgeschüttelt.

Da sich nach 24stündigem Stehen keine nennenswerte Ausscheidung wie bei kynurensäurehaltigem Harn bemerkbar machte, wurde die Flüssigkeit vom Äther getrennt und wiederholt mit Äther geschüttelt, bis der Äther sich nicht mehr färbte. Die saure, wässrige Flüssigkeit wurde mit 5%iger Queck-

<sup>1)</sup> G. Plancher und U. Ponti, l. c.

silbersulfatlösung versetzt und nach 12stündigem Stehen der Quecksilberniederschlag abgesaugt. Der Niederschlag wurde, wie schon angegeben, in Wasser suspendiert, vom Quecksilber durch Schwefelwasserstoff befreit und die Schwefelsäure mit Barytwasser genau neutralisiert. Das Filtrat hinterließ beim Einengen auf dem Wasserbad einen sirupösen Rückstand. Beim Zusatz von Alkohol und Stehenlassen schied sich die Säure krystallinisch aus. Die Mutterlauge wurde mit 5%iger Schwefelsäure aufgenommen, durch 5%ige Quecksilbersulfatlösung wieder gefällt, und aus dem Niederschlag noch eine geringe Menge Krystalle erhalten. Die krystallinisch abgeschiedene Substanz selbst wurde ebenfalls einer erneuten Lösung und Fällung mit Mercurisulfat unterzogen und so gereinigt.

Die aus der zweiten Fällung erhaltenen Krystalle wurden aus ca. 60%igem Alkohol umkrystallisiert und schmolzen bei 230—232°. Die Ausbeute betrug etwa 0,2 g vor der Umkrystallisation aus Alkohol. Das Kaninchen ging 35 Stunden nach der Injektion ein. Die Todesursache waren nach dem Ergebnis der Sektion Darmgeschwüre, die mit dem Versuch in keinem Zusammenhang standen.

Der Harn eines Kaninchens von 1620 g, dem zweimal 0,5 g Methyltryptophan als Natriumsalzlösung unter die Haut gespritzt waren, wurde während 24 Stunden nach der Injektion gesammelt, und wie im vorigen Versuche nach der Jaffeschen Methode auf Kynurensäure verarbeitet. Da auch dieses Mal beim Stehen unter Äther sich kein Niederschlag abschied, wurde die saure Flüssigkeit vom Äther getrennt und wiederholt mit Äther geschüttelt. Die mit Äther erschöpfte Flüssigkeit wurde mit Phosphorwolframsäure ausgefällt.

Der abfiltrierte Niederschlag wurde mehrmals mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen und mit Barytwasser zerlegt; das stark alkalische Filtrat wurde durch Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit, eine Weile auf der Flamme gekocht, dann sofort heiß filtriert; die klare Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade eingeeengt. Nachdem das ausgeschiedene kohlen-saure Baryum abfiltriert war, wurde die Flüssigkeit bis zum Sirup eingedampft und in dem Exsikkator getrocknet.

Der Rückstand gab keine Kynurensäurereaktion.

Er wurde mit Schwefelsäure angesäuert, von wenig Baryumsulfat abfiltriert und in der vorher beschriebenen Weise mit Quecksilbersulfat gefällt.

Aus dem Quecksilberniederschlag wurden nach Wiederholung der ganzen Prozedur 0,129 g krystallinische Substanz gewonnen, die nicht scharf zwischen 230—237° schmolzen.

Eine Analyse der vereinigten umkrystallisierten Portionen aus den Urinen beider Versuche ergab folgende Werte:

0,0998 g im Vakuum getrocknete Substanz:

0,2409 g CO<sub>2</sub> und 0,0612 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C = 66,01 H = 6,47.

Gefunden: (218,13) C = 65,83 H = 6,81.